

| | |
|--|-----------|
| 1. TRACTAMENT I OBTENCIÓ DE MOSTRES ANIMALS | 53 |
| 1.1. CASTRACIÓ | 53 |
| 1.2. TRACTAMENT AMB CSA | 53 |
| 1.3. OBTENCIÓ DE RNA | 53 |
| 1.3.1. <u>PROTOCOL D'EXTRACCIÓ DE RNA TOTAL</u> | 53 |
| 1.4. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS | 54 |
| 1.5. OBTENCIÓ DE MOSTRES PER A IMMUNOHISTOQUÍMICA | 54 |
| 2. CULTIUS CEL·LULARS | 55 |
| 2.1. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA I ESTABLE | 55 |
| 2.1.1. <u>PROTOCOL DE TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA</u> | 55 |
| 2.1.2. <u>PROTOCOL DE TRANSFECCIÓ ESTABLE</u> | 56 |
| 2.2. OBTENCIÓ DE RNA | 56 |
| 2.3. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES | 57 |
| 2.4. MARCATGE METABÒLIC | 57 |
| 2.4.1. <u>PROTOCOL DE MARCATGE METABÒLIC</u> | 57 |
| 2.5. ESTUDI DEL CICLE CEL·LULAR | 57 |
| 2.5.1. <u>PROTOCOL DE SINCRONITZACIÓ</u> | 58 |
| 2.5.2. <u>PROTOCOL D'OBTENCIÓ DE NUCLIS</u> | 58 |
| 2.6. ASSAIGS DE TOXICITAT | 58 |
| 2.6.1. <u>PROTOCOL D'ASSAIG D'ACTIVITAT LDH</u> | 59 |
| 3. AMPLIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS | 59 |
| 3.1. PRIMERS UTILITZATS | 59 |
| 3.2. CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ | 60 |
| 3.2.1. TRANSCRIPCIÓ REVERSA (RT) | 60 |
| 3.2.2. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) | 60 |
| 3.2.3. RT-PCR | 61 |
| 4. METODOLOGIA DE DNA RECOMBINANT | 61 |
| 4.1. DIGESTIÓ DE DNA | 61 |
| 4.2. ELECTROFORESI DE DNA | 61 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4.3. | PURIFICACIÓ DE DNA | 62 |
| 4.3.1. | PURIFICACIÓ DE PRODUCTES DE PCR: | 62 |
| 4.3.2. | PURIFICACIÓ A PARTIR DE GEL D'AGAROSA | 62 |
| 4.3.3. | MINIPREPARACIÓ DE DNA PLASMÍDIC | 62 |
| 4.3.4. | MAXIPREPARACIÓ DE DNA PLASMÍDIC | 63 |
| 4.4. | LLIGACIÓ DE FRAGMENTES DE DNA | 63 |
| 4.4.1. | LLIGACIÓ DE PRODUCTES DE PCR | 63 |
| 4.4.2. | LLIGACIÓ DE FRAGMENTES COHESIUS | 63 |
| 4.5. | TRANSFORMACIÓ | 64 |
| 4.5.1. | <u>PROTOCOL D'OBTENCIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS</u> | 64 |
| 4.5.2. | <u>PROTOCOL D'ELECTROPORACIÓ</u> | 65 |
| 4.6. | SEQÜENCIACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS | 65 |
| 4.6.1. | <u>PROTOCOL DE SEQÜENCIACIÓ MANUAL</u> | 65 |
| 4.6.2. | <u>PROTOCOL DE SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA</u> | 66 |
| 5. | <u>NORTHERN BLOT</u> | 66 |
| 5.1. | PREPARACIÓ DE LES MOSTRES I ELECTROFORESI | 66 |
| 5.2. | TRANSFERÈNCIA DEL RNA | 67 |
| 5.3. | MARCATGE DE LA SONTA | 67 |
| 5.4. | HIBRIDACIÓ I EXPOSICIÓ | 68 |
| 6. | <u>EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES</u> | 68 |
| 6.1. | EXPRESSIÓ EN BACTERI. PROTEÏNES DE FUSIÓ AMB GST | 68 |
| 6.1.1. | <u>PROTOCOL D'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ AMB GST (COSSOS D'INCLUSIÓ)</u> | 69 |
| 6.2. | EXPRESSIÓ "IN VITRO". RETICULÒCIT DE CONILL I MEMBRANES MICROSOMALS .. | 70 |
| 6.2.1. | <u>PROTOCOL DE SÍNTESI IN VITRO DE PROTEÏNES</u> | 70 |
| 6.3. | EXPRESSIÓ EN LÍNIES CEL·LULARS | 71 |
| 6.3.1. | SISTEMA REGULABLE D'EXPRESSIÓ. TET-OFF | 71 |
| 6.3.2. | PROTEÏNES DE FUSIÓ AMB GFP I FLAG | 71 |
| 7. | <u>TÈCNiques IMMUNOLÒGIQUES</u> | 73 |
| 7.1. | ANÀLISI DE PROTEÏNES PER SDS-PAGE D'UNA DIMENSIÓ I WESTERN BLOT | 73 |
| 7.1.1. | <u>PROTOCOL DE SDS-PAGE</u> | 73 |
| 7.1.2. | <u>PROTOCOL DE WESTERN BLOT</u> | 74 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 7.2. | IMMUNOPRECIPITACIÓ | 74 |
| 7.2.1. | IMMUNOPRECIPITACIÓ A PARTIR DE TEIXIT | 74 |
| 7.2.2. | IMMUNOPRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ AMB FLAG..... | 75 |
| 7.3. | IMMUNOHISTOQUÍMICA I IMMUNOCITOQUÍMICA | 75 |
| <u>7.3.1.</u> | <u>PROTOCOL D'IMMUNOHISTOQUÍMICA</u> | <u>75</u> |
| <u>7.3.2.</u> | <u>PROTOCOL D'IMMUNOCITOQUÍMICA</u> | <u>76</u> |
| <u>7.3.3.</u> | <u>CONTRA-TINCIÓ PER A MICROSCOPIA ÒPTICA</u> | <u>76</u> |
| <u>7.3.4.</u> | <u>CONTRA-TINCIÓ PER A MICROSCOPIA CONFOCAL</u> | <u>76</u> |
| 8. | DETECCIÓ D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA | 76 |
| 8.1. | DOBLE HÍBRID | 76 |
| 8.1.1. | AMPLIFICACIÓ I TITULACIÓ DEL FAG HELPER | 77 |
| 8.1.2. | ESCISSIÓ "IN VIVO" DE LA LLIBRERIA | 78 |
| 8.1.3. | AMPLIFICACIÓ DE LA LLIBRERIA ESCINDIDA | 79 |
| 8.1.4. | CONSTRUCCIÓ DE L'HÍBRID BD-GAL4-KAP | 79 |
| 8.1.5. | CO-TRANSFORMACIÓ DE LA LLIBRERIA | 79 |
| 8.1.6. | TRANSFORMACIÓ DE LLEVATS AMB ACETAT DE LITI | 80 |
| 8.1.7. | IDENTIFICACIÓ I VERIFICACIÓ DELS POSITIUS | 80 |
| 8.1.8. | MINIPREPARACIÓ DE DNA PLASMÍDIC DE S.CEREVISIAE..... | 82 |
| 8.2. | GST-PULLDOWN | 82 |
| <u>8.2.1.</u> | <u>PROTOCOL</u> | <u>82</u> |
| 8.3. | CO-IMMUNOPRECIPITACIÓ A PARTIR DE TEIXIT | 83 |
| 8.3.1. | PROTOCOL DE CO-IMMUNOPRECIPITACIÓ | 83 |

1. TRACTAMENT I OBTENCIÓ DE MOSTRES ANIMALS

1.1. *Castració*

Els mascles es van castrar quirúrgicament per extirpació testicular. A tal efecte varen ser anestesiats amb injecció intra-peritoneal de 20µl/g (pes de l'animal) d'una barreja de droperidol (Dehidrobenzperidol, ROCHE, S.A.) (417 µg/ml) i midazolam (Dormicum, ROCHE, S.A.) (833 µg/ml). Un cop castrats es van deixar recuperar durant 8 dies abans de l'inici del tractament.

1.2. *Tractament amb CsA*

Els animals mascles, femelles i castrats van ser tractats amb 15 mg/ Kg/ dia de CsA (Sandimmune[®], Novartis) o vehicle (90% oli d'oliva, 10% etanol), via intramuscular durant 24 hores, 3 dies o 1 setmana.

1.3. *Obtenció de RNA*

Per a l'extracció d'RNA total de teixit s'ha emprat el mètode descrit per Chomczynski i Sacchi 1987 amb algunes modificacions. Immediatament després de sacrificar l'animal s'extreuen els teixits en condicions lliures de ribonucleases i ràpidament es congelen en nitrogen líquid. Guardar a -80°C. El pes de les mostres òptim per a l'extracció és d'aproximadament 150-250 mg dels quals s'obté entre 400 i 700 µg de RNA total segons el teixit.

1.3.1. Protocol d'extracció de RNA total

1. Mantenir els teixits en neu carbònica.
2. Homogeneïtzar cada mostra (150-250 mg) en 4 ml de solució D utilitzant Politron a velocitat 7 fins a la completa disgregació del teixit.
3. Passar l'homogenat a tub Corex de vidre lliure de ribonucleases i afegir:
 - 400 µl d'acetat sòdic 2M pH 4,0. Barrejar per inversió.
 - 4 ml de Fenol-H₂O (DEPC). Barrejar per inversió.
 - 800 µl de cloroform-alcohol isoamílic (49:1). Agitar amb força.
4. Deixar reposar en gel 15 min.
5. Centrifugar 30 min a 10.000 rpm a 4 °C.
6. Recuperar la fase aquosa.
7. Afegir a la fase recuperada 5,5 ml d'isopropanol 100% fred (-20°C) i agitar amb força.

8. Incubar a -20 °C durant més de 2 hores.
9. Centrifugar 20 min a 10.000 rpm a 4°C.
10. Decantar el sobrenedant d'immediat i resuspendre en 700 µl de solució D.
11. Afegir 700 µl d'isopropanol 100% fred i agitar amb força.
12. Incubar a -20 °C durant 60 min com a mínim.
13. Microfugar 15 min a 13.000 rpm a 4 °C.
14. Decantar el sobrenedant d'immediat i rentar el *pellet* amb etanol 70% fred.
15. Microfugar 15 min a 13.000 rpm a 4 °C.
16. Decantar el sobrenedant i assecar el *pellet*.
17. Resuspendre en H₂O lliure de ribonucleases (entre 100 i 200 µl) i valorar la concentració a l'espectrofotòmetre (260 nm).

