

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

REGULACIÓ DEL PROMOTOR DE *Sp3*

ALICIA TAPIAS SOLER
Barcelona 2008

MATERIALS I MÈTODES



La descripció dels mètodes més habituals en Biologia Molecular queden referenciats als corresponents articles que es troben a la secció de Resultats d'aquesta memòria.

Per la seva novetat al grup d'investigació on s'ha realitzat aquest treball doctoral, s'han descrit específicament alguns dels mètodes emprats. A més, es presenta una descripció del material biològic utilitzat.

1. MATERIALS

1.1 LÍNIES CEL·LULARS

- **HeLa**: Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma de cèrvix. ATCC CCL-2. Cultiu en medi Ham's F-12 + 5% (V/V) FBS.

- **293T**: Línia cel·lular humana embrionària de ronyó transformada que expressa l'antigen gran T del SV40. ATCC CRL-11268. Cultiu en medi DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, ref: 52100-039 de GIBCO BRL) suplementat amb bicarbonat sòdic (1,5 g/l), penicil·lina G sòdica (100 U/ml) i estreptomicina (100 mg/l). 10% (V/V) FBS.

- **HT29**: Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma colorectal. ATCC HTB-38. Cultiu en medi Ham's F-12 + 7% (V/V) FBS.

- **MCF-7**: Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma mamari. ATCC HTB-22. Cultiu en medi Ham's F-12 + 7% (V/V) FBS.

- **K562**: Línia cel·lular humana de leucèmia mieloide crònica. ATCC CCL-243. Cultiu en medi Ham's F-12 + 7% (V/V) FBS.

- **p21.9**: Línia cel·lular humana derivada de la línia de fibrosarcoma HT1080 (ATCC CCL-121) a la que s'ha introduït de forma estable el gen p21 controlat per un promotor induïble per IPTG. Aquestes cèl·lules permeten modular els nivells intracel·lulars de p21 assolint nivells alts fisiològics. Cultiu en medi DMEM + GlutaMAX (ref: 31966 GIBCO). 10% (V/V) FBS.

Per a les cèl·lules cultivades en medi Ham's F12 (ref. 21700-018), aquest era suplementat amb bicarbonat sòdic (1,176 g/l), penicil·lina G sòdica (100U/ml) i estreptomicina (100mg/l). FBS és *Foetal Bovine Serum* (ref. 10270106 Invitrogen).

Les cèl·lules eren incubades a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂. Quan les cèl·lules arribaven a confluència, es procedia a l'expansió del cultiu mitjançant el tractament amb tripsina (Sigma, ref: T4799) al 0.05% en PBS 1x (136.9 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 2.8 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O, pH 7.4) per desenganxar-les de la

placa. Els medis de cultiu i la tripsina es van esterilitzar per filtració a través de membranes de 0.2 µm de tamany de porus (Schleicher & Schuell, ref: 10401770).

1.2. VECTORS PLASMÍDICS

1.2.1. VECTORS D'EXPRESSIONI EUCARIOTA

NOM	INSERT	VECTOR	RESISTÈNCIA	REFERÈNCIES
pSp1CMV	cDNA Sp1	pCMV	Ampicil·lina	(Pascal and Tjian, 1991)
pSp3CMV	cDNA Sp3	pRC/CMV	Ampicil·lina Neomicina	(Hagen et al., 1994)
pNFYA13	cDNA NF-YA	pG4MpolyII	Ampicil·lina	(Mantovani et al., 1992)
pDNSp1	cDNA Sp1 sense domini transactivador (aa 592-778)	pCMV3	Ampicil·lina	(Sowa et al., 1999)
pDNSp3	cDNA Sp3 sense domini transactivador (aa 399-654)	pCMV3	Ampicil·lina	(Sowa et al., 1999)
pCMV-CTF-ΔUTR	cDNA NF-1/CTF	pcDNA3	Ampicil·lina Neomicina	(Alevizopoulos et al., 1995)
pcDNA3cMyb	cDNA c-Myb	pcDNA3	Ampicil·lina Neomicina	(Tanno et al., 2002)
pCMV-β-Myb	cDNA B-Myb	pcDNA3	Ampicil·lina Neomicina	(Tanno et al., 2002)
pCMV-cJun	cDNA c-Jun	pCMV-IE	Ampicil·lina	(Sonnenberg et al., 1989)
pCMV-cFos	cDNA c-Fos	pCMV-IE	Ampicil·lina	(Sonnenberg et al., 1989)
pCMV-E2F	cDNA E2F1	pCMV-Neo-Bam	Ampicil·lina	(Martin et al., 1995)

