

# Relació estructura-funció en la família de transportadors d'aminoàcids heteromultimèrics. Identificació d'una nova família de transportadors lisosomals

Raúl Estévez Povedano

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNITAT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ EN LA FAMÍLIA DE  
TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMULTIMÈRICS  
IDENTIFICACIÓ D'UNA NOVA FAMÍLIA DE  
TRANSPORTADORS LISOSOMALS**

**RAÚL ESTÉVEZ POVEDANO**

Barcelona, desembre de 1999



## 2.20 ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'ACRILAMIDA

Es fan servir quan el grau necessari de discriminació és molt alt.

### 2.20.1 GELS NO DESNATURALITZANTS

En aquest tipus de gel es poden discriminar diferències de mida entre 5 i 10 parells de bases (pb) en fragments de DNA que no passin de 500 pb. Com més grans siguin les molècules analitzades, més petita serà la capacitat de discriminació del gel, la qual dependrà també de la concentració d'acrilamida. Normalment aquesta concentració pot variar entre un 4% per mides > 500 pb i 15% a mides < 100 pb.

#### 2.20.1.a Reactius

- Solució mare de 19:1 d'acrilamida i bisacrilamida al 40%.
- Tampó de càrrega: formamida, 95%, EDTA, 20 mM, pH 8.0, blau de bromofenol, 0.05%, cianol de xilé FF, 0.05%, NaOH, 10 mM.

#### 2.20.1.b Procediment

1. Es netegen dos vidres amb etanol. Es posen enfrontats i separats per separadors de 0.6 mm. Se subjecten amb 4 pinces pels costats.
2. Es preparen 25 ml d'acrilamida a la concentració desitjada (4-15%) fent servir l'estoc d'acrilamida al 40% en TBE 1x. S'afegeixen 150 µl de APS 10% i 15 µl de TEMED. Es barreja bé.
3. Amb l'ajuda d'una xeringa de 50 ml es posa aquesta barreja entre els dos vidres sense que acabi d'arribar al final. Es posen les pintes i es deixa polimeritzar.
4. Es preequilibra el gel durant 15 minuts a 150 V. Es carreguen les mostres a les quals prèviament s'ha afegit tampó de càrrega. Es fan migrar a 150-200V.

### 2.20.2 GELS DESNATURALITZANTS

En aquest tipus de gels, les cadenes d'àcids nucleics migren com a molècules senzilles, i el grau de discriminació arriba a ser d'una base en molècules de fins a 300 bases o més, en gels de 50 cm de llarg. He fet servir aquest gels en fer seqüenciació manual, amb un 6% d'acrilamida.

#### 2.20.2.a Procediment

1. En un vas de precipitats es barregen 95 g d'urea, 40 ml de TBE 5x, i la quantitat corresponent d'acrilamida al 40%. S'enrasa amb aigua fins a 200 ml.
2. Es tapa el recipient i es cobreix amb paper de plata, ja que l'acrilamida és fotosensible. Es deixa en un bany a 65°C en agitació fins que la urea es dissol completament. S'agita manualment de tant en tant per facilitar el procés. Es guarda a 4°C protegit de la llum.
3. Es renten els vidres amb aigua i sabó, s'asseca i desgreixa amb una mica d'etanol. Es posen els dos vidres un a sobre de l'altre i separats per dues tires primes (0.4 mm) situades paral·lelament en els dos costats del gel. Se subjecta amb pinces col·locades als dos costats.
4. S'agafen 50 ml de la barreja d'acrilamida amb urea i s'hi afegeixen 350 µl de persulfat amònic (APS) al 10% i 35 µl de TEMED. Es barreja bé amb una xeringa i es posa la barreja lentament entre els dos vidres. Es posen les pintes a l'inrevés i es deixa polimeritzar (dues hores).

5. Es treuen les pintes i les pinces. Es munta el gel en la cubeta d'electroforesi. Es posa TBE 1x en els receptacles superior i inferior. Es connecten els cables i la font d'electroforesi. Es preequilibra el gel durant 20 minuts a 1600 V. Es neteja el front de restes d'acrilamida i urea. Es posen les pintes.
6. Es posa també de càrrega a les mostres en proporció 2:3. Es denatura durant 1 min a 95°C i es carreguen les mostres. Es deixar migrar el temps adequat.

## 2.21 SEQÜENCIACIÓ DEL DNA

És el procés que ens permet conèixer l'ordre o la seqüència de nucleòtids d'un fragment de DNA. En el primer any de tesi vaig utilitzar la seqüenciació manual i automàtica per comprovar unes mutacions que havia fet per mutagènesi dirigida a l'Institut de Recerca Oncològica. Posteriorment, totes les seqüències s'han fet en els Serveis Científic tècnics.

### 2.21.1 SEQÜENCIACIÓ MANUAL

Es basa en el mètode de Sanger o dels didesoxinucleòtids (Sanger *et al.*, 1977). El fragment a analitzar és amplificat per PCR i purificat. En la seqüència es fa servir un nucleòtid marcat radioactivament ( $\alpha^{35}\text{S-ATP}$ ; 1000 Ci/nmol).

#### 2.21.1.a Procediment

1. S'amplifica per PCR, en un volum de 50  $\mu\text{l}$ , el fragment a seqüenciar.
2. Per eliminar els nucleòtids en excés, es purifica el producte de PCR mitjançant una columna de Qiagen seguint les recomenacions i es resuspèn en 40  $\mu\text{l}$  d'aigua. Alternativament es pot seqüenciar directament d'un plasmidi purificat per minipreparacions.
3. S'agafa 1  $\mu\text{g}$  de DNA i s'afegeixen 5 pmol de l'oligonucleòtid de seqüenciació, que pot ser un dels utilitzats en la PCR o un més intern.
4. S'utilitzar l'equip Sequenase 2.0 T7 DNA Polymerase (US Biochemical Corporation) i se segueix el protocol recomenat.
5. Cal fer un gel d'acrilamida al 6%.
6. Es desnaturalitzen les mostres durant 1 min a 95°C. Es posen en gel durant 5 min. Es carregar la meitat de la reacció en el gel i es deixa migrar durant dues hores a 1600 V. Es torna a desnaturalitzar i es carrega en el gel en altres pous la meitat de la reacció que quedava. Es deixa migrar 2-3 hores més.
7. Es separen els vidres, es transfereix a un gel Whatmann 3MM i s'asseca al buit. S'exposa en una pel·lícula de raigs X. Es deixa 24-48 h a -80°C. Es revela.

### 2.21.2 SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA

Es basa en el mateix principi que l'anterior. Té l'aventatge que no és radioactiu, que és molt sensible, que llegeix automàticament la seqüència que queda en forma de llistats i perquè fa servir un únic carril pels quatre nucleòtids. S'ha utilitzat un seqüenciador automàtic 373 A d'Applied Biosystems, que està format per un equip d'electroforesi, un làser i un ordinador que recull i analitza les dades enviades pel làser. Com a sistema de detecció es fan servir didesoxinucleòtids marcats amb un fluorocrom diferent, que més tard és llegit i reconegut per un sensor. Aquests didesoxinucleòtids

en ser incorporats a la reacció impedeixen que la polimerasa continuï allargant la cadena.

### 2.21.2.a Procediment

1. Agafem 200 ng del producte de PCR prèviament purificat o 1 µg de plasmidi purificat per minipreparacions (més de  $10^{10}$  còpies).
2. Utilitzem l'equip *Taq DyeDeoxy*<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, #401113) seguint el protocol recomenat, però per a un volum final de 10 µl en lloc dels 20 µl que diu l'equip. La temperatura d'hibridació en la PCR ha de ser calculada per l'oligonucleòtid que s'utilitzi. L'extensió a 60°C no és necessari que sigui de 4 min, i pot reduir-se a 2 min amb idèntics resultats.
3. Purifiquem el producte de la PCR de seqüenciació passant-lo per una columna de G-50 (TE 10/1) de forma que quedin retinguts els nucleòtids no incorporats. Liofilitzem-ho al buit.
4. Ho resuspenem en 5 µl de tampó de càrrega. Ho agitem. Ho desnaturalitzem 2 min a 95°C i ho deixem en gel.
5. Fem un gel d'acrilamida al 6%. Ho preequilibrem durant 10 min a 40W. Carregem les mostres. Ho fem migrar 10 h a 1700 volts.
6. Les dades són recollides i analitzades pels programes d'ordinador Collection i Analysis d'Applied Biosystems.

## 2.22 CONSTRUCCIÓ DE GENOTEQUES DE cDNA PER EXPRESSIÓ FUNCIONAL

Una vegada s'ha determinat la mida de l'mRNA responsable de la funció que estem analitzant, el pas següent és la construcció d'una genoteca de cDNA fent servir com a substrate les fraccions positives (per enriquir el nombre de clons positius) i seleccionant també la mida dels cDNA que s'obtinguin. I per això un bon fraccionament de l'mRNA incrementarà les possibilitats de trobar el clon buscat. Hem utilitzat l'equip SuperScript<sup>TM</sup> de clonatge de cDNA (GIBCO BRL), seguint les recomenacions del fabricant amb alguns canvis.

2-5 µg d'mRNA (fraccions positives), els dNTPs i l'adaptador oligo(dT) que conté una diana de restricció NotI en un volum final de 9 µl s'escalfen a 65-70°C durant 10 minuts, es refreden en gel i es retrotranscriuen a 37°C durant 1 h en un volum final de 20 µl. L'RNA es degrada per l'RNAasa H, i la segona cadena de cDNA se sintetitza al afegir dNTPs, l'*E. coli* DNA polimerasa I i l'*E. coli* DNA lligasa. Es lliga un adaptador SalI rom al cDNA, es talla amb NotI, i crea així la direccionalitat dels cDNA (SalI 5'-NotI 3'). S'extreu el DNA mitjançant una precipitació amb fenol-cloroform i es precipita amb etanol i acetat amònic. Es dissol el DNA en 30 µl d'aigua. Es fa migrar una part alíquota en gel per comprovar l'aspecte dels cDNA obtinguts.

El pas següent no segueix les recomenacions de l'equip. Els cDNA es fan migrar en un gel d'electroforesi agafant únicament aquells que tenen la mida adequada. Així ens assegurem que la genoteca no té fragments de cDNA incomplets o cDNA oligomèrics. Es carreguen els cDNA en un gel, posant al costat separadament dos marcadors. Es talla el carril del mig, es tenyeixen els marcadors, i es posa una transparència on es dibuixen el gel i els marcadors. Es talla el carril del mig on hi ha

els cDNA de mida adequada. El DNA s'extreu del fragment d'agarosa fent servir l'equip GeneClean Spin kit. Es fa migrar una part alíquota en gel.

Es munta ara el lligament posant diferents quantitats d'insert i una fixa del vector que ja ve a l'equip. El DNA es precipita i per millorar l'eficiència s'afegeix tRNA de llevat que actua com a *carrier*. S'ha de transformar ara mitjançant electroporació i fent servir les millors competents: en principi les Electro MAX DH10B són adequades. És convenient comprar-les 1 dia o dos abans per assegurar que siguin de la millor qualitat.

Es plaquegen 3 dilucions de la reacció de transformació (1x, 10x, 100x) amb la qual cosa es titula la genoteca. La resta es guarda a 4°C com a molt 2 dies. Es compten les colònies i es fan els càlculs adients per posar un nombre de colònies conegut en plaques grans. Es piquen algunes colònies, s'extreu el DNA i s'analitza l'insert mitjançant digestió amb SalI-NotI, amb el qual s'analitza la qualitat de la genoteca. En la figura següent presento algunes imatges dels passos que es van fer en construir una genoteca de cDNA d'mRNA de pulmó.

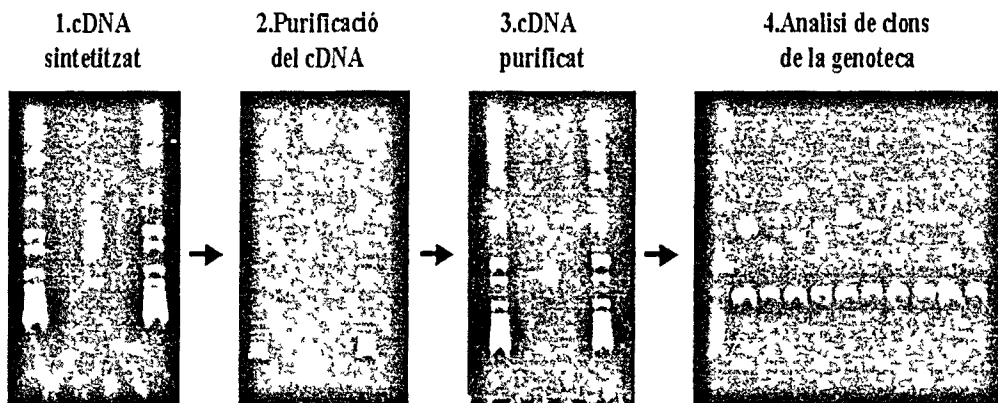


Figura 11. Esquema dels passos duts a terme en la construcció de la genoteca de cDNA.

