



Programa de Doctorat de Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona
Bienni 2005-2007

NOVES FUNCIONS DE LA PROTEÏNA FLOTILLIN-1 EN LA REGULACIÓ DEL PROCÉS DE MITOSI I DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DEL RECEPTOR NOTCH1

Memòria presentada per

Valentí Gómez Martínez

per optar al grau de

Doctor

per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Rosanna Paciucci, a la Unitat de Recerca Biomèdica de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Amb el suport del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya.

Tesi doctoral adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, sota la tutoria de la Dra. Adela Mazo.

Dra. Rosanna Paciucci
directora de tesi

Dra. Adela Mazo
tutora de tesi

Valentí Gómez
autor

Barcelona, Abril de 2009

MATERIALS I MÈTODES



7. CULTIUS CEL·LULARS

7.1. Línies cel·lulars

Tots els experiments han sigut realitzats sobre línies cel·lulars adquirides a ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA).

- a) **HeLa:** línia cel·lular establerta l'any 1951 a partir d'un carcinoma epiteloide de cèrvix, provinent d'una dona d'ètnia negra de 31 anys d'edat. Tenen una morfologia similar a les cèl·lules epitelials i creixen en monocapa. Presenta una versió activa de l'enzim telomerasa, evitant així l'escurçament dels telòmers durant la divisió cel·lular i la conseqüent mort de la cèl·lula. El seu creixement és anormalment ràpid, fins i tot comparat amb altres línies cel·lulars derivades de tumors; essent un cicle complet al voltant de les 12 hores.
- b) **PC-3:** creada a partir d'una metàstasi òssia d'un adenocarcinoma prostàtic amb grau IV present en un individu caucàsic de 62 anys (adenocarcinoma indiferenciat). De morfologia epitelial, forma una monocapa en el flascó de cultiu. Capaç de formar tumors en ratolins *nude* i de créixer en *soft agar*. És una línia androgen-independent (no respon a tractaments pro- o antiandrogènics).
- c) **Jurkat:** línia cel·lular establerta a partir de limfòcits T provinents de sang perifèrica d'un individu de 14 anys d'edat amb leucèmia limfoblàstica aguda. Creix en suspensió individualment o en associacions en forma de raïm.

7.2. Manteniment de cultius cel·lulars

Les cèl·lules foren cultivades a una temperatura de 37°C en una atmosfera de 5% CO₂-95% aire amb un 99% d'humitat. Per a les cèl·lules HeLa s'utilitzà el medi DMEM - *Dulbecco's modified Eagle medium*- (Gibco, Grand Island, N.Y, USA) i les cèl·lules PC-3 i Jurkat en medi RPMI 1640 (Gibco). Ambdós medis foren complementats amb *fetal bovine serum* (FBS) al 10%, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina, 10 mM de piruvat sòdic i 0.1 mM d'aminoàcids no essencials (MEM, *non essential amino acids*). Tots els reactius foren adquirits a PAA Laboratories (Pasching, Austria).

La descongelació de les diferents alíquotes es realitzà per la immersió de criotubs (Nunc, Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Denmark) en un bany a 37°C i la seva posterior sembra en flascons T-25 (Nunc). Per subcultivar les poblacions cel·lulars es

desagregaren del plàstic mitjançant un tractament amb Tripsina-EDTA (0.5 mg/ml tripsina, 0.22 mg/ml EDTA) (PAA) a 37°C. Es centrifugaren les cèl·lules 5 min. a 1500 rpm i se sembraren en el flascó T-75 i T-175 (Nunc) successivament en funció del nombre de cèl·lules necessàries per realitzar els experiments. La conservació de les línies cel·lulars es realitzà per congelació progressiva en els respectius medis complementats al 10% amb DMSO (Dimethyl Sulfoxide \geq 99.7% Hybri-Max[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Primer s'emmagatzemaren les cèl·lules a -80°C per un període de 24 hores i posteriorment es transferiren a nitrogen líquid.

7.3. Transfecció cel·lular

Consisteix en un mètode d'introducció de DNA plasmídic dins de cèl·lules eucariotes. Existeixen diversos mètodes fisico-químics destinats a superar la barrera que suposa la membrana plasmàtica d'aquestes cèl·lules: electroporació, precipitació per fosfat càlcic, etc. En els diferents experiments que es presentaran s'han fet servir dos protocols basats en el sistema de liposomes, sistemes vesiculars artificials de composició fosfolipídica semblant a la membrana cel·lular. D'aquesta manera, el liposoma pot unir-se a la membrana plasmàtica afavorint la distribució de les substàncies contingudes en el seu interior: fàrmacs, virus o, cadenes dobles de DNA o RNA. En el nostre cas, es realitzà una transfecció transitòria en la qual l'àcid nucleic introduït només s'expressa per un període curt de temps (24-96 hores aproximadament). Això és degut a que no s'integra en el genoma de la cèl·lula, sinó que es manté de forma episòmica i és degradat finalment per la maquinària cel·lular.

En la transfecció de la línia cel·lular HeLa s'utilitzà l'agent de transfecció *TransIT*[®]-HeLaMONSTER[®] Transfection Kit (Mirus Bio Corp, Madison WI, USA). El protocol és el següent:

1. Sembra de les cèl·lules HeLa el dia anterior en un grau de confluència entre el 50-70%.
2. Preparar la barreja de transfecció que s'aplicarà al cultiu cel·lular. Mescla de medi OPTI-MEM (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) o, en el seu defecte, medi DMEM no complementat amb FBS, i Trans-IT HeLa Reagent (3µl de reactiu per µg d'àcid nucleic que es transfectarà).
3. Incubar la barreja 15 min. a temperatura ambient (RT).

4. Addició del DNA a la barreja de transfecció (la quantitat de DNA variarà en funció de la mida del cultiu a transfectar: placa de 24, 12 o 6 pous, o 6, 10 cm de diàmetre)
5. 15 min. d'incubació a RT.
6. Addició de Monster Reagent (1µl de reactiu per µg d'àcid nucleic que es transfectarà).
7. 15 min. d'incubació a RT.
8. Afegir medi complert (amb FBS al 10%) a la barreja i aplicar-ho a les cèl·lules.
No canviar el medi fins realitzar l'experiment corresponent.

| Placa cultiu | Nº cèl·lules | OPTI-MEM | Trans-IT | DNA | Monster | Medi complert |
|--------------|--------------|----------|----------|--------|---------|---------------|
| 24-well | 20.000 | 50 µl | 1.5 µl | 0.5 µg | 0.5 µl | 0.5 ml |
| 12 well | 50.000 | 100 µl | 3 µl | 1 µg | 3 µl | 1 ml |
| 6 well | 300.000 | 200 µl | 6 µl | 2 µg | 6 µl | 2 ml |
| 10 cm Ø | 1.000.000 | 500 µl | 24 µl | 8 µg | 8 µl | 5 ml |

Taula 2. Quantitats i volums de transfecció amb TransIT®-HeLaMONSTER® Transfection Kit

Per a la transfecció de la línia cel·lular PC-3 el kit utilitzat va ser Lipofectamine™ Plus Reagent (Invitrogen). Es tracta d'una barreja 3:1 (w/w) del lípid policatiònic 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)ethyl]- N, N dimethyl – 1 – propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) i el lípid neutre dioleoyl phosphatidyl ethanolamine (DOPE). El reactiu Plus millora el preacomplexament del DNA. El protocol és similar a l'anterior:

1. El dia anterior a la transfecció, sembrar les cèl·lules en una confluència aproximada del 70%.
2. Preacomplexament de DNA i Plus Reagent en OPTI-MEM o medi *serum free*.
3. 15 min. d'incubació a RT.
4. Afegir Lipofectamine Reagent diluïda en el volum apropiat d'OPTI-MEM.
5. 15 min. d'incubació a RT.
6. Afegir OPTI-MEM a la barreja i aplicar-ho a les cèl·lules.
7. 4 h. d'incubació en les condicions habituals de cultiu cel·lular.
8. Canvi de medi a RPMI + 10% sèrum.

| Placa cultiu | Nº cèl·lules | OPTI-MEM | DNA | Plus | Lipofectamine | Medi transfecció |
|--------------|--------------|----------|--------|-------|---------------|------------------|
| 24-well | 50.000 | 25 µl | 0.4 µg | 4 µl | 1 µl | 0.250 ml |
| 12 well | 100.000 | 50 µl | 1µg | 6 µl | 4 µl | 1 ml |
| 6 well | 300.000 | 100 µl | 2 µg | 8 µl | 12 µl | 2 ml |
| 10 cm Ø | 1.000.000 | 750 µl | 12 µg | 20 µl | 30 µl | 6.5 ml |

Taula 3. Quantitats i volums de transfecció amb Lipofectamine™ Plus Reagent

L'experiment associat a la transfecció transitòria es durà a terme 48 h. post-transfecció en el cas de DNA i 72 h. si estem treballant amb siRNA. En el cas de barrejar ambdós tipus d'àcids nucleics s'experimentarà a les 72 h. després de la transfecció.

7.4. Transducció cel·lular

La transfecció estable d'una seqüència de DNA és un procés llarg del què no sempre s'obtenen resultats positius (la inserció és a l'atzar i pot ser que es produeixi en una regió del genoma què no s'expressi) i en el cas dels RNA d'interferència és encara més difícil. Per a incorporar aquests RNA a les cèl·lules es varen utilitzar les partícules lentivirals MISSION™ Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich). Aquestes partícules es troben produïdes a partir d'una llibreria de seqüències de shRNA (*short hairpin RNA*) inclosa en vectors produïts per lentivirus. Els shRNAs es processen intracel·lularment originant el siRNA corresponent. El protocol utilitzat per la infecció de cèl·lules HeLa és:

1. Sembrar 50.000 cèl·lules en plaques de 12 pouets.
2. Afegir Polybrene Infection Transfection Reagent (Millipore, Billerica, MA, USA) a una concentració final de 8 µg/ml. Es tracta d'un polímer catiònic destinat a augmentar l'eficiència de la infecció.
3. Afegir les partícules lentivirals a una densitat de 10 MOIs (*multiplicity of infection*). Es tracta del nombre de partícules infectives per cèl·lula eucariota objecte de la infecció.
4. Centrifugar la placa 1h. a 1800 g.

5. Als 3 dies post-infecció afegir l'agent de selecció. Les partícules MISSION se seleccionen amb puromicina (Sigma-Aldrich) amb una concentració variable en funció del tipus cel·lular. En HeLa s'ha fet servir una concentració de 2 µg/ml.

Notes: l'agent de selecció es manté constantment en el cultiu cel·lular. A fi d'evitar alteracions en el patró d'expressió proteica de les cèl·lules, la puromicina fou retirada en el moment de sembrar les cèl·lules per realitzar un experiment concret. S'observà també que les cèl·lules recuperen l'expressió normal de la proteïna diana del shRNA a les 3 setmanes aproximadament d'iniciar la selecció. Per tant, els clons obtinguts foren congelats una setmana després de la infecció i, un cop descongelats, s'utilitzaren en els 2-3 primers passis posteriors.

7.5. Tractaments cel·lulars.

Nota: tots els reactius per realitzar tractaments cel·lulars foren aconseguits de Sigma-Aldrich.

7.5.1. Sincronització: doble bloqueig amb timidina.

El doble bloqueig amb timidina és un protocol pel qual s'aconsegueix la sincronització cel·lular en fase G₀/G₁. És un agent què, afegit en excés, inhibeix la síntesi de DNA.

- Incubar les cèl·lules 16 h. amb medi complert + 2mM timidina
- Alliberar les cèl·lules del bloqueig provocat per la timidina (9 h amb medi complert + 24 µM deoxicitidina)
- Incubar 16 h. amb medi complert + 2 mM timidina
- Alliberar amb medi complert + 24 µM deoxicitidina i realitzar l'experiment en els temps corresponents.

7.5.2. Sincronització: nocodazol.

El nocodazol és un agent què impedeix la polimerització de microtúbuls. D'aquesta manera, impossibilita la formació del fus mitòtic bloquejant les cèl·lules en la transició prometafase-metafase (inici de la fase M). El bloqueig s'aconseguí amb un tractament O/N afegint al medi complert una concentració 1 µM de nocodazol.

7.5.3. Sincronització: taxol.

A diferència del nocodazol, el taxol actua estabilitzant els microtúbuls ja formats, impedit la seva despolimerització. En aquest cas, les cèl·lules resten bloquejades en metafase, sense poder progressar en el cicle. El bloqueig amb taxol es realitzà amb un tractament O/N a una concentració 1µM.

7.5.4. Inhibició del proteasoma.

La poliubiquitinació de proteïnes per l'acció dels enzims ubiquitin ligases és un sistema de senyalització que direccionalitza diferents substrats cap a la via del proteasoma. A més, la ubiquitinació remodela la superfície de les proteïnes substrat, modificant propietats com l'estabilitat o l'activitat (Mukhopadhyay & Riezman, 2007). El proteasoma (26S) és una estructura complexa formada per diferents subunitats (un nucli catalític 20S i subunitats reguladores 19S), encarregada de degradar els substrats proteics prèviament ubiquitinats. Forma per tant, un dels principals processos reguladors del *turnover* proteic en cèl·lules eucariotes. L'ús d'inhibidors del proteasoma és una manera de comprovar quina via de degradació segueix una proteïna concreta i com es veu regulat aquest procés (Kim & Crews, 2008). En els estudis d'inhibició del proteasoma per a l'anàlisi de l'expressió proteica, s'han realitzat els següents tractaments cel·lulars:

- Lactacistina: incubació de 2h. a concentració 10 µM.
- Epoxomicina: incubació de 2h. a concentració 10 µM.
- MG132: incubació de 2h. a concentració 20 µM.

7.5.5. Disrupció dels *lipid rafts*.

A fi d'avaluar la localització subcel·lular on Flotillin-1 està duent a terme les seves funcions, s'utilitzaren 2 fàrmacs amb la capacitat de destruir les regions membranoses resistents a l'acció dels detergents habituals com el Tritó X-100:

- Lovastatina: depleciona el colesterol a llarg termini. S'utilitzà O/N a una concentració 5 µM dissolt en medi complert.
- Metil ciclodextrina: actua a curt termini bloquejant el colesterol. El tractament fou de 15 min. a concentració 10 mM en medi no complementat amb FBS.