			Geneticina	
pCMV-DP1	cDNA DP1	pCMV-Neo-Bam	Ampicil·lina Geneticina	(Martin et al., 1995)
pCMV-Cip1	cDNA p21(Cip1)	pSXV	Ampicil·lina Neomicina	(Harper et al., 1995)
pSV40-Stat3	cDNA Stat3	PEF-BOS	Ampicil·lina	(Aznar et al., 2001)
pC53-SN3	cDNA p53	pCMV-Neo-Bam	Ampicil·lina Neomicina	(Baker et al., 1990)
p45SKP2	cDNA de p45 ^{Skp2}	pMT2-myc	Ampicil·lina	(Mongay et al., 2001)
pRcCMV-Rad51	cDNA Rad51 hamster	pRcCMV	Ampicil·lina Geneticina	(Vispe et al., 1998)
pcDNA3-BRCA2	cDNA BRCA2	pcDNA3	Ampicil·lina Neomicina	(Wang et al., 2001)
pCMV-p65	cDNA p65	pcDNA3	Ampicil·lina Neomicina	
CyclinD1	cDNA Ciclina D1	pCMV	Ampicil·lina	(Casanovas et al., 2000)
pcDNA3-CDK4	cDNA Cdk4	PcDNA3	Ampicil·lina Neomicina	(Abella et al., 2005)
pCMV-Rb	cDNA Rb	pCMV-Neo-Bam	Ampicil·lina Geneticina	(Kaelin et al., 1992)
β-gal-pCMV SPORT	cDNA β- galactosidasa		Ampicil·lina	Invitrogen
pRL-CMV	cDNA Renilla		Ampicil·lina	Promega

1.2.2. VECTORS AMB EL GEN *LUC*

Els vectors amb el gen LUC (Promega) permeten l'estudi de seqüències reguladores de la transcripció eucariota. En aquest cas es mesuren els nivells d'activitat de luciferasa de cuca de llum (*Photinus pyralis*). Els vectors utilitzats en aquest estudi són:

- **pGL3-Basic:** Vector mancat de promotor eucariota i de seqüències enhancer que permet l'estudi de diferents promotors situats davant del gen luciferasa de *Photinus pyralis* (luciferasa de cuca de llum) (Promega). Presenta resistència a ampicil·lina.

Tots els plàsmids amb el gen reporter luciferasa es van construir a partir del pGL3-Basic digerit amb NheI/XhoI mitjançant la inserció de fragments de PCR digerits amb els mateixos enzims de restricció.

- Per als assajos luciferasa amb proteïnes que interaccionaven amb Sp1, es va utilitzar també un plàsmid amb 5 caixes Sp1 col·locades en tàndem clonades al vector pG5 (**pG5-5x(GC)-Luc**) que va ser un regal del Dr. Man-Wook Hur.

2. MÈTODES

2.1. ARRAY D'ANTICOSSOS

Per al cribatge de les proteïnes que interaccionen amb Sp1, es va emprar un array d'anticossos comercial (AntibodyArray™, Cell Cycle array, Hypomatrix) i extractes totals de cèl·lules HeLa.

L'array d'anticossos consisteix en una membrana de nitrocel·lulosa en la que s'han immobilitzat anticossos en posicions predeterminades, tot mantenint les seves capacitats de reconèixer i capturar antigens així com proteïnes associades als antigens. Les proteïnes capturades a l'array poden ser identificades per immunodetecció. Així doncs, aquests arrays ens permeten fer screenings d'interaccions proteïna-proteïna.

La figura 14 mostra un esquema del funcionament de l'array d'anticossos: Es va utilitzar un Array que contenia 60 anticossos contra proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular. Les proteïnes presents i les seves posicions a la membrana estan indicades a la taula 3. La membrana es va incubar amb l'anticòs biotinilat anti-Sp1 (PEP 2, Santa Cruz) i després amb avidina-peroxidasa. La unió de l'anticòs Sp1 es va visualitzar per quimioluminiscència (ECL) tal com indicava el fabricant (GE Healthcare). Després del revel·lat es va obtenir la imatge de l'array representada a la figura 15.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	BM28	BRCA1	BRCA2	Brm	Cdc6	Cdc25A	Cdc34	Cdk1	Cdk2	Cdk4
2	Cdk6	Chk	CUL-1	Cyclin A	Cyclin B	Cyclin D3	Cyclin E	Cyclin H	DMC1	E2F1
3	GADD34	GADD45	GADD153	GAK	Hdlg	Ne-dlg	ING1-p33	KAP	MAD2	Mos
4	NF-1	NFkB.	Ikb	Nibrin	p16	p19Skp1	p21/CIP1	p27	p35	p45 skp2
5	p53	p55 CDC	p57	p63	p73	PCNA	Plk	Rad51	Rad52	Rb(p107)
6	Rb(p110)	Rbp130	RBBP	Rbx1&2	Sam68	Stat1	p-Stat1	Stat3	TTK	XRCC4