## 2.23 ANÀLISI DE GENOTEQUES DE cDNA PER EXPRESSIÓ FUNCIONAL

En analitzar la llibreria de cDNA per expressió funcional es requereix ser molt sistemàtic i realitzar el cribratge de forma contínua i ràpida, per evitar possibles contaminacions durant tot el procés.

Una vegada hem fet el títol de la genoteca, els bacteris es plaquegen a una densitat de 200-500 (en el meu cas 300) colònies en plaques de LB-agar amb ampicil·lina que tenen filtres de nitrocel·lulosa (132 mm de diàmetre, Scheleicher&Schuell, BA85, 0.45 µm de tamany de porus, #20570), són les *Master-Plates*. Les plaques han d'estar ben seques, per evitar que les colònies s'escampin. Els filtres es rotulen per indicar el número del filtre. Vaig plaquejar les plaques utilitzant un Millipore *filtration device*, que assegura que estiguin ben repartides.

Una vegada han crescut les colònies fins a 1 mm de diàmetre (creixen més lentes en filtres), s'ha de fer una rèplica (*sub-master*) per poder fer l'assaig funcional. Es posa un altre filtre a sobre del primer, traient-lo de la placa, s'apreta i es posa en una placa nova amb LB-ampicil·lina. La *master-plate* es torna a créixer en plaques amb LB-

agar-glicerol-ampicil·lina i la *sub-master* es creix fins que les colònies tenen una mida molt més gran (3-4 mm).

Per guardar el filtre de les *masters-plates* es fa créixer, es fa una rèplica i es posa amb paper de filtre sec (2 o 3) i un de mullat amb aigua. Tot el sandvitx es posa en una bossa d'hibridació, se segella i es guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Per analitzar la rèplica, es posa el filtre en una placa neta, s'afegeixen 3 ml de LB-ampicil·lina freda i es rasquen els bacteris amb un *scraper*. Es repeteix el procés un cop. Es creixen i s'obté el DNA. Es talla amb NotI O/N i s'obté cRNA per transcripció *in vitro*, s'injecta en els oòcits i s'analitzen funcionalment.

Un cop s'identifica una *master plate* que és positiva, es fan subdivisions, que es poden fer en el mateix filtre o picant colònies individuals que es transfereixen a un filtre en forma de xarxa (per exemple, 10 filtres de 30 colònies) i es torna a procedir de la mateixa forma. És molt important que les colònies hagin crescut molt, per evitar pèrdues de clons. Finalment es creixen clons de forma individual fins a trobar el clon singular responsable de la funció.

## 2.24 CLONATGE VIRTUAL (IDENTIFICACIÓ DE GENS HOMÒLEGS) EN BASES DE DADES D'EST. ANÀLISI PER COMPUTADORA DE SEQUÈNCIES DE DNA I PROTEÏNA

Diferents grups d'investigació de tot el món estan seqüenciant clons de genoteques de cDNA de diferents teixits. En algun cas, com ara el Kasuza DNA Research Institute, seqüencien enterament tot el clon. En la majoria de casos, però, només seqüencien els extrems 5' i 3' del vector, ja que fan servir els oligos M13R i M13F presents en el vector. Aquestes seqüències reben el nom d'EST (*expressed-sequence tags*). Hi ha diferents organitzacions mundials, entre elles, l' NCBI. (National Center Biotechnology Information) que s'encarrega de posar noms a aquestes EST i als clons, i són d'accés lliure i gratuït a través d'Internet. D'altra banda, tenen cultius de glicerol de cadascun dels clons. A través de diferents empreses com ara Research Genetics o Genome Systems es poden obtenir cultius d'aquests clons per un mòdic preu (unes 7000 pesetes el clon). D'altra banda hi ha una gran desorganització, ja que molts cultius no corresponen al clon que demanes i molts altres tenen contaminació de fags.

Quan un té una seqüència de DNA i/o proteïna pot preguntar-se si hi ha gens homòlegs a aquesta seqüència. Una possibilitat és escollir una genoteca de cDNA i buscar per hibridació en condicions no molt astringents. L'altra possibilitat és buscar a través de la computadora en tots els clons que estiguin accessibles de moltes genoteques de cDNA de teixits diferents. En el futur, quan tot el genoma estigui seqüenciat i estigui més desenvolupada la informàtica deixarà d'existir la primera opció.

Així en tenir la seqüència de LyCAT (vegeu "Resultats i discussió") vam voler veure si hi havia clons homòlegs humans o de ratolí. Vam dur a terme tBLASTn (es posa la proteïna i es tradueix a nucleòtids) contra nr (non-redundant), human-EST i mouse-EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast?Jform=1>). A partir



de la primera recerca vam trobar un altre cDNA, MTP, que ja s'havia descrit. En analitzar les EST vam observar que hi havia clons de LyCAT, de MTP i d'un altre gen no identificat.

Per veure si les EST formaven part d'un *cluster*, és a dir, si tenien zones de solapament entre elles vam dur a terme THC BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/THCBlast/nph-thcbblast>), que t'ordena les EST segons la posició relativa del clon i et dona una seqüència *consensus* del cDNA (*contig*). També és útil fer el mateix al TIGEM (EST cluster finder) (<http://gcg.tigem.it/>).

Així, ara ja podem escollir quins són els clons que poden contenir el cDNA complet o el més llarg possible. De vegades es pot obtenir més informació com la mida del clon en The LENS Clone Browser (<http://agave.humgen.upenn.edu/cgi-bin/lens/scripts/browse/browseClone.perl>). Quan es demanen els clons, és important, una vegada que els hem plaquejat, analitzar 4 o 5 clons per seqüenciació. En la meua experiència de 6 clons demanats només 2 van ser correctes.

Quan ja s'ha seqüenciat el clon algunes adreces d'Internet que et permeten treballar són les següents: a) multialineaments: BCM (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) o CLUSTALW (<http://www.clustalw.genome.ad.jp/>); b) Anàlisi de seqüències: Sequence Interpretation Tools (<http://genome.ad.jp/SIT/SIT.html>), Pedro's BioMolecular Research Tools ([http://www.public.iastate.edu/~pedro/rt\\_all.html](http://www.public.iastate.edu/~pedro/rt_all.html)).

De totes formes hi ha adreces d'Internet on es poden trobar connexions amb altres serveis com ara l'IRO Home Page (<http://www.iro.es/gm.html>).

## 2.25 CRIBRATGE DE GENOTEQUES DE cDNA ( $\lambda$ ZAP) PER HIBRIDACIÓ

Un dels clons humans obtinguts a través del clonatge virtual (vegeu la secció anterior) era incomplet, li faltaven 300 nucleòtids de l'extrem 5', incloent part de la zona codificant. Com que vam veure que el missatger corresponent s'expressava a grans nivells en cor, vam voler trobar el cDNA complet a través del cribratge d'una genoteca humana de cor construïda en el vector  $\lambda$ ZAP. La genoteca era comercial de la casa Stratagene, que acostuma a tenir genoteques amb gran quantitat de transcrits amb la seqüència completa.

### 2.25.1 PROTOCOL

#### 2.25.1.a Títulació de la genoteca

La titulació de la genoteca es fa en 3 dies. El primer dia s'inoculen 50 ml de medi LB suplementat amb 0.2% de maltosa i 10 mM de MgSO<sub>4</sub> amb la soca XL1-Blue MRF' ( $\Delta$ (mcrA) 183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15 Tn10 (Tetr)]). Es creixen O/N a 30°C per assegurar que els bacteris no creixin massa, ja que el fag també es pot unir a cèl·lules mortes.

El segon dia es centrifuguen els bacteris (10 minuts, 2000 rpm) i es resuspèn el pellet en uns 15 ml de 10 mM MgSO<sub>4</sub>, sense posar-ho al vòrtex. Es dilueixen fins que la

DO<sub>600</sub> sigui de 0.5. Es preparen dilucions seriades del fag en el tampó SM (5.8 g de NaCl, 2 g de MgSO<sub>4</sub>, 50 ml de TrisCl 1 M pH 7.5 i 5 ml de 2% de gelatina per litre). S'afegeixen 200 µl de bacteris i s'inoculen amb la dilució determinada del fag, s'incuba a 37°C durant 15 minuts en tubs falcon. S'afegeixen ara 3 ml de *top agar* (medi NZY amb 0.7% agarosa), el qual ha de ser refredat a 48°C sobre els bacteris amb el fag, es barreja i es plaqueja sobre plaques d'LB-agar. Es deixa 10 minuts a RT i s'incuba O/N a 37°C.

El dia següent es compta el nombre de calbes en cada placa i es determinen les unitats formadores de plaques (pfu) de la genoteca.

### 2.25.1.b Amplicació de la genoteca

Es barreja ara la quantitat de fag suficient per tenir 50000 pfu amb 600 ml dels mateixos bacteris (DO<sub>600</sub> = 0.5). S'afegeixen 6.5 ml de *top agar* a cada part alíquota i s'afegeixen a plaques de 15 cm de diàmetre que tenen LB-agar. En el nostre cas vam analitzar 400000 clons. S'incuben les plaques a 37°C durant unes 10 hores, vigilant que la mida de les calbes no sigui més gran que 1-2 mm.

### 2.25.1.c Cribratge primari de la genoteca

Es refreden les plaques a 4°C durant 2 hores per prevenir que el *top agar* es trenqui en treure el filtre de nitrocel·lulosa. Es posa el filtre a sobre de la placa i amb una agulla es fan forats per saber l'orientació de les calbes. Primer desnaturalitzem el filtre submergint-ho en una safata que conté 1.5 M de NaCl i 0.5 M de NaOH durant 2 minuts. Es neutralitza canviant-lo a una safata que conté 1.5 M de NaCl i 0.5 M de Tris-HCl (pH 8.0) i finalment 30 segons en una altra que conté 0.2 M de Tris-HCl (pH 7.5) i 2xSSC. Es posen tots els filtres sobre paper Whatmann 3MM i es fa un *cross linking* del DNA en una estufa a 80°C durant 2 hores.

Vam hibridar amb un fragment de DNA intern al clon obtingut per PCR el més cap a l'extrem 5' possible. D'aquesta forma volíem evitar tenir transcrits que no fossin complets per l'extrem 5'.

Els filtres s'introdueixen en tubs Rolex i es fa la prehibridació dels filtres amb la solució de prehibridació (2x Tampó PIPES, 50% de formamida desionitzada, 0.5% d'SDS i esperma de salmó desnaturalitzat i sonicat (100 µg/ml), que ha estat prebullit abans). Es prehibrida a 42°C durant 2 hores. Mentre es produeix la prehibridació es fa el marcatge de la sonda fent servir [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP i l'enzim T4 polinucleòtid-kinasa. Es purifica la sonda marcada dels nucleòtids fent servir columnes de Sephadex (G-50) i es compta la radioactivitat en un comptador  $\beta$ . S'afegeix la sonda a la solució de prehibridació amb els filtres, mai directament sobre els filtres, i s'incuba O/N a 42°C.

El dia següent es fan els rentatges fent servir tampó amb diferents concentracions d'SSC (des d'1x a 0.1x) i al 0.1% d'SDS, i es deixa primer a temperatura ambient i després s'incrementa la temperatura fins a 65°C. Es va controlant la radioactivitat que va quedant en els filtres. Es treu l'excés de líquid amb paper Whatmann i es posen en un casset amb pantalla intensificadora O/N amb un film a -80°C. El dia següent es revela.

### 2.25.1.d Cribratge secundari

S'orienten els films sobre els filtres fent servir els forats que havíem fet. Amb una pipeta Pasteur s'agafa la porció d'agar on hi ha el positiu i es posa en un eppendorf on hi ha 1 ml de tampó SM i 20  $\mu$ l de cloroform. Es posa al vòrtex. Es fan diverses dilucions (1/10 i 1/100) i es repeteix el procés descrit en l'apartat anterior, però amb plaques de 10 cm de diàmetre. En el meu cas no vaig haver de repetir el cribratge (terciari), ja que vaig trobar positius que estaven força separats i es podien agafar bé.