A partir del RNA total es pot enriquir en RNA missatger utilitzant diferents kits disponibles al mercat. S'ha utilitzat el QuickPrep™ Micro mRNA purification kit de la casa Amersham-Pharmacia-Biotech. Aquest sistema es basa en la utilització de resina conjugada amb oligo d-T on queden retinguts els mRNA per la cua de poly-A. Partint de 300 µg de RNA total es poden obtenir aproximadament 6 µg de mRNA. En tots els casos s'ha seguit el protocol especificat pel fabricant.

1.4. Obtenció d'extractes proteics

Els teixits es poden processar immediatament després de la seva extracció o bé es poden congelar amb nitrogen líquid i guardar a -80°C fins a la seva utilització. Les mostres s'han homogeneïtzat en tampó RIPA suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases, utilitzant un homogeneïtzador d'èmbol a raó de 500 µl de tampó per cada 200 mg de teixit; posteriorment l'extracte es sonica a potència suau i es passa varies vegades per xeringa d'insulina evitant l'aparició d'escuma. Valorar la concentració de proteïna amb el kit Bio-Rad Dc Protein Assay (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). Aliquotar i congelar a -80°C fins a la seva utilització.

1.5. Obtenció de mostres per a immunohistoquímica

Els teixits estudiats s'han extret immediatament després del sacrifici de l'animal, s'han inclòs en O.C.T. (Tissue-Tek®) i congelat en un bany d'isopentà refredat amb nitrogen líquid. Els talls de 5 µm s'han obtingut en criostat i dipositats sobre portes amb anelles de teflon tractats amb poli-lisina.

2. CULTIUS CEL·LULARS

Totes les línies amb les quals s'ha treballat han estat mantingudes i expandides segons el descrit a la literatura (Cartier et al.1993, Lacave et al. 1993) i seguint les directrius de l' ATCC. Els medis emprats varien segons la línia cel·lular i estan especificats a l'annex medis i tampons.

2.1. *Transfecció transitòria i estable*

La transfecció consisteix en la introducció de DNA plasmídic dins de cèl·lules en cultiu. La utilització de fosfat càlcic, liposomes o l'electroporació són mètodes clàssics de transfecció.

Per a la transfecció de DNA en cèl·lules eucariotes en cultiu s'ha utilitzat el reactiu LIPOFECTAMINE PLUS . La LIPOFECTAMINE és una barreja liposòmica (3:1) del lípid policatiònic 2,3-dioleiloxi-N-[2(sperminecarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato (DOSPA) i el lípid neutre dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Per altra banda el reactiu PLUS forma uns pre-complexes amb el DNA augmentant l'eficiència de la transfecció i disminuint els requeriments de LIPOFECTAMINE i DNA.

2.1.1. Protocol de transfecció transitòria

1. El dia abans de la transfecció sembrar la quantitat de cèl·lules especificada a la taula II.
2. Barrejar el DNA amb el reactiu PLUS en medi OPTI-MEM , incubar 15 min a temperatura ambient.
3. Diluir la LIPOFECTAMINE en OPTI-MEM .
4. Barrejar el DNA-PLUS del pas 2 i la LIPOFECTAMINE del pas 3 i incubar 15 min a temperatura ambient.
5. Rentar les cèl·lules dues vegades amb OPTI-MEM escalfat a 37°C.
6. Afegir a les cèl·lules la quantitat de OPTI-MEM especificada a la taula II i distribuir amb cura sobre les cèl·lules la barreja del pas 4.
7. Incubar a 37°C 5% CO₂ durant 3 hores.
8. Rentar les cèl·lules amb medi complet a 37 °C i afegir una quantitat suficient de medi.
9. Assajar l'activitat del gen reportador a les 48 hores.

| Mida de la placa | Superfície (cm ²) | Cèl·lules a sembrar | DNA (µg) | PLUS (µl) | OPTI-MEM volum final passos 2 i 3 (µl) | LIPO (µl) | OPTI-MEM pas 6 (µl) |
|------------------|-------------------------------|---------------------|----------|-----------|--|-----------|---------------------|
| 96 pous | 0.3 | 12.000 | 0,25 | 1 | 10 | 0,5 | 50 |
| 24 pous | 2 | 50.000 | 1 | 4 | 25 | 1 | 200 |
| 6 pous | 10 | 250.000 | 2,5 | 6 | 100 | 4 | 800 |
| 60 mm | 20 | 500.000 | 5 | 8 | 250 | 12 | 2000 |
| 100 mm | 56 | 1,5·10 ⁶ | 15 | 20 | 750 | 30 | 5000 |

Taula II: Quantitats recomanades en assaigs de transfecció de PCT

En una transfecció estable l'objectiu és introduir el DNA transfectat dins el genoma cel·lular. Aquest esdeveniment es dona aleatòriament en una petita proporció de les cèl·lules transfectades, les quals són seleccionades per la resistència a antibiòtic conferida pel DNA transfectat.

2.1.2. Protocol de transfecció estable

1. La transfecció estable es realitza en placa de 10 cm de diàmetre seguint el protocol especificat anteriorment fins al pas 8.
2. Transcorregudes 24 hores, les cèl·lules es tripsinitzen i es sembren de nou en 10 plaques de 10 cm a raó de 2×10^5 cèl·lules per placa.
3. Es deixen dividir un parell de vegades i, posteriorment, s'afegeix l'antibiòtic requerit per a la selecció.
4. Es canvia el medi amb antibiòtic cada 3-4 dies. Les cèl·lules aniran morint de manera massiva.
5. A les 2 setmanes apareixen colònies aïllades resistents a l'antibiòtic.
6. Aïllar, mitjançant cilindres de clonatge, aquestes colònies i transferir-les a pous de 2 cm².
7. Expandir els clons i assajar l'activitat del gen reportador inserit al genoma cel·lular.
8. Opcionalment, en els casos que la clonalitat sigui dubtosa, es pot re-clonar les cèl·lules per dilució al límit.

2.2. **Obtenció de RNA**

Les cèl·lules crescudes en placa de 6 cm en monocapa fins a confluència es renten amb PBS 1X fred lliure de RNAses, es rasquen amb 360 µl de solució D i s'homogeneïtzen en fred passant varies vegades per xeringa d'insulina. L'obtenció de RNA a partir d'aquest homogenat segueix el mètode especificat anteriorment per a teixits, modificant els volums segons els 360 µl inicials de solució D.

2.3. Obtenció de proteïnes

Els cultius cel·lulars es renten amb PBS fred i es rasquen en tampó RIPA (100 µl / 10⁶ cèl·lules, o 500 µl per placa confluent de 10 cm) suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases. L'homogenat es completa amb successives passades per xeringa d'insulina i sonicació fins a la completa disgregació de l'extracte. Valorar la concentració de proteïna (Kit Bio-Rad Dc Protein Assay, Bio-Rad), aliquotar i congelar a -80°C.

2.4. Marcatge metabòlic

La caracterització de proteïnes a partir d'un extracte, així com l'anàlisi de la seva biosíntesi, processament, tràfic intracel·lular i degradació, generalment requereix que la proteïna a estudiar estigui marcada i es pugui immunoprecipitar a partir de l'extracte. El marcatge metabòlic consisteix en proporcionar a les cèl·lules un precursor marcat, de manera que aquest s'incorpora a les proteïnes mitjançant la seva pròpia maquinària biosintètica.

2.4.1. Protocol de marcatge metabòlic

1. Sembrar les cèl·lules en plaques de 6 cm de diàmetre fins a un 90% de confluència.
2. Rentar les cèl·lules dues vegades amb medi de marcatge escalfat a 37 °C.
3. Afegir 2,5 ml de medi de marcatge per placa i incubar 30 min a 37°C 5%CO₂ per tal de depleccionar les cèl·lules de metionina i cisteïna.
4. Preparar la solució de marcatge radioactiva diluint el Tran-³⁵S-label™ (ICN Pharmaceuticals, Inc. Costa Mesa, CA-USA) a 0,1 mCi / ml en medi de marcatge.
5. Substituir el medi de les cèl·lules per 2,5 ml de solució de marcatge radioactiva i incubar durant 30 minuts a 37°C 5% CO₂.
6. Retirar el medi radioactiu, rentar amb medi fresc suplementat amb aminoàcids no marcats i recuperar medi i cèl·lules a diferents temps.

2.5. Estudi del cicle cel·lular

Bona part dels mètodes d'estudi del cicle cel·lular requereixen la sincronització del cultiu a estudiar. Aquesta sincronització es pot assolir per diferents vies, incloent-hi la deprivació nutricional o la utilització d'inhibidors del cicle. Com a contrapartida, una aturada perllongada del cicle provocada per aquests mètodes freqüentment pertorba el metabolisme cel·lular. Per tal d'evitar aquest efecte indesitjable en l'estudi del cicle cel·lular, s'ha optat per un mètode de sincronització menys eficient però poc agressiu

que es basa en la capacitat d'alguns cultius cel·lulars d'aturar el seu creixement en arribar a la confluència.

2.5.1. Protocol de sincronització

1. Sembrar les cèl·lules a un 70-90% de confluència.
2. Deixar créixer les cèl·lules fins a 3 dies post-confluència.
3. Tripsinitzar i sembrar 2×10^6 cèl·lules en plaques de 60 mm de diàmetre.
4. Tripsinitzar les cèl·lules a diferents temps i congelar en 10% DMSO.
5. Guardar a -80°C fins al moment de passar-les pel citòmetre de flux.

2.5.2. Protocol d'obtenció de nuclis

1. Descongelar les cèl·lules (pas 5 protocol de sincronització) al bany a 37°C .
2. Centrifugar 5 min 800 g a 4°C .
3. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 5 ml de tampó HB (15 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM KCl, 500 μM EDTA pH 8, 1 mM PMSF i 1 mM β -mercaptoetanol).
4. Incubar en gel 4 min perquè s'inflin.
5. Centrifugar 5 min 800 g a 4°C .
6. Descartar el sobrenedant i resuspendre poc a poc en 5 ml de tampó HB amb 0,1% tritó X-100.
7. Deixar en gel 5 min.
8. Centrifugar 10 min 1000 g a 4°C .
9. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 5 ml de tampó HB.
10. Centrifugar 10 min 1000 g a 4°C .
11. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 1 ml de tampó HB.
12. Afegir 25 μg / ml de iodur de propidi.
13. Incubar 10 min en la foscor.
14. Passar les cèl·lules pel citòmetre de flux.