7.6. Cicle cel·lular

L'anàlisi del cicle cel·lular es realitzà per la tècnica de citometria de flux combinada amb el marcatge per iodur de propidi (PI). El PI és un agent intercalant de les bases del DNA, de manera que emet un senyal directament proporcional a la quantitat de DNA i consegüentment, a la fase del cicle en què es troben les cèl·lules. S'utilitzà el protocol:

- Tripsinització de les cèl·lules.
- 1 rentat amb medi sense FBS.
- 2 rentats amb PBS – EDTA 10 mM
- Fixació de les cèl·lules en etanol 70% (diluït en PBS) O/N a -20°C (500 mL EtOH/10⁶ cèl·lules).
- 2 rentats amb PBS – EDTA 10 mM
- Incubar 1h. a 37°C amb RNasa A (DNasa *free*) 100 µg/ml.
- Afegir iodur de propidi 25 µg/ml.
- Processat de les mostres amb el citòmetre analític de flux FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).
- Anàlisi dels resultats amb el software FCS Express (DeNovo Software, Los Angeles, CA, USA).

8. MANIPULACIÓ DE RNA

8.1. Extracció RNA

L'extracció de RNA total es realitzà amb el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Es basa en l'ús de columnes cromatogràfiques d'afinitat per evitar la manipulació de substàncies potencialment tòxiques com el fenol i el cloroform què es fan servir en el mètode clàssic (Chomczynski & Sacchi, 1987).

1. 2 rentats de les cèl·lules amb PBS.
2. Afegir *buffer* RLT (350 µl per $\leq 5 \cdot 10^6$ cèl·lules, 600 µl per $> 5 \cdot 10^6$ cèl·lules) + β -mercaptoetanol (β -ME): 10 µl/ml *buffer* RLT.
3. Disrupció de la monocapa cel·lular per *scraping*.
4. Homogeneïtzació mitjançant una xeringa 18-20 G (0.9 mm diàmetre; 5-10 vegades)
5. Afegir un volum d'etanol 70% a l'extracte i aplicar a la columna proveïda pel kit.

6. Seguint les instruccions del fabricant, realitzar els processos de rentat i elució per centrifugació de la columna.

La quantificació es realitzà amb l'espectrofotòmetre Nano-Drop ND-100 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). La integritat del RNA es comprovà mitjançant la visualització en gel d'agarosa al 2%.

8.2. Electroforesi d'àcids nucleics

Per visualitzar el resultat dels diferents protocols realitzats sobre àcids nucleics (digestions, amplificacions, preparacions) es feu servir l'electroforesi en gels d'agarosa estàndard de grau mig (Ecogen, Barcelona, Catalunya) preparada en percentatges que oscil·len entre el 0.7 i el 2% en funció de la mida a separar en tampó TAE (40mM Tris base pH=8.1, 2mM àcid acètic, 0.2 mM EDTA). Per visualitzar els àcids nucleics mitjançant llum ultraviolada (UV) s'incorporà als gels bromur d'etidi (EtBr) a una concentració final de 0.5 µg/ml. L'electroforesi es resol a diferències de potencial entre 70 i 120 V.

Les mostres es carreguen prèvia addició de tampó de càrrega (5% glicerol, 0.021% blau de bromofenol, 0.021% xilen cianol i 0.02 M EDTA pH 8.0).

Per identificar la mida del DNA visualitzat es comparà amb el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

8.3. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

La transcripció inversa o RT-PCR permet obtenir un cDNA de doble cadena partint del mRNA corresponent. La tècnica es divideix en dues etapes: la primera on es produeix la transcripció inversa mRNA → cDNA; i una segona en que s'amplifica aquesta cadena de cDNA sintetitzada inicialment.

1. Barrejar 2 µg RNA + H₂O fins a un total de 13 µl. Afegir 4 µl de Random Primers (Invitrogen-Life Technologies)
2. 5 min. a 70°C.
3. Afegir els components de la MIX de PCR (Invitrogen-Life Technologies) fins a un volum de 25 µl:
 - a) 0.5 mM de cada dNTP
 - b) *Buffer* MMLV (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM. KCl, 3 mM MgCl)
 - c) MMLV Reverse Transcriptase

d) 1 µl d'inhibidor de RNases (Qiagen)

4. 1h. a 37°C.

Per controlar les temperatures s'emprà un termociclador Minicycler™ (MJ Research Inc, Waltham, MA, USA).

8.4. Real Time PCR (RTqPCR)

8.4.1. Principis generals

La tècnica de PCR a temps real consisteix en la detecció i anàlisi de la quantitat de producte generat a cada cicle d'amplificació. Aquesta quantitat de producte està directament relacionada amb la quantitat de cadenes de cDNA prèvies a l'inici del procés de PCR. La detecció cicle a cicle del producte generat és possible gràcies a la capacitat dels nous termocicladors de PCR per detectar emissions de fluorescència.

El procés d'amplificació de PCR a temps real consta de 3 fases diferenciades:

- Fase geomètrica o exponencial:* existeix una alta precisió entre la concentració de DNA i el cicle de PCR.
- Fase lineal:* no hi ha correlació entre l'amplificació de DNA i el cicle de PCR.
- Fase plateau:* saturació dels reactius i amplificació mínima.

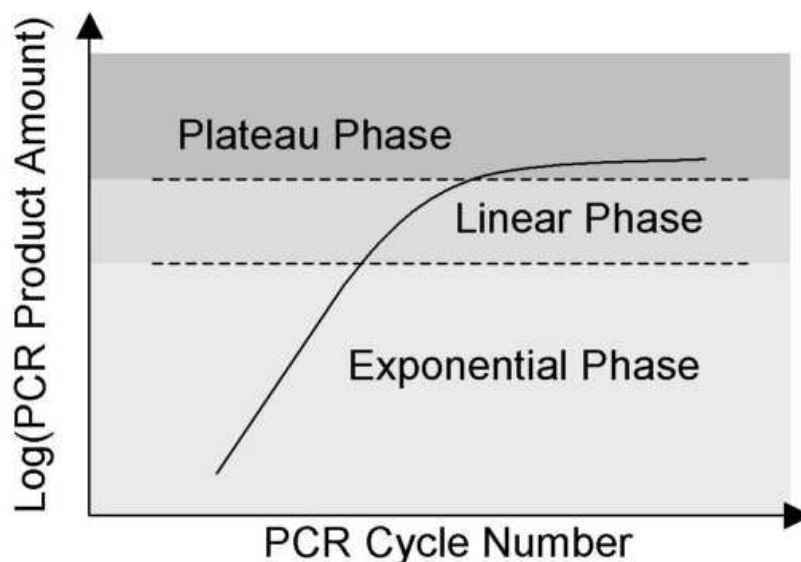


Fig 13. Esquema que mostra les diferents fases de l'amplificació per PCR. En la fase geomètrica existeix una perfecta correlació entre quantitat de DNA-cicle PCR, i on es poden extrapolar els resultats obtinguts (www.appliedbiosystems.com).

8.4.2. Sybr Green Dye

El marcador fluorescent Sybr-Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s'uneix al solc menor de la doble cadena de DNA. Quan es troba unit, la capacitat d'emissió de fluorescència augmenta. Per tant, major quantitat amplificada de DNA es correlaciona amb major emissió de fluorescència.

8.4.3. Corba d'amplificació

En la fase geomètrica l'eficiència de la reacció és màxima. És en aquest punt on es pot comparar si un gen s'expressa més que un altre. Per comprovar que l'amplificació és proporcional a la quantitat de DNA inicial es realitza un banc de dilucions des de 1 µg/µl fins a 1/10000. Les corbes d'amplificació indiquen l'augment progressiu de fluorescència resultant dels diferents cicles de PCR. S'estableix un llindar de detecció o *threshold* en el punt en què la corba permet una detecció de fluorescència superior al *background* dins de la fase exponencial. El cicle en què l'amplificació del gen assoleix aquest nivell s'anomena **Ct (cycle threshold)**. Amb els diferents Cts en relació a la quantitat de DNA s'obté una recta el pendent de la qual permet determinar l'eficiència de la PCR. Un pendent de -3.32 indica que l'eficiència de la PCR és d'un 100%, podent-se determinar així amb exactitud els Cts de les mostres problema i per tant, la seva quantitat.

8.4.4. Protocol d'amplificació de la PCR a temps real

L'assaig què es va dur a terme per RTqPCR fou la quantificació relativa entre mostres infectades amb diferents partícules lentivirals. Cada partícula contenia una seqüència shRNA (especificades en l'apartat 2.5). L'objectiu fou determinar les diferències d'expressió de les proteïnes d'interès: Aurora cinasa B i Flotillin-1.

Quantificació relativa: el fonament es basa en comparar una mostra de cDNA del gen d'interès (Flotillin-1 i Aurora cinasa B) amb un altre gen d'expressió ubiqua a totes les mostres i què actua com a control endogen (en el nostre cas, el gen què codifica per a la proteïna ribosomal S14). La mesura a cada mostra, tant del gen problema com del control ens proporciona un nivell de variació què indica la diferència d'expressió del gen entre cada una de les mostres problema.

La PCR es dugué a terme en el termociclador amb detecció de fluorescència ABI PRISM 7700[®] (Applied Biosystems) i les dades s'analitzaren mitjançant el *software*

ABI PRISM Sequence Detection System™. Cada reacció de PCR va portar-se a un volum total de 20 µl contenint:

- 10 µl de Sybr Green
- 1 µl de cDNA (dilució corresponent)
- 0.5 µl de primer *forward* 25 µM
- 0.5 µl de primer *reverse* 25 µM
- 8 µl d'aigua

El programa d'amplificació fou:

| | | |
|-------|--------|---------------|
| 95° C | 15 min | } x 45 cicles |
| 95° C | 30 s | |
| 55° C | 30 s | |
| 72° C | 30 s | |

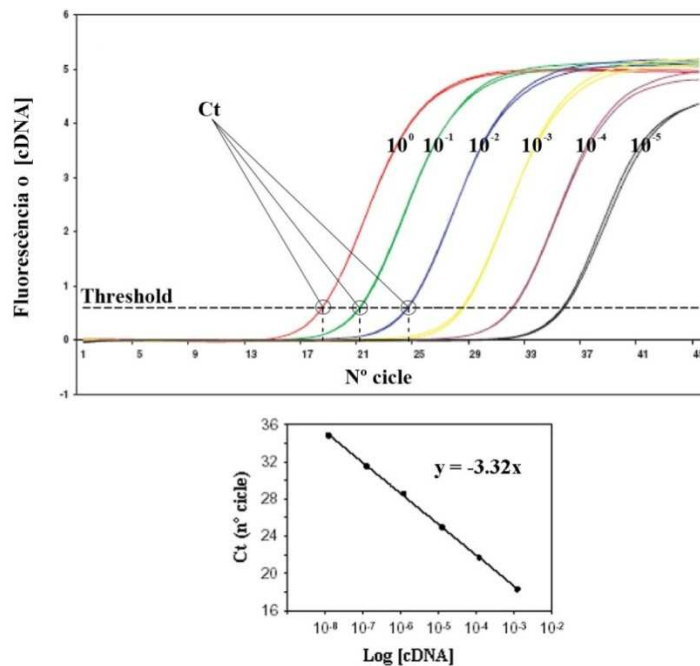


Fig 14. *Panell superior*: representació d'un banc de dilucions de cDNA i obtenció dels Cts per a cada concentració. *Panell inferior*: recta pendent que relaciona Ct amb quantitat inicial de DNA. Quan aquest valor és -3.32 implica una eficiència de la PCR del 100% (*modificat de www.appliedbiosystems.com*).

8.4.5. Anàlisi de les dades

Totes les reaccions d'amplificació es realitzaren per triplicat i es descartaren aquells valors que implicaven una desviació superior a 0.380. D'altra banda, es realitzà una corba prèvia de dilucions del cDNA, de manera que s'obtingué el pendent que determina l'eficiència de l'amplificació. Aquelles PCRs amb valors de pendent no ajustats a 3.32 (± 0.2) foren descartades.

Sobre els resultats obtinguts s'aplicà el mètode comparatiu de Ct's. Aquest mètode consta de 3 processos matemàtics:

- e) ΔCt : Ct gen problema – Ct gen normalitzador
- f) $\Delta\Delta Ct$: ΔCt mostra problema - ΔCt mostra control
- g) Aplicació de la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El valor resultant ens dóna una idea de l'expressió relativa d'aquell gen en les condicions concretes d'aquella mostra.

8.4.6. Primers

Els *primers* utilitzats en els experiments de PCR a temps real foren adquirits a ThermoFisher Scientific (Thermo Electron, Ulm, Alemanya).

| Nom | Gen | Seqüència |
|-------------|-----------------|---------------------------------------|
| S14 Left | S14 | 5'- GGC AGA CCG AGA TGA ATC CTC A -3' |
| S14 Right | S14 | 5'- CAG GTC CAG GGG TCT TGG TC -3' |
| Flot1 Left | Flotillin-1 | 5'- GGC AGA AAT TCT CAG AAC AG -3' |
| Flot1 Right | Flotillin-1 | 5'- GTG CAA ATA GTC CTG GTC AT -3' |
| AKB Left | Aurora Cinasa B | 5'- TCC TCT TCA AGT CCC AGA TA -3' |
| AKB Right | Aurora Cinasa B | 5'- GTT GTA GAG ACG CAG GAT GT -3' |
| Flot1 Forw | Flotillin-1 | 5'- TGC CAG AGA GTG TGG AAA GA -3' |
| Flot 1 Rev | Flotillin-1 | 5'- GGC TGT TCT CAA AGG CTT GT -3' |

Taula 4. Nom i seqüències dels *primers* utilitzats en els experiments de RTqPCR. S14 com a gen control i Aurora B i Flotillin-1 com a objectes de l'estudi.

8.5. Mecanismes de *knock-down* gènic. siRNAs i shRNAs.

8.5.1 Principis generals

El RNA d'interferència (RNAi) és un mecanisme de silenciament gènic conservat evolutivament i present en nombroses varietats d'espècies eucariotes. RNAi utilitza seqüències curtes de doble cadena de RNA (dsRNA) que vehiculen la degradació o la repressió de la transcripció d'una seqüència homòloga de RNA diana, d'una forma específica per a la seqüència utilitzada. Aquest sistema pot ser induït eficientment *in vitro* i *in vivo* mitjançant l'aplicació directa de *small interfering RNAs* (siRNAs) o per l'expressió mitjançant vectors virals o no virals de *short hairpin RNAs* (shRNAs). La tècnica s'ha convertit en una eina molt útil per als estudis genòmics funcionals i presenta un gran potencial en terapèutica (Ma et al, 2007).