Taula 3. Esquema de la colocació dels anticossos a l'Array d'Anticossos del Cicle Cel·lular

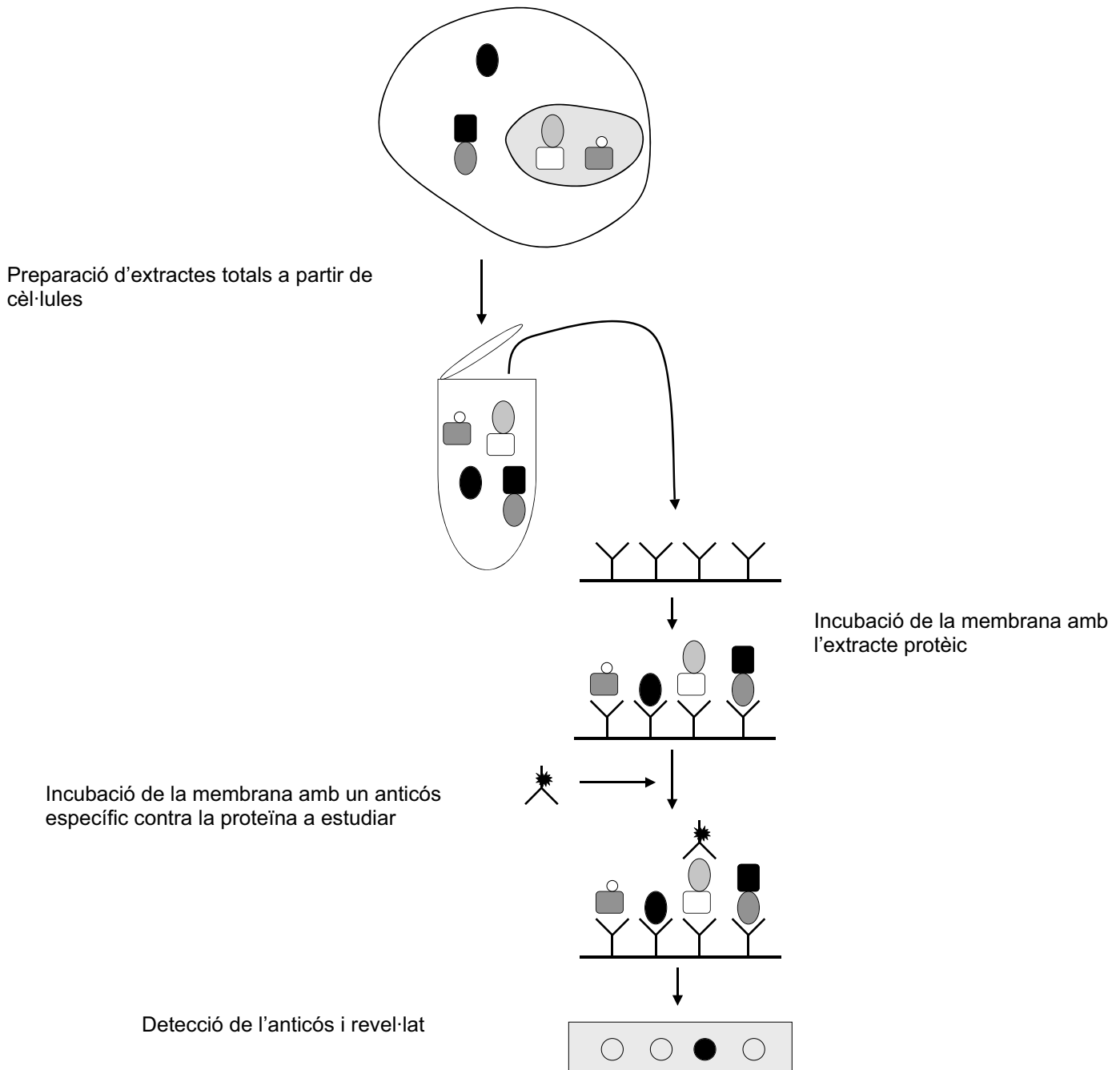


Figura 14. Esquema del funcionament dels arrays d'anticossos

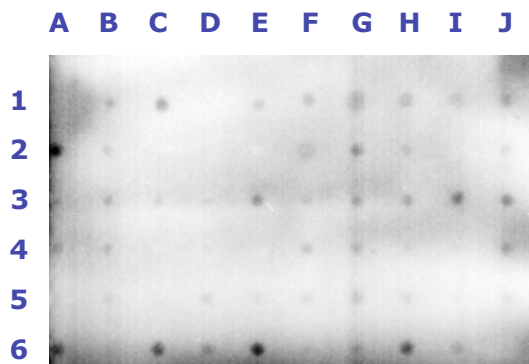


Figura 15. Imatge de l'Array d'Anticossos. Sp1 es va detectar utilitzant un anticòs biotbiotinilat. Posteriorment, es va incubar la membrana amb avidina-peroxidasa i es va revelar de forma convencional utilitzant ECL.

2.3. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA

La immunoprecipitació de Cromatina permet determinar la unió d'un factor de transcripció específic a un promotor concret *in vivo*. A la figura 16 es presenta un esquema del procediment a seguir.

Partint d'una placa de 100mm semiconfluent de cèl·lules HeLa, es va realitzar un rentat amb PBS i es van incubar les cèl·lules durant 10 minuts amb F12 sense sèrum amb 1% de formaldehid. La reacció de fixació es va aturar amb 0,1M glicina i les cèl·lules es van sonicar per a obtenir-ne fragments de cromatina d'entre 500 i 800 bp (entre 4 i 10 cicles de sonicació). La immunoprecipitació es va realitzar amb proteïna G-sefarosa (GE Healthcare) i 5µg d'anticossos contra les proteïnes estudiades. Com a control