2.6. Assaigs de toxicitat

La mort cel·lular s'ha avaluat per quantificació de la integritat de la membrana cel·lular. La lactat deshidrogenasa és un enzim citoplasmàtic present a totes les cèl·lules que s'allibera ràpidament al medi de cultiu com a conseqüència d'un dany a la membrana cel·lular. Un augment en la mort cel·lular resulta en un augment en l'activitat lactat deshidrogenasa del medi de cultiu; aquest augment d'activitat que correlaciona amb la quantitat de formazan produït, és quantificable per medis colorimètrics. Hem utilitzat el kit *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* de Roche Diagnostics GmbH.

2.6.1. Protocol d'assaig d'activitat LDH

1. En plaques de 96 pous sembrar 2×10^4 cèl·lules per pou, incubar a 37°C 5% CO_2 durant 24 hores.
2. Tractar les cèl·lules durant 24h amb CsA a diferents dosis (6,25; 9,375; 12,5; 18,75; 25; 37,5 i 50 $\mu\text{g/ml}$) amb 12 rèpliques per dosi. Incloure els controls de background (medi sense cèl·lules), valors mínims (cèl·lules no tractades amb CsA) i valors màxims (cèl·lules lisades amb 2% triton X-100 al medi de cultiu).
3. Recuperar 100 μl de medi de cada pou.
4. Preparar la barreja de reacció segons el nombre de mostres a analitzar i seguint les indicacions del fabricant.
5. En placa d'ELISA de fons transparent barrejar els 100 μl de medi amb 100 μl de barreja de reacció.
6. Incubar 15 min a temperatura ambient.
7. Mesurar l'absorbància de les mostres a 490 nm utilitzant un lector de plaques d'ELISA.
8. Quantificar el percentatge de toxicitat amb la següent fórmula:

$$\text{Citotoxicitat (\%)} = (\text{valor experimental} - \text{valor mínim}) / (\text{valor màxim} - \text{valor mínim})$$

3. AMPLIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

L'amplificació d'àcids nucleics ens permet obtenir grans quantitats de DNA a partir d'un àcid nucleic motlle (ja sigui DNA o RNA) alhora que fa possible la introducció de modificacions específiques, com ara dianes de restricció als extrems del DNA, mutagènesi dirigida, addició de cues etc.

Les condicions d'amplificació (Saiki et al. 1988) depenen en gran part del fragment de DNA que es vol amplificar, així com de les característiques intrínseques dels *primers* d'elecció.

3.1. *Primers utilitzats*

A no ser que s'especifiqui el contrari, tots els *primers* han estat dissenyats escollint-se les parelles que presentaven unes condicions d'amplificació òptimes segons el programa OLIGO -4.02 Primer Analysis Software. Els oligonucleòtids van ser sintetitzats per Boehringer-Mannheim-ROCHE.

| Nom | Seqüència | Tm | Característiques |
|-----------|--------------------------------------|------|------------------|
| KCURT-LOW | 5'-GGAAGTAGGGGAGACTGG-3' | 54,0 | - |
| KCURT-UP | 5'-TTGCCTTAACCTACTAAAGC-3' | 55,3 | - |
| KUP2HYB | 5'-TATGTCGACGCATGATGCTTTTCAAGG-3' | 63,8 | Diana Sal I |
| KLOW2HYB | 5'-TAGTCGACGTCAGGAAGTAGGGGAGACTGG-3' | 66,0 | Diana Sal I |

| | | | |
|-------------|--------------------------------------|------|--------------|
| Cyp 28 | 5'- TGAATTCTCGGAGCGCAATATGAA- 3' | 59.3 | Diana Eco RI |
| Cyp 231 | 5'- TCTCGAGGGCTACAAAATTATCCACTG- 3' | 63.4 | Diana Xho I |
| Cyp 235 | 5'- TGAATTGCGGATAATTTTGTAGCCTTAGC-3' | 64.0 | Diana Eco RI |
| Cyp 515 low | 5'-TCTCGAGAACTTTGCCGAAAACCAC-3' | 63.0 | Diana Xho I |
| Cyp 515 up | 5'-TGAATTTCGTGGTTTTTCGGCAAAGTT-3' | 59.7 | Diana Eco RI |
| Cyp 664 | 5'-TCTCGAGTCCCCCAGGCTCTCTAC-3' | 67.8 | Diana Xho I |
| KAPpgeXUP | 5'-GGATCCGCATGATGCTTTTCAAGGTC-3' | 64.8 | Diana Bam HI |
| KAPpgeXLOW | 5'-GGATCCTCAGGAAGTAGGGGAGACTGG-3' | 69.5 | Diana Bam HI |
| GFP-KAPup | 5'-CTCGAGATGATGCTTTTCAAGG-3' | 61,1 | Diana Xho I |
| GFP-KAPlow | 5'-GGATCCTCAGGAAGTAGGGGAGAC-3' | 64,7 | Diana Bam HI |
| FlagKAP-UP | 5'-GTTCGACGTTCACTGGTTGCCTTAA-3' | 66,6 | Diana Sal I |
| FlagKAP-LOW | 5'-GTTCGACGGAAGTAGGGGAGACTG-3' | 65,5 | Diana Sal I |

Taula III: Primers utilitzats en les diferents amplificacions

3.2. Condicions d'amplificació

3.2.1. Transcripció reversa (RT)

La primera cadena de cDNA s'obté a partir del mRNA per extensió amb oligo(dT).

Barreja de RT

Concentracions finals

RNA.....20 ng/µl (RNA total) o 0,5 ng/µl (mRNA).
 Tampó de RT*.....1x
 dNTP's*.....200 µM
 Oligo (dT)*.....1 µM
 RNasin*.....0.8 U/µl
 MoMuLV*.....2 U/µl.

*PROMEGA

En 50 µl de volum final.

Incubar a 37 °C durant una hora i escalfar a 95 °C durant 10 min. Guardar a -20 °C.

3.2.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Són molts els paràmetres a contemplar en el disseny d'una reacció de PCR. La optimització de la mateixa passa per variar tant les concentracions dels reactius, com les temperatures i els temps d'amplificació. A continuació s'indiquen unes condicions estandar aplicables, com a punt de partida previ a l'optimització, a tots els productes amplificats.

Barreja de reacció

Tampó de PCR.....1x

| | |
|-------------------------|---------------------|
| MgCl ₂ | 1.5 mM |
| dNTPs (PROMEGA)..... | 200 µM |
| Primer 5'..... | 1 µM |
| Primer 3'..... | 1 µM |
| Taq polimerasa..... | 0.04 U/µl |
| H ₂ O..... | Fins al volum final |

Condicions d'amplificació

| | |
|--|--------|
| 94 °C 3 min | } x 30 |
| 92 °C (entre 15 seg i 1min) | |
| T _m (<i>primers</i>) - 5 °C (entre 15 seg i 1min) | |
| 72 °C (entre 30 seg i 3 min) | |
| 72 °C 5 min | |
| 4 °C | |

3.2.3. RT-PCR

Utilitzant una barreja de polimerases (transcriptasa reversa + taq DNA polimerasa) i unes condicions d'amplificació determinades, és possible realitzar la síntesi del cDNA i la PCR en un únic tub utilitzant *primers* específics. A tal efecte s'han utilitzat dos kits comercials: *Access RT-PCR System* de PROMEGA i *SuperScript One-Step RT-PCR System* de LIFE-TECNOLOGIESTM. En tots dos casos les reaccions d'amplificació es van dissenyar segons les indicacions de la casa subministradora, reduint el volum final de reacció a 50 µl.

4. METODOLOGIA DE DNA RECOMBINANT

4.1. Digestió de DNA

Totes les digestions s'han realitzat amb enzims de restricció de la casa Boehringer Mannheim-ROCHE a una concentració d'aproximadament 2 U/µg de DNA. Les temperatures utilitzades han estat les indicades per proveïdor i els temps de digestió han variat entre 2 i 18 hores.

4.2. Electroforesi de DNA

Per tal de visualitzar tant els productes de purificació d'àcids nucleics, com de PCR, com els resultats de les digestions hem utilitzat l'electroforesi en gels d'agarosa-TAE amb percentatges d'agarosa que han oscil·lat entre 0.7% i 2.5%, segons la grandària dels fragments a identificar. Les electroforesis s'han resolt a voltatges d'entre 70 i 115 V.

4.3. Purificació de DNA

S'han utilitzat diversos mètodes de purificació d'àcids nucleics, depenent de l'origen dels mateixos i de les seves característiques. Alguns d'aquests mètodes es basen en kits comercials i, en aquests casos, es va seguir el protocol indicat pel fabricant.

4.3.1. Purificació de productes de PCR:

Els DNAs amplificats mitjançant una reacció de PCR s'han separat dels *primers*, nucleòtids i enzims utilitzant el kit QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN) seguint les instruccions del fabricant.

4.3.2. Purificació a partir de gel d'agarosa

A partir de banda retallada de gel preparatiu i seguint les instruccions del kit QIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN) o del kit Agarose Gel DNA Extraction Kit (ROCHE). El primer d'aquests kits es basa en la unió del DNA a la membrana carregada d'una columna. El segon, en canvi, aprofita la capacitat del DNA de lligar-se a una resina de sílica en presència d'una sal caotrópica. El kit QIAquick proporciona un DNA més net i és el sistema d'elecció quan el destí del producte purificat és la seqüenciació automàtica. El Agarose Gel DNA Extraction Kit, en canvi, proporciona un més alt rendiment de purificació.

4.3.3. Minipreparació de DNA plasmídic

Bàsicament s'han emprat dos protocols diferents per a l'obtenció de DNA plasmídic: lisi amb liozima i *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*. Amb tots dos mètodes s'obtenen 1-5 µg de DNA / ml de cultiu i aquest ADN és suficientment pur per a les digestions amb enzims de restricció i per a la seqüenciació manual.

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Seguint les instruccions del fabricant. Modifiquem el volum de resuspensió portant a 50 µl finals (el protocol original indica 100 µl). Aquest és el protocol d'elecció per a la posterior seqüenciació automàtica.