Els siRNAs són dúplex preformats de RNA de 21 bp que, un cop introduïts a la cèl·lula, són reconeguts i formen una estructura tríplex amb el RNA diana, la qual serà reconeguda per la maquinària de degradació d'aquest RNA, el complex RISC (*RNA induced silencing complex*).

Els shRNAs en canvi, presenten un sistema similar al que succeeix endògenament a la cèl·lula eucariota. S'introdueix a la cèl·lula un vector que conté una seqüència específica de DNA, la qual serà transcrita. El RNA resultant conté les seqüències *sense* i *antisense* unides per una seqüència central que estructuralment forma un bucle (*hairpin*). Aquesta estructura és processada per RNasa III citoplasmàtica DICER, produint-se el siRNA corresponent (Aagaard & Rossi, 2007).

8.5.2 siRNA

Foren sintetitzats siRNAs per a diverses seqüències de Flotillin-1 que codifiquen per a diferents regions de la proteïna.

Els siRNAs F19 i F3 se sintetitzaren al laboratori contra regions que afecten tant als nivells de mRNA endògens com també a aquells mRNAs provinents de la transcripció de formes exògenes de Flotillin-1 introduïdes transitòriament a la cèl·lula. Les parelles de primers foren adquirits a Invitrogen-Life Technologies i els dúplex de RNA se sintetitzaren amb el kit *SilencerTM* siRNA Construction Kit (Ambion, Austin, TX, USA) seguint el protocol subministrat pel fabricant:

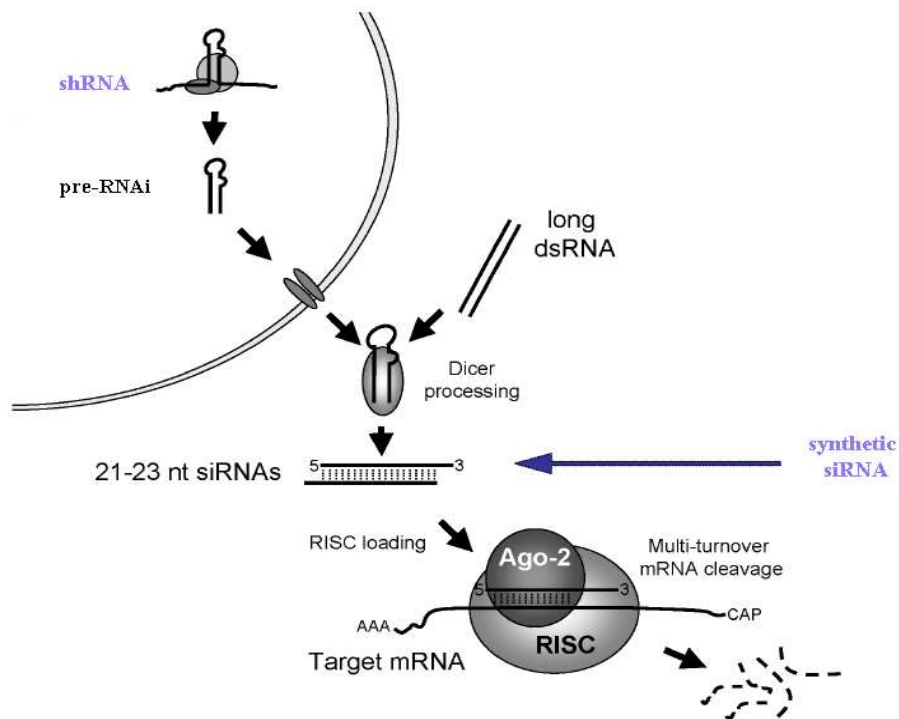


Fig 15. Representació de les dues estratègies de silenciament gènic. El shRNA codificat en un vector és processa per la endonucleasa DICER originant un producte anàleg als siRNAs introduïts directament en la cèl·lula. Els dsRNA reconeixen la seqüència diana i el complex ternari es degrada per acció del complex RISC (Aagaard, L. et al, 2007)

- Preparació dels RNA motlle:
 - Barrejar 2 µl de T7 promoter primer, 6 µl de DNA Hyb Buffer i 2 µl de l'oligonucleòtid motllo sense o antisense.
 - 5 min. a 70°C.
 - Afegir: 2 µl 10X Klenow Reaction Buffer, 2 µl dNTP Mix, 4 µl Nuclease-Free Water, 2 µl d'enzim Exo-Klenow.
 - 30 min. a 37°C.
- Síntesi dels dsRNA:
 - Per cada siRNA, preparar les 2 reaccions de síntesi dels siRNA sense i antisense (RT) barrejant: 2 µl cadena sense o antisense motllo

(preparats en el pas anterior), 4 µl Nuclease-Free Water, 10 µl 2X NTP Mix, 2 µl 10X T7 Reaction *Buffer*, 2 µl T7 Enzyme Mix.

- Incubar 2h. a 37°C.
 - Combinar les reaccions *sense* i *antisense* a 37°C *overnight*.
- Preparació i purificació del siRNA:
 - Digerir amb RNasa i DNasa: 6 µl Digestion *Buffer*, 48.5 µl Nuclease-Free Water, 3 µl RNase, 2.5 µl DNase
 - Incubar 2h. a 37°C.
 - Purificació per columna d'afinitat seguint les instruccions del kit.
 - Elució en 100 µl de Nuclease-Free Water.
 - En cada un dels passos es comprovarà l'eficiència del protocol per electroforesi d'un 10% de la mostra en un gel d'agarosa a l'1%.

D'altra banda, els siRNA F92, F93, F94 foren adquirits a la casa Ambion ja purificats i preparats per incorporar-se a les cèl·lules. Aquests siRNAs foren dissenyats contra la regió 5'UTR del gen Flotillin-1 de manera que només afecta al gen endogen.

El siRNA contra Aurora cinasa B (AKB siRNA) s'adquirí a Qiagen.

En els diferents experiments s'utilitzaren 2 siRNAs control: en paral·lel als experiments amb F19 o F3 s'utilitzà un siRNA codificat com R13, el qual havia estat dissenyat i sintetitzat contra una proteïna anomenada Rack1, també objecte d'estudi en el nostre laboratori, però què no produïa efecte sobre cap proteïna estudiada. D'altra banda, en paral·lel amb els experiments duts a terme amb F92, F93, F94 i AKB s'emprà el control comercial ON-TARGET *plus* siCONTROL Non-Targeting Pool (Dharmacon-Thermo Fischer Scientific).

| siRNA | Fabricant | ID | Seqüència |
|----------------------|------------|----|---|
| F19 <i>sense</i> | Invitrogen | | 5'- AAC UGG UCA UCG UGA AUG UCC CCU GUC UC -3' |
| F19 <i>antisense</i> | Invitrogen | | 5'- AAG GAC AUU CAC GAU GAC CAG CCU GUC UC -3' |
| F3 <i>sense</i> | Invitrogen | | 5'- AAG AGA GAU CCU CUG GAU CUG CCU GUC UC -3' |

| | | | |
|----------------------|------------|-------------|---|
| F3 <i>antisense</i> | Invitrogen | | 5'- AAC AGA UCC AGA GGA UCU CUC CCU GUC UC -3' |
| F92 <i>sense</i> | Ambion | 293692 | 5'- ACC UCA CAC UGC UAU GAU Utt -3' |
| F92 <i>antisense</i> | Ambion | 293692 | 5'- AAU CAU AGC AGU GUG AGG Utg -3' |
| F93 <i>sense</i> | Ambion | 293693 | 5'- GAA UAU UUU CCU GAC CAA Gtt -3' |
| F93 <i>antisense</i> | Ambion | 293693 | 5'- CUU GGU CAG GAA AAU AUU Cta -3' |
| F94 <i>sense</i> | Ambion | 293694 | 5'- UGU CCA UUG ACA GUG AGG Utt -3' |
| F94 <i>antisense</i> | Ambion | 293694 | 5'- ACC UCA CUG UCA AUG GAC Atg -3' |
| AKB <i>sense</i> | Qiagen | 1789912_10 | 5'- AGG GAU CCC UUC UUU CC dTdT -3' |
| AKB <i>antisense</i> | Qiagen | 1789912_10 | 5'- GGA AAG AAG GGA UCC CU dAdA -3' |
| R13 <i>sense</i> | Invitrogen | | 5'- AAG CUG GUC AAG GUA UGG AACCCU GUC UC -3' |
| R13 <i>antisense</i> | Invitrogen | | 5'- AAG UUC CAU ACC UUG ACC AGC CCU GUC UC -3' |
| siCONTROL | Dharmacon | D-001810-10 | |

Taula 5. Llistat de seqüències utilitzades en la síntesi i transfecció de siRNA.

8.5.3 shRNA

Les partícules lentivirals que contenen les seqüències shRNA per a Flotillin-1 pertanyen a la llibreria de RNAi contra gens humans i de ratolí MISSION™ shRNA Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich), la qual està basada en vectors virals. El control es realitzà mitjançant la infecció de partícules lentivirals produïdes a partir de MISSION® Non Target shRNA Control Vector (Sigma-Aldrich), vector que conté una seqüència no relacionada amb cap gen humà ni de ratolí.

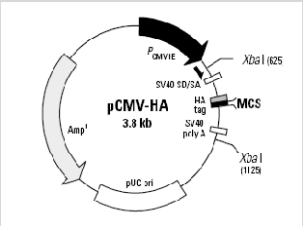
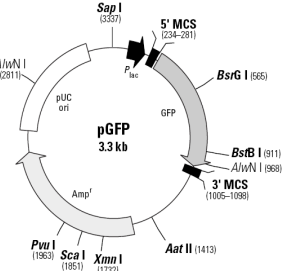
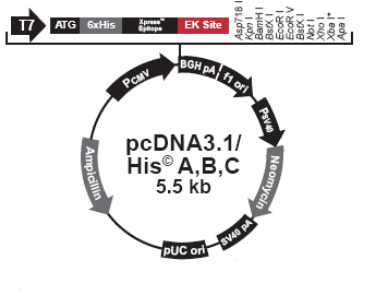
| shRNA | Fabricant | ID | Seqüència |
|-------------------------|-----------|----------------|--|
| shRNA1 – Flotillin-1 | Sigma | TRCN0000029312 | 5'- CCG GGC AGA GAA GTC CCA ACT AAT TCT CGA GAA TTA GTT GGG ACT TCT CTG CTT TTT -3' |
| shRNA2 – Flotillin-1 | Sigma | TRCN0000029309 | 5'- CCG GCC AGG ACT ATT TGC ACT CTT TCT CGA GAA AGA GTG CAA ATA GTC CTG GTT TTT -3' |

| | | | |
|-------|-------|--------|--|
| shRNA | Sigma | SHC002 | 5'- CCG GCA ACA AGA TGA AGA GCA CCA ACT CGA GTT GGT GCT CTT CAT CTT GTT GTT TTT - 3' |
|-------|-------|--------|--|

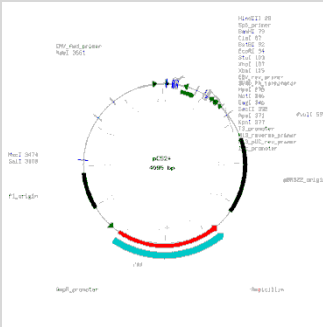
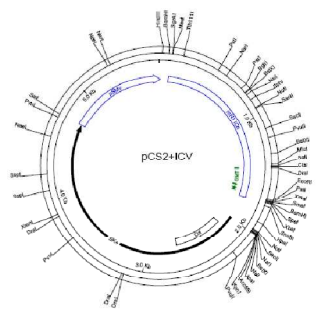

Taula 6. Llistat de seqüències utilitzades en la transducció cel·lular de shRNA

9. MANIPULACIÓ DE DNA

9.1. Vectors i constructes

| Nom | Vector | Especificacions |
|--------------------------------|--|---|
| HA-Flotillin-1 (HA-Flot) | pCMV-HA (Clontech, Palo Alto, CA, USA)  | El cDNA <i>full length</i> del gen humà de Flotillin-1 fou amplificat del clon IMAGE CM214-H04. Es clonà per les dianes de restricció EcoRI i XhoI en pauta amb el tag hemaglutinina. |
| GFP-Flotillin-1 (GFP-Flot) | pEGFP-C1 (Clontech)  | El cDNA humà de Flotillin-1 fou clonat afegint les dianes de restricció EcoRI i KpnI. |
| Flotillin-1-HA (Flot-HA) | pCDNA3.1HisA (Invitrogen) + insert UEV1A-HA  | El cDNA de Flotillin-1 s'amplificà amb dianes EcoRI i EcoRV (aquesta diana en substitució del codó STOP). El vector es digerí amb aquests dos enzims per alliberar un cDNA clonat prèviament (UEV1A-HA) mantenint el tag HA i en pauta amb Flotillin-1. |
| GFP-NLS-Flotillin-1 (NLS-Flot) | pEGFP-C1 (Clontech) + insert Flot1 | La seqüència NLS (seqüència consens idèntica a la del virus SV40) es creà per anellat <i>in vitro</i> incorporant les dianes EcoRI i XhoI. GFP-Flot fou digerit amb els mateixos enzims. |