negatiu es van fer servir immunoglobulines inespecífiques (Sigma). La solució de cromatina es va pre-aclarir amb proteïna G-sefarosa durant 2 hores a 4°C. Posteriorment, la solució de cromatina es va dividir en alíquotes que es van incubar durant tota la nit amb els diferents anticossos. Abans d'utilitzar-la, la proteïna G-sefarosa es va bloquejar amb DNA inespecífic (herring sperm 1µg/µl) i BSA (1µg/µl) durant dues hores i després durant tota la nit, tot a 4°C.

Després del període d'immunoprecipitació pròpiament dita, es van realitzar cinc rentats amb tampó RIPA (10mM TrisHCl, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, 0,1% SDS, 0,1% Deoxicolat, 140mM NaCl, 1% Tritó), un rentat amb Tampó LiCl (0,25M LiCl, 0,5% NP40, 0,5% Deoxicolat, 10mM TrisHCl, 1mM EDTA) i un rentat amb TE. Posteriorment es va resuspendre el precipitat en 100µl de TE i es va incubar durant tota la nit amb 10µg de RNAsa a 65°C. A aquesta primera incubació va seguir una segona durant 4 hores a 50°C després d'afegir 0,5mg/ml de proteinasa K i qsp 0,5% SDS. El producte resultant d'aquestes incubacions es va precipitar amb etanol absolut i sal, es va secar i es va resuspendre en 60µl de TE per a procedir a amplificar-lo per PCR.