### 2.25.1.e Escisió del fagèmid pBluescript SK(-) del vector $\lambda$ ZAP

En el vector  $\lambda$ ZAP s'ha clonat la zona d'inici de la síntesi de DNA i de finalització del fag fl a l'inici i al final del vector pBluescript. En infectar amb un altre fag aquest aporta les proteïnes necessàries per a l'escissió: es produeix un tall en una de les cadenes i se sintetitza DNA fins a trobar el senyal de terminació. Aquest DNA de cadena simple es circularitza pel gen II del fag fl. Els senyals d'empaquetament també es troben a la zona de finalització de la síntesi, amb la qual cosa el fagèmid se secreta fora dels bacteris. El fag *helper* (ExAssist) té una mutació ambre que impedeix la seva replicació en una soca d'*E. Coli* no supressora com les SOLR (e14<sup>-</sup> (mcrA)  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 sbcC recB recJ umuC::Tn5(Kan<sup>r</sup>) uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1  $\lambda^R$  [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15] Su<sup>-</sup>), i amb això s'evita la possible contaminació.

En un falcon es posen 200  $\mu$ l de la soca XL1-Blue MRF' (DO<sub>600</sub> = 1.0), 100 o 10  $\mu$ l del fag positiu i 1 ml del fag ExAssist. S'incuba 15 minuts a 37°C. S'afegeixen 3 ml de 2xYT i s'incuba a 37°C amb agitació durant 2.5 hores. S'escalfa el tub a 70°C durant 20 minuts per matar els bacteris, i se centrifuga 15 minuts a 4000 g. S'agafa 1  $\mu$ l i 50  $\mu$ l d'aquest sobrenedant, se l'afegeixen 200  $\mu$ l dels bacteris SOLR (DO<sub>600</sub> = 1.0) en un tub eppendorf. S'incuba a 37°C durant 15 minuts i es plaquejen 100  $\mu$ l sobre plaques d'LB-ampicil·lina que s'incuben O/N a 37°C.

Vam analitzar 10 clons positius: dels 10, 9 corresponien al gen buscat i, d'aquests 9, 7 tenien el gen amb la seqüència completa. Mostro ara una imatge de l'aspecte del cribratge primari i del secundari d'una de les plaques que va ser positiva.

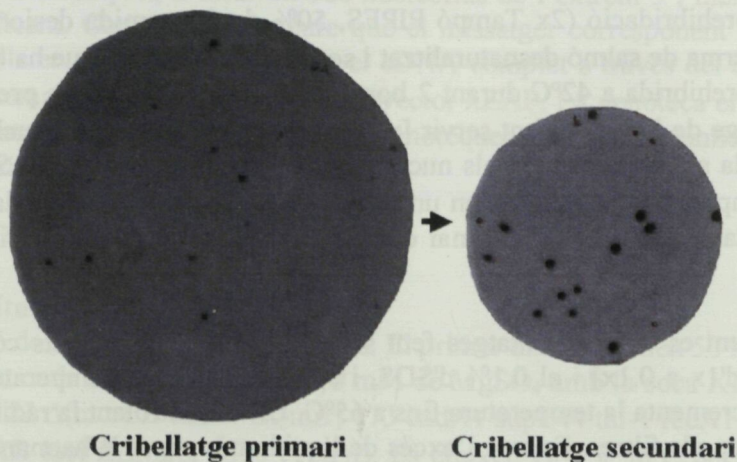


Figura 12. Resultat del cribratge de LyMAT en una genoteca de cDNA de cor en fags  $\lambda$ ZAP.

## 2.26 TRANSCRIPCIÓ *IN VITRO*

### 2.26.1 MÈTODE 1

Per produir el cRNA dels diferents clons de cDNA vam emprar el protocol següent. S'afegeixen 40 µl de barreja de transcripció a 10 µl de DNA linealitzat. Les concentracions finals dels diferents components són:

- DNA linealitzat 0.04 mg/ml
- Tampó de transcripció 1X: 40 mM de Tris-HCl, pH 7.9; 2 mM d'espermidina i 6 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega).
- 0.5 mM ATP
- 0.5 mM CTP
- 0.5 mM UTP
- 0.5 mM <sup>7</sup>GpppG (New England Biolabs)
- 0.1 mM GTP
- 10 mM DTT
- 1 unitat/ml d'inhibidor d'RNAases (RNA<sub>guard</sub> Pharmacia)
- 0.5 unitats/ml T3 o T7 RNA polimerasa (Promega)

Per produir cRNA de 4F2hc, vam emprar 1 unitat/ml d'SP6 RNA polimerasa. La composició del tampó de transcripció per a aquest enzim és lleugerament diferent: (1X: 40 mM de Tris, pH 8; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4 mM d'espermidina, 10 mM de NaCl i 50 mg/ml de BSA).

La reacció es fa durant 60 minuts a 37°C. Després d'aquest temps es torna a afegir polimerasa i inhibidor d'RNAases i la reacció continua durant una altra hora. Finalment, s'afegeix novament inhibidor d'RNAases i 10 unitats de DNAasa I lliure d'RNAases. Ara les mostres novament s'incuben a 37°C durant 10-15 min per digerir el DNA. Després, les mostres s'extreuen dues vegades amb fenol/cloroform i es precipiten afegint un volum d'acetat amònic, 5 M, i 2.5 volums d'etanol per eliminar els nucleòtids lliures. Les mostres es deixen a -80°C al menys durant 3 h, i després es centrifuguen a màxima velocitat durant 40 minuts, es renten amb etanol al 70% fred i s'assequen durant 1-2 minuts a 60°C. Els precipitats immediatament es resuspenen en 10 µl d'aigua tractada amb DEPC. 1 ml s'empra per mesurar la concentració llegint l'OD a 260 nm i un altre es fa migrar en un gel d'agarosa a l'1% per veure si els transcrits produïts estan o no degradats. L'RNA obtingut d'aquesta forma s'injecta en els oòcits a concentracions que varien entre 0.2 ng/µl fins a 0.5 ng/µl.

### 2.26.2 MÈTODE 2

El mètode 2 és bàsicament igual al primer però amb certes modificacions respecte al moment en què s'afegeix el rGTP.

La reacció és: - 2.5 µl RNAsin (Promega, 40 U/µl).

- 10 µl 5x tampó transcripció (Stratagene).
- 2 µl rNTPs mix (10 mM rATP, 10 mM rUTP, 10 mM rCTP, 1 mM rGTP).
- 1.5 µl Cap analogue (Pharmacia, 0.5 U/µl).
- 1.5 µl 1 M DTT (es barreja abans, es posa a 65°C, spin)
- 1 µl T7(T3) RNA polimerasa.
- 9 µl aigua-DEPC.

- 2.5 µl DNA (≈ 2 µg)

Es deixa durant 10 minuts a 37 °C. S'afegeix 0.5 µl 10 mM rGTP. Es deixa 10 minuts a 37°C. S'afegeix 0.5 µl 10 mM rGTP. Es deixa 10 minuts a 37 °C. S'afegeix 2 µl RNase free DNAase (Stratagene, 10 U/µl). Es deixa 20 minuts a 37 °C i s'extreu l'RNA mitjançant dissolvents orgànics i precipitació.

### 2.26.3 MÈTODE 3

Aquest últim mètode, que hem observat que és el més reproduïble i del qual s'obté molt més quantitat de DNA, correspon a l'equip mMessage mMachine (Ambion). El temps d'obtenció també és menor que en els altres. El procés s'ha dut a terme seguint les recomenacions de la casa comercial, la qual ha aconseguit les relacions òptimes entre els diferents components de la reacció.

### 2.26.4 TRANSCRIPCIÓ/TRADUCCIÓ *IN VITRO*

Aquest procés s'ha fet bàsicament seguint les indicacions de l'equip TNT<sup>TM</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems. En afegir membranes de microsomes de pàncrees de gos (catàleg Y4051) s'ha observat a vegades una disminució de la proteïna sintetitzada seguint les recomenacions de l'equip. En aquest cas hem vist que és bo reduir la quantitat de microsomes que s'afegeixen.

## 3. TÈCNiques RELACIONADES AMB ELS OÒCITS DE *XENOPUS*

### 3.1 MANIPULACIÓ DE LES GRANOTES, OBTENCIÓ D'OÒCITS I MICROINJECCIÓ

S'han utilitzat gripaus femelles de 110 mm de llargada (obtinguts de H. Kähler, Institut für Entwicklungsbiologie, Hamburg, Germany), que es mantenen en tancs d'aigua amb 15 o 20 litres d'aigua per gripau. Han estat sotmeses a un cicle llum-fosc de 12 hores en una habitació termostatitzada a 19-21°C. Se'ls alimentava dos cops a la setmana, els dilluns i els dijous amb pinso obtingut de H. Kähler i l'aigua es canviava cada dimarts i divendres.

Per a les operacions, s'escollia un gripau que no havia estat operat com a mínim en un mes, i es col·locava en un litre de solució MS222 (Sandoz) a 1 g/l preparada amb aigua de l'aixeta. El gripau es mantenia en aquesta solució durant 20 minuts. Després se'l rentava sota l'aixeta i se'l col·locava al damunt d'un conglomerat de gel, cobert amb draps mullats, per tal de mantenir l'estat anestesià de l'animal. Per tal d'evitar la dessecació, també es col·locaven draps mullats sobre el cap i les potes de l'animal. Es recollien petits grups d'oòcits de l'abdomen. Això s'aconsegua fent un petit tall (1 cm) a la pell superior i un tall de 0.5 cm a la pell interna i capa muscular. Després s'extreia de l'abdomen amb pinces la quantitat d'oòcits que es necessitava, i es col·locava sobre una placa de Petri que contenia solució ORII lliure de calci (82.5 mM de NaCl, 2mM de KCl, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM d'Hepes ajustada a pH 7.4 amb Tris; s'autoclavava). Després de l'extracció, la capa muscular i la pell interna es cosien juntes amb un punt de sutura, i la pell exterior amb dos punts de sutura.

Normalment els gripaus s'operaven de 6 a 10 vegades cadascun. Quan ja no produïen més oòcits es rebutjaven i es compraven gripaus nous.

Per tal d'eliminar les capes fol·liculars els oòcits es tractaven dos cops durant 90 minuts amb col·lagenasa D (Boehringer-Mannheim) a 2 mg/ml en solució ORII lliure de calci. Usualment, 10 ml de solució de col·lagenasa es col·locava en un tub estèril graduat de 15 ml i, després de tallar els lòbuls ovàrics en petites porcions d'aproximadament 1 cm amb tisores, els oòcits s'afegien fins a un volum de 3 ml, mesurat quan es dipositaven al fons del tub. El tub es guardava a la foscor a 18°C en un rotor orbital que girava a baixa velocitat (20 rpm). Després del tractament amb la col·lagenasa, els oòcits es rentaven acuradament amb solució ORII i amb solució de Barth modificada (MBS: 88 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 0.82 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2.4 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM d'Hepes ajustat a pH 7.5 amb Tris; s'autoclavava). Per tal d'eliminar la col·lagenasa, es feien de 4 a 6 canvis de solució, amb l'ajut d'una pipeta Pasteur connectada a una bomba de buit, i se substituïa aquest volum per un igual de ORII nou. Després es feien de 4 a 6 rentatges amb MBS, de la mateixa forma.

Després, els oòcits es classificaven en dues categories: els aptes per a la injecció i els que no ho eren. Per a la injecció només s'utilitzaven aquells que eren morfològicament intactes, amb aparença saludable dels estadis V-VI. Les característiques d'aquests oòcits de bona qualitat són: un pol animal pigmentat de color marró o negre, un pol vegetal groguenc, i un diàmetre d'1-1.2 mm. Les cèl·lules morfològicament alterades no són estables en cultiu i no es poden utilitzar en experiments d'expressió. De fet, després del primer examen, molts gripaus femella tenien uns pocs oòcits madurs o cèl·lules que presentaven plaques estranyes al pol animal. A les 4 setmanes, després de la primera operació, el mateix animal presentava oòcits morfològicament intactes. Alguns dels gripaus es van utilitzar fins a 10 vegades. La reutilització del mateix animal ajuda a reduir el nombre de gripaus necessaris i assegura l'obtenció d'un subministrament de bons oòcits.

Quan els oòcits havien estat classificats, s'incubaven a la foscor amb MBS, durant una nit a 18°C en un incubador. Després d'aquest període d'incubació, els oòcits sans dels estadis V i VI eren microinjectats amb RNA o aigua. La mateixa tarda es comprovava que encara continuaven sans. Si algun tenia un aspecte estrany, se l'eliminava per tal d'evitar la mort dels veïns.

Les mostres d'RNA poli(A<sup>+</sup>) es dissolien en aigua a concentracions que anaven des de 0.7 fins 1.0 mg/ml. La injecció s'efectuava amb un injector semiautomàtic (Inject+Matic-system, J.A. Gabay, Geneva). El volum injectat al pol vegetal de cada oòcit era de 50 nl. Els oòcits s'incubaven a 18°C, en MBS amb sulfat de gentamicina a 20 mg/l durant 1 a 7 dies abans de la mesura de la captació. La solució d'incubació es canviava cada dia. Amb aquest protocol es podien mantenir els oòcits amb un aspecte més o menys saludable durant 2 setmanes després de l'extracció del gripau.