MATERIALS I MÈTODES

| | | |
|---|---|--|
| <p>HA-Flotillin-1 ΔN (Flot ΔN)</p> | | <p>Procediment idèntic a HA-Flot1 però partint d'un cDNA corresponent a Flotillin-1 mancada dels primers 23 residus.</p> |
| <p>HA-Flotillin-1 ΔC (Flot-ΔC)</p> | <p>pCMV-HA (Clontech)</p> | <p>S'introduí un codó STOP en l'aminoàcid 382 del constructe HA-Flot mitjançant el kit <i>QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit</i> de Stratagene (La Jolla, CA, USA)</p> |
| <p>Flotillin-1-domini SPFH (SPFH)</p> | <p>pCMV-HA (Clontech)</p> | <p>Digestió de HA-Flot per BamHI i KpnI. Digestió de pCMV-HA per BglII i KpnI.</p> |
| <p>Flotillin-1- domini Flotillin (Flot)</p> | <p>pCDNA3.1HisA (Invitrogen)</p> | <p>Digestió de Flot-HA per BamHI i KpnI. Digestió de pCMV-HA per BglII i KpnI.</p> |
| <p>myc- Notch1-ΔE (ΔE) (cedit per la Dra. Anna Bigas)</p> | <p>pCS2 (+) Constructe original dels Drs. D. Turner -University of Michigan- i R. Rupp -Max-Planck Institute-.</p>  | <p>Notch-ΔE es clonà en el vector pBluescriptSK (Nye et al, 1994) (Stratagene) per PCR afegint les dianes EcoRI i SalI. L'epítoc myc s'afegí per amplificació i tall amb enzims BamHI i SalI. El producte resultant fou subclonat en el vector pCDNA1 (Nye et al, 1994) (Invitrogen). Finalment, l'insert global fou alliberat per BamHI i EcoRI i clonat en el vector pCS2 (+). Notch-ΔE conté la regió intracel·lular (dominis PEST, TAD, <i>ankirin repeats</i>, RAM) i la regió transmembrana.</p> |
| <p>6 Myc Tag- Notch1- ICN (ICN) (cedit per la Dra. Anna Bigas)</p> | <p>pCS2 (+) 6MT</p>  | <p>Notch-ICN s'amplificà i es digerí utilitzant BamHI i EcoRI de forma paral·lela a l'anterior. Conté la regió intracel·lular idèntica a Notch1-ΔE però manca de la regió transmembrana (Mumm & Kopan, 2000).</p> |
| <p>GST-Aurora B (GST-AKB)</p> | <p>pGEX (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)</p>  | <p>Cedit per la Dra. Sally P. Wheatley. Aurora B s'amplificà i es digerí per EcoRI i XhoI (Morrison et al, 2002).</p> |

| | | |
|----------------------------|-----------------|---|
| GST-Survivin (GST-Surv) | pGEX (Amersham) | Cedit per la Dra. Sally P. Wheatley. De forma anàloga a l'anterior, survivin s'amplificà i es digerí per EcoRI i XhoI (Wheatley et al, 2001). |
|----------------------------|-----------------|---|

Taula 7. Relació de vectors utilitzats per a la sobreexpressió de les diferents proteïnes estudiades. Es detalla l'estratègia de clonatge duta a terme.

9.2. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

L'amplificació del DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa és un dels procediments bàsics en els laboratoris de biologia molecular. Cada reacció d'amplificació s'ha d'optimitzar de manera individualitzada: disseny dels *primers*, establiment de la temperatura d'anellament (T_a), nombre de cicles de la reacció i concentració de Mg^{2+} .

Les propietats de la polimerasa utilitzades es basaran en la posterior aplicació que es dona al producte de PCR. Si l'objectiu és la visualització d'aquest producte en un gel d'agarosa s'utilitzarà EcoTaq (Ecogen), mentre que per protocols de clonatge de DNA o mutagènesi dirigida s'opta per una polimerasa amb activitat correctora (*proofreading*) de cara a evitar mutacions: Pfu DNA Polymerase (Stratagene) o Expand High Fidelity PCR system (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanya).

La reacció general aplicable com a punt de partida per posteriors optimitzacions de la PCR consisteix en:

- 2.5 μ l *buffer* 10X
- 0.75 μ l $MgCl_2$ 50 mM
- 0.9 μ l dNTPs 25 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- Aigua milli-Q estèril fins a un volum de 22 μ l
- 1 μ l primer *forward* 5 μ M
- 1 μ l primer *reverse* 5 μ M
- 0.1 μ l enzim polimerasa EcoTaq (1 u approx.)
- 1 μ l cDNA (1-10 ng de DNA plasmídic, 100 ng de DNA genòmic i en el cas de la *colony PCR* el DNA es substitueix per una colònia bacteriana).

Els diferents reactius necessaris foren adquirits a Promega Corporation (Madison, WI, USA). Els tubs es col·locaren en el termociclador Minicycler™ (MJ Research Inc). Un programa general de PCR seria:

| | | |
|------------------|----------------|---|
| 94° C | 5 min | |
| 94° C | 30 s | } |
| T _a # | 30 s | |
| 72° C | 1 min / Kb DNA | |
| 72° C | 5 min | |
| 4° C | ∞ | |

Temperatura d'anellament equival a $\sim T_m(\text{primers}) - 5^\circ\text{C}$

La PCR *high fidelity* es realitzà com a punt d'inici de diferents clonatges, a fi d'evitar la introducció de mutacions que puguin afectar a l'expressió final de la proteïna. El procés consisteix en preparar dues barreges de reacció (MIX 1 i MIX2):

- MIX 1:
 - 0.8 µl dNTPs 25 mM
 - 6 µl primer *forward* 5 µM
 - 1 µl DNA/clon IMAGE (dilució 1:1000)
 - 42.2 µl aigua milli-Q estèril.
- MIX 2:
 - 10 µl *buffer* + MgCl₂
 - 6 µl primer *reverse* 5 µM
 - 3 µl enzim polimerasa *high fidelity*
 - 31 µl aigua milli-Q estèril

Les dues MIX es barrejaren i es dividiren en 4 aliquotes de 25 µl que s'introdueixen en el termociclador. El programa aplicat fou:

| | | |
|----------------|----------------|---|
| 94° C | 3 min | |
| 94° C | 30 s | } |
| T _a | 30 s | |
| 72° C | 1 min / Kb DNA | |

72° C 5 min

4° C ∞

Els productes de PCR estàndard es visualitzaren mitjançant electroforesi en agarosa. Els productes de *high fidelity* es purificaren per columna d'afinitat (apartat 3.3.2.1.).

9.3. Clonatge de DNA

El clonatge de DNA mitjançant l'enginyeria del DNA recombinant és l'eina principal per alterar el patró cel·lular d'expressió proteica d'una manera regulada. L'objectiu és la inserció d'un fragment de DNA d'interès (codificant per una proteïna amb o sense epítops, un domini proteic, siRNA, etc.) dins d'un vector què, un cop introduït a la cèl·lula pels mecanismes detallats anteriorment, ens assegurarà l'expressió d'aquest DNA d'interès.

El protocol de clonatge segueix els passos següents:

1. Digestió d'insert i vector.
2. Purificació d'insert i vector.
3. Lligació d'insert i vector.
4. Transformació del producte de lligació en bacteris competents.
5. Identificació de les colònies recombinants per seqüenciació.

9.3.1. Digestió

L'eina bàsica què permet la manipulació de la informació genètica són els enzims de restricció, endonucleases d'origen bacterià principalment, què reconeixen seqüències palindròmiques específiques (dianes de restricció), tallant la cadena del DNA. El tall origina uns extrems què es poden relligar reconstituïnt-se la diana de restricció. L'estratègia és digerir vector i insert amb els mateixos enzims (o, en el seu defecte, amb enzims què originin extrems compatibles) per la seva posterior lligació.

L'origen de l'insert pot ser:

- a) per amplificació (PCR), tenint en compte que els primers utilitzats han d'amplificar les dianes de restricció adequades en els extrems del producte d'amplificació. En aquest cas parlem de clonatge.
- b) Per digestió d'un vector preexistent. En aquest cas parlem de subclonatge.

Tots els reactius i enzims necessaris per a les diferents digestions realitzades s'adquiriren de New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, USA). Les digestions poden

ser simples (un sol enzim de restricció) o dobles. En el cas d'una digestió simple, el primer producte es purificarà com s'especifica en l'apartat 3.3.2.1. El segon producte o el resultat d'una digestió doble es purificarà com s'especifica en l'apartat 3.3.2.2. El volum final de la reacció dependrà dels microlitres d'enzim utilitzats. Aquests venen en una solució amb glicerol per evitar la seva congelació i el percentatge final de glicerol no podrà excedir el 5%. La digestió consta dels components següents:

- 10 µg de DNA
- 3 unitats d'enzim/ µg de DNA (una unitat enzimàtica es defineix com la quantitat d'enzim necessària per digerir 1 µg de λDNA en 1h. a 37°C.
- BSA (1% del total)
- *Buffer* 10X (10% del total)
- Aigua milli-Q estèril

La digestió pot ser doble si els dos enzims presenten un tampó compatible comú. De no ser així, es farà seqüencial. Les reaccions s'incubaren 4-5 h. a 37°C o a RT en funció dels requeriments dels enzims utilitzats.

9.3.2. Purificació

9.3.2.1. Producte PCR

Els productes de PCR es purificaren mitjançant el kit High Pure PCR Purification Kit (Roche) seguint les instruccions del proveïdor. Aquests protocols es basen en la unió del DNA a una columna d'afinitat. De forma general consta dels passos següents:

- Unió del producte de PCR al tampó d'unió (*binding buffer*).
- Aplicació a la columna i centrifugació.
- Rentats (*washing buffer*).
- Elució (*elution buffer*) en 50 µl.

9.3.2.2. Electroforesi en gel d'agarosa.

L'electroforesi orientada a la purificació dels productes d'una digestió enzimàtica amb endonucleases de restricció (apartat 9.3.1) incorpora dues variacions fonamentals: els volums de càrrega són superiors (50-100 µl) i el voltatge a què es resol l'electroforesi és menor (40-60 V).

Es tallà amb fulls de bisturí estèrils els fragments d'agarosa on es trobaren localitzats vector i insert, es pesaren i es tractaren amb el kit Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen):

- Afegir tampó GQ (3 volums tampó:1 volum gel, on 100 mg gel ~ 100 µl)
- Incubar 10 min. a 50°C i vortejar fins dissoldre el gel
- Si el color del producte no és groc, afegir 10 µl acetat de sodi 3M per ajustar el pH.
- Afegir un volum d'isopropanol.
- Aplicar la barreja a una columna (el tampó GQ actua com a *binding buffer*).
- Aplicar els tampons de rentat (PE) i d'elució (EB) en 30 µl finals.

9.3.3. Lligació

Un cop purificats vector (V) i insert (I), s'analitzà 1 µl de cadascun en un gel d'agarosa per establir una relació entre les quantitats d'un i altre. Tenint també en compte la relació entre la mida del vector i la de l'insert, es calcula la quantitat molar que s'inclourà en la lligació. En general, s'han fet servir les relacions I:V de 1:1, 1:3 i 3:1.

La reacció de lligació inclou:

- 1 µl enzim T4 ligasa (New England Biolabs)
- 1 µl *buffer* T4
- Vector i insert, en la relació adequada (fins a 8 µl màxim)
- Aigua milli-Q estèril fins a 10 µl de reacció.

La reacció es dugué a terme durant 16 h. a 16°C en un termociclador PerkinElmer 2400[®] (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences Inc., Boston, MA, USA).

9.3.4. Bacteris competents

Com a pas intermedi en la realització de clonatges i subclonatges, així com per a la obtenció de grans quantitats de DNA plasmídics s'ha fet servir la soca bacteriana *E.Coli DH5α*.

9.3.4.1. Preparació

- Sembrar bacteris de la soca escollida en LB agar sense antibiòtic i *créixer* O/N a 37°C.
- Inocular un cultiu líquid de 3 ml de LB amb una colònia aïllada i *créixer* O/N a 37°C en agitació (225 rpm).

- Inocular 250 ml de LB amb els 3 ml de cultiu crescuts prèviament en un *erlenmeyer* d'1 L. Incubar a 37°C en agitació fins que el cultiu assoleixi la fase exponencial (A_{595} 0.7-0.8).
- Centrifugar el cultiu a 4000 rpm, 5 min. a 4°C, i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el *pellet* bacterià en 50 ml de $MgCl_2$ 100 mM temperat a 4°C.
- Incubar els bacteris en gel 30 min.
- Centrifugar a 4000 rpm, 5 min. a 4°C, i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el *pellet* bacterià en 50 ml de $CaCl_2$ 100mM temperat a 4°C.
- Incubar els bacteris en gel 30-90 min.
- Centrifugar a 4000 rpm, 5 min. a 4°C, i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el *pellet* en 20 ml de $CaCl_2$ 85 mM – 15% glicerol.
- Repartir els bacteris en alíquotes de 50-100 μ l i congelar-los ràpidament en nitrogen líquid.
- Conservar els bacteris competents a -80°C.

9.3.4.2. Transformació

S'utilitzarà major o menor quantitat de DNA en funció del seu origen. En el cas d'una lligació es transformaran 5 μ l dels 10 que formaven la reacció, mentre que per un plasmidi *supercoiled* es transformaran 1-10 ng de plasmidi. La transformació serà per electroporació o per *shock* tèrmic:

a) Electroporació:

- Barrejar DNA + 50 μ l bacteris competents i mantenir 1 min. en gel.
- Aplicar un pols de 2.5 V amb l'electroporador Gene PulserTM (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).
- Resuspendre en 1 ml de LB.
- 1 h. a 37°C en agitació (225 rpm)
- Sembrar en plaques LB agar + antibiòtic de selecció.

Se sembraren 100 μ l en el cas de DNA plasmídic. En el cas de la lligació s'aplicà un *spin* al cultiu i el *pellet* es resuspengué en 100 μ l, de manera que se sembrà la totalitat de la lligació.

b) *Shock* tèrmic:

- a) Barrejar DNA + bacteris competents.
- b) 30 min. en gel

- c) 45 s. a 42°C.
- d) 2 min. en gel.
- e) Recuperar els bacteris del *shock* amb 1 ml de LB i sembrar com en l'apartat anterior.

9.3.5. Preparació DNA plasmídic

El DNA plasmídic utilitzat en processos intermedis de clonatges i subclonatges fou extret i purificat utilitzant el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). L'extracció es basa en el tractament del llisat bacterià amb una proteasa alcalina aïllada del bacteri *Bacillus licheniformis*, que actua tant específicament inactivant endonucleases, com inespecíficament degradant proteïnes, reduint d'aquesta manera considerablement la contaminació amb proteïnes del llisat bacterià. L'extracció del DNA plasmídic es realitzà seguint les instruccions del fabricant. Es basa en una purificació per columna d'afinitat, utilitzant les solucions d'unió, rentat i elució de forma similar als protocols de RNA.

En canvi, per aconseguir una major puresa en aquelles preparacions de DNA que posteriorment foren utilitzades en la transfecció cel·lular s'utilitzà el kit Nucleobond[®] AX PC 20/PC 100 (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemanya) per la consecució de minipreparacions o midipreparacions respectivament. El sistema es basa en columnes d'intercanvi iònic per un procés de *buffers* similar a l'anterior, incorporant una precipitació amb isopropanol i un rentat amb etanol 70% final per aconseguir unes preparacions plasmídiques lliures d'endotoxines.