Protocol de minipreparació de DNA plasmídic per lisi amb liozima

1. Inocular 3 ml de LB estèril suplementat amb ampicil·lina amb la colònia o *stock* bacterià que es desitja amplificar. Créixer en agitació (250 rpm) a 37 °C durant 10-18 hores.

2. Centrifugar 1,5 ml de cultiu a 12000 rpm durant 1 minut en microfuga a temperatura ambient.
3. Descartar un 90% del sobrenedant per inversió i resuspendre el *pellet* en el que resti de sobrenedant.
4. Afegir 300 µl de solució A+B (just abans d'utilitzar-la se suplementa amb 1 mg/ml de lisozima i 10 µg/ml de ribonucleasa A bullida).
5. Afegir 2 µl de dietilpirocarbonat (DEPC) 25% (v/v) en etanol.
6. Barrejar per inversió i incubar 10 min a 70 °C.
7. Deixar 30 min en gel.
8. Centrifugar a 12000 rpm durant 15 min a temperatura ambient.
9. Treure el precipitat, que té consistència mucosa, amb un escuradents estèril.
10. Precipitar el DNA afegint 2 vol d'etanol 100% a temperatura ambient. Barrejar per inversió.
11. Centrifugar immediatament a 12500 rpm durant 15 min i a temperatura ambient.
12. Descartar el sobrenedant i deixar assecat el *pellet*.
13. Resuspendre en 50 µl d'aigua estèril i guardar a -20 °C.

4.3.4. Maxipreparació de DNA plasmídic

Maxipreparació de DNA plasmídic de E.coli amb kit QIAGEN Plasmid Maxi kit seguint les instruccions del fabricant.

4.4. Lligació de fragments de DNA

4.4.1. Lligació de productes de PCR

Algunes polimerases presenten activitat adenosina transferasa 3' terminal, de manera que els productes amplificats tenen en els seus extrems adenosines protuberants. La lligació d'aquests fragments aprofita aquesta característica utilitzant vectors plasmídics amb extrems 3' timidina protuberants. Hem utilitzat el kit *pGEM-T i pGEM-T Easy Vector System* de PROMEGA basat en aquest principi i seguint les instruccions del proveïdor.

4.4.2. Lligació de fragments cohesius

Els fragments amb extrems cohesius els hem lligat mitjançant la lligasa de T4 de PROMEGA. És necessari defosforilar el vector quan les dianes dels extrems són compatibles per tal d'evitar la recircularització del plàsmid.

Defosforilació del vector:

10x Tampó de fosfatasa alcalina.....10 µl
 Vector digerit.....10 µg
 Fosfatasa alcalina (1 U/µl).....0.02 U/µl

H₂O.....Fins a 100 µl
Incubar a 37 °C durant 60 min.

Inactivar la fosfatasa amb 1/10 del volum de 200mM EGTA.
Escalfar a 65 °C 10 min

Lligació

DNA plasmídic digerit.....100 ng
DNA de l'insert.....*
Tampó 10x.....1 µl
Lligasa de T4.....1 U
H₂O.....Fins a 10 µl

Incubar 16 h a 15 °C.

*Hem utilitzat ratis molars vector:insert de 3:1 calculats amb la fórmula següent:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{mida de l'insert (en Kb)}}{\text{mida del vector (en Kb)}} \times \frac{1}{3} = \text{ng d'insert}$$

4.5. Transformació

El protocol d'obtenció de bacteris competents es va realitzar en base al mètode de transformació emprat, seguint-se les instruccions detallades en el manual de l'aparell d'electroporació. Les soques d'*E.coli* que s'han fet servir han estat JM109 i DH5- .

4.5.1. Protocol d'obtenció de cèl·lules competents

1. Créixer en una placa d'LB sense antibiòtic, un *streak* de la soca d'*E.coli* a 37°C o.n.
2. Inocular un minicultiu líquid de 3 ml d'LB amb una colònia aïllada. Créixer o.n.
3. Amb 1ml del cultiu fresc inocular un Erlenmeyer de dos litres amb 500 ml d'LB. Incubar-ho a 37°C amb agitació (225rpm) fins que el cultiu assoleixi una densitat A₅₉₅ ~0.7-0.8 (fase exponencial).
4. Deixar el cultiu en gel durant 15 min.
5. Centrifugar a 3500 rpm durant 15 min a 4°C .Decantar el sobrenedant.
6. Resuspendre el *pellet* bacterià en 500 ml d'H₂O freda (4 °C) estèril. Centrifugar de nou com en el pas 5.
7. Decantar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 250 ml d'H₂O freda autoclavada. Centrifugar com en el pas 5.
8. Resuspendre els bacteris en 10 ml de glicerol al 10% en H₂O fred i centrifugar com al punt 5.
9. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en un volum de 1-2ml de glicerol 10% fred. Repartir els bacteris resuspesos en alíquotes de 40µl i congelar-les ràpidament en un bany de acetona/neu carbònica. Conservar les cèl·lules competents a -80°C.

4.5.2. Protocol d'electroporació

S'ha utilitzat l'aparell Bio-Rad *Gene Pulser*TM de Bio-Rad amb cubetes d'electroporació de 0,2 cm

1. Es descongela en gel una alíquota de cèl·lules competents, mantenir fredes les cubetes d'electroporació i el suport de les cubetes.
2. Afegir a la suspensió de bacteris 1-3 µl del DNA que es desitgi transformar (~50 ng). Es barreja suaument. Mantenir en gel durant 1 min.
3. Condicions de l'electroporador:

| | |
|--------------|--------|
| resistència | 200 |
| capacitància | 25 µF |
| Voltatge | 2.5 kV |
4. Transferir la els bacteris amb DNA a la cubeta refredada en gel.
5. Situar la cubeta en el suport i introduir-los a la cambra d'electroporació fins que contacti amb els electrodes.
6. Realitzar el pols amb els paràmetres seleccionats.
7. Afegir a la cubeta 1 ml de medi LB, recuperar tot el volum i incubar a 37°C durant 45 min.
8. Sembrar una alíquota de 100 µl en plaques de medi selectiu, per tal d'identificar els transformants.

4.6. **Seqüenciació d'àcids nucleics**

Seqüenciació manual: Hem utilitzat el mètode de seqüenciació manual descrit inicialment per Sanger i col·laboradors (Sanger, 1977) amb el kit *T7 Sequanase* v2.0 (Amersham-Pharmacia-Biotech) amb algunes modificacions sobre el protocol indicat pel fabricant.

Seqüenciació automàtica: Bona part de les seqüències han estat realitzades per part del servei intern de seqüenciació del Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM) amb el seqüenciador automàtic *Abi-prism 310 Genetic Analyser* (Perkin Elmer) utilitzant el kit *ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit*.

4.6.1. Protocol de seqüenciació manual

1. Barrejar en un tub 8 µl de DNA (a aprox. 150 ng/µl), 2 µl de NaOH (1M) i 1 µl de *primer* (2µM).
2. Incubar 10 min a 37 °C. Clavar en gel.
3. Afegir 2 µl de HCl (1M) i 2µl de PRB (0.4 µM Tri-HCl pH 7.5, 0.1 µM MgCl₂, 250 mM NaCl). Incubar 10 min a 37 °C. Clavar en gel.
4. Afegir 1µl de 0.1M DTT, 2 µl de *labeling mix* 1x, 1 µl de ³³PdATP, 2µl de *Sequenase* diluïda. Incubar 5 min a temperatura ambient.
5. Aliquotar 2,5 µl de cada ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP i ddGTP) en tub.

6. Transferir 4,5 µl de la barreja anterior a cada tub de ddNTP. Incubar 5 min a 37 °C.
7. Aturar la reacció amb 4 µl de STOP solution.
8. Escalfar les mostres a 75 °C 2 min i córrer 3 µl en gel 6% d'acrilamida 8M urea.
9. Desmuntar el gel i fixar-lo en una solució de 5% àcid acètic-15% metanol durant 20 min.
10. Assecar el gel sobre paper Watmann 3MM i exposar una pel·lícula autoradiogràfica aproximadament 18 hores.

4.6.2. Protocol de seqüenciació automàtica

1. En tub de paret fina per a PCR barrejar:

900 ng de DNA plasmídic
5 pmols de primer
4 µl de *dRhodamine Terminator Cycle Sequen. Ready React. kit*
H₂O MilliQ autoclavada fins a 20 µl

2. Dur a terme la reacció de seqüència en termociclador amb les següents condicions:

| | |
|------------------|-------------|
| 94°C.....3 min | } 25 cicles |
| 96°C.....10 seg | |
| Tm-5°C.....5 seg | |
| 60°C.....4 min | |
| 4°C..... | |

3. En tub Eppendorff de 1,5 ml barrejar:

16 µl de H₂O MilliQ autoclavada
3,1 µl de Mg Cl₂ 12,5 M
55 µl d'etanol 95%
Els 20 µl de la reacció de seqüència

4. Deixar reposar 10 min a temperatura ambient.
5. Microfugar 15 min a temperatura ambient.
6. Descartar el sobrenedant i rentar el *pellet* amb 150 µl d'etanol 70%.
7. Decantar l'etanol, assecar les mostres a temperatura ambient o 37°C i guardar el *pellet* a 4°C.

5. NORTHERN BLOT

La transferència de RNA d'un gel d'agarosa a membrana de niló o nitrocel·lulosa és conceptualment similar a la transferència de DNA o Southern (Southern, 1975). El RNA es desnatura amb formaldehid abans de carregar el gel (Thomas, 1980), la transferència es dona per capil·laritat en gradient salí i és necessari fixar el RNA a la membrana.

5.1. *Preparació de les mostres i electroforesi*

Gel de formaldehid

Agarosa.....1.1%

MOPS.....1x
 Formaldehid 37%.....18% (v/v)
 Aigua DEPC.....Fins al volum final

Desfer l'agarosa amb l'aigua, refredar fins a 60 °C i afegir poc a poc els MOPS i el formaldehid (a campana de fums).