## 3.2 ASSAJOS DE TRANSPORT

### 3.2.1 ENTRADA DE SUBSTRATS

Per cada dada individual s'utilitzaven de 7 a 10 oòcits. Els oòcits es rentaven primer durant 30 segons amb la solució A (100 mM de clorur de colina, 2 mM de KCl, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM d'Hepes ajustat a pH 7.5 amb Tris). Per iniciar el transport, aquesta solució se substituïa per 100 µl de la solució A suplementada amb la concentració desitjada de substrat a la activitat específica convenient. Les activitats específiques per als diferents substrats eren 10 µCi/ml per a L-arginina i L-leucina. Quan es feien estudis de cis-inhibició, l'aminoàcid utilitzat com a inhibidor s'afegia a la solució A i s'afegia clorur de colina als tubs de control per tal de corregir canvis d'osmolaritat.

Els experiments de captació es duïen a terme en un bany a 25°C. Després de la incubació amb l'aminoàcid radioactiu, s'extreïa la solució de transport i els oòcits es rentaven 3 cops amb 4 ml de solució d'aturada (solució A amb només 80 mM de clorur de colina, suplementada amb 20 mM d'L-leucina, 20 mM d'L-arginina i 2 mM d'L-alanina. Cada oòcit individual es col·locava en un vial d'escintil·lació, es dissolia en 200 µl d'SDS al 10% i la radioactivitat incorporada es mesurava després d'afegir 3 ml de líquid d'escintil·lació.

### 3.2.2 SORTIDA DE SUBSTRATS

Per a aquests assajos, 3 o 4 dies després de la injecció del corresponent cRNA, s'incubaven grups de 5-7 oòcits a 25°C durant 30 minuts (per a experiments amb rBAT i CAT-1) o 60 minuts (per experiments amb 4F2hc) en un medi que contenia 50 mM d'arginina o de leucina tritiades (3-10 mCi/90 ml). Després d'aquesta càrrega, el medi radiactiu es rentava 4 cops en solució A a 25°C. Després, l'efluxió es mesurava com l'aparició de triti en el medi d'incubació no marcat (600 ml o 1 ml de solució A o solució B, en la qual el clorur de colina està substituït per clorur de sodi, depenent de l'experiment) que contenia o no diferents concentracions d'aminoàcids. Quan es va emprar L-cistina, l'efluxió es va mesurar en presència de 10 mM diamida per prevenir la reducció de la cistina. L'efluxió es mesurava prenent parts alíquotes (200 µl) del medi a temps zero i a diferents temps. Les velocitats d'efluxió es calculaven restant l'efluxió a temps zero. Estudis previs van demostrar que després de restar el valor en temps zero, la recta passava per l'origen i hi havia linealitat durant 1 min, 2 min o 5 min per oòcits injectats amb CAT-1, rBAT o 4F2hc, respectivament.

Les dades d'efluxió estan expressades com la radiactivitat (cpm x 1000) que apareixia en el medi per unitat de temps (2 o 5 min) per grup de 5-7 oòcits, o com el percentatge de la radiactivitat total pre carregada en els oòcits que apareixia en el medi per unitat de temps (2 o 5 min).

### 3.2.3 TRACTAMENT AMB AGENTS SULFHIDRIL

Els agents sulfhidril són compostos químics que presenten una reactivitat molt elevada per grups tiol. Com que l'aminoàcid cisteïna presenta un grup tiol lliure, aquests reactius poden interaccionar amb aquest residu en una proteïna nativa. Fent

servir aquests reactius podem tenir informació estructural sobre una determinada proteïna.

Així els oòcits s'incuben amb una determinada concentració del compost en qüestió (per exemple  $\text{HgCl}_2$ , pCMBS, pCMB, MTS, DNTP, DNTB, NEM, etc.) el qual es prepara just abans de començar l'assaig, durant un temps determinat. Com que la inhibició provocada és de tipus irreversible, la concentració i el temps d'incubació s'han d'ajustar en cada cas. Es renten 3 vegades amb medi colina 1x, i es posa el medi de transport amb el traçador radioactiu.

Si es vol comprovar que l'efecte és específic de grups SH, es pot comprovar que agents amb molts grups SH, com ara el  $\beta$ -mercaptoetanol, reverteixen la inhibició. S'ha d'afegir just abans de passar els oòcits de la incubació amb l'agent sulfhidril. La concentració pot variar, però pot ser adequat començar amb una concentració d'1 mM.

### 3.3 ESTUDIS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

#### 3.3.1 METABOLISME D'ARGININA I LEUCINA

##### 3.3.1.a Reactius

- Fase mòbil: butanol: àcid acètic: aigua (4:1:1)
- Medi d'efluxió
- Medi de transport MGA (50  $\mu\text{M}$  d'arginina; 1  $\mu\text{Ci/ml}$ )
- Solució d'aminoàcid fred, 50 mM en tampó MGA
- Ninhidrina (0.2% en acetona)

##### 3.3.1.b Procediment

1. Es va utilitzar una placa de capa prima de silicagel, sobre la qual es van carregar al voltant de 50  $\mu\text{l}$  de medi d'efluxió. Com a control positiu de la presència d'arginina van carregar-se 10  $\mu\text{l}$  de medi de transport amb l'aminoàcid marcat (se sap prèviament la quantitat de radioactivitat present al medi de transport i al medi d'efluxió). Tant al control positiu com a les mostres s'afegiren 20  $\mu\text{g}$  d'aminoàcid fred per facilitar la localització de l'aminoàcid i poder demarcar les fraccions que després es tallarien.
2. Un cop carregada la placa i secs els punts d'aplicació, es va fer la cromatografia durant 6 hores, la placa es deixà assecat sota la campana extractora tota la nit, i tornà a deixar córrer durant 6 hores fins a una distància de migració equivalent a la inicial. Es deixà assecat la placa i els aminoàcids van visualitzar-se amb la solució de ninhidrina que es vaporitzà sobre la placa i es deixà desenvolupar la reacció de 2 a 3 minuts a l'estufa a 80-100°C.
3. Es dividí cada carril en uns 10 rectangles, que es van rascar individualment i van posar-se a comptar en 5 ml de líquid d'escintil·lació. Va calcular-se el percentatge de radioactivitat de les mostres localitzat als fragments corresponents a l'arginina (ho sabem pel control positiu).



### 3.3.2 METABOLISME DE CISTINA

Aquest procediment està adaptat del publicat en Schafer i Watkins (1984). Amb aquests experiments preteníem esbrinar quin era el destí de l'L-cistina un cop dins dels oòcits, en presència de diamida (un agent permeable que manté oxidat el glutatió intracel·lular).

S'utilitzà una placa de capa prima de silicagel. La fase mòbil era N-butanol:piridina:àcid acètic:aigua (3:2:0.6:1.5). Els controls positius eren L-cistina marcada amb  $^{35}\text{S}$  i L-cisteïna-NEM marcada igualment. Es prenia 1 mCi d'L-cistina (aproximadament 15 ml) i s'afegien 10 ml de 2.5 mM NaOH. A una meitat (A) se li afegien 12.5 ml de tampó fosfat 100 mM pH 7.4, i a l'altra (B) 12.5 ml de 100 mM DTT, 1 mM NaOH. Es deixava incubar 10 min a temperatura ambient perquè actués el DTT. Ara es prenia 1 ml de cada mostra i s'afegien 10 ml de 20 mM NEM en tampó fosfat 100 mM. Es carregaven els 11 ml. (A) és el control d'L-cistina i (B) el d'L-cisteïna-NEM.

Les mostres eren (1) medi amb L-cistina marcada amb  $^{35}\text{S}$ , després d'haver-hi oòcits incubats en ell; (2) oòcits injectats amb rBAT després d'haver estat incubats durant un cert temps en el medi anterior. La mostra (1) es preparava prenent 10  $\mu\text{l}$  de medi, afegint 5  $\mu\text{l}$  de NEM 20 mM, i finalment 5  $\mu\text{l}$  de TCA al 5%. La mostra (2) es preparava com segueix: 5-8 oòcits s'assecaven de l'excés de medi i se'ls afegien 50  $\mu\text{l}$  de NEM 20 mM. S'homogeneïtzaven amb una pipeta de 200  $\mu\text{l}$ , es passaven a un eppendorf i es centrifugava a velocitat màxima durant 5 min per treure el vitel. El sobrenedant es precipitava amb TCA al 5% per treure les proteïnes i ens quedàvem amb el sobrenedant. De la mostra (1) es carregava tot el volum, i de la mostra (2) es carregava una quantitat suficient de cpm (prèviament s'havien comptat oòcits en paral·lel per saber quantes cpm havien estat acumulades).

Un cop carregada la placa i secs els punts d'aplicació, es feia la cromatografia durant 90 min, es deixava assecar i s'exposava la placa cromatogràfica amb films sensibles per a autoradiografia.

### 3.4 ESTUDIS DE DEPLECIÓ D'mRNAS PER HIBRIDACIÓ AMB OLIGOS *ANTISENSE*

En oòcits de *Xenopus* s'ha demostrat que la utilització de RNA *antisense* (complementari) inhibeix la traducció de l'mRNA (Harland *et al.*, 1985; Melton *et al.*, 1985) i succeeix el mateix si s'utilitza DNA *antisense* (Kawasaki *et al.*, 1985; Fakler *et al.*, 1994).

#### 3.4.1 PROCEDIMENT

Es prepara l'mRNA a una concentració de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  amb aigua DEPC, prèviament a la injecció es feia una breu centrifugació per tal d'eliminar l'oligo dT que procedia de la columna on s'havia purificat l'mRNA. S'incubà en presència d'una solució de 20  $\mu\text{M}$  d'oligonucleòtids *sense* o *antisense* en NaCl 50 mM. Es van desnaturalitzar a 65°C durant 5 minuts i la incubació es va fer a 42°C durant 30 minuts. Després s'injectà l'mRNA als oòcits. L'*antisense* de la seqüència de conill utilitzat conté 17 mers, l'*antisense* de la seqüència humana (anomenat PIR) conté 21 mers. El *sense* utilitzat és de la seqüència de conill i conté 18 mers:

*Sense* (conill) 5'(775) GATGAAGTGCGAAACCAG 3'  
*Antisense* (conill) 5'(572) GCTGCC AGC AGG TTC TC 3' (seqüència complementària)  
*Antisense* PIR (humà) 5'(222)GAACAGCACCTCCTTGGGCAT 3' (seqüència complementària)  
 De forma anàloga es va procedir amb l'mRNA de pulmó i oligonucleòtids dirigits contra l'extrem 5'.

### 3.5 ANÀLISI DE PROTEÏNES

#### 3.5.1 MARCATGE METABÒLIC AMB METIONINA

Els oòcits eren injectats amb 35 ng del cRNA d'rBAT en un volum final de 50 nl. 24 hores després, 15-20 oòcits eren injectats ara amb 0.5 mCi de <sup>35</sup>S-metionina (ICN). Els oòcits eren ara incubats durant 30 hores a 18°C en 1 ml de solució Barth (MBS), i finalment es recollien per obtenir membranes totals. Les mostres marcades es fan migrar en un gel o poden servir per fer altres assaigs com ara immunoprecipitació. Al fer migrar les mostres, el gel es tenyeix amb blau de Coomassie i es renta amb aigua. Per incrementar la sensibilitat es pot incubar el gel durant 1 h en salicilat sòdic 1 M o en la solució Amplify (Amersham). Després s'asseca i s'exposa amb un film.

#### 3.5.2 MARCATGE DE PROTEÏNES DE MEMBRANA AMB BIOTINA

##### 3.5.2.a Marcatge

El procediment que presento seguidament està adaptat de Müller *et al.*, (1993). Tots els reactius emprats fins just abans de lisar els oòcits no han de contenir grups amino (per exemple, el pH de l'ORII s'ajusta normalment amb Trizma base, que conté grups amino; en aquest procediment, el pH de l'ORII emprat s'ajustava amb NaOH). El reactiu que s'empra és la NHS-LC-biotina (Pierce), un derivat de la biotina amb les seves mateixes propietats, però amb l'aventatge de què és soluble en aigua. 50-75 oòcits es rentaven 5 cops amb medi ORII. Prèviament s'havien preparat plaques de Petri de 35 mm de diàmetre plenes fins a la meitat d'agarosa al 2% en ORII i es vertien a sobre 1.9 ml d'ORII. Els oòcits rentats es col·locaven en la placa de Petri. Ara s'afegien 500 µl d'una solució de biotina (2 mg/500 µl d'ORII). Es barrejava i es deixava que procedís el marcatge a temperatura ambient durant 10 min.