9.3.6. Seqüenciació

Les seqüències foren realitzades amb el seqüenciador automàtic ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PerkinElmer Sciences). Les reaccions de seqüència s'obtingueren amb BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) i foren optimitzades en un termociclador Minicycler[™] (MJ Research Inc.). La reacció de seqüència conté:

- 800 ng DNA plasmídic
- 2 µl BigDye
- 1 µl BigDye Sequencing *Buffer*
- 1 µl primer 5µM

- Aigua milli-Q estèril fins a un total de 10 µl

La PCR corresponent fou:

| | | |
|--------------------------|-------|---------------|
| 94° C | 3 min | } x 25 cicles |
| 94° C | 10 s | |
| T _a (50-55°C) | 5 s | |
| 72 ° C | 4 min | |
| 72° C | 5 min | |
| 4° C | ∞ | |

Posteriorment, les seqüències foren precipitades segons el protocol:

- Barrejar 10 µl reacció seqüència + 5 µl EDTA 125 mM + 60 µl etanol 100%
- 15 min. RT
- Centrifugar 30 min. a 5000-6000 rpm, RT. Descartar el sobrenedant.
- Afegir 60 µl etanol 70%
- Centrifugar 15 min. a 4000 rpm, 4°C. Descartar el sobrenedant.
- Assecar la seqüència precipitada a 37°C.

9.4. Mutagènesi dirigida

Per introduir mutacions puntuals o deleccionar DNA de doble cadena, fet què ens permet l'estudi de la rellevància d'una determinada seqüència gènica o l'alteració de les seves propietats, s'ha fet servir QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) seguint les instruccions del fabricant.

El punt de partida és un vector plasmídic què conté el DNA d'interès. Com a *primers*, foren utilitzats dos oligonucleòtids sintètics contenint la mutació desitjada, cada un d'ells complementari a la respectiva seqüència del vector. Mitjançant la Pfu Turbo DNA Polymerase es varen estendre els encebadors generant un nou plasmidi de doble cadena contenint la mutació. El DNA parental, què no la conté, s'eliminà afegint a la barreja l'enzim de restricció Dpn I, endonucleasa específica de DNA metilat i hemimetilat. El DNA mutat es transformà en la soca de bacteris XL1-Blue Supercompetent Cells, proveïda pel mateix kit. El procediment concret:

- Preparar la reacció: 50 ng DNA 2.5 µl *primer forward*
 5 µl Pfu *buffer* 10X 2.5 µl *primer reverse*

1 µl dNTPs Mix 10mM 1.25 µl Pfu Turbo

Aigua milli-Q estèril fins a 50 µl.

- Executar el programa d'amplificació:

| | | | |
|-------|----------------|---|--------------------|
| 95° C | 30 s | } | x 12/16/18 cicles* |
| 95° C | 30 s | | |
| 55° C | 1 min | | |
| 72° C | 2 min / Kb DNA | | |
| 72° C | 5 min | | |
| 4° C | ∞ | | |

* 12 cicles per mutacions puntuals

16 cicles per mutacions de 2 nucleòtids

18 cicles per delecions o mutacions > 2 nucleòtids

- 2 min. en gel.
- Afegir 1 µl d'enzim Dpn I i incubar 1 h. a 37°C.
- Transformar 2-5 µl per shock tèrmic.
- Sembrar tot el volum de la transformació en plaques LB agar amb l'antibiòtic adequat per seleccionar els bacteris transformats.

10. PROTEÏNA

10.1. Extracció de proteïna

En funció de les característiques de la proteïna que es vol estudiar (localització, modificacions post-traduccionals, etc.) es faran servir diferents tampons d'extracció. En tots els casos partirem de línies cel·lulars i el mecanisme serà similar.

10.1.1. Extracció de proteïna total

Es preparà el tampó de lisi RIPA amb certes modificacions (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritó X-100, 0,5% DOC, 1% SDS) complementat amb Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) diluït 1:200 – 1:500. Es procedí:

- Descartar el medi de cultiu i rentar les cèl·lules 2 vegades amb PBS (144 mg/l KH_2PO_4 , 9000 mg/l NaCl, 795 mg/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4).
- Afegir el volum adequat de tampó de lisi fred i arrencar les cèl·lules de la placa mitjançant un *scraper*.

- Transferir les cèl·lules a un tub *ependorf*. Si l'extracte mostra una consistència viscosa (fruit d'una elevada presència de DNA), passar les cèl·lules a través d'una xeringa d'1ml (similar a les utilitzades per la injecció d'insulina) diverses vegades fins aconseguir una consistència més fluida.
- Agitar 1h. a 4°C.
- Centrifugar 10 min. a 13000 rpm i 4°C. Descartar el *pellet* (*debree* cel·lular). El sobrenedant constitueix l'extracte proteic total en condicions natives. En funció de l'experiment, es quantificà, s'afegí tampó de càrrega, s'aliquotà i es conservà a -20°C.

La composició del tampó de càrrega o Laemmli *Buffer*:

- 188 mM Tris-HCl pH 6.8
- Glicerol 30% (v/v)
- SDS 6% (v/v)
- β -Mercaptoetanol 15% (v/v)
- Blau de bromofenol 0.02% (w/v)

10.1.2. Extracció de proteïna fosforilada

El procediment fou el mateix que en l'apartat anterior. El tampó d'extracció utilitzat fou RIPA complementat amb:

- RNasa (30 μ g/ml)
- DNasa (30 μ g/ml)
- DTT 1 μ M
- *Cocktail* inhibidors proteases 1:200
- PMSF 1 μ M
- β -glicerofosfat 20 mM (inhibidor de fosfatases)
- NaF 20 mM (inhibidor de fosfatases)
- Ortovanadat sòdic 30 μ M (inhibidor de fosfatases)

10.1.3. Separació de fraccions cel·lulars (Nuclear/No nuclear)

En aquest procediment el procés de *scraping* es realitzà amb un tampó hipotònic MES per garantir la integritat cel·lular (MES 25 mM pH 6.5, inhibidors de proteases 1:500, 1% Tritó X-100). La disgregació dels nuclis es realitzà de forma mecànica mitjançant

30 *strokes* en un homogeneïtzador Teflon Dounce. El producte resultant es centrifugà 20 min. a 2000 rpm i 4°C. El *pellet* resultant es considerà com la fracció nuclear mentre el sobrenedant constituí la fracció citosòlica.

Amb la fracció nuclear:

- 4 rentats amb el *buffer* MES
- Resuspendre en 100 µl de tampó d'extracció RIPA

Amb la fracció citosòlica:

- Centrifugar 10 min. a màxima velocitat i descartar el *pellet* (*debree* cel·lular). Ajustar el sobrenedant amb els components del tampó RIPA:
 - 1% Tritó X-100
 - 150 mM NaCl
 - 0.5 mM EDTA
 - 60 mM octylglucopiranoside (Sigma-Aldrich). Es tracta d'un detergent que solubilitza específicament les proteïnes de membrana que s'inclouen en els *rafts* lipídics.

En aquest punt, tractarem ambdues fraccions de forma idèntica:

- 1h. a 4°C en agitació
- Centrifugar 10 min. a 13000 rpm i 4°C. Descartar els *pellets*.
- Afegir tampó de càrrega als sobrenedants, bullir 5 min. (95°C) i congelar.

10.1.4. Gradient de densitat de sacarosa

El protocol és idèntic a l'anterior en referència a l'extracció de la fracció nuclear. Sobre la fracció citosòlica s'aplicà el gradient de densitat:

- Ajustar l'extracte a 150 mM NaCl
- Preparar una dilució 70% (w/v) de sacarosa (Sigma-Aldrich) en tampó MES + 150 mM NaCl (sense Tritó X-100 i sense inhibidors de proteases)
- Afegir a l'extracte el volum necessari de sacarosa al 70% perquè la concentració final d'aquesta sigui d'un 40%.
- Dipositar la mostra en un tub d'ultracentrífuga de 12 ml.

- Fer un banc de dilucions de sacarosa en tampó MES: 40%, 30%, 20%, 10%, 5%.
- Completar la fracció del 40% afegint sacarosa 40% a la mostra fins a un volum final de 2.5 ml.
- Afegir 2.5 ml de cada una de les dilucions 30%, 20%, 10% (gota a gota per evitar barrejar el gradient). Afegir 2 ml de la dilució 5%, la qual també s'utilitzarà per acabar d'equilibrar els tubs.
- Centrifugar 16 h. a 39000 rpm i 4°C en la ultracentrífuga Sorvall® Discovery 90SE (Kendro Laboratories, Asheville, NC, USA) amb un rotor basculant Sorvall® TH 641.
- Recollir fraccions d'un volum igual a la quantitat dipositada per aplicar el gradient (2.5 ml).
- Precipitar cada fracció amb àcid tricloroacètic (TCA) 20% (Applichem, Darmstadt, Alemanya). S'afegeix gota a gota en agitació constant un volum igual al de la fracció que es vol precipitar (2.5 ml).
- Centrifugar 20 min. a 10000g i 4°C. Descartar el sobrenedant.
- Rentar amb TCA 10%. Centrifugar 10 min. a 10000g i 4°C. Descartar el sobrenedant.
- Rentar amb dietilèter (Sigma-Aldrich) saturat amb aigua (es barreja el dietilèter amb aigua milli-Q, es deixa reposar i s'utilitza la fase superior). Centrifugar 10 min. a 10000g i 4°C. Descartar el sobrenedant.
- Deixar assecar a RT les restes de dietilèter.
- Resuspendre el pellet en 40 µl de Tris-HCl 1M pH 8.0 + 40 µl de Laemmli *Buffer* 2X. Bullir 5 min (95°C) i congelar (-20°C).

10.1.5. Immunoprecipitació

La coimmunoprecipitació és una tècnica analítica d'interaccions proteïna-proteïna. L'objectiu es visualitzar aquelles proteïnes que interaccionen amb la proteïna objecte de l'immunoprecipitació. Per tant, el tampó inicial que es farà servir ha de respectar la integritat d'aquestes interaccions:

- 20 mM Tris-HCl pH 8.0
- 150 mM NaCl
- 1% Tritó X-100

- 60 mM octylglucopiranoside
- 5 mM EDTA
- *Cocktail* d'inhibidors de proteases en dilució 1:200 – 1:500

10.2. Quantificació de proteïna

Les tècniques d'avaluació de l'expressió proteica per SDS-PAGE i *Western Blot* permeten fer una anàlisi comparativa i quantitativa dels nivells d'una determinada proteïna en diferents tractaments o situacions. Per optimitzar l'eficiència d'aquesta anàlisi s'ha de partir de la mateixa quantitat de proteïna total en totes les condicions. Per determinar la concentració proteica en un extracte es feu servir el kit RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad), el qual es basa en la determinació proteica pel mètode de Lowry (Lowry et al, 1951). Es preparà un banc de dilucions de BSA (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 i 2 mg/ml). Es tractà cada punt de la recta patró i cada mostra per duplicat en una placa de 96 well:

- Aplicar 5 µl de patró de BSA, tampó de lisi (blanc) o mostra.
- Afegir 25 µl d'una combinació dels reactius A + S (relació 50 µl A: 1 µl S).
- Afegir 200 µl de reactiu B
- Incubar 15 min. a RT (protegit de la llum)
- Llegir l'absorbància a 720 nm. S'utilitzà l'espectrofotòmetre amb lector de microplaques iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finlàndia).

Amb la relació concentració-absorbància del banc de dilucions de BSA es construí una recta patró. S'acceptà com a vàlida una $r^2 \geq 0.9$. Les absorbàncies de les mostres foren interpolades a la recta per aconseguir les respectives concentracions.

En funció de l'experiment, s'utilitzaren quantitats de proteïna total entre 30-100 µg.

10.3. Anàlisi de proteïnes per SDS-PAGE i *Western Blot*

Es tracta d'una tècnica analítica per detectar proteïnes de forma específica mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals o policlonals. Fa servir l'electroferesi en gel per separar les proteïnes, les quals són transferides a un suport membranós on es realitzarà la detecció (Towbin et al, 1979).

10.3.1. Electroforesi SDS-PAGE

L'electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE) és la tècnica per separar les proteïnes. El detergent SDS les desnatura, recobrint-les de càrrega negativa de forma proporcional a la seva mida. S'afegí també 1,4-Dithiothreitol (DTT) com agent reductor pel trencament dels ponts disulfur. SDS-PAGE per tant, separa les proteïnes en funció del seu pes molecular al aplicar un camp elèctric sobre les mostres. La barreja d'acrilamida/bisacrilamida polimeritza fruit d'una reacció d'oxidació-reducció i forma una complexa xarxa amb mida de porus inversament proporcional a la seva concentració. A través d'ella migraran les proteïnes quan s'aplica el camp elèctric. El protocol què se seguí fou:

- Preparació de les mostres. Barrejar:
 - x μ l de mostra per carregar (y μ g de proteïna)
 - DTT 100 mM de concentració final
 - Laemmli *Buffer* 1X de concentració final.
- Escalfar 3 min. a 95°C.
- Preparació del gel d'acrilamida. El percentatge d'aquesta augmentarà de forma inversament proporcional a la mida de les proteïnes l'expressió de les quals es vol analitzar. Els components què es feren servir s'adquiriren de Sigma-Aldrich (acrilamida) i Applichem (la resta):
 - 30% *acrylamide/bisacrilamide mix*. Aceptor d'electrons de la reacció REDOX, per la qual canvia la seva conformació i polimeritza formant la xarxa.
 - Tris-HCl 1.5 M pH 8.8. Confereix el pH del gel separador (*resolving buffer*)
 - Tris-HCl 1 M pH 6.8. Aporta el pH del gel concentrador (*stacking buffer*)
 - SDS. Agent desnaturalitzant de proteïnes. Aporta càrrega negativa.
 - *Ammonium persulfate* (APS). Agent oxidant (donant d'electrons).
 - *Tetramethylethylenediamine* (TEMED). Catalitzador de la reacció.
 - Aigua milli-Q.