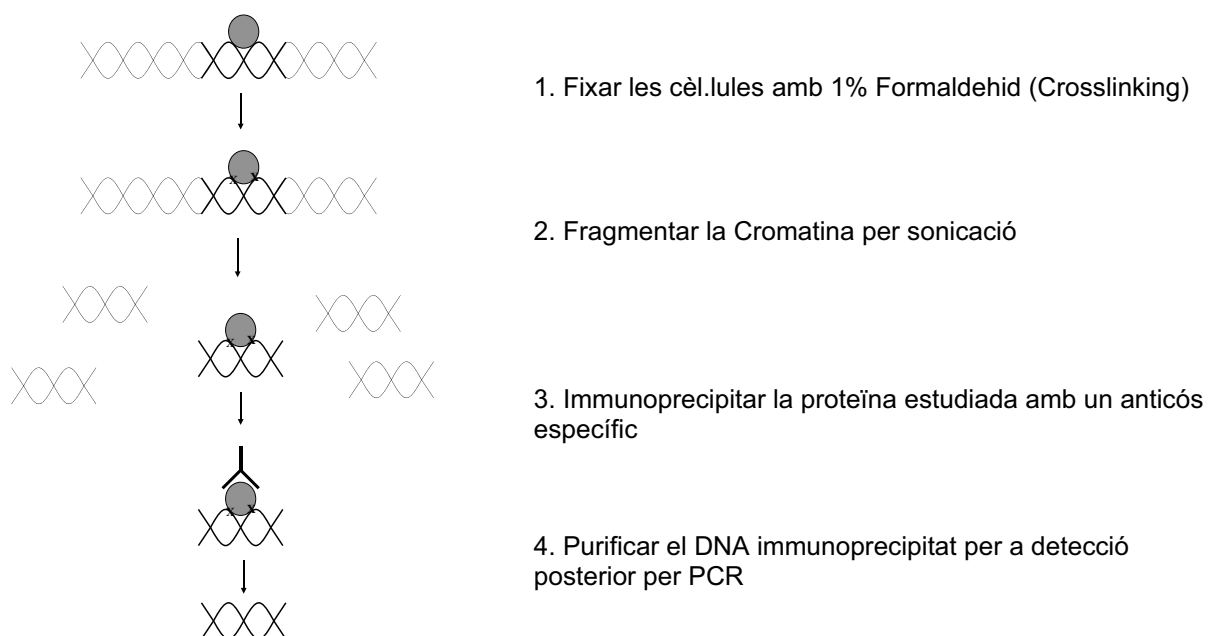


Figura 16. Esquema del funcionament de la Immunoprecipitació de Cromatina

2.4. MUTACIONS PUNTUALS

Per a la introducció de mutacions a la construcció pSp3FOR4 que contenia el promotor proximal de Sp3, es va utilitzar el kit comercial QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) seguint les instruccions del fabricant.

El procediment bàsic utilitza un DNA de doble cadena superenrotllat (dsDNA) amb l'insert d'interès i dos encebadors que continguin la mutació desitjada (Fig.17). Els encebadors són complementaris a les cadenes oposades del vector i s'extenen durant els cicles gràcies a la Pfu DNA polimerasa. La incorporació dels encebadors genera un plàsmid mutat.

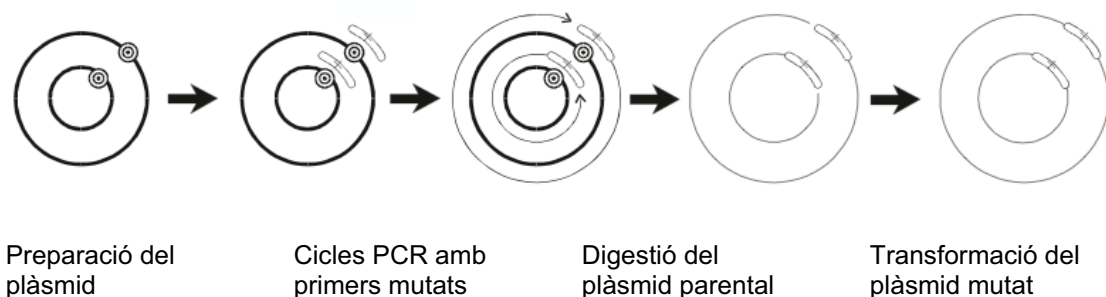


Figura17. Esquema del procediment per a obtenir mutacions puntuals

Breument, la construcció a mutar, en aquest cas la pSp3FOR4, es va utilitzar com a motllo per a una reacció de PCR utilitzant dos encebadors que contenen la mutació. Després de la reacció de PCR, el DNA es va tractar amb DpnI durant 1 hora per a digerir el DNA motllo. El vector resultant contenint la mutació es va transformar en cèl·lules supercompetents XL1-Blue. La introducció de la mutació es va comprobar per seqüenciació utilitzant el kit BigDye 3.1 (Applied Biosystems).

2.5. PCR A TEMPS REAL

Aquesta tècnica segueix el principi general de la PCR però amb la característica diferencial de que el DNA amplificat es quantifica al temps que s'acumula a la reacció en temps real. El procediment es basa en la detecció de la fluorescència produïda per una molècula reportera que augmenta amb l'acumulació del producte de PCR amb cada cicle de la reacció.

Aquestes molècules reporteres poden ser marcadors que s'uneixen al DNA de doble cadena (SYBR Green) o sondes específiques de seqüència (sondes TaqMan). En aquest treball s'han utilitzat les dues aproximacions (sondes TaqMan de Applied Biosystems i SYBR Green).