Desnaturalització de les mostres (Barrejar en l'ordre indicat)

RNA.....5 µg de poliA
 MOPS.....1X
 Formaldehid 37%.....18% (v/v)
 Formamida desionitzada.....50% (v/v)
 Desnaturalitzar 10 min a 65 °C
 Tampó de càrrega..... 1X

Carregar en gel i córrer suficientment en MOPS 1X

5.2. Transferència del RNA

1. Treure el gel de la cubeta d'electroforesi i retallar el carril del marcador molecular.
2. Tenyir el marcador amb bromur d'etidi i fotografiar
3. Rentar el gel varies vegades amb H₂O destil·lada abundant
4. Rentar 45 min en 20 x SSC.
5. Muntar la transferència , transferir a membrana Zeta-Probe Bio-Rad .
6. Desmuntar la transferència i fixar el RNA al filtre mitjançant irradiació ultraviolada

5.3. Marcatge de la sonda

En tots els casos hem partit de 25 ng de DNA de doble cadena purificat que hem marcat *per Random Priming* utilitzant [-P³²]dCTP amb el kit *Prime-It II* de Stratagene, seguint les indicacions del fabricant.

Precipitació de la sonda

1. A 50 µl de marcatge afegir:
 - 5 µl de AcNa 3M pH 5.0
 - 10 µl de tRNA (10 mg/ml)
 - 150 µl d'etanol 100% (-20 °C)
2. Incubar 15 min a -80 °C.
3. Centrifugar 15 min a 13.000 rpm.
4. Rentar el *pellet* amb etanol 70 %.
5. Centrifugar 15 min a -80 °C.
6. Resuspendre el *pellet* en 100 µl de H₂O destil·lada.
7. Valorar amb el comptador de centelleig la quantitat de radioactivitat incorporada a la sonda.

5.4. Hibridació i exposició

Les condicions de pre-hibridació, hibridació i rentats depenen per una banda del tipus de sonda a utilitzar (tipus d'acid nucleic, mètode de marcatge, llargada i homologia amb l'acid nucleic a detectar) i per altra de les característiques intrínseques de la membrana. Hem seguit les instruccions del fabricant de la membrana Zeta-Probe Bio-Rad per a les hibridacions amb sondes de DNA.

1. Pre-hibridar la membrana durant 5 min amb solució de prehibridació (7% SDS, 50% (v/v) formamida, 0,12 M Na₂HPO₄ i 0,25 M NaCl)
2. Desnaturalitzar la sonda 5 min a 100 °C
3. Afegir 10⁶ cpm / ml de solució d'hibridació.
4. Hibridar a 42 °C en forn d'hibridació 12-18 hores.
5. Rentar amb 2xSSC 0.1 % SDS 10 min. Repetir 4 vegades
6. Rentar amb 0.5xSSC 0.1% SDS 10 min.
7. Rentar amb 0.2xSSC 0.1% SDS entre 20 min i 1 hora a 50 °C.
8. Exposar un film d'autoradiografia (*Hyperfilm*, Amersham-Pharmacia-Biotech).
9. Revelar.

6. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES

6.1. Expressió en bacteri. Proteïnes de fusió amb GST

Hem utilitzat un sistema d'expressió procariòtic que ens permet sobre-expressar alhora que purificar la proteïna recombinant d'interès. El sistema pGEX de Pharmacia es fonamenta en la utilització d'un promotor fort induïble per IPTG i la generació d'una proteïna híbrida amb GST (glutathione-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*). Aquesta construcció híbrida ens permet purificar la proteïna mitjançant una resina de Sepharose 4B acoblada a glutathion. Per altra banda també és possible eliminar el fragment de GST digerint amb la proteasa factor Xa.

Per RT-PCR amplifiquem el cDNA de KAP amb els primers pGEXUP i pGEXLOW. Lliguem en pGEM-T i digerim amb l'enzim BamHI. Purifiquem l'insert i subclonem en pGEX-3 (Pharmacia).

Comprovem per patró de restricció i seqüenciació automàtica l'orientació i integritat de l'insert. Un cop triats un clon *sense* i un *anti-sense* s'electroporen JM109 amb aquests plàsmids i s'indueix l'expressió de proteïna.

La presència de cossos d'inclusió provocada per la sobre-expressió de la proteïna és un dels principals inconvenients d'aquests sistemes procariòtics. Aquests agregats

insolubles de proteïna mal plegada són fàcilment purificables però la seva solubilització presenta sovint dificultats. Així, hem emprat un protocol de solubilització de cossos d'inclusió que utilitza clorhidrat de guanidina 6M com a agent solubilitzador i sulfobetaines no detergents (NDSB) com a facilitadores de la renaturalització i bon plegament de la proteïna (Vuillard, et al. 1998, Blisnick, et al. 1998, Goldberg, et al. 1996). El protocol original es pot obtenir a: <http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/inclusion.html>. En els casos en que la proteïna no sigui insoluble (per exemple, la GST sola) es segueix el protocol indicat per la casa comercial.

6.1.1. Protocol d'expressió de proteïnes de fusió amb GST (cossos d'inclusió)

1. Iniciar un cultiu o.n. en 3 ml de LB-amp a partir de colònia aïllada.
2. Inocular 25 ml de LB-amp amb 375 µl del cultiu o.n. Afegir 1,25 ml de glucosa 40% (inhibeix l'expressió basal del promotor induïble per IPTG).
3. Créixer a 37°C fins a O.D. 0,6-0,8 (aproximadament 5 h).
4. Induir amb IPTG (concentració final 0,1 mM) durant 2 h.
5. Centrifugar i guardar el *pellet* congelat.
6. Resuspendre el *pellet* en 500 µl de tampó de resuspensió (50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM DTT) suplementat amb 0,35 mg / ml de liozima i incubar 30 min a temperatura ambient.
7. Afegir triton X-100 (concentració final 1%) i sonicar amb polsos de 30 segons fins que la solució deixi de ser tèrbola.
8. Tractar amb DNAsa I (20 mg/ml) durant 1h a 37°C.
9. Microfugar 30 min a 4°C per sedimentar els cossos d'inclusió.
10. Rentar el *pellet* amb PBS contenint 1% triton X-100 i microfugar 30 min a 4°C. Repetir el rentat.
11. Solubilitzar el *pellet* amb 50 µl de tampó de solubilització (50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 6M clorhidrat de guanidina, 25 mM DTT) i deixar 1 h a 4°C.
12. Microfugar 30 min a 4°C per eliminar els agregats no solubilitzats.
13. Recuperar el sobrenedant i diluir amb 20 volums de tampó de plegament fred (50 mM HEPES pH 7,5, 0,2 M NaCl, 1 mM DTT, 1M NDSB201 (Calbiochem)). La dilució ha de ser gota a gota, utilitzant Vortex i dispensant la proteïna en el tampó de plegament.
14. Rentar la resina de Glutathione Sepharose 4B amb tampó de plegament.
15. Afegir 100 µl de resina (50%) a la proteïna plegada i incubar en rotació a 4°C o.n.
16. Rentar la resina amb 1 ml de PBS fins a un total de 3 rentats.
17. Depenent de la utilització que vulguem fer de la resina es pot equilibrar en el tampó d'elecció, o equilibrar en 200 µl de PBS i guardar a 4°C fins a la seva utilització.

6.2. Expressió “*in vitro*”. Reticulòcit de conill i membranes microsomals

El procès de síntesi *in vitro* de proteïnes consta de tres etapes principals:

- Clonatge del cDNA de la proteïna d'interès en un vector que contingui regions promotores per a les polimerases víriques de T3, T7 o SP6.
- Obtenció de mRNA mitjançant la transcripció d'aquest cDNA per part de la RNA polimerasa de bacteriòfag d'elecció.
- Traducció del missatger en presència d'un aminoàcid marcat ([³⁵S]-Metionina, Amersham Pharmacia Biotech) i utilitzant un lisat de reticulòcit de conill que conté els elements indispensables per a la traducció de la proteïna. De manera complementària, la utilització de membranes microsomals pancreàtiques canines durant el procés de traducció, permet la modificació post-traduccional de la proteïna expressada.

S'ha utilitzat un sistema comercial de transcripció i traducció acoblada (TNT-Promega) conjuntament amb membranes microsomals pancreàtiques canines (PROMEGA). Així, a partir d'un cDNA clonat sota el control d'un promotor de RNA polimerasa (SP6, T3 o T7), s'obté el mRNA i simultàniament la proteïna. La presència en el medi de metionina marcada radioactivament permet la posterior identificació de la proteïna d'elecció.

6.2.1. Protocol de síntesi *in vitro* de proteïnes

1. Barrejar en tub de 1,5 ml:
 - 12,5 µl de lisat de reticulòcit
 - 0,5 µl de tampó de la polimerasa
 - 0,5 µl d'aminoàcids (sense metionina)
 - 0,5 µl de RNAsin[®] (PROMEGA)
 - 0,5 µl de RNA polimerasa
 - 2 µl de [³⁵S]-Metionina
 - 1 µg de DNA plasmídic
 - Opcionalment s'hi pot afegir 1 µl de membranes microsomals canines
2. Incubar a 30°C durant 90 min.
3. Carregar SDS-PAGE amb 5 µl d'una dilució 1:5 de la reacció en tampó de càrrega.
4. Fixar el gel 30 min en 50% metanol 10% àcid acètic.
5. Incubar 10 min en salicilat sòdic 1M.
6. Rentar 5 min amb H₂O.
7. Assecar el gel sobre paper Watman[®]3MM i exposar pel·lícula autoradiogràfica.

6.3. Expressió en línies cel·lulars

6.3.1. Sistema regulable d'expressió. Tet-Off

El sistema Tet-OFF (Clontech) es basa en una doble transfecció estable; en la primera d'aquestes transfeccions s'introdueix un plàsmid que codifica per a un regulador transcripcional inhibït per l'antibiòtic tetraciclina. El segon plàsmid transfectat conté el cDNA de la proteïna que volem expressar sota el control d'un promotor sensible al regulador transcripcional de la primera transfecció.

Com a resultat s'obtenen clons cel·lulars que, en absència de tetraciclina, expressen el cDNA d'interès; aquesta expressió es reprimeix en presència de l'antibiòtic.

Protocol d'obtenció de les línies Tet-Off™

1. Amplificar per RT-PCR el cDNA de KAP amb els primers KAPpgexUP i KAPpgexLOW.
2. Subclonar en el vector pTRE i comprovar pauta i seqüència per seqüenciació automàtica.
3. Transfectar de manera estable el plàsmid pTet-Off en la línia cel·lular PCT.
4. Assajar els clons transfectats mitjançant la transfecció transitòria del plàsmid pTRE-Luc i valorar els nivells d'activitat luciferasa (Luciferase Assay System, PROMEGA) en absència o presència de tetraciclina.
5. De tots els clons, seleccionar aquell que presenti els nivells més baixos d'activitat basal i alhora els nivells més alts d'inducció per absència de tetraciclina.
6. Transfectar de manera estable el clon seleccionat amb els constructes pTRE-KAP *sense* i *antisense* conjuntament amb el plàsmid pTK que codifica per a la resistència a l'antibiòtic.
7. Seleccionar aquells clons que presentin uns nivells d'inducció més elevats del mRNA de KAP i de l'antisentit.