Les proporcions dels components són les següents:

| Gel concentrador 10 ml (2 gels) | |
|---------------------------------|---------|
| Aigua | 6.8 ml |
| 30 % Acrilamida | 1.7 ml |
| Tris-HCl 1 M pH 6.8 | 1.25 ml |
| 10 % SDS | 0.1 ml |
| 10 % APS | 0.1 ml |
| TEMED | 0.01 ml |

Taula 8a. Quantitats de les solucions emprades en la preparació del gel concentrador o *stacking buffer*.

| Gel separador 20 ml (2 gels) | | | |
|------------------------------|----------|---------|---------|
| | 8% | 10% | 15% |
| Aigua | 9.3 ml | 7.9 ml | 4.6 ml |
| 30 % Acrilamida | 5.3 ml | 6.7 ml | 10 ml |
| Tris-HCl 1 M pH 8.8 | 5.0 ml | 5.0 ml | 5.0 ml |
| 10 % SDS | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml |
| 10 % APS | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml |
| TEMED | 0.012 ml | 0.08 ml | 0.08 ml |

Taula 8b. Quantitats de les solucions emprades en la preparació del gel separador o *resolving buffer*. Els percentatges d'acrilamida són els més freqüents que s'han emprat en els diferents experiments (*extret de Molecular Cloning: a laboratory manual, Sambrook, J. i Russel, D.*)

- Preparació del tampó d'electroforesi o *running buffer* (25 mM Tris Base, 0.20 M glicina, 0.1% (w/v) SDS).
- Electroforesi mitjançant el sistema Mini-PROTEAN 2 de Bio-Rad. Es muntà el sistema cobrint-lo amb tampó d'electroforesi, es carregaren les mostres i s'aplicà una diferència de potencial entre 80-120 V. Es deixà córrer la mostra fins que el tampó de càrrega eluí pel fons de la cubeta. Per visualitzar la separació proteica s'utilitzà el marcador de pes molecular Prestained SDS-PAGE Standard (Bio-Rad).

10.3.2. Transferència (*Western Blot*)

Un cop separades per SDS-PAGE, les proteïnes foren transferides a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) o nitrocel·lulosa mitjançant una segona electroforesi. D'aquesta manera, les proteïnes queden adherides en la mateixa posició i ordre que ocupaven en el gel i el sistema és l'adiant per a la detecció de proteïnes específiques mitjançant la incubació amb anticossos. Per a realitzar la transferència s'utilitza l'aparell Mini Trans *Blot-Cell* (Bio-Rad):

- Treure el gel del suport de vidre en què s'ha realitzat l'electroforesi.
- Equilibrar el gel amb el tampó de transferència (57 mM Tris Base, 0.44 M glicina, 20% (w/v) metanol).
- Retallar la membrana i activar-la. Per la membrana de nitrocel·lulosa (Nitrocellulose Membrane 0.45µm, Bio-Rad), submergir en aigua destil·lada i equilibrar amb el tampó de transferència. En el cas de la membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore), tractar 15 s. amb metanol, 2 min. amb aigua destil·lada i equilibrar amb tampó de transferència.
- Muntar el *sandwich* de transferència (de negatiu a positiu): esponja absorbent, 2 papers Whatman® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Regne Unit), gel de poliacrilamida, membrana, 2 papers Whatman®, esponja absorbent. Tenir cura d'eliminar possibles bombolles d'aire (p.ex.: fent rodar una pipeta Pasteur per sobre de la transferència).

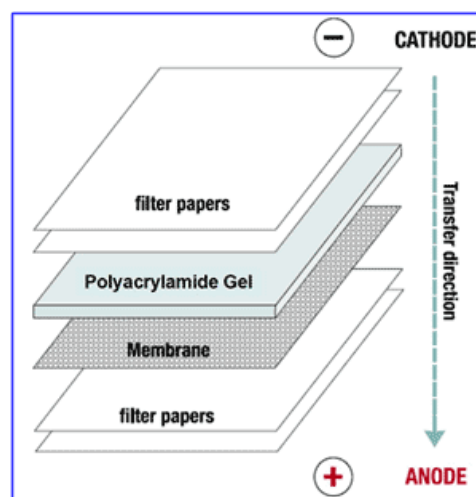


Fig 16. Representació esquemàtica del muntatge del *cassette* de transferència (*blotting cell*) (www.fermentas.com)

- Aplicar el camp elèctric:
 - i. 2 h. a 80 V
 - ii. O/N seguint la fórmula $1000 \text{ mA} = \text{mA/h} \cdot n^\circ \text{ hores totals per proteïnes} < 100 \text{ KDa}$. Per proteïnes de pes molecular superior s'augmentà la resistència a 1500 mA.

10.3.3. Red Ponceau

Es tracta d'un mètode general, ràpid i reversible de tinció de proteïnes. Indica una aproximació de l'eficàcia del procés de transferència, així com de les quantitats de proteïna total carregades en els diferents carrils. El procediment és:

- Tenyir la membrana durant 2 min. amb la solució de *Red Ponceau*: 0.5% (w/v) Ponceau S (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) àcid acètic.
- Rentar l'excés de colorant amb aigua destil·lada (fer diversos rentats fins que les bandes de proteïna quedin ben contrastades).

10.3.4. Bloqueig unions inespecífiques

El fonament és incubar la membrana amb una solució proteica de manera que quedin recoberts aquells llocs del suport de nitrocel·lulosa o PVDF on no hi hagi proteïna. S'aconsegueix evitar o minimitzar d'aquesta manera la unió inespecífica d'anticossos primaris o secundaris a la membrana. S'utilitzaren solucions de 5% (w/v) de llet descremada o BSA en *buffer* TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20). Les membranes foren incubades per un mínim de 45 min. a RT.

10.3.5. Anticossos primaris

Els anticossos primaris per detectar una proteïna específica foren incubats en una solució de 5% de llet descremada en TBST O/N a 4°C (i, excepcionalment, 1h. a RT) i en agitació. Les alíquotes ja preparades es conservaren a 4°C incorporant azida sòdica a una concentració de 0.02% (w/v). Les concentracions o dilucions, així com les cases comercials d'origen són:

MATERIALS I MÈTODES

| Anticòs | Font | Dilució/ Concentració | Fabricant/ N° catàleg |
|--------------------|--------|--------------------------|--|
| Actin (I-19) | Goat | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology #sc-1616 |
| AIM-1 (Aurora B) | Mouse | 1:250 (1µg/ml) | BD Transduction Laboratories #611082 |
| Aurora B | Rabbit | 1:500 | Sigma-Aldrich #A5102 |
| Borealin (N-15) | Goat | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology #sc-47955 |
| CBP (A-22) | Rabbit | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology #sc-369 |
| CREST antibodies | Human | 1:1000 | Aïllat d'un pacient amb el síndrome de CREST. Cedit pel Dr. Timothy M. Thomson |
| cyclin D1 (A-12) | Mouse | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology #sc-8396 |
| Flag-M2 monoclonal | Mouse | 10µg/ml | Sigma-Aldrich #F 3165 |
| Flag polyclonal | Rabbit | 10µg/ml | Sigma-Aldrich #F 7425 |
| Flag-M2 agarose | Mouse | IP | Sigma-Aldrich #A 2220 |
| Flotillin-1 | Rabbit | 1:500 | Abcam (Cambridge, Regne Unit) #ab40753 |
| Flotillin-1 | Rabbit | 1:500 | Epitomics (Burlingame, CA, USA) #1678-1 |
| Flotillin-1 | Mouse | 1:250 | BD Transduction Laboratories #610820 |
| Flotillin-2/ESA | Mouse | 1:5000 | BD Transduction Laboratories #610383 |
| GFP | Mouse | 1:500 | Clontech #8362-1 |

| | | | |
|-----------------------------|--------|--------|--|
| HA | Rat | 1:100 | Roche #1 867 423 |
| P-H3 (Ser10) | Rabbit | 1:1000 | Upstate (Lake Placid, NY, USA) #06-570 |
| INCENP | Rabbit | 1:500 | Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA) #2786 |
| PCNA | Mouse | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology # sc-56 |
| myc-tag | Rabbit | 1:500 | Abcam #ab9106 |
| myc-tag 9E10 | Mouse | 1:1000 | Cedit per la Dra. Anna Bigas |
| c-Myc (9E10) | Mouse | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology #sc-40 |
| cleaved Notch1 (Val1744) | Rabbit | 1:1000 | Cell Signaling #2421 |
| activated Notch1 | Rabbit | 1:500 | Abcam #ab8925 |
| Notch1 (C-20) | Goat | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology #sc-6014 |
| Survivin | Rabbit | 1:1000 | Cedit pel Dr. Timothy M. Thomson |
| β -Tubulin | Mouse | 1:1000 | Sigma-Aldrich #T 4026 |

Taula 9. Anticossos primaris utilitzats en els experiments de Western Blot.

Un cop finalitzada la incubació, la membrana fou rentada 3 cops amb TBST (10 min. a RT cada rentat).

10.3.6. Anticossos secundaris

Totes les incubacions amb anticossos secundaris foren realitzades a RT durant un període entre 1-2 h. a una dilució 1:2000.

Posteriorment la membrana fou rentada 3 cops amb TBST (10 min. cada rentat).

| Anticòs | Font | Dilució/ Concentració | Fabricant/ N° catàleg |
|-------------------------------------|--------|--------------------------|--------------------------------------|
| anti-goat immunoglobulins/HRP | Rabbit | 1:2000 | Dako (Glostrup, Dinamarca) #P0160 |
| anti-rabbit immunoglobulins/HRP | Goat | 1:2000 | Dako #P0448 |
| anti-mouse immunoglobulins/HRP | Goat | 1:2000 | Dako #P0447 |
| anti-rat IgG peroxidase antibody | Goat | 1:2000 | Sigma-Aldrich #A9037 |

Taula 10. Anticossos secundaris utilitzats en els experiments de Western Blot.

10.3.7. Sistemes de revelat

Tots els anticossos secundaris emprats es troben conjugats a l'enzim *horse radish peroxidase* (HRP). Els sistemes de revelat consten de 2 productes: el substrat de l'enzim HRP, el producte del qual emet llum i un augmentatiu o *enhancer* d'aquesta emissió lumínica. S'han fet servir dos sistemes de revelat, de menor i major sensibilitat en funció de les característiques dels anticossos primaris (afinitat, especificitat, ...).

- i. ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham™, GE Healthcare)
- ii. Supersignal® West Dura Extended Detection Substrate (Pierce-Thermo Scientific)

El sistema és el mateix en tots dos casos:

- Barrejar ambdues solucions del kit en proporció 1:1.
- Incubar la membrana amb la barreja durant 1 min. (i) o 5 min. (ii) i col·locar-la en un *cassette* d'exposició Autoradiogram Cassette SQX-1118 (CBS Scientific Co., Del Mar, CA, USA).
- En una cambra fosca (amb llum infraroja), aplicar una pel·lícula radiogràfica Medical X-Ray Film Blue (Agfa HealthCare, Mortsel, Bèlgica) durant el temps adequat. Aquest temps oscil·la entre 10 s. i 30 min. en funció de la qualitat de l'anticòs primari.

- Per processar la pel·lícula s'utilitzà una màquina reveladora automàtica FujiFilm FPM-100A (Fuji Medical Systems, Stamford, CT, USA).

Les imatges foren posteriorment adquirides amb un sistema d'escanejat GS-800 Calibrated Densitometer associat al *software* Quantity One 4.3.0 (Bio-Rad).

10.4. Coimmunoprecipitació

Els protocols d'immunoprecipitació es fonamenten en la capacitat dels anticossos de formar complexos antigen-anticòs quan són afegits a un extracte proteic. Aquests complexos es precipitaren per reacció amb una fase sòlida immunoabsorbent. Aquesta fase es troba formada per proteïnes (A o G) de gran afinitat pel fragment Fc de les immunoglobulines i unides a resines insolubles com agarosa o sefarosa. Un cop sedimentats per centrifugació, els complexos es dissociaren i s'analitzaren per SDS-PAGE.

El protocol que s'emprà en les coimmunoprecipitacions fou:

- Rentat de les cèl·lules dues vegades amb PBS
- *Scraping* amb 300 µl de tampó de lisi.
- Incubar 1 h. a 4°C en agitació.
- Centrifugar 10 min. a 13000 rpm. Descartar el *pellet* cel·lular. Del sobrenedant, separar una alíquota (10% del total) que consistirà en una mostra control de l'extracte proteic no subjecta a immunoprecipitació (INPUT).
- Augmentar el volum de l'extracte fins al doble per afavorir la formació dels immunocomplexos.
- Preaclarar. Incubar 2 h. amb 25 µl de protein A o protein G Agarose (Roche Applied Science). S'utilitzà una o altra en funció de l'espècie de la que s'obtingué l'anticòs utilitzat en l'immunoprecipitació. Prèviament, la proteïna A/G fou equilibrada: se substituï el *buffer* en que es troba conservada pel tampó de lisi mitjançant centrifugacions a baixes revolucions (2000-2500 rpm) a fi d' evitar el trencament de les *beads* d'agarosa.
- Centrifugar 5 min. a 2500 rpm i 4°C. Descartar el *pellet* d'agarosa.
- Incubar O/N a 4°C en agitació amb 4 µg d'anticòs específic o amb una immunoglobulina (IgG) inespecífica de la mateixa espècie que actuarà com a control negatiu de la immunoprecipitació.

- Afegir 40 µl de proteïna A/G. Incubar 5 h. a 4°C en agitació.
- Centrifugar 5 min. a 2500 rpm i 4°C. El *pellet* constituirà l'immunoprecipitat (IP), i el sobrenedant serà la fracció no unida (*not bound*, NB o SN).
- Rentar 3 vegades l'immunoprecipitat (IP) amb tampó de lisi. Resuspendre les *beads* d'agarosa en 40 µl de Laemmli *Buffer* 2X per aconseguir una concentració final 1X igual al tampó descrit en l'apartat 10.1.1. Bullir 5 min. Centrifugar 5 min a 2500 rpm i recuperar el sobrenedant (d'aquesta manera s'elimina la matriu d'agarosa que perjudica l'electroforesi posterior). Congelar.
- A la fracció no unida (NB o SN) afegir Laemmli *Buffer* 5X per aconseguir la concentració final idèntica al punt anterior. Bullir i congelar.