La reacció s'aturava afegint 1 ml de 0.5 M de glicina pH 7.4. Seguidament es feien 3 rentatges amb la mateixa solució i 2 rentatges amb ORII. Finalment els oòcits eren transferits a un eppendorf i l'excés de líquid era assecat. S'afegien 500 µl de tampó de lisi (2% de Nonidet P-40, 150 mM de NaCl, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris pH 7.4 més 2 mM de leupeptina i pepstatina i 1 mM de PMSF). L'homogeneïtzació es feia passant els oòcits a través d'una pipeta de 200 µl 20 cops, i l'homogenat se centrifugava 2 cops a 1000 g, durant 10 min a 4°C per eliminar el vitel. El sobrenedant se sonicava durant 1 min a velocitat mínima i era novament centrifugat com abans.

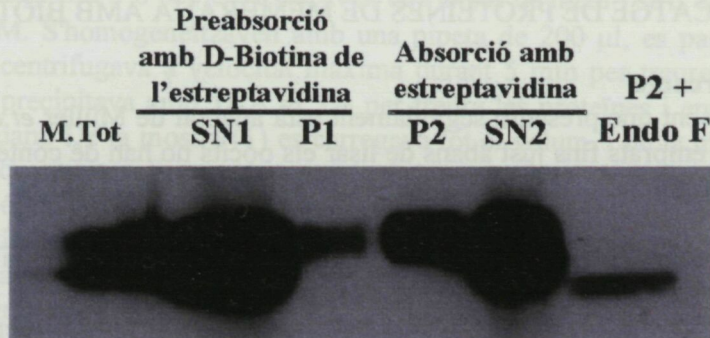
El sobrenedant es dialitzava tota la nit a 4°C contra un volum 2000 vegades més gran de tampó d'estreptavidina (0.3% de Nonidet P-40, 0.5 M de NaCl, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris pH 8 més els mateixos inhibidors de proteases

emprats en el tampó de lisi) i després se centrifugava durant 30 min a 14000 rpm a 4°C per treure el material insoluble. El sobrenedant s'incubava tota la nit amb 75 ml de boletes d'agarosa lligades a estreptavidina (prèviament rentades 3 cops amb tampó d'estreptavidina). Per comprovar que la unió era específica es pot comparar l'absorció amb boletes d'estreptavidina que s'han preincubats amb biotina com es mostra en la **figura 13**. El sobrenedant (proteïnes no biotinilades) i el precipitat (proteïnes biotinilades) se separaren per centrifugació a baixa velocitat (2000 rpm).

El sobrenedant es precipitava amb TCA al 5% i es resuspensava per sonicació en 150 ml d'LSB. Una meitat se separava i s'afegia DTT fins a 100 mM. Després les dues meitats (reduïda i no reduïda) es bullien durant 5 min i s'enmagatzemaven a -20°C.

Els precipitats eren eluïts afegint 100 ml d'LSB sense DTT i bullint 5 min. Ara, una meitat se separava i s'afegia DTT fins a 100 mM. Finalment, les dues meitats (reduïda i no reduïda) es bullien un cop més i es guardaven a -20°C. En alguns experiments els tampons de lisi i d'estreptavidina contenien a més 5 mM de NEM (*N*-etil maleimida).

Seguidament, mostro un experiment típic de biotinilació amb  $\beta_1$ -integrina la qual serveix com a control de biotinilació, ja que la forma present en la membrana plasmàtica té una mida superior a la present en membranes intracel·lulars.



**Figura 13.** Experiment de biotinilació i detecció de la proteïna  $\beta_1$ -integrina. En els pellets només apareix la forma de la proteïna present en superfície. En preabsorbir l'estreptavidina amb biotina disminueix la quantitat de proteïna que precipita, ja que la biotina un cop unida no es pot desplaçar (la constant d'unió és la més alta de la natura). En l'últim carril tractem les proteïnes de superfície amb endo F, per treure els glúcids.

### 3.5.3 PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES AMB ÀCID TRICLOROACÈTIC

A un volum determinat de mostra amb proteïnes s'afegia TCA fins al 5% i es deixava en gel 30 min. Se centrifugava a 10000 g, 5 min a 4°C i es descartava el sobrenedant. El precipitat es rentava 6 cops amb 500 ml d'una barreja 1:1 (vol/vol) d'etanol/èter freda, i finalment es resuspensava per sonicació en LSB. Si la mostra adquiria un color groguenc (indicant un pH baix), s'afegia Tris 1 M pH 8 fins que tornava al color habitual de l'LSB.

### 3.5.4 ASSAIG DE TIPUS TRANSFERÈNCIA WESTERN

#### 3.5.4.a Transferència Western d'rBAT expressat en oòcits

Es feia exactament igual que amb membranes de ronyó, excepte que la concentració habitual d'anticòs MANRX utilitzada era 1:100 i no 1:400 o 1:500.

#### 3.5.4.b Transferència Western de $\beta_1$ -integrina d'oòcits

Un cop fet l'SDS-PAGE de la manera habitual, la membrana es blocava amb llet desnatada en pols al 10% en PBS amb 0.05% de Tween-20 durant 30 min a 37°C. L'anticòs utilitzat era el monoclonal 8C8, que només reconeix la  $\beta_1$ -integrina de *Xenopus* no reduïda, i per això només s'utilitzaven les mostres no reduïdes per a detectar  $\beta_1$ -integrina. S'incubava la membrana amb l'anticòs 8C8 diluït 1/10 en solució de blocatge durant tota la nit a temperatura ambient. Els rentatges, tant per a l'anticòs primari com pel secundari, es feien amb PBS amb un 0.05% de Tween-20 sense azida sòdica, a 37°C. Per al primari es feien 2 rentatges ràpids seguits d'un de 15 min i 2 de 5 min. Ara s'incubava amb l'anticòs secundari (*goat anti mouse*) lligat amb peroxidasa, a una dilució 1/1000 en solució de blocatge durant 1 h. Els rentatges del secundari eren els següents: 1 de 15 min i 4 de 5 min. Seguidament es revelava per ECL (Amersham), seguint estrictament el protocol dels fabricants.

### 3.5.5 EXPERIMENTS DE *BINDING-ASSAYS*

Amb aquesta tècnica es pot obtenir una mesura semiquantitativa dels nivells d'una proteïna en la membrana plasmàtica. Es requereix un anticòs que detecti un epítop extracel·lular de la proteïna que estudiem. En el meu cas vaig estudiar els nivells de la proteïna 4F2hc en la superfície, fent servir l'anticòs de ratolí monoclonal anti-CD98 (Immunotech, Marseille, France).

3-4 dies després de la injecció del cRNA, 8 oòcits es van col·locar en un tub eppendorf que contenia el tampó PBSm (PBS modificat): 137 mM de NaCl, 9 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.4 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4) i 2% (w/v) d'ovoalbumina. Els oòcits van ser rentats 3 vegades en aquest tampó. Seguidament, es van incubar durant 3 hores a 4°C en 0.5 ml d'una dilució 1:25 de l'anticòs primari dissolt en PBSm. Es van rentar 3 vegades amb PBSm i es va tornar a incubar en 0.4 ml d'una dilució 1:200 d'anticòs *goat anti-mouse* biotinitat (Sigma) en PBSm durant 1 hora a 4°C, es va rentar 3 vegades i es va incubar finalment en 0.3 ml amb 0.3 mCi de [ $^{125}\text{I}$ ]-estreptavidina (Amersham, Arlington Heights, III) durant 1 hora a temperatura ambient. Es va rentar 3 vegades amb PBSm i es va comptar directament la radioactivitat fent servir un comptador gamma. Els valor de radioactivitat que vam trobar associats a oòcits no injectats era de  $5600 \pm 500$  cpm.

### 3.5.6 IMMUNOCITOQUÍMICA SOBRE TALLS D'OÒCITS

Un cop analitzat el transport com a control d'expressió, grups de 5 oòcits es preparen per al posterior processament. És convenient que les dosis de cRNA injectades siguin altes, per tenir una sensibilitat més alta. Es posen en criomotlles (Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, IN) on s'ha afegit una mica del compost OCT (Agar Scientific Ltd, Essex, England). S'intenta treure l'aigua que porten els oòcits i s'omple amb més compost OCT, tot sobre neu carbònica en contacte amb una superfície metàl·lica per afavorir la transmissió del fred. Es guarden a -80°C.

Es tallen seccions (15 µm) i es munten en portaobjectes de vidre pretractats amb un 0.5% de gelatina. S'assequen 10 minuts a 37°C. Per afavorir les incubacions es marquen els talls exteriorment amb un retolador PapPen que impedeix que l'aigua s'escampi. Es fixen les seccions amb un 3% de paraformaldèhid en PBS, s'incuba amb 100 mM de glicina en PBS durant 10 minuts (redueix l'autoimmunofluorescència), es permeabilitza amb un 1% de TX-100 en PBS durant 10 minuts, es renta 3 vegades amb PBS i es bloca amb un 10% de sèrum fetal boví durant 30 minuts.

Depenent de l'anticòs primari la dilució pot variar; així, hem vist que és idoni una dilució en PBS 1/50 per detectar 4F2hc (CD98, Immunotech, Marseille, France), 1/25 per a  $\beta_1$ -integrina (anticòs 8C8, obtingut de Dr. A.H.J.Muller, Max Planck Institute für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Germany) o 1/500 per a l'anticòs monoclonal 9E10 anti-*myc* (ATCC, Manassas, VA). Els anticòsos primaris de conill acostumen a donar nivells alts de marcatge en oòcits no-injectats, ja que el conill acostuma a fer anticòsos anti-queratina, proteïna expressada altament en els oòcits. S'incuben durant 1 h a RT, es renten 3 cops amb PBS, s'incuben amb 7.5 mg/ml *Texas red-conjugated goat anti-mouse* (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) durant 1 h a RT. La fluoreceïna no és un fluorocrom molt adequat, ja que els oòcits presenten un grau molt elevat d'autofluorescència. Es renten 3 cops amb PBS, es munten en immunofluore (ICN, Madrid, Spain), es deixen assecar tota la nit i s'observen posteriorment mitjançant microscòpia confocal en els Serveis Científic tècnics. Alguns detalls tècnics d'aquest protocol es poden consultar en l'apartat d'immunolocalitzacions de cèl·lules en cultiu.

A l'hora de fer les observacions al microscopi és important recordar que en els oòcits el reticle es troba molt a prop de la membrana plasmàtica, es parla d'un reticle cortical. Aquest fet pot portar a confusions respecte de si una proteïna es troba o no en la membrana plasmàtica.

### 3.5.7 FREEZE-FRACTURE EN OÒCITS

Aquesta tècnica es basa en el mètode descrit per Zampighi *et al.*, (1995) i té la finalitat de calcular el nombre de proteïnes exògenes expressades en la membrana plasmàtica dels oòcits de *Xenopus*. El mètode es basa en el fet que els oòcits no injectats presenten una densitat molt baixa de partícules endògenes en les cares protoplasmàtiques (P), i en expressar proteïnes exògenes incrementa el nombre de partícules en les cares P, però no en les cares exoplasmàtiques. Una vegada hem mesurat el transport i vèiem que els oòcits expressen la proteïna en qüestió, comença el protocol.

#### 3.5.7.a Protocol

##### - Fixació

Es posa un portaobjectes amb 2 gillettes en els dos extrems. Al mig es dibuixa la forma d'un oval amb un retolador PapPen, de forma que en posar la solució aquosa el líquid no surt fora d'aquest dibuix. Es dipositen els oòcits (4-5) que han passat abans 1 minut per la solució de fixació: 3.5% de glutaraldèhid en 0.2 M de cacodilat sòdic pH 7.4. Amb un portaobjectes, suaument, s'intenten aplastar els oòcits sense arribar a trencar-los. Tenir els oòcits amb aquesta forma d'el·lipse facilita després

l'obtenció de grans zones de membrana. Després de 15 minuts, es treuen els oòcits i es posen 1 h en la mateixa solució a temperatura ambient.

#### - Criofractura

Els oòcits en forma d'el·lipse s'infiltra amb un 25% de glicerol en 0.2 M de cacodilat sòdic durant 1 h a temperatura ambient. Es tallen en trossos petits sota una lupa i es posen en els especimens Balzers, amb la cara vitel·lina mirant cap a fora. Normalment es posa el pol animal de l'oòcit. Es congela per immersió en propà líquid refredat per nitrògen líquid. Els oòcits congelats es transfereixen a l'aparell de *freeze-etching* (en els Serveis Científic tècnics). Es fracturen a  $-150^{\circ}\text{C}$  a  $10^{-7}$  mbar de pressió parcial. Les superfícies fracturades se sombrejen amb platí a  $45^{\circ}$  i carboni a  $90^{\circ}$ . Els especimens replicats s'agafen en un 0.5% de col·lodió en acetat d'amil, per evitar que la rèplica es fragmenti i es renten en una solució de lleixiu O/N. Es renten amb aigua destil·lada i es dipositen en portaobjectes de coure per al microscopi electrònic. El col·lodió es treu per immersió en acetat d'amil.