6.3.2. Proteïnes de fusió amb GFP i FLAG

L'expressió transitòria de proteïnes en línies cel·lulars és una altra opció que, tot i requerir la transfecció de les cèl·lules a cada assaig, proporciona uns nivells d'expressió de proteïna força més elevats que la transfecció estable. S'han utilitzat dos sistemes, ambdós basats en la transfecció transitòria de proteïnes de fusió.

GFP-KAP

La Green Fluorescent Protein (GFP) es va purificar originalment de l'organisme *Aequorea victoria*. La GFP salvatge emet llum en activar-se per la fosfoproteïna activada per calci, aequorin. Aquesta GFP salvatge s'ha modificat genèticament per tal

d'optimitzar la seva utilització en sistemes experimentals. Així, la EGFP presenta 35 vegades més intensitat de fluorescència que la GFP.

El cDNA de KAP es va amplificar amb els primers GFP-KAPup i GFP-KAPlow mitjançant RT-PCR a partir de RNA de ronyó de ratolí. Un cop clonat el producte de PCR, es va subclonar en el plàsmid pEGFP-3 utilitzant les dianes incorporades als primers. La proteïna de fusió conté la GFP en l'extrem amino terminal i KAP en l'extrem carboxi-terminal.

Es comprova per seqüenciació automàtica la correcta seqüència i orientació de l'insert i es transfecta de manera transitòria seguint el protocol ja especificat. Entre 18 i 24 hores post-transfecció les cèl·lules són tripsinitzades i sembrades sobre cubres o portes amb anells de teflon. A l'endemà els cultius es renten i es fixen (veure protocol d'immunocitoquímica) i es visualitza la proteïna de fusió procedint segons el protocol de contra-tinció per a microscopia confocal.

KAP-FLAG

Les proteïnes de fusió amb el pèptid FLAG són una alternativa als híbrids amb GFP. Com a avantatge presenta el fet que el FLAG és considerablement més petit que la GFP, reduint-se així els resultats artefactuals provocats per la presència de la proteïna. Per altra banda el taq està situat en l'extrem carboxi-terminal deixant lliure l'extrem amino-terminal de KAP. Tanmateix, l'existència d'anticossos específics contra el pèptid FLAG, així com de resines conjugades a aquests anticossos facilita enormement els assaigs de immunoprecipitació de la proteïna de fusió. Com a contrapartida, la visualització de la proteïna en cultius cel·lulars no és tan immediata com en el cas de les fusions amb GFP i passa per la realització d'una immunocitoquímica.

Breument, el cDNA de KAP s'amplifica per RT-PCR amb els primers flagKAP-UP i flagKAP-LOW, es comprova la seqüència i la orientació per seqüenciació automàtica i es subclona en el plàsmid pCMV-FLAG5. Les cèl·lules PCT són transfectades amb aquest plàsmid i, 48 hores després de la transfecció, el medi i les cèl·lules són assajats per a la presència de la proteïna híbrida seguint les instruccions del fabricant.

7. TÈCNIQUES IMMUNOLÒGIQUES

7.1. Anàlisi de proteïnes per SDS-PAGE d'una dimensió i Western blot

La tècnica de Western blot consisteix bàsicament en la separació i transferència a membrana d'una barreja més o menys complexa de proteïnes. L'electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE) és probablement la tècnica analítica més emprada per separar i caracteritzar proteïnes. La barreja acrilamida-bisacrilamida polimeritza formant unes xarxes més o menys complexes segons el rati acrilamida: bisacrilamida. Aquesta polimerització és induïda pel persulfat amònic i catalitzada pel TEMED. L' SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) és un detergent amfipàtic amb un cap aniònic i una cua lipofílica; s'uneix no-covalentment a les proteïnes (aproximadament 1 molècula de SDS per cada dos aminoàcids) provocant la seva desnaturalització i carregant-les negativament, neutralitzant la càrrega intrínseca de la proteïna.

Un cop separades electroforèticament les proteïnes es transfereixen a membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride) i s'hibriden amb anticossos que reconeixen específicament les proteïnes d'interès. La utilització d'un anticòs secundari marcat permet la visualització dels resultat.

7.1.1. Protocol de SDS-PAGE

1. Muntar els vidres de l'aparell Miniprotean II o Miniprotean III (Bio-Rad).
2. Abocar el gel separador preparat segons la taula. Deixar polimeritzar.
3. Abocar el gel concentrador preparat segons la taula. Situar la pinta i deixar polimeritzar.
4. Diluir les mostres en tampó de càrrega, bullir 3 min i clavar en gel.
5. Muntar els gels en la cubeta, cobrir amb tampó d'electroforesi i carregar les mostres.
6. Córrer a 20 mA / gel durant 1h o fins que surti el front.
7. Desmuntar el gels.

| | Gel 10 % | Gel 12% | Gel 15% | | Gel concentrador |
|------------------------|----------|---------|---------|------------------------|------------------|
| 30 % acril / 0,8 % bis | 5,0 ml | 6,0 ml | 7,5 ml | 30 % acril / 0,8 % bis | 0,65 ml |
| 4 x Tris / SDS pH 8,8 | 3,75 ml | 3,75 ml | 3,75 ml | 4 x Tris / SDS pH 6,8 | 1,25 ml |
| H ₂ O | 6,25 ml | 5,25 ml | 3,75 ml | H ₂ O | 3,05 ml |
| 10% Persulfat amònic | 0,05 ml | 0,05 ml | 0,05 ml | 10% Persulfat amònic | 0,025 ml |
| TEMED | 0,01 ml | 0,01 ml | 0,01 ml | TEMED | 0,01 ml |

Taula IV: Volums necessaris per a la preparació de dos mini gels de poliacrilamida.

7.1.2. Protocol de Western blot

1. Equilibrar els gels en tampó de transferència.
2. Activar la membrana de WESTRAN® PVDF (Schleicher & Schuell) submergint-la 5 seg en metanol, rentar 3 cops amb H₂O.
3. Equilibrar la membrana en tampó de transferència.
4. Muntar la transferència seguint les instruccions de l'aparell i transferir a 400 mA durant 90 min.
5. Desmuntar la transferència.
6. Bloquejar les membranes amb 5% llet en pols descremada en 1 x PBS, entre 1 i 18 hores a temperatura ambient.
7. Incubar amb anticòs primari diluït en PBS-T durant 1h a temperatura ambient.
8. Rentar amb quantitat suficient de PBS-T durant 10 min, repetir fins a un total de 3 rentats.
9. Incubar amb anticòs secundari conjugat a peroxidasa diluït 1:5000 en PBS-T durant 1h a temperatura ambient (TA).
10. Rentar amb quantitat suficient de PBS-T durant 10 min, repetir fins a un total de 3 rentats.
11. Revelar amb ECL+Plus (Amersham farmacia biotech).
12. Exposar pel·lícula autoradiogràfica entre 5 seg i 15 min.
13. Revelar.

7.2. **Immunoprecipitació**

Els protocols d'immunoprecipitació es fonamenten en la formació del complex antígen-anticòs específic i en la capacitat de fer precipitar aquests complexos, ja sigui amb la conjugació prèvia de anticòs a una resina o bé utilitzant resines conjugades a proteïnes que específicament reconeixin i s'acomplexin a anticòs.

7.2.1. *Immunoprecipitació a partir de teixit*

La immunoprecipitació a partir de teixit depèn de la disponibilitat d'anticossos específics amb capacitat d'immunoprecipitar la proteïna d'estudi.

Protocol d'immunoprecipitació

1. Barrejar en gel: 1 mg d'extracte total
Tampó RIPA fins a 500 µl
25 µl de proteïna G-Sepharose (SIGMA)
2. Incubar en agitador orbital durant 60 min a 4°C.
3. Microfugar 1 min a 4°C per eliminar els agregats no específics.
4. Recuperar el sobrenedant i afegir 1 µg anticòs específic.
5. Incubar 90 min a 4°C en agitació orbital.
6. Afegir 50 µl de proteïna G-Sepharose (SIGMA).
7. Incubar en agitació orbital a 4°C entre 2 i 18 hores.
8. Precipitar la resina centrifugant 30 seg a 1000 rpm a 4°C.

9. Rentar 3 vegades la resina amb 1 ml de tampó RIPA.
10. Rentar 3 vegades la resina amb 1 ml de PBS.
11. Resuspendre la resina en 25 µl de tampó de càrrega.
12. Procedir a l'anàlisi per SDS-PAGE i western blot o bé congelar a -80°C.

7.2.2. Immunoprecipitació de proteïnes de fusió amb FLAG

En aquest cas, per a la immunoprecipitació utilitzem l'anticòs anti-FLAG conjugat a un gel que facilita la precipitació.

Protocol

1. 48 hores post-transfecció recuperar el medi i rentar les cèl·lules amb TBS/Ca.
2. Afegir 1 ml de tampó de lisis a les cèl·lules (TBS/ Ca, 1% triton X-100).
3. Recuperar el lisat cel·lular i centrifugar 15 seg el medi i les cèl·lules.
4. Afegir 100 µl de gel conjugat a l'anticòs antiFLAG M2.
5. Incubar en agitació orbital a 4° C durant 18 h.
6. Rentar la resina 5 vegades amb 1 ml de TBS/ Ca.
7. Resusperndre la resina en 100 µl de tampó de càrrega i procedir a SDS-PAGE i western blot.