10.5. *Pull-down*

L'expressió d'una proteïna recombinant en un sistema procariota permet la sobreexpressió i també la fàcil purificació de grans quantitats de la proteïna d'interès. El sistema escollit fou pGEX (Amersham – GE Healthcare). Les proteïnes de fusió foren construïdes per inserció del gen d'interès en la zona de clonatge múltiple del vector pGEX-6P-1. L'expressió d'aquests vectors es troba sota el control del promotor *tac*. Aquest promotor és induït per l'anàleg de la lactosa *isopropyl β-D-thiogalactoside* (IPTG). Tots els vectors contenen un gen intern *lacI^q*. El producte d'aquest gen és una proteïna repressora que s'uneix a la regió operadora del promotor *tac*, prevenint així l'expressió fins al moment de la inducció amb IPTG. D'aquesta manera s'aconsegueix un control total sobre l'expressió de l'insert. El protocol consistí en 2 parts: la síntesi i purificació de la proteïna que actuarà d'esquer, i l'assaig de *pull-down* pròpiament dit:

a) Síntesi de la proteïna GST o GST-pt. esquer:

- Créixer O/N a 225 rpm i 37°C 4 colònies aïllades en 4 ml de LB + ampicil·lina respectivament.
- Inocular 500 ml de LB + Amp amb els 16 ml del cultiu O/N i créixer a 37°C i 225 rpm fins que el cultiu assoleixi una OD₆₀₀ de 0.6-0.8.
- Induir l'expressió de la proteïna recombinant afegint IPTG a una concentració final 1mM. Créixer durant 5 h. més.
- Centrifugar el cultiu a 7700g 10 min. a 4°C per sedimentar les cèl·lules.

- Descartar el sobrenedant i col·locar les cèl·lules en gel. Resuspendre el *pellet* cel·lular afegint 50 µl de PBS per ml de cultiu.
- Sonicar 4x 1 min. a 100% d'amplitud i cicle 1 (constant, 50W i 30KHz). S'utilitzà el sonicador UP-50H (Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Alemanya)
- Afegir 20% Tritó X-100 fins a una concentració final de 1%. Agitar 30 min. per solubilitzar la proteïna de fusió.
- Centrifugar a 12000g 10 min. a 4°C. Transferir el sobrenedant a un tub nou i conservar a 4°C.

b) **Purificació per cromatografia d'afinitat.** Es fa servir una matriu de sefarosa GStap FF 1ml (Amersham). Quan s'afegeix el llistat bacterià a aquesta matriu, la proteïna de fusió s'uneix al seu lligand, i mitjançant rentats s'eliminen les impureses. L'elució s'aconsegueix mitjançant l'addició de glutatió reduït:

- Omplir una xeringa amb tampó d'unió (PBS)
- Connectar la xeringa a la columna mitjançant l'adaptador. Evitar l'entrada d'aire.
- Treure el tap de la columna.
- Equilibrar la columna amb 5 volums de tampó d'unió.
- Afegir la mostra conservada a 4°C mitjançant la xeringa (cabdal 0.2-1.0 ml/min).
- Rentar la columna amb 5-10 volums de tampó d'unió (cabdal 1.0-2.0 ml/min).
- Eluir la proteïna de fusió amb 5-10 volums de tampó d'elució (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, glutatió reduït 10 mM) (cabdal 1.0-2.0 ml/min).
- Recollir l'eluit i testar la presència dels eluïts per SDS-PAGE. Carregar un banc de dilucions representatiu.
- Tenyir els gels 10 min. amb blau de Coomassie (0.025% blau Coomassie (w/v), metanol 40% (v/v), àcid acètic 7% (v/v)).
- Destenyir fent diversos rentats amb una solució d'àcid acètic al 10% fins observar bandes discretes en el gel.

c) Assaig de *pull-down*.

- Recollir l'extracte cel·lular de manera idèntica a l'apartat 4.1.1.
- Preaclarar amb 50 µl de Bulk Glutathione Sepharose 4B al 50% (Amersham) i 25 µg de GST. Incubar 2 h. a 4°C en agitació.
- Centrifugar a màxima velocitat 2 min. a 4°C. Descartar el *pellet*.
- Dividir l'extracte en dos alíquotes iguals. Afegir 50 µl de *glutathione sepharose*. Afegir 10 µg de proteïna GST o proteïna de fusió-GST respectivament a cadascuna de les alíquotes.
- Incubar els tubs 2 h. a 4°C en agitació.
- Centrifugar les mostres 2 min. a màxima velocitat. Els sobrenedants corresponen a la fracció no unida (SN o NB). Els *pellets* són la fracció *pull-down* (PD). Es tracten les fraccions de forma idèntica a l'apartat 4.4.

11. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Mitjançant la tècnica d'immunofluorescència es pot avaluar la localització subcel·lular d'una determinada molècula. Mitjançant l'ús d'anticossos secundaris conjugats a fluorocroms diferents, la tècnica pot aplicar-se a diferents proteïnes de forma simultània, permetent l'anàlisi doble o triple de colocalització entre les diferents proteïnes.

Per iniciar la tècnica, les cèl·lules foren sembrades sobre cobreobjectes de vidre (Menzel-Glaser Deckgläser, Menzel GmbH & Co., Braunschweig, Alemanya) col·locats en plaques de 24 pous. Sobre aquest suport es procedí a la fixació, procés pel qual les cèl·lules moren mantenint les propietats físico-químiques inalterades. D'aquesta manera s'obté una instantània del tipus cel·lular analitzat en les condicions concretes què interessin a l'experiment (p.ex.: cèl·lules en una determinada fase del cicle cel·lular). El protocol de fixació consistí:

- 2 rentats de les cèl·lules amb PBS.
- Incubar amb paraformaldehid (PFA) 4% en PBS 10-20 min. a 4°C.
- 2 rentats amb PBS.

Les cèl·lules es conservaren a 4°C fins el moment d'aplicar el protocol d'immunofluorescència. Totes les incubacions es realitzaren a RT:

- 30 min. amb NH₄Cl 50 mM.

- 1h. amb el tampó de bloqueig i permeabilització. Es fa servir un detergent que permeabilitza la membrana i permetrà l'entrada dels diferents anticossos. El tampó consta de:
 - PBS (diluent)
 - BSA (agent bloquejant) 1-5%
 - Sèrum de conill o cabra, en funció dels anticossos a utilitzar (agent bloquejant) 1:40
 - Saponina (detergent permeabilitzador) 0.1%
- Preparar l'anticòs primari (30-40 µl) sobre *parafilm* en una cambra humida (per exemple, una placa de cultius de 15 cm de diàmetre amb paper de filtre humit a la base)
- Treure el *cupre* del pou i col·locar-lo sobre el *parafilm* amb les gotes d'anticòs primari (la cara del vidre on es troben les cèl·lules en contacte amb l'anticòs). Incubar 1h.
- Rentar amb PBS i incubar 1 h. amb l'anticòs secundari. El procés es repetirà 2-3 vegades en funció de les proteïnes que es vulguin detectar. Es pot fer de forma seqüencial o simultània (incubant els anticossos primaris junts i posteriorment, els anticossos secundaris també alhora).
- Rentar i, si és necessari, tenyir el DNA. S'utilitzarà Hoechst 33342, un agent que té afinitat pels parells de bases A-T, durant 10 min. a la cambra humida.
- Rentar el *cupre*, assecar-lo curosament i col·locar-lo sobre el portaobjectes. Prèviament, en el *porta* s'havia col·locat uns 3-4 µl de medi de muntatge (glicerol 70% en tampó de bloqueig). Guardar les mostres a 4°C protegides de la llum.

| Anticòs | Font | Dilució/ Concentració | Fabricant/ N° catàleg |
|--------------------|--------|--------------------------|---|
| AIM-1 (Aurora B) | Mouse | 1:50 (5µg/ml) | BD Transduction Laboratories #611082 |
| Flag-M2 monoclonal | Mouse | 5µg/ml | Sigma-Aldrich #F 3165 |
| Flotillin-1 | Rabbit | 1:25 | Abcam #ab40753 |

| | | | |
|-------------------------------------|--------|--------|--|
| Flotillin-1 | Mouse | 1:25 | BD Transduction Laboratories #610820 |
| HA | Rat | 1:100 | Roche #1 867 423 |
| P-H3 (Ser10) | Rabbit | 1:1000 | Upstate #06-570 |
| Ki67 | Rabbit | 1 gota | Dako Corporation #N1574 |
| Ki67 | Rabbit | 1:30 | Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA) #18-0191Z |
| MAD2 | Rabbit | 1:1000 | Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA) #A300- 300A |
| MAD2 | Rabbit | 1:50 | Covance (Berkeley, CA, USA) #PRB-452C |
| myc-tag 9E10 | Mouse | 1:1000 | Cedit per la Dra. Anna Bigas |
| Notch1 (C-20) | Goat | 1:50 | Santa Cruz Biotechnology #sc-6014 |
| Tubulin polyclonal antibody | Sheep | 1:200 | Cytoskeleton Inc. (Denver, CO, USA) #ATN02 |
| β -Tubulin | Mouse | 1:200 | Sigma-Aldrich #T 4026 |
| β -Tubulin-Cy3 conjugated | Mouse | 1:200 | Sigma-Aldrich #C 4585 |
| γ -Tubulin-Cy3 conjugated | Rabbit | 1:200 | Sigma-Aldrich #C 7604 |

Taula 11. Anticossos primaris utilitzats en els experiments d'immunofluorescència.

| Anticòs | Font | Dilució | Fabricant/ N° catàleg |
|---|--------|---------|--|
| Alexa-Fluor® 488 anti mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed | Goat | 1:200 | Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA) #A-11029 |
| Alexa-Fluor® 568 anti mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed | Goat | 1:200 | Molecular Probes, Inc. #A-11004 |
| Alexa-Fluor® 488 anti rabbit IgG (H+L) | Goat | 1:200 | Molecular Probes, Inc. #A-11008 |
| TRITC-conjugate anti rabbit IgG | Goat | 1:350 | Sigma-Aldrich #T-6778 |
| Alexa-Fluor® 594 anti rat IgG (H+L) | Donkey | 1:200 | Molecular Probes, Inc. #A-21209 |
| FITC-conjugate anti rat IgG | Goat | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology #sc-2011 |
| Alexa-Fluor® 568 anti goat IgG (H+L) | Rabbit | 1:200 | Molecular Probes, Inc. #A-11079 |
| Alexa-Fluor® 568 anti human IgG (H+L) | Goat | 1:200 | Molecular Probes, Inc. #A-21090 |
| Alexa-Fluor® 488 anti sheep IgG (H+L) | Donkey | 1:200 | Molecular Probes, Inc. #A-11015 |

Taula 12. Anticossos secundaris utilitzats en els experiments d'immunofluorescència.

Les immunofluorescències es visualitzaren amb el microscopi de fluorescència convencional BX61 de l'empresa Olympus Corporation (Tokio, Japó). La captació de les imatges s'aconseguí mitjançant el microscopi confocal espectral FV1000 (Olympus) i el *software* de visionat FV-ASW.

D'altra banda, per aquells experiments que requerien fer un seguiment visual *in vivo* de les cèl·lules sotmeses a diferents condicions experimentals s'utilitzà el microscopi multidimensional TIRFM CellR d'alta velocitat (Olympus); el qual es troba equipat amb un incubador de metacrilat de grans dimensions amb control de temperatura i CO₂.

Pel tractament de la informació resultant es feren servir els programes CellR (Olympus) i ImageJ -Image Processing and Analysis in Java- (National Institutes of Health, USA).

12. ASSAJOS DE LUCIFERASA

Aquest tipus d'experiment es destinà a avaluar la capacitat d'activació de la transcripció del promotor del gen *Hes1*, el qual es relaciona directament a l'estat d'activació de la via de transducció de senyal mediada pel receptor Notch1. A aquest efecte, el promotor del gen *Hes1* es fusionà al gen reporter luciferasa, mitjançant un subclonatge en el plasmidi pGL3-Basic Vector (cedit per la Dra. Anna Bigas). El gen *Firefly (Photinus Pyralis) Luciferase* codifica per un enzim capaç de catalitzar una reacció d'oxidació, generant-se emissió de llum. La quantitat de llum recollida per un luminòmetre serà, per tant, directament proporcional a l'estat d'activació del promotor de *Hes1* i en definitiva, proporcional a l'estat d'activació de la via de Notch1.

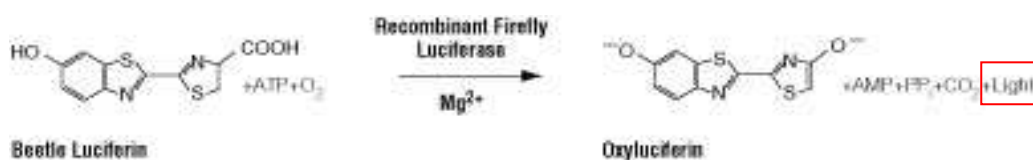


Fig 17. Reacció d'oxidació-reducció catalitzada per l'enzim *firefly luciferase*.

S'han fet servir 2 sistemes de detecció de luciferasa de la casa comercial Promega Corporation:

- i. Luciferase Assay System (Cat. #E1500)
- ii. Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Cat #E1910)

La diferència entre els dos sistemes radica en que el sistema dual incorpora un segon substrat per l'enzim *Renilla (Renilla Reniformis) Luciferase*. El substrat de la reacció catalitzada per aquest segon enzim inactiva al primer, de manera que s'atura l'emissió de llum. Al mateix temps, aquesta segona reacció torna a produir una emissió lumínica. En el nostre cas, el gen *Renilla* es trobava sota el control d'un promotor constitutiu (vector TK-Luciferase), aportant un control normalitzador sobre l'eficiència de transfecció de les diferents condicions experimentals.

En el cas (i), la normalització s'aconseguia incorporant a les cèl·lules el gen β -galactosidasa també sota el control d'un promotor constitutiu (pCMV- β -GAL). La β -

galactosidasa és un enzim capaç de catalitzar la conversió del substrat colorimètric adient (*ortho-Nitrophenyl- β -galactoside*, ONPG) en un producte de color groc mesurable a 420 nm de longitud d'ona.

Els assajos es realitzaren sobre plaques de cultiu de 12 pous i cada condició experimental fou mesurada per triplicat. L'extracte cel·lular s'aconseguí per *scraping* a 4°C utilitzant el tampó *Lysis Buffer 1X* (70 μ l/pou). Per cada punt s'aplicà la meitat del llistat cel·lular en una placa de 96 pous de fons opac. En el cas del sistema simple, l'altra meitat de l'extracte s'utilitzà en una segona placa de 96 pous (fons translúcid) per mesurar l'activitat galactosidasa.