#### - Observació al microscopi electrònic

S'intenten agafar 3-4 rèpliques de cada oòcit per intentar que la densitat de partícules sigui més representativa del mateix oòcit. Les rèpliques es miren al microscopi electrònic a 25000x. En primer lloc s'han d'identificar dins de la rèplica zones que puguin correspondre a membrana plasmàtica i no a membranes intracel·lulars. En la figura inferior es mostra un exemple de membrana. La presència de grànuls corticals sempre és una bona pista per saber on s'ha de mirar.

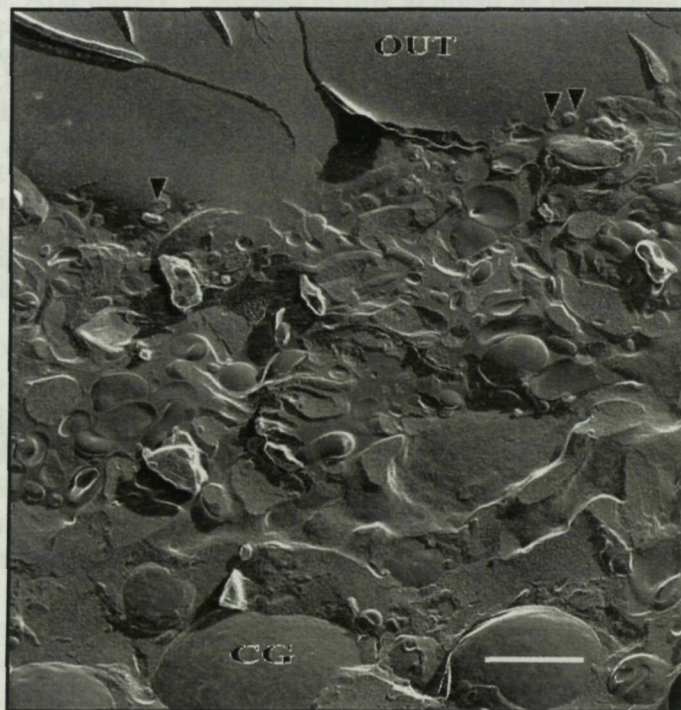


Figura 14. Rèplica d'un experiment de criofractura d'oòcits *squeeze-fixed* 4 dies després de la injecció amb 4F2hc. La rèplica mostra una panoràmica de la membrana: CG (grànuls corticals), microvil·li i àrees de cares de fractura protoplasmàtiques (P) i exoplasmàtiques (E) de la membrana plasmàtica, les quals són requerides per a la quantificació de la densitat de partícules intramembranals. Les fletxes assenyalen un microvil·li de forma transversal. Magnificació: x16.000. Línia de calibratge:  $0.25\ \mu\text{m}$ .

Un cop s'ha identificat una zona candidata de membrana el pas següent és identificar quines cares de fractura són P, quines E, quines no contenen rèplica i quines cares són conseqüència de doble fractura. A vegades, l'observació dels microvil·lis pot ajudar a diferenciar-les, però és molt més evident quan s'observen els negatius, ja que cada cara presenta un aspecte diferent. Com es pot apreciar en la figura inferior la zona sense rèplica no presenta cap tipus de rugositat. Les cares E presenten partícules de mida més gran i són còncaves. Més difícil és la diferència entre cares P i de doble fractura: aquestes últimes presenten una rugositat més gran i a més les cares P tenen una forma convexa.

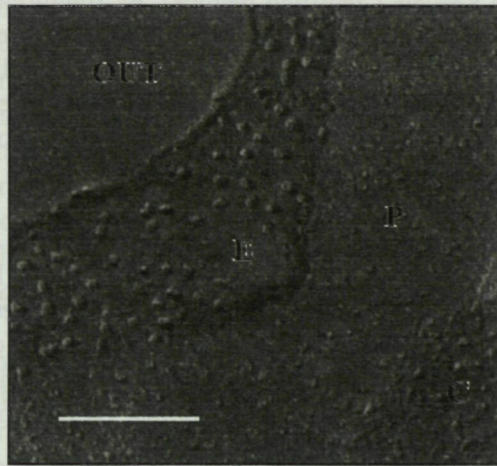


Figura 15. Cares de fractura de la membrana plasmàtica d'un oòcit expressant 4F2hc 4 dies després de la injecció. Mostra superfícies de cares de fractura P (protoplasmàtica) i E (exoplasmàtica). A vegades el pla de fractura va cap al citoplasma (C), com en aquesta imatge d'un plec (*fold*). La cara P conté partícules de  $14.5 \pm 0.3$  nm de diàmetre ( $n = 52$ ) a una densitat de  $825 \pm 68$  partícules/ $\mu\text{m}^2$  ( $0.98 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 13$ ). D'altra banda, la cara P d'oòcits no injectats té partícules de  $6.9 \pm 0.2$  nm ( $n = 44$ ) a una densitat de  $273 \pm 37$  partícules/ $\mu\text{m}^2$ . Les proteïnes de membrana expressades apareixen com partícules únicament en la cara P (Zampigui *et al.*, 1995). En els nostres experiments, la injecció del cRNA de 4F2hc provoca un increment de la densitat de partícules intramembrana (IMPs) en la cara P amb un diàmetre més gran ( $10.4 \pm 0.3$  nm,  $n = 43$ ) que les IMPs dels oòcits no injectats. Magnificació:  $\times 53000$ . Barra de calibratge:  $0.3 \mu\text{m}$ .

#### - Quantificació de la densitat de partícules

Els negatius es revelen a una ampliació final de 75000x i es digitalitzen en un escàner amb alta resolució (200 o 300 d.p.i.). En primer lloc es tracten en Adobe Photoshop i la imatge tractada es transfereix al programa IMAGE 1.6, *software* obtingut a través d'Internet a l'adreça [zippy.nimh.nih.gov](http://zippy.nimh.nih.gov). De cada imatge es quantificava l'àrea de la cara P i el nombre de partícules intramembrana. En la figura inferior presento un exemple d'aquesta quantificació.

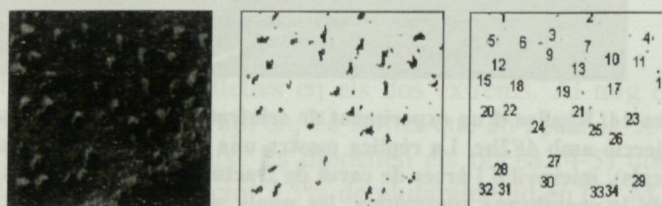


Figura 16. La imatge digitalitzada es converteix en forma binària (ADOBE) que es finalment quantificada (IMAGE).

## 4. TÈCNiques RELACIONADES AMB ELS CULTIUS CEL·LULARS

### 4.1 LÍNIES CEL·LULARS UTILITZADES. NORMES GENERALS DE MANIPULACIÓ

#### 4.1.1 INTRODUCCIÓ

En la present tesi s'han utilitzat com a model dues línies cel·lulars establertes:

- a) Cèl·lules COS-1 (ATCC CRL, 1650) procedents de ronyó de simi verd, presenten un fenotip fibroblàstic i tenen incorporat al seu genoma una sola còpia de la part alíquota primerenca sencera del genoma del virus SV40. Les cèl·lules COS han estat àmpliament utilitzades en molts treballs per a l'estudi de diferents proteïnes transfectades de forma transitòria. No presenten expressió endògena de l'mRNA d'rBAT (Yan, 1992) ni de LyCAT (present tesi).
- b) Cèl·lules RAW 264.7 (ATCC TIB-71). Es van establir a partir d'un tumor fent servir el virus de leucèmia murí Abelson. Expressen endògenament el missatger de LyCAT (vegeu "Resultats i discussió").

En la manipulació de cèl·lules en cultiu és imprescindible observar les normes més extremes de netedat. Es treballava sempre sota campana de flux vertical. Sempre que s'havia de començar a treballar es rentaven les mans amb sabó i es fregaven amb etanol al 70%. Així mateix, s'encenia el flux al nivell de funcionament, i es netejava la plataforma de treball amb etanol al 70%. Després que s'hagués evaporat l'etanol s'encenia la flama. Tot el material estèril fungible es guardava preferentment dins de la sala de cultius. Les bosses que contenien el material estèril havien de mantenir-se ben tancades i només havien d'obrir-se sota el flux de la campana. Els medis de cultiu i les solucions que havien d'estar en contacte amb les cèl·lules es preescalfaven a 37°C al bany de la sala, s'eixugaven i es passava etanol al 70%. Tota substància o material que hagués d'estar en contacte amb les cèl·lules havia de ser estèril (per filtració, autoclavament, irradiació, etc.). Les ampolles estèrils només s'obrien sota la campana, i es flamejava el tap abans i després d'utilitzar-les, i es posa en acabar cinta adhesiva al voltant del tap. Les deixalles biològiques es tractaven amb lleixiu al 30%. Després de treballar a la campana es tornava a netejar amb etanol al 70% i es reduïa el flux a les condicions de manteniment. Es feien neteges periòdiques de la campana i de l'incubador per evitar contaminacions. Abans de treballar s'encenia el llum ultraviolat de la campana durant 10 minuts. Com que dins de la campana el flux és vertical, no s'han de passar les mans per sobre de qualsevol material destinat a contactar amb cèl·lules.

Les condicions de cultiu van ser sempre 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO<sub>2</sub>. Els medis de cultiu preparats sense suplementar es guardaven a 4°C. La suplementació consistia en l'addició de substàncies com ara la L-glutamina, aminoàcids no essencials, antibiòtics, sèrum fetal boví, etc suplementes que s'acostumaven a guardar a -20°C. El sèrum boví fetal (FBS) era sotmès a un tractament previ d'inactivació del complement i d'anticossos que poguessin trobar-s'hi presents durant 30 minuts a 56°C. Els antibiòtics utilitzats rutinàriament van ser penicil·lina (inhibeix la síntesi de peptidoglicans en la paret bacteriana) i estreptomycina (inhibeix la síntesi del ribosoma 70S bacterià) i a aquests s'ha afegit l'us de la geneticina (G418, Gibco BRL, inhibeix la síntesi proteica) quan es



seleccionen línies transfectades establement. El medi de cultiu, que és d'un color vermellós, pot presentar una tonalitat groguenca a causa de canvis en el pH que es poden produir per depleció de nutrients o contaminació bacteriana. En el primer cas es canvia el medi, mentre que en el segon cas es llença.

#### 4.1.2 CONDICIONS DE CULTIU DE LES CÈL·LULES COS-1

##### 4.1.2.a Composició del medi suplementat

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): sense glutamina, sense Hepes, amb 25 mM d'L-glucosa 25 mM (BioWhittaker, #12-614F)
- 2 mM d'L-glutamina (BioWhittaker, #12-605A)
- 100 IU/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina (BioWhittaker, #17-602A)
- 25 mM d'Hepes estèril per filtració 0.22 µm, pH 7.4
- 10% Sèrum boví fetal (FBS) inactivat (BioWhittaker, #14-601B)

A 500 ml de DMEM s'afegien 5 ml de la barreja d'antibiòtics comercial, 5 ml d'L-glutamina 200 mM, 10 ml d'Hepes 1.25 M, pH 7.4, i 50 ml d'FBS inactivat.

##### 4.1.2.b Tripsinització

Es partia normalment d'un flascó de 75 cm<sup>2</sup> mare confluent (90-100%) que contenia les cèl·lules per al passatge seriat. No s'han de tripsinitzar les cèl·lules quan estan hiperconfluents, ja que poden tenir característiques que dificultin la tripsinització. En principi, aquestes cèl·lules no presenten limitacions en el nombre de passades.

El protocol era el següent:

- S'elimina el medi que cobria les cèl·lules.
- Es renten les cèl·lules 2 cops amb 10 ml de PBS.
- S'afegeixen 3 ml de tripsina (Tripsina-EDTA 1x, Boehringer-Mannheim, #210242). S'espera al voltant de 3 minuts a RT i es monitoritza al microscopi el desenganxament. Si es resisteixen es continua el procés a 37°C, evitant la sobreexposició per evitar causar danys importants a les cèl·lules.

Per acabar de desenganxar-les es donen lleugers cops al flascó amb el palmell de la mà i immediatament s'afegeixen 7 ml de medi per tal d'inhibir la tripsina. Es centrifuguen les cèl·lules a 220 g (1500 rpm) durant 5 minuts, es descarta el sobrenedant i es resuspèn amb medi nou. Es compta una part alíquota de les cèl·lules en una càmara de Neubauer i es fan les dilucions necessàries per tal de sembrar 10<sup>6</sup> cèl·lules per placa de 10 cm de diàmetre en un volum de 10-15 ml finals i 125000 cèl·lules per als experiments de transfecció transitòria. Per als estudis d'immunolocalització sobre el microscopi òptic es preparaven prèviament les plaques sobre les quals se sembren les cèl·lules, cobrint part de la seva superfície amb cobreobjectes estèrils, a sobre dels quals creixen les cèl·lules.