7.3. Immunohistoquímica i immunocitoquímica

7.3.1. Protocol d'immunohistoquímica

1. Treure els portes del congelador (-80°C) i deixar atemperar.
2. Submergir en acetona freda (-20°C) durant 10 min.
3. Rentar amb PBS durant 3 min 3 vegades.
4. Bloquejar l'activitat peroxidasa amb H₂O₂ 0.3% en PBS.
5. Rentar amb PBS 1x durant 3 min 3 vegades.
6. Bloquejar durant 10 min amb sèrum de cavall diluït 1:20 en PBS.
7. Eliminar l'excés de solució de bloqueig i, sense rentar, incubar amb anticòs primari a una concentració de 20 µg/ml. Incubar 1 hora 30 min.
8. Rentar amb PBS-Tween-20 0.01% durant 3 min 3 vegades.
9. Afegir anticòs secundari diluït 1:200. Incubar 1 hora.
10. Rentar amb PBS-Tween 3 vegades 3 minuts.
11. Revelar amb solució de diaminobenzidina (DAB) amb 1µl/ml de H₂O₂ 1 min
12. Rentar amb PBS 3 vegades 3 min.
13. Contra-tenyir 1 min en hematoxilina diluïda al 20% en PBS
14. Rentar amb aigua corrent
15. Deshidratar en banys successius d'etanol de 50% al 100%. Passar finalment a xilè i muntar amb DPX.
16. Visualitzar el marcatge amb microscopia òptica i captar les imatges amb microscopi òptic.

7.3.2. Protocol d'immunocitoquímica

1. Les cèl·lules a estudiar han estat creixent sobre cubre o sobre porta durant 18-24 hores
2. Rentar amb PBS fred, 3 min 3 vegades
3. Fixar amb metanol:acetona 1:1 fred 1 min
4. Rentar amb PBS, 3 min 3 vegades
5. Incubar amb anticòs primari diluït a 20 mg/ ml en PBS durant 1h 30 min
6. Rentar amb PBS, 3 min 3 vegades
7. Incubar amb anticòs secundari diluït 1:200 en PBS durant 1h
8. Rentar amb PBS, 3 min 3 vegades

7.3.3. Contra-tinció per a microscopia òptica

1. Contra-tenyir durant 1 min amb hematoxilina diluïda en PBS
2. Rentar amb abundant aigua corrent
3. Rentar amb PBS 3 min
4. Muntar amb AQUATEX® (MERCK)
5. Visualitzar en microscopi òptic

7.3.4. Contra-tinció per a microscopia confocal

1. Rentar amb 2xSSC durant 3 min.
2. Contra-tenyir durant 2 min amb TO-PRO™3 (1 mM) (Molecular probes, Inc) o iodur de propidi (1,5 mM) (Sigma) diluïts 1:3000 en 2x SSC.
3. Rentar amb 2x SSC durant 3 min.
4. Rentar amb PBS durant 3 min.
5. Equilibrar durant 5 min amb el component C de l'*SlowFade™ Antifade Kit* (Molecular probes, Inc).
6. Descartar el component C i muntar amb unes gotes de component A.
7. Segellar amb laca d'ungles i visualitzar al microscopi confocal.

8. DETECCIÓ D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA

8.1. *Doble híbrid*

El sistema de dobles híbrids és un model eucariòtic que permet la identificació de gens que codifiquen per proteïnes que interaccionen amb la proteïna d'interès o *bait* (Fields, 1989). Aquest sistema es basa en la naturalesa modular d'alguns activadors transcripcionals. Això ens permet escindir els seus dominis funcionals -per una banda, el

domini d'unió a DNA i per l'altra el domini d'activació-, recuperant-se la funció activadora en reunir de nou ambdós dominis.

Es construeixen sengles vectors d'expressió de llevat que contenen:

- el cDNA del domini d'unió fusionat al cDNA de nostra proteïna d'interès KAP.
- el cDNA del domini d'activació fusionat a una llibreria de cDNAs de ronyó.

L'expressió d'aquestes proteïnes híbrides està sota el control d'un promotor constitutiu. La interacció de la nostra proteïna KAP amb alguna de les proteïnes de ronyó aproxima els dominis de l'activador transcripcional, essent aquesta unió fàcilment detectable en posar un gen indicador sota el control d'aquest activador transcripcional.

8.1.1. Amplificació i titulació del fag helper

Protocol d'amplificació

1. Sembrar bacteris XL1-Blue MRF' en medi sòlid selectiu (LB-tet). Creïxer o.n. a 37 °C
2. Inocular 10 ml de medi 2xYT amb una colònia aïllada i créixer a 37 °C en agitació fins a OD₆₀₀ d'aproximadament 0.3.
3. Afegir el fag helper a una multiplicitat d'infecció de 20:1 (fags:bacteris) assumint que una OD₆₀₀ de 1 equival a una concentració de 8·10⁸ cèl·lules/ml.
4. Créixer el cultiu en agitació a 37 °C durant 8 hores.
5. Escalfar el cultiu a 65 °C durant 15 min.
6. Centrifugar a 3500 rpm 5 min i transferir el sobrenedant a un tub nou.
7. Titular el sobrenedant, afegir DMSO a una concentració de 7% (v/v) i congelar a -80 °C.

Protocol de titulació

1. Fer les següents dilucions del sobrenedant de l'apartat anterior (en TE)
2. 10⁻⁵, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰.
3. Combinar aquestes dilucions amb 200 µl de XL1-Blue MRF' (OD₆₀₀=1.0)
4. Incubar 15 min amb agitació suau a 37 °C per tal de permetre que els fags s'enganxin a les cèl·lules.
5. Afegir 3 ml de NZY-top agar (prèviament fosa i refredat a 48 °C) i abocar ràpidament en plaques de NZY-agar atemperades a 37 °C.
6. Incubar les plaques a 37 °C o.n.
7. Comptar el nombre de calbes i aplicar la següent fórmula per obtenir el títol del sobrenedant:

$$\frac{\text{nombre de calbes} \times \text{factor de dilució}}{\text{Volum de fags sembrat } (\mu\text{l})} \times 1000$$

8.1.2. Escissió "in vivo" de la llibreria

Hem utilitzat una llibreria de ronyó de ratolí mascle de la casa Stratagene, especialment dissenyada per al sistema de dobles híbrids. El vector de clonatge d'aquesta llibreria és el *HybriZapTM Two-Hybrid Vector*. Aquest vector permet l'escissió dels inserts continguts en el vector víric lambda, donant lloc a un conjunt de fagèmids que contenen els inserts de cDNA.

Protocol d'escissió

1. Inocular sengles cultius líquids (100 ml) a partir de colònia aïllada de XL1-Blue MRF' i XLOLR.
2. Créixer els cultius o.n. a 30 °C i en agitació.
3. Centrifugar les cèl·lules a 500g durant 10 min.
4. Resuspendre en 10mM MgSO₄ portant a una OD₆₀₀ final de 1.0.
5. Transferir una quantitat suficient de la resuspensió de cultiu a 50 ml de LB
6. Incubar el cultiu a 37 °C en agitació fins a OD₆₀₀ de 0.3-0.4 (aproximadament 2 hores)
7. Centrifugar i resuspendre en 10mM MgSO₄, portant el cultiu de XL1-Blue MRF' a 4 ml finals i el de XLOLR a 15 ml.
8. Combinar una proporció de la llibreria comercial (Hybri-Zap Two-Hybrid library) amb la resuspensió cel·lular de XL1-Blue MRF' amb una multiplicitat d'infecció de 1:10 (fag:cèl·lula). Per tal de assegurar una representació estadística correcta dels clons, convé escindir entre 10 i 100 vegades més fags dels presents en la llibreria primària, e.g. si la llibreria original té un títol de 10⁶ escindir 10⁷-10⁸ fags de la llibreria amplificada.
9. NOTA: Considerem que una OD₆₀₀ de 1.0 correspon a una concentració de 8 x 10⁸ cèl·lules/ml.
10. Afegir el fag helper a un rati 10:1 (helper:cèl·lules) per tal d'assegurar que totes les cèl·lules són coinfectades amb el fag lambda i el helper.
11. Incubar 15 min a 37 °C
12. Afegir 20 ml de LB i incubar en agitació suau durant 3 hores a 37 °C.
13. Escalfar el cultiu a 70 °C durant 20 min per tal de lisar el fag lambda i les cèl·lules bacterianes.
14. Centrifugar a 500g durant 10 min i transferir el sobrenedant a un tub nou. Aquest sobrenedant conté les partícules escindides del fagèmids i és estable a 4 °C durant 1-2 mesos.

Titulació del sobrenedant

1. Preparar dilucions del sobrenedant 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁵ i 10⁻⁶.

2. Barrejar 10 µl de dilució de sobrenedant amb 200 µl de XLOLR (OD₆₀₀ 1.0).
3. Incubar 15 min a 37 °C.
4. Sembrar en plaques de LB-amp i incubar o.n. a 37 °C.
5. El títol del sobrenedant es calcula segons la fórmula:

$$\frac{\text{nombre de colònies} \times \text{factor de dilució}}{\text{Volum de fagèmid sembrat} (\mu\text{l})}$$

8.1.3. Amplificació de la llibreria escindida

Protocol d'amplificació

1. Iniciar un cultiu o.n. de XLOLR com a l'apartat 1. del protocol d'escissió.
2. Reinocular amb aquest cultiu com a l'apartat 5 del protocol d'escissió.
3. Resuspendre les cèl·lules en MgSO₄ 10 mM fins a O.D. 1.0
4. Combinar una porció del sobrenedant de la llibreria escindida amb les cèl·lules XLOLR amb rati de 10:1 (cèl·lules: fagèmid). Cal amplificar una porció del sobrenedant que representi, com a mínim, deu vegades més clons dels presents a la llibreria primària.
5. Afegir 500 ml de LB amp i incubar en agitació a 37 °C fins a OD₆₀₀ de 0.2, 0.3.
6. Centrifugar a 500 g durant 10 min i aïllar els plàsmids mitjançant maxiprep.

8.1.4. Construcció de l'híbrid BD-GAL4-KAP

1. Obtenir de cDNA de ronyó de ratolí mitjançant RT
2. Amplificar per PCR del cDNA de KAP amb els *primers* K2HYBUP i K2HYBLOW a partir del cDNA obtingut.
3. Purificar del producte de PCR i lligació en pGEM-T.
4. Electroporar JM109 amb 3 µl de la lligació. Obtenir colònies i fer miniprep.
5. Digerir la miniprep de pGEM-T-KAP i el plàsmid pBD-GAL4 amb enzim Sall.
6. Purificar els productes de digestió: KAP i pBD-GAL4, defosforilar el vector i lligar.
7. Electroporar JM109 amb 3 µl de la lligació.
8. Obtenir miniprep de les colònies crescudes, comprovar per digestió la presència de l'insert i seqüenciar per verificar que la pauta de lectura és la correcta i no s'ha introduït mutacions en la seqüència codificant per KAP.