La lectura de luciferasa es realitzà de forma automatitzada mitjançant el luminòmetre Clarity (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Els passos foren:

- Afegir 30 μ l del substrat del gen *Firefly*: Luciferase Assay Reagent (LAR).
- Mesurar la luminescència durant 10 s. en un lector de multiplaques.
- En el cas (ii), afegir 20 μ l del substrat del gen *Renilla*: Stop & Glo[®] Reagent.
- Mesurar la luminescència durant 10 s. més.

En el cas (i) la normalització consistí en:

- Afegir a l'extracte 70 μ l ONPG (4 mg/ml dissolt en Na₃PO₄ 100 mM pH= 7.3).
- Incubar a 37°C fins observar l'aparició de color groc.

13. ASSAJOS D'APOPTOSI (TUNEL)

A la cèl·lula apoptòtica es produeix el processat del DNA genòmic originant-se fragments de DNA de baix pes molecular (mono- i oligòmers) així com “*breaks*” de cadena simple o *nicks* en el DNA d'elevat pes molecular. Aquestes discontinuïtats es poden identificar marcant els extrems 3'-OH que han quedat lliures, mitjançant l'addició enzimàtica de nucleòtids marcats. L'enzim que possibilita l'addició d'aquests nucleòtids a les cadenes trencades de DNA és la TdT o *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling). Els nucleòtids poden estar marcats amb HRP per la seva detecció enzimàtica per immunohistoquímica, amb marcadors fluorescents per microscòpia o citometria de flux, etc. Els experiments de mesura de l'índex d'apoptosi es realitzaren amb el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR Red* (Roche), en el qual s'afegeix el nucleòtid

marcat TMR Red dUTP què possibilita la detecció per immunofluorescència. El protocol seguit fou el següent:

- Control positiu:
 - 2 min. amb *buffer* de permeabilització (PBS, 0.1% Tritó X-100, 0.1% citrat trisòdic) en gel.
 - 10 min. amb DNAsa (100 µg/ml) a RT.
 - Mantenir en PBS.
- Control negatiu i mostra:
 - 2 min. amb *buffer* de permeabilització en gel.

A partir d'aquest punt es continua en paral·lel amb totes les mostres:

- 2 rentats amb PBS.
- Barrejar la solució enzimàtica (Enzyme Solution, 50 µl) amb la solució de marcatge (Label Solution, 450 µl).
- Afegir 50 µl de la barreja a cada còbreeobjecte (pel control negatiu es faran servir 50 µl de Label Solution, sense l'enzim terminal transferasa).
- Incubar 1 h. a 37°C en cambra humida.
- 3 rentats amb tampó de bloqueig (PBS, 0.1% Tritó X-100, 0.5% BSA).
- Muntatge dels *covers* i visualització al microscopi de fluorescència.

El recompte de les cèl·lules amb marcatge positiu permeté establir els percentatges de cèl·lules apoptòtiques de cada condició.

14. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA

La immunoprecipitació de cromatina (ChIP) és un mètode experimental per determinar quines proteïnes com per exemple, factors de transcripció, es troben associades a regions específiques del genoma (en línies cel·lulars o teixits). El mètode es basa en la capacitat del formaldehid de reaccionar amb les amines primàries localitzades tant en els aminoàcids com en les bases de les molècules de RNA i DNA, formant un *cross-link* covalent entre una proteïna específica i el DNA sobre el què aquesta es troba situada.

Posteriorment, les cèl·lules són lliades i els extractes sonicats a fi d'aconseguir fragments de DNA d'una mida menor. El complex DNA-proteïna és immunoprecipitat fent servir un anticòs específic contra la proteïna d'interès, d'una forma similar al protocol emprat en la immunoprecipitació proteïna-proteïna (apartat 4.4). El *cross-linking* és revertit per l'aplicació de calor i la porció de DNA pot ésser purificada i

identificada per PCR fent servir *primers* específics a la suposada regió d'unió (Benson et al, 2006).

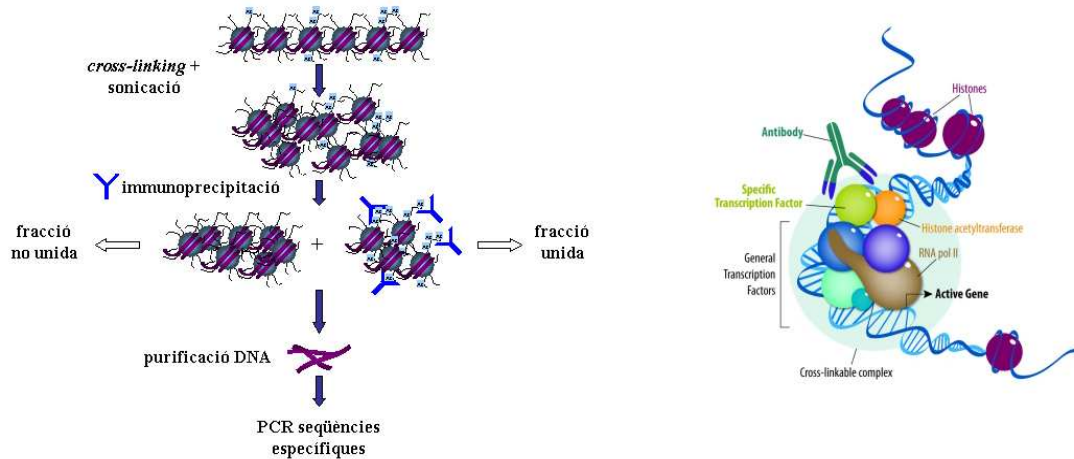


Fig 18. *Panell esquerre*. Representació esquemàtica del procés de ChIP. *Panell dret*. Visió ampliada del complex anticòs específic- proteïna immunoprecipitada- seqüència de DNA interactuant (www.cancerepigenetics.com).

El protocol aplicat partí d'un nombre molt elevat de cèl·lules (3 plaques de 15 cm de diàmetre per condició experimental). Sobre aquestes cèl·lules es procedí:

i) *Cross-linking*:

- Mantenir les cèl·lules en 9 ml de medi complert.
- Afegir 1 ml (1/10) de solució de *cross-linking* 1X (50 mM HEPES pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, formaldehid 1%).
- Incubar 10 min. a RT i agitació intensa.
- Aturar la reacció afegint 1/10 de solució STOP (1.25 M glicina, 10mM TRIS-HCl pH 8.0)
- Incubar 5 min. a RT i agitació intensa.
- Aspirar el medi (eliminant les cèl·lules no adherides).

ii) *Lisi cel·lular*:

- 2 rentats amb PBS (fred) - 0.5 mM EDTA
- Afegir 1 ml de tampó de lisi. El *stock* de 50 ml (diluït en aigua) consta de:
 - Tris 10 mM pH 8.0
 - 10% Tritó X-100 (Surfact-Amps[®] X-100, Pierce-Thermo Scientific)
 - NaCl 100 mM
 - EDTA 1 mM
 - EGTA 0.5 mM
 - Na-butirate 10 mM
 - Na-butirate 10 mM
 - β -glicerofosfat 400 μ M
 - Ortovanat sòdic 300 nM
- Recuperar les cèl·lules per *scraping*.
- Incubar 20 min. en gel.
- Centrifugar 4 min. a 3000 rpm.
- 2 rentats amb tampó de rentat (20 μ l de NaCl 5 M en 1 ml de tampó de sonicació).

iii) Sonicació:

- Resuspendre el *pellet* en 600 μ l de tampó de sonicació:
 - Tris 10 mM pH 8.0
 - NaCl 100 mM
 - EDTA 1 mM
 - EGTA 0.5 mM
 - Na-butirate 10 mM
 - β -glicerofosfat 400 μ M
 - Ortovanat sòdic 300 nM
 - *Cocktail* inhibidors proteases 1:500
- Afegir SDS 1% final.
- Sonicar 4X 90% amplitud i cicle constant.
- Centrifugar a màxima capacitat 15 min. a RT. Descartar el *pellet* negre (provocat per les altes temperatures què es donen durant la sonicació)
- Afegir 6 ml de tampó de sonicació 10X per diluir el SDS al 0.1% final.

- Concentrar per centrifugació en columnes VIVASPIN 20 (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanya) a 3400 rpm i 15°C fins un volum final aproximat de 0.8 ml.

iv) Preaclarat de la cromatina:

- Ajustar l'extracte al tampó RIPA afegint Tritó 1%, 140mM NaCl, deoxicolat sòdic 0.1% (w/v).
- Afegir 50:50 sepharose A/G (SPA/SPG) prèviament equilibrada (50 µl/condició).
- Incubar 2 h. a 4°C en agitació. Centrifugar 2 min. a 3000 rpm i 4°C. Recuperar els sobrenedants.
- Salvar 50-100 µl què seran el control INPUT. Sobre aquesta alíquota es revertirà el cross-linking:
 - O/N 65°C + 2 h. 55°C afegint 5 µl proteïnasa K (20 mg/ml).
 - Purificar mitjançant High Pure PCR Purification Kit (Roche).

v) Immunoprecipitació:

- Afegir 5 µg d'anticòs específic o d'IgG no relacionada com a control negatiu.
- Incubar O/N a 4°C en agitació.
- Afegir 50 µl de SPA/SPG (50:50) prèviament equilibrada.
- Incubar 2 h. a 4°C en agitació.
- Centrifugar 2 min. a 3000 rpm i descartar els sobrenedants.
- Rentar els immunocomplexos: 3X RIPA *buffer*, 3X RIPA + 1 M NaCl, 2X LiCl *buffer* (RIPA + 250 mM de clorur de liti), 2X TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).
- Eluir en 100 µl de *buffer* d'elució:
 - Tampó TE +
 - SDS 1.5%
 - β-glicerofosfat 20 µM
 - NaCl 30 µM
 - Na-butirate 10 µM
- Centrifugar 2 min. a 3000 rpm, recuperant els sobrenedants.

- Revertir el *cross-linking* O/N a 65°C.

vi) Purificació DNA:

- 2 h. 55°C afegint 5 µl proteïnasa K (20 mg/ml).
- Purificar mitjançant High Pure PCR Purification Kit (Roche).

Un cop purificat el DNA es procedí a la realització d'una PCR semiquantitativa, fent servir *primers* contra les regions promotores dels gens Hes1 o Hey1, ambdós dianes transcripcionals de Notch1. Les condicions de PCR foren:

| | | | |
|-----------------------------|-------|---|----------------------------|
| 94° C | 3 min | | |
| 94° C | 30 s | } | x 25-28-31-34-37-40 cicles |
| T _a [#] | 30 s | | |
| 72° C | 30 s | | |
| 72° C | 5 min | | |
| 4° C | ∞ | | |

Temperatura d'anellament: 57.5°C en el cas de Hes1 i 55°C per Hey1.

Sobre l'immunocomplex s'aplicà també un protocol de **ReChIP**, el qual consisteix en immunoprecipitacions seqüencials de cromatina amb l'objectiu d'estudiar la presència simultània de proteïnes unides a una regió de DNA (normalment aquest fenomen indica la presència de complexos proteics). També es poden avaluar modificacions en el patró d'histones. Sobre el complex sefarosa-anticòs-cromatina s'aplicà:

- Resuspendre les *beads* de sefarosa en 30 µl de DTT 10 mM.
- Incubar 30 min. a 37°C.
- Centrifugar 5 min. a 2000 rpm i recuperar el sobrenedant.
- Afegir 400 µl de tampó RIPA + inhibidors de proteases.
- Afegir 3 µg del segon anticòs i incubar O/N.
- Afegir 20 µl de SPA/SPG
- Incubar 3h. a 4°C en agitació.

- Rentar 3X amb tampó RIPA. A partir d'aquest punt, finalitzar la immunoprecipitació i la purificació del DNA de manera idèntica al protocol anterior.

| Primer | Promotor | Seqüència |
|------------|----------|---|
| Hey1 Forw | Hey1 | 5'- TCA GTG TGT GCG GAA CGC AAG -3' |
| Hey 1 Rev | Hey1 | 5'- TTC TTC ACC TCG ATG GTC TCG TC -3' |
| Hes 1 Forw | Hes1 | 5'- TAC CTC TCT CCT TGG TCC TGG AAC -3' |
| Hes1 Rev | Hes1 | 5'- CAG ATG CTG TCT TTG GTT TAT CCG -3' |

Taula 13. Llistat de primers utilitzats en les PCRs corresponents als experiments de ChIP i ReChIP.

15. ASSAJOS DE PROLIFERACIÓ

15.1 Comptatge

Les cèl·lules d'interès foren plaquejades en plaques de 12 pous. Diàriament, les cèl·lules de 3 pous per cada condició experimental foren tripsinitzades. Una alíquota de la suspensió cel·lular es diluí 1:10 en Trypan Blue Solution 0.5% (Biological Industries, Kibbutz, Israel), colorant capaç de penetrar i tenyir únicament les cèl·lules mortes. S'aplicaren 10 µl de la dilució a una cambra de comptatge Neubauer. Es comptaren les cèl·lules vives dels 4 camps independents i s'aplicà la fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ cèl·lules} = \text{promig cèl·lules dels 4 camps} \times 10^4 \times 10 \text{ (dilució)} \times \text{ml totals suspensió}$$

Aquest procés es dugué a terme durant 7 dies consecutius.

15.2 Anàlisi per immunofluorescència del marcador de proliferació Ki67

La proteïna Ki67 és un marcador cel·lular de proliferació. Es troba absent de cèl·lules quiescents, mentre que en cèl·lules que progressen en el cicle cel·lular (fases G₁, S, G₂) Ki67 es detecta exclusivament en el nucli. Durant la mitosi, la major part de la proteïna es relocalitza sobre la superfície dels cromosomes. Per tant, Ki67 és un bon mètode per determinar el percentatge de creixement d'una població cel·lular (Scholzen & Gerdes, 2000).

Les cèl·lules foren plaquejades d'acord amb el protocol d'immunofluorescència (apartat 11) fent-se servir les concentracions indicades d'anticossos anti Ki67 i secundaris corresponents. Es realitzà un comptatge d'un mínim de 300 cèl·lules totals de cada condició experimental establint-se el percentatge d'aquelles què eren positives en nucli per Ki67.