##### 4.1.2.c Congelació d'estocs

Després d'una tripsinització es poden també congelar cèl·lules per mantenir un estoc. De 5 a 10 milions de cèl·lules (flascó de 75 cm<sup>2</sup> confluent), es tripsinitzaven, es centrifugaven i es resuspenien amb 9 ml de medi al qual s'afegia DMSO estèril (Sigma, D2650). Es disposaven 1.5 ml d'aquesta suspensió ràpidament en criotubs que es traslladaven a -80°C, col·locats dins d'un tros d'espuma foradada, amb el qual la congelació era més lenta. Després es feia el trasllat a un tanc de nitrogen líquid.

#### 4.1.2.d Descongelació d'estocs

La descongelació s'ha de fer ràpida per tal d'eliminar el DMSO del medi. Es posa el criotub a 37°C, es diposita el contingut sobre un tub Corning que conté 20 ml de medi, es centrifuga, es treu el medi i es tornen a resuspendre en poc volum per tal de que els factors de creixement estiguin més concentrats i s'afavoreixi el creixement.

#### 4.1.3 CONDICIONS DE CULTIU DE LES CÈL·LULES RAW 264.7

Aquestes cèl·lules es fan créixer en medi Eagle's modificat Dulbecco's amb 4 mM L-glutamina amb 1.5 g/l de bicarbonat sòdic, 4.5 g/l de glucosa i 1 mM de piruvat sòdic; tot això és un 90%. El 10% restant és sèrum boví fetal (FBS).

Els subcultius es preparen rasant, es treu el medi vell, i es posa en un nou flascó. Normalment, es recomana una dilució de 1:2 o 1:6.

### 4.2 TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DE CÈL·LULES COS-1

Atès que les cèl·lules COS tenen incorporat en el seu genoma l'antigen T en transfectar-les transitòriament amb plasmidis que contenen l'origen de replicació del virus SV40, el plasmidi introduït s'autoreplica i, per tant, s'incrementa el nombre de còpies per cèl·lula. Normalment no se seleccionen per integració estable ja que el nombre elevat de còpies compromet la viabilitat cel·lular. Hem utilitzat el vector pCDNA3 (Invitrogen) a les transfeccions de rBAT, b<sup>0,+</sup>AT, N-myc-LyCAT i N-myc-LyCATΔC. El vector té un gen de resistència a l'ampicil·lina, té el promotor del gen primerenc del citomegalovirus humà, un *polylinker* i un fragment del gen de l'hormona de creixement humà (hGH), que inclou el senyal d'acabament de la transcripció i el senyal de poliadenilació d'aquest gen.

El reactiu que hem utilitzat per transfectar és el Fugene<sup>TM</sup> (Boehringer Mannheim, #1814443). El DNA plasmídic que hem utilitzat s'ha obtingut a partir de diverses minipreparacions (Qiagen), s'ha precipitat amb etanol, rentat amb etanol al 70% i s'ha resuspès amb aigua Milli-Q estèril. S'ha escollit una relació d'1 μg de DNA i 3 μl de reactiu Fugene.

En primer lloc s'afegeix el reactiu Fugene sobre medi de cultiu (100 ml) en un eppendorf directament (no sobre les parets d'un eppendorf ja que es pot adsorbir al plàstic). S'incuba durant 5 minuts. Aquesta barreja s'afegeix al DNA en un altre eppendorf i s'incuba durant 15 minuts. Finalment aquesta barreja s'afegeix sobre la placa de cultiu. Entre les 24 i les 48 hores després de la transfecció es fan els experiments pertinents (immunocitoquímica, transport, etc.).

### 4.3 TRANSFECCIÓ PERMANENT DE CÈL·LULES RAW 264.7 AMB CONSTRUCTES D'ORIENTACIÓ *SENSE* I *ANTISENSE* DE ratLYCAT

La transfecció permanent permet treballar amb una població homogènia de cèl·lules que han incorporat al seu genoma el DNA exogen desitjat. En el nostre cas la transfecció ha estat la de fragments truncats del cDNA d'rLyCAT en orientació *sense* o *antisense*. S'ha escollit el fragment EcoRI corresponent als primers 673 parells de

bases del cDNA. S'ha observat que vectors transfectats de forma transitòria que contenen el promotor de citomegalovirus s'expressen a nivells molt baixos o no s'expressen. Vam utilitzar un vector quimèric pCDNA3-BOS, on s'havia intercanviat el promotor CMV pel promotor BOS, corresponent al factor de traducció E2 $\alpha$ . Aquest vector va ser construït per Marta Barrachina, del grup del professor Antonio Celada.

La selecció dels transfectants estables s'efectua amb l'antibiòtic geneticina. Prèviament a la transfecció es va dur a terme una corba de supervivència de les cèl·lules RAW 264.7 per utilitzar la dosi mínima letal. Aquesta dosi va ser de 0.5 mg/ml, la qual causa un 100% de mortalitat als 6 dies després de la seva aplicació. Les cèl·lules es van transfectar amb el reactiu Fugene<sup>TM</sup>, però amb la proporció de 2  $\mu$ g de DNA i 3  $\mu$ l de reactiu, ja que es va veure que era més eficient.

El primer dia es va fer la transfecció en plaques de 10 cm<sup>3</sup>. Al dia següent es van rascar les cèl·lules i es van repartir en 4 plaques a diverses dilucions. Així, en una d'aquestes dilucions els clons no estaven molt junts i es podien aïllar amb més facilitat. En aquest moment es va afegir la geneticina a la concentració adient.

Es van deixar passar ara de 2 a 3 setmanes fins que es van morir les cèl·lules que no havien incorporat el plasmidi, després les cèl·lules on el plasmidi s'havia transfectat però no s'havia integrat i les cèl·lules on el plasmidi s'havia integrat es deixaven créixer fins que es veien a simple vista ( $\approx$  5 cm). Durant aquest temps es van fer diferents canvis de medi i sempre es mantenia la pressió selectiva de la geneticina.

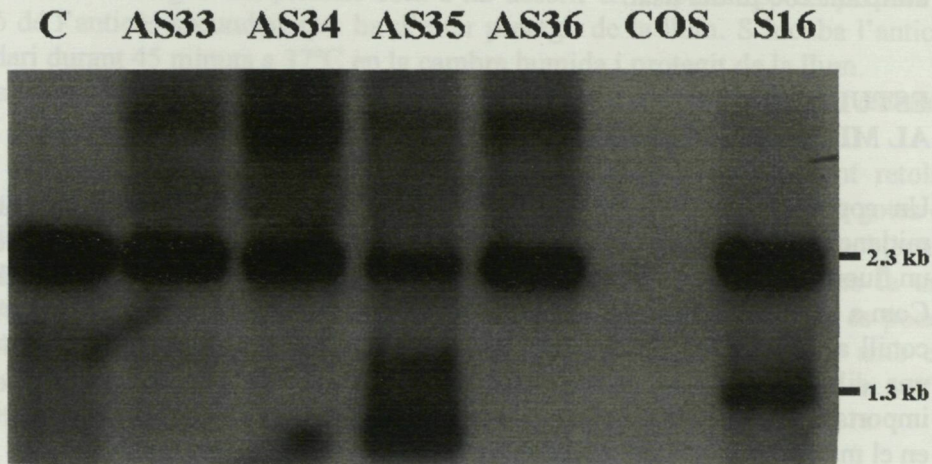
Per aïllar els clons es van aspirar amb una pipeta d'1 ml. Per afavorir que creixessin ràpidament es van posar primer en plaques multipou de 96 amb poc volum de medi. Quan eren confluents es van passar a plaques multipou de 24, després a plaques multipou de 6 i finalment es van passar a plaques de 10 cm<sup>3</sup> i també es van congelar dues parts alíquotes en criotubs.

Les plaques de 10 cm<sup>3</sup> es van processar per obtenir RNA. Per veure si els clons expressaven el transcrit exogen es van analitzar per assaig de transferència Northern fent servir com a sonda el fragment de DNA de 673 parells de bases de LyCAT. D'aquesta forma podíem detectar el transcrit exògen però també estudiar els nivells de l'mRNA de LyCAT de les cèl·lules RAW.

Es va observar que una gran proporció de clons expressaven els transcrits exògens, amb diferents nivells d'expressió. Es van analitzar 24 clons transfectats amb el plasmidi *sense* i 36 clons amb el plasmidi antisense. Per contra es va observar que molts pocs clons *antisense* (3) presentaven una caiguda dels nivells de l'mRNA endogen. Així, no hi havia correlació entre els nivells d'expressió del transcrit exògen *antisense* i els nivells dels transcrits endògens. És possible, però, que aquests clons també inhibeixin l'expressió de la proteïna endògena en interferir la síntesi de la proteïna.

Un cop vam escollir alguns clons, dels quals mostro una figura, es van posar a créixer una de les parts alíquotes i se'n van congelar moltes més per tenir estocs de seguretat. Seguidament es van estudiar aquests clons de manera funcional.

Ens vam decidir per a fer transfeccions estables i no transitòries per la gran quantitat de proves funcionals que volíem dur a terme (transport en lisosomes, mesures d'òxid nítric, fagocitosi, etc.).



**Figura 17.** Transferència Northern que mostra un dels clons estables antisense seleccionats (AS35). L'RNA 18S era igual en tots els carrils.

#### 4.4 ASSAJOS DE TRANSPORT EN CÈL·LULES COS-1

S'han realitzat sobre plaques multipou de 3.5 cm de diàmetre prèviament transfectades 48 hores abans amb pCDNA3, pCDNA3-hrBAT, pCDNA3-hrBAT i pCDNA3-b<sup>0,+</sup>AT (construït per Núria Reig).

##### 4.4.1 REACTIUS

- Tampó de transport: 12.5 mM d'Hepes, 3 mM de KCl, 1.2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 136 mM de NaCl o clorur de colina, depenent de si el transport es fa en presència o absència de sodi. S'ajusta el pH a 7.4 amb Trizma base.

- Tampó d'aturada del transport: és el tampó de transport amb 10 mM d'arginina i 10 mM de leucina. Es manté en gel durant tot el procés de transport.

- Solució de lisi: 0.1 M de NaOH, 0.1% de SDS.

- Barreja radioactiva: conté el tampó de transport, aminoàcid fred a la concentració desitjada i aminoàcid radioactiu (1 µCi/ml). L'activitat específica de l'aminoàcid marcat és molt alta i no modifica la concentració final. S'afegeix 1 ml de barreja radioactiva per pou.

##### 4.4.2 PROCEDIMENT

1. Es renta el pou dos cops amb el tampó de transport i s'afegeix la barreja radioactiva. S'ha d'afegir amb cura per no desenganxar les cèl·lules. Al temps determinat es treu la barreja radioactiva i es renta 3 cops amb solució freda d'aturada, tot amb l'ajut d'una bomba de succió.

2. La lisi de les cèl·lules s'aconsegueix amb 1 ml de solució de lisi per pou. S'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient.

3. El comptage es fa per escintil·lació líquida. S'agafen 200 µl de lisat. Els vials s'agiten vigorosament.
4. Es determina la concentració de proteïnes mitjançant el mètode de Bradford, utilitzant 200 µl del lisat.

#### **4.5 ESTUDIS D'IMMUNOLocalització SOBRE CÈL·LULES EN CULTIU AL MICROSCOPI ÒPTIC**

Un cop les cèl·lules estan transfectades, les proteïnes expressades s'han detectat mitjançant una tècnica indirecta, és a dir, utilitzant anticossos secundaris conjugats a un fluorocrom (FITC, TRITC) que detecten les cadenes pesades d'un anticòs primari. Com a anticossos primaris hem utilitzat un anticòs dirigit contra rBAT (MANRX) de conill a una dilució 1/200 i l'anticòs monoclonal 9E10 que reconeix l'epítip *myc* a una dilució 1/500. La dilució de l'anticòs secundari ha estat sempre d'1/50. És important que les cèl·lules no iguin massa confluents per tenir una millor resolució en el marcatge.