El SYBR green és un compost que s'uneix al DNA de doble cadena i emet fluorescència. En solució, el SYBR green emet poca fluorescència i aquesta emissió es veu molt augmentada

quan s'uneix al DNA. (Fig. 18A). Així doncs, un augment del DNA durant la PCR produeix un augment de la fluorescència que permet quantificar el DNA present a la reacció.

La utilització de sondes Taqman permet obtenir resultats més acurats. S'utilitza una sonda específica que s'uneix al fragment a amplificar i que conté un fluoròfor a l'extrem 5' i un apantallador al 3'. La proximitat de l'apantallador al fluoròfor evita l'emissió de fluorescència. Durant la PCR, quan la polimerasa copia un fragment amb una sonda TaqMan unida, l'activitat 5' nucleasa de la polimerasa trenca la sonda i allibera el fluoròfor permetent així l'emissió de fluorescència (Fig.18B). La fluorescència augmenta a cada cicle proporcionalment amb la quantitat de sonda degradada.

En aquest treball s'ha utilitzat aquesta tècnica per a quantificar nivells de mRNA de gens concrets, a partir d'una reacció de RT prèvia a la PCR a temps real. D'altra banda, la PCR a temps real també s'ha emprat per a quantificar els resultats de les immunoprecipitacions de cromatina, utilitzant com a producte de partida el DNA immunoprecipitat.

Per a la quantificació dels resultats es poden utilitzar dues estratègies diferents: el mètode de la corba estàndard i el mètode de comparació del llindar o C_t . En aquesta tesi, s'ha fet servir el mètode de comparació de la $\Delta\Delta C_t$.

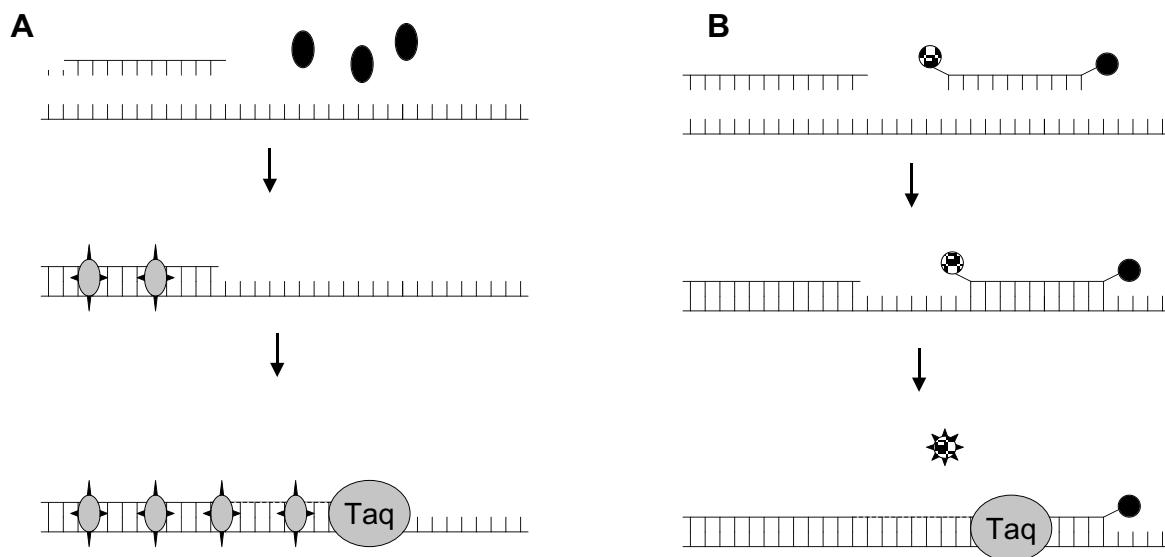


Figura 18. Esquema del funcionament de la reacció de Real Time – PCR amb SYBR green (A) i amb sondes TaqMan (B)

El mètode de comparació de les C_t s es basa en comparar els valors de C_t de les mostres d'interès amb un control (RNA d'una mostra no tractada). El valor de C_t és el número de cicle en el qual la fluorescència arriba a una línia arbitrària. Els valors de C_t del control i el problema són normalitzats amb un gen endogen apropiat. Aquest mètode comparatiu s'anomena també mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$, on $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{problema}} - \Delta C_{t\text{control}}$ i ΔC_t és el valor per a cada mostra normalitzat pel gen endogen.