##### **4.5.1 REACTIUS**

- PBS estèril
- Metanol absolut fred (-20°C). També es fa servir paraformaldehid al 3% en PBS
- Azida sòdica 2%
- BSA 1% en PBS (amb azida sòdica al 0.005%)
- Anticossos primaris i secundaris adients.
- Medi de muntatge Immunofluore Mounting Medium (ICN)
- Hoechst 33342 (Sigma)
- Cobreobjectes de vidre de 10 mm de diàmetre, esterilitzats per tractament amb calor seca (estufa a 200°C, 4 hores o estufa a 65°C 12 hores)
- Placa de Petri quadrículada i recoberta amb paper d'alumini
- Cambra humida (safata amb paper de cel·lulosa humit)
- Cubeta amb suport per als cobreobjectes
- Pintes de cirurgia de precisió

##### **4.5.2 PROCEDIMENT**

1. S'aspira el medi i es renta la placa dos cops amb PBS.
2. Es fa la fixació ja sigui amb metanol fred (5 minuts) o paraformaldehid al 3% en PBS durant 10 minuts. Es retira el fixador, es renta dos cops amb PBS i s'afegeix PBS amb azida sòdica al 0.02%. Aquesta placa es pot guardar a 4°C durant un mes, vigilant que no es quedi seca.
3. Se seleccionen els cobreobjectes que es volen utilitzar i es renten breument amb PBS durant 5 minuts en la cubeta amb suport per a cobreobjectes. És molt important saber durant tot el procés quina és la cara del cobreobjectes que té les cèl·lules. En el cas de fer-se la fixació amb paraformaldehid es requereix un pas de permeabilització amb TX-100 a l'1% en PBS.
4. Es coliquen els cubres sobre la placa de Petri i es bloquegen amb 50 µl de BSA a l'1% durant 30 minuts. També es pot utilitzar FBS. Es tapa la placa i es posa en la cambra humida. Es prepara l'anticòs primari a la dilució adient en solució de bloqueig i es centrifuga durant 5 minuts a 4°C. Després del blocatge, el

cobreobjectes es posa en posició vertical, s'asseca i es torna a colocar en la cambra humida. En depositar l'anticòs és molt important que la superfície oposada estigui seca. S'incuba l'anticòs durant 1 hora i 30 minuts a 37°C en una cambra d'humitat.

5. Es fan els rentatges del primari com s'ha descrit en l'apartat 3. Es prepara la dilució de l'anticòs secundari que ha d'estar protegit de la llum. S'incuba l'anticòs secundari durant 45 minuts a 37°C en la cambra humida i protegit de la llum.

6. Es fan els rentatges de l'anticòs secundari. Es pot afegir ara, si es volen veure els nuclis, el colorant Hoescht (10 µl de solució d'estoc per 40 ml de PBS).

7. Es munten els cubreobjectes sobre un portaobjectes convenientment retolat. S'asseca la superfície interior del cubre amb paper de cel·lulosa. Es posen gotes de medi de muntatge (20 µl medi/cubre) separats, unes quatre gotes per portaobjectes. Es posa la superfície que té les cèl·lules sobre el medi de muntatge, es fa una lleugera pressió i amb paper es treu l'excés de medi. Un cop muntats ja es poden observar al microscopi amb epifluorescència (Reichert Jung Polyvar II) amb els filtres corresponents amb objectiu d'immersió. Els portaobjectes es guarden a 4°C protegits de la llum.

## 4.6 MESURA DE L'ÒXID NÍTRIC.

### 4.6.1 DETECCIÓ DE NITRATS I NITRITS

Per mesurar la concentració de nitrats i nitrits el dia abans posar l'estímul que indueix la síntesi de l'enzim NO-sintasa induïble en la línia cel·lular RAW264.7 (IFN- $\gamma$ , LPS), s'ha de canviar el medi de cultiu per un medi que no tingui roig de fenol, ja que interfereix la detecció colorimètrica. Es posen de l'ordre de dos milions de cèl·lules en multipou de 6.

Vam fer servir l'equip colorimètric Nitrate/Nitrite de la casa comercial Alexis (Cayman (850-001-KI01)), que es fa en una placa d'*elisa* seguint les instruccions del fabricant.

### 4.6.2 MESURA DEL NO INTRACEL·LULAR: CITOMETRIA DE FLUX FENT SERVIR LA MOLÈCULA DAF-2DA

Vam utilitzar la molècula DAF-2DA (Kojima, 1998) o diacetat de 4,5-diaminofluoresceïna (Alexis, 620-052). Aquest compost és permeable a les cèl·lules, dins és hidrolitzat per esterases citosòliques formant el compost DAF-2, que no pot sortir de la cèl·lula. Aquest compost no és fluorescent al pH fisiològic, però en presència de NO i O<sub>2</sub>, es converteix en el derivat triazol DAF-2T, que s'excita a 492 nm i emet a 515 nm.

Per detectar la fluorescència vam fer servir citometria de flux en els SCT. Vam observar que 1 µM de DAF-2DA era la concentració més idònia (la casa comercial recomana 10 µM). El compost es degrada ràpidament després de la primera hora, i per això que feiem la mesura 1 hora després d'afegir el compost. La fixació afectava la fluorescència basal: obteníem millors resultats sense fixar les cèl·lules. L'anàlisi de les dades mitjançant el programa IMMUNO-4, que té en compte l'àrea dels pics, donava millors resultats de sensibilitat que el simple càlcul de les mitjanes.

## 5. APÈNDIX: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL

### 5.1 AIGUA TRACTADA AMB DEPC (DIETILPIROCARBONAT)

Aigua Milli-Q, Millipore

DEPC al 0.01%

S'afegeix el DEPC sota campana extractora, es deixa durant 16 hores a 37°C amb agitació i s'autoclava per tal d'inactivar el DEPC, que pot alterar químicament els residus de purines de l'RNA per carboximetilació.

### 5.2 DNA D'ESPERMA DE SALMÓ

1. Es dissol el DNA d'esperma en aigua estèril (10 mg/ml) durant 2-4 h a temperatura ambient.
2. S'ajusta la concentració de NaCl a 0.1 M.
3. Es fa una extracció amb fenol: s'afegeix un volum de fenol, s'agita, es centrifuga a baixa velocitat i es recull la fase aquosa.
4. Es fa una extracció amb fenol/cloroform. Es procedeix com en el pas anterior, però aquest cop amb la barreja fenol/cloroform.
5. Es recull la fase aquosa i es passa per una xeringa de 17 G diverses vegades o, alternativament, se sonica.
6. Es precipita la solució amb dos volums d'etanol a -20°C durant un mínim de 2 h.
7. Es redissol el precipitat amb aigua estèril, per tal d'obtenir una concentració final de DNA que s'aproximi a 10 mg/ml.
8. La concentració exacta es determina llegint a una absorbància de 260 nm.
9. La solució es guarda en parts alíquotes a -20°C.
10. El dia que s'utilitza es convenient tornar a sonicar fins que la seva consistència sigui gairebé aquosa.

### 5.3 FENOL SATURAT AMB AIGUA (ÀCID)

Fenol, 250 g (Merck ref.206)

1. El fenol es liqua a 65°C (es fa sota campana extractora en un bany amb aigua, i amb el tap mig obert).
2. Un cop líquid s'afegeix un volum igual d'aigua DEPC. Es barreja fins a tenir una emulsió. Es deixa 12-14 hores fins que s'hagin separat les fases. S'aspira l'excés d'aigua (només romandrà una capa d'aigua de 0.5 cm sobre el fenol), i es guarda a 4°C, protegit de la llum.

### 5.4 FENOL SATURAT AMB TRIS I FENOL-CLOROFORM

1. Afegim fenol saturat amb aigua (si és per a DNA es recomana que no se sature amb aigua DEPC) el mateix volum de Tris-HCl 1 M, pH 8. Es barreja per inversió.
2. Se separen les fases per centrifugació a baixa velocitat durant 5 minuts. S'elimina la fase aquosa. Si el pH d'aquesta fase és inferior a 7 es repeteix el pas anterior, en cas contrari es procedeix a afegir un volum de Tris-HCl 0.1 M, pH 8. Es barreja per inversió.

3. Se separen les fases per centrifugació i es mira el pH de la fase superior, si és inferior a 7 es repeteix el pas anterior, en cas contrari el procés de preparació ja ha finalitzat.

#### 5.4.1 FENOL-CLOROFORM

A partir de fenol àcid.

Es barregen 25 ml de fenol àcid amb 25 ml de Tris HCl 1 M, pH 8, i s'afegeixen de 20 a 30 mg de 8-hidroxiquinolina. S'utilitzen tubs Corning de 50 ml (núm. cat. 25331-50). S'agita per inversió, es fa una centrifugació a 4000 rpm (centrífuga RC-3B) de 10-15 minuts. Es deixa reposar a temperatura ambient fins que la fase aquosa quedi transparent.

Es comprova el pH de la fase aquosa, si és inferior al 7.5 (amb tires de pH (Merck)), es treu la fase superior i es torna a afegir Tris-HCl. Es barreja, se centrifuga i es torna a mesurar el pH, si és superior o igual a pH 7.5 es treu la fase aquosa.

S'afegeixen 25 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8. S'agita i se centrifuga a 4000 rpm de 10 a 15 minuts. Es torna a comprovar el pH de la fase superior, que ha de ser superior a 7.5. Es tornen a afegir 25 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8, i es torna a repetir el procés. Es comprova el pH, si és superior o igual a 7.5, es treu la fase aquosa amb una punta estèril. Si el tub està deteriorat es canvia per un de nou.

Es reparteix en dos tubs, cadascun amb 12.5 ml i s'afegeixen 12.5 ml de cloroform, i 12.5 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8. Es barreja, es deixa reposar i se centrifuga. Es protegeix de la llum, es guarda a 4°C com a màxim 1 mes.

#### 5.5 FORMAMIDA D.I.

Formamida

Resina Amberlite MB3 (SIGMA), 0.1 g/ml

Després d'afegir la resina a la formamida, ho agitem en un agitador magnètic a temperatura ambient durant 30 min. Es filtra a través de paper Whatmannn 1MM, es fan parts alíquotes i es guarda a -20°C.

#### 5.6 AMPICIL·LINA

Es dissol en aigua Milli-Q a 100 mg/ml, es filtra a 0.22 µm, es fan parts alíquotes i es guarda a -20°C. Un cop descongelada s'ha de mantenir en gel. S'ha de tenir en compte que l'ampicil·lina s'inactiva a temperatures superiors a 55°C.

#### 5.7 LB

Triptona, 1%

Extracte de llevat, 0.5%

NaCl, 0.5%

El pH s'ajusta a 7.5 amb NaOH. S'autoclava.



En cas de preparar LB-agar, s'afegeix l'agar (1.5% en pes) a l'ampolla que conté l'LB just abans d'autoclavar-ho. Es deixa temperar fins a 50°C. S'aboca el medi sobre les plaques i es deixen solidificar a temperatura ambient. Es guarden a 4°C en posició invertida.

### 5.8 PBS

NaCl, 136 mM

KCl, 2.7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM

El pH s'ajusta a 7.35 amb HCl si s'ha d'autoclavar la solució, a 7.2 si s'ha de filtrar a 0.22 µm, a 7.4 si no ha de patir cap d'aquests processos. En el cas que es tracti de PBS per a cultius cel·lulars s'afegeixen 17 mg/litre de roig de fenol com a indicador de pH. S'ajusta el pH a 7.2 i es filtra a 0.22 µm.

### 5.9 SOLUCIÓ DE DENHARDT X50

Ficoll, 1%

Polivinilpirrolidona, 1%

BSA, 1%

Es guarda en parts alíquotes a -20°C.

### 5.10 SSC x20

Citrat trisòdic, pH 7.0, 0.3 M

NaCl, 3.0 M

### 5.11 SSPE x20

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.2 M

NaCl, 3.0 M

EDTA, 0.02 M

### 5.12 TE

Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM

EDTA, 1 mM

Quan es prepara TE estèril es fa per filtració a 0.22 µm o bé s'autoclava.

### 5.13 PREPARACIÓ DE LA <sup>35</sup>S-L-CISTINA ESTOC

La dissolució de la cistina es fa amb una solució en aigua Milli-Q estèril: 10 mM de DTT oxidat (trans-4,5-dihidroxi-1,2-dithiana; Sigma, núm. cat. D3511), 1% d'etanol

absolut, pH 2.5 amb HCl (el pH es mesura amb tires de pH Acilit, Merck). Aquesta solució s'afegeix al pot comercial, i es va rentant repetitivament amb aquesta solució, per tal d'extreure-hi tota la cistina en pols. Es posa al vòrtex abans de pipetejar i fer l'extracció. El volum extret cada vegada es diposita en un tub Corning de 50 ml fins a arribar a una concentració final de 300  $\mu$ M de cistina, es barreja el conjunt, i es divideix sota corrent de nitrogen gas en parts alíquotes d'1.5 ml; es guarden a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El procés es du a terme dins d'una campana extractora no engegada, ja que podria aspirar la cistina radioactiva en pols. Pot engegar-se l'extractor després d'haver afegit el tampó que s'utilitza com a dissolvent.



## **Resultats i discussió**