8.1.5. Co-transformació de la llibreria

S'han utilitzat bàsicament dos mètodes de co-transformació. El primer és l'indicat pel protocol de la llibreria Hybri-Zap Two-Hybrid d'Stratagene i s'utilitzen tant uns reactius com uns llevats competents inclosos en el kit de la llibreria. Posteriorment hem utilitzat un protocol convencional.

Cotransformació a gran escala: Amb alíquotes de 1 ml, l'objectiu és obtenir la màxima eficiència donat que estem co-transformant amb la llibreria i volem que tots els

clons estiguin representats. Els llevats competents subministrats per la casa Stratagene són ideals per a aquest assaig. La transformació es dona simultàniament per a tots dos tipus de plàsmids (pAD-GAL4-libreria i pBD-GAL4-KAP) mitjançant xoc tèrmic. L'eficiència de co-transformació acostuma a ser de 2×10^4 co-transformats per μg de plàsmid. En tots els casos s'han seguit les indicacions del protocol proporcionat pel fabricant.

8.1.6. Transformació de llevats amb acetat de liti

Aquest protocol d'obtenció de llevat competent s'ha utilitzat per a la comprovació de les interaccions així com en la identificació dels dominis proteics implicats en les interaccions.

Protocol de transformació

1. Inocular 5 ml de medi YPD amb una colònia aïllada de YRG2, créixer o.n. a 30 °C en agitació.
2. Inocular 50 ml de YPD amb els 5 ml de cultiu o.n. i créixer fins a duplicar la OD600 inicial.
3. Centrifugar 5 min a 5000 rpm.
4. Rentar amb 10 ml de TE estèril i centrifugar com a 3.
5. Rentar amb 10 ml de solució LiAc i centrifugar (repetir dos cops aquest pas)
6. Resuspendre en 1 ml de solució LiAc i afegir 100 μl d'esperma de salmó (10mg/ml).
7. Afegir 100 μl de la suspensió de cèl·lules al DNA que es vol transfectar (entre 1 i 5 μg).
8. Incubar 20 min a 30 °C en agitació suau.
9. Afegir a cada tub 700 μl de solució LiAc/PEG, barrejar amb la pipeta.
10. Incubar 40 min a 30 °C en agitació suau.
11. Incubar 15 min a 37 °C.
12. Centrifugar 4 segons a 5000 rpm per tal de sedimentar els llevats.
13. Eliminar sobrenedant i resuspendre en 200 μl de medi sense L-leucina ni L-triptofan.
14. Deixar créixer durant 3 hores a 30°C en agitació.
15. Sembrar en medi selectiu per a la interacció (sense leucina ni metionina ni triptofan) i créixer a 30 °C durant 3-4 dies.

8.1.7. Identificació i verificació dels positius

La identificació dels positius s'ha realitzat segons les indicacions del protocol del kit de la llibreria Hybri-Zap Two-Hybrid amb algunes modificacions.

Protocol d'activitat -galactosidasa en filtre

1. Esperar a que les colònies tinguin aproximadament entre 1 i 2 mm de diàmetre (entre 3 i 7 dies).
2. Afegir 4.5 ml de tampó Z acabat de suplementar amb X-gal a una placa de 150 mm de diàmetre. Dipositar un filtre Whatman 3M de 150 mm de diàmetre a sobre de la placa. Comprovar que queda totalment impregnat.
3. Dipositar un filtre de Duralosa-UV sobre una placa de llevat. Marcar la posició del filtre amb tinta xinesa i mantenir en contacte amb les colònies durant 3 min.
4. Aixecar el filtre acuradament amb pinces, des d'un extrem.
5. Congelar el filtre en nitrogen líquid durant 5-10 segons. Deixar descongelar sobre paper Whatman.
6. Dipositar el filtre amb les colònies mirant amunt a la placa impregnada de tampó Z. Segellar amb parafilm i incubar a 30 °C. Els positius es detecten pel color blau, conseqüència de la activació del gen de la -galactosidasa.
7. Un cop localitzats els possibles positius en el filtre, tornar a la placa i recuperar la colònia original de la qual provenen.
8. Amb les colònies recuperades inocular un cultiu líquid de medi selectiu SD(Leu⁻, Trp⁻ His⁻) i incubar en agitació a 30 °C.
9. Sembrar una alíquota del cultiu en placa de 10mm, incubar a 30 °C i preparar glicerolat amb la resta.
10. Quan les colònies estiguin prou crescudes repetir l'*screening*.
11. Amb aquelles que tornen a donar positiu s'inocula medi i es fa miniprep de llevat

Assaig d'activitat -galactosidasa en medi líquid

La mesura de l'activitat -galactosidasa d'un cultiu de llevat ens permet avaluar la interacció entre dues proteïnes d'una manera mes sensible que l'assaig en filtre i alhora quantificable.

Protocol d'activitat -galactosidasa en medi líquid

1. Inocular 8 ml de medi SD selectiu per a la interacció amb 2 ml d'un cultiu o.n. de llevat
2. Créixer a 30°C en agitació fins que les cèl·lules assoleixen una densitat òptica OD₆₀₀ de 0.5-0.8
3. Valorar la densitat òptica OD₆₀₀ exacta dels cultius
4. Microfugar 1.5 ml de cultiu durant 30 seg
5. Treure el sobrenedant i resuspendre els *pellets* en 1.5 ml de tampó Z
6. Microfugar i resuspendre el *pellet* en 300 µl de tampó Z (factor de concentració: 1.5 / 0.3 = 5)
7. Recuperar 100 µl de la suspensió cel·lular i congelar en nitrogen líquid durant 1 min
8. Descongelar a 37°C durant 1 min
9. Repetir els cicles de congelació-descongelació dues vegades més

10. Afegir 700 µl de tampó Z amb -mercaptoetanol
11. Afegir 160 µl de ONPG (4 mg/ ml en tampó Z) i començar a comptar el temps
12. Incubar els tubs a 30°C fins que les mostres es tornen grogues
13. Aturar la reacció amb 400 µl de Na₂CO₃ 1M
14. Microfugar i valorar la densitat òptica OD₄₂₀ del sobrenedant
15. Calcular l'activitat -galactosidasa aplicant la fórmula:
$$\text{unitats -galactosidasa} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (\text{temps en minuts} \times 0.1 \times \text{factor de concentració} \times \text{OD}_{600})$$

8.1.8. Minipreparació de DNA plasmídic de *S.cerevisiae*

El mètode utilitzat per tal de purificar DNA plasmídic a partir de llevat és relativament ràpid i senzill. La quantitat de plàsmid obtinguda és suficient per transformar posteriorment *E.coli* però no per seqüenciar ni fer anàlisi de restricció.

Protocol

1. Inocular 2 ml del medi adient (YPD o SD) amb colònia aïllada. Incubar el cultiu a 30 °C en agitació (250 rpm) fins a la saturació del medi (entre 2 i 3 dies).
2. Centrifugar 1,5 ml de cultiu a 14000 g durant 10 seg. Decantar sobrenedant.
3. Afegir 200 µl de solució de lisi i resuspendre el *pellet* amb vòrtex. Afegir 200 µl de fenol-cloroform-alcohol isoamílic [25:24:1 (v/v/v)] i 300 µg de *acid washed glass beads* 425-600 (Sigma G-8772). Vortexar durant 2 min.
4. Centrifugar aquesta suspensió durant 5 min a 14000 g i recuperar la fase aquosa.
5. Precipitar el DNA amb 1/10 vol de 3 M NaOAc (pH 5,2) i 2,5 vol d'etanol. Centrifugar a 14000 g durant 10 min i descartar el sobrenedant.
6. Rentar el *pellet* amb etanol 70%, centrifugar, decantar el sobrenedant i assecar el *pellet*.
7. Resuspendre en 50 µl d'aigua estèril.

8.2. GST-Pulldown

La tècnica del GST-pulldown resulta de gran utilitat a l'hora de comprovar *in vitro* les interaccions proteïna-proteïna prèviament identificades amb altres metodologies. De manera prèvia a la realització del *pulldown* és necessària l'optimització de dues tècniques d'expressió de proteïnes; per una banda l'expressió, correcte plegament i immobilització en resina de la proteïna recombinant fusionada amb GST, i per altra banda l'obtenció *in vitro* de quantitats suficients de proteïna marcada radioactivament utilitzant reticulòcit de conill.

8.2.1. Protocol

1. Rentar la resina lligada a GST-proteïna amb tampó d'interacció

2. Barrejar 5 µl del producte de la traducció in vitro amb 40 µl de resina (50%) en 100 µl de volum final amb tampó d'interacció
3. Incubar a 4°C en agitació orbital durant 18 hores
4. Rentar 4 vegades amb 100 µl de tampó d'interacció
5. Carregar en gel SDS-PAGE volums equivalents de la barreja inicial, els rentats i la resina
6. Fixar els gels en metanol-acètic
7. Incubar amb salicilat sòdic
8. Rentar i assecar sobre Watmann 3MM
9. Exposar pel·lícula autoradiogràfica
10. Revelar

8.3. Co-immunoprecipitació a partir de teixit

La co-immunoprecipitació és una aproximació de gran utilitat en l'estudi d'interacció de proteïnes. Bàsicament, una proteïna és immunoprecipitada en condicions no desnaturalitzants i el precipitat s'assaja per a la presència d'una segona proteïna.

8.3.1. Protocol de co-immunoprecipitació

1. Barrejar en gel: 1 mg d'extracte total
 - 5 M NaCl fins a concentració final de 100 mM NaCl
 - Tampó de co-immunoprecipitació fins a 500 µl
 - 25 µl de proteïna G-Sepharose (SIGMA)
2. Incubar en agitador orbital durant 60 min a 4°C.
3. Microfugar 1 min a 4°C per eliminar els agregats no específics.
4. Recuperar el sobrenedant i afegir 1 µg anticòs específic.
5. Incubar 90 min en gel barrejant per inversió ocasionalment.
6. Afegir 50 µl de proteïna G-Sepharose (SIGMA).
7. Incubar en agitació orbital a 4°C entre 2 i 18 hores.
8. Precipitar la resina centrifugant 30 seg a 1000 rpm a 4°C.
9. Rentar 3 vegades la resina amb 1 ml de tampó de co-immunoprecipitació.
10. Resuspendre la resina en 25 ml de tampó de càrrega.
11. Procedir a l'anàlisi per SDS-PAGE i western blot o bé congelar a -80°C.

| | |
|---|------------|
| <u>1. ANÀLISI COMPUTACIONAL DE LA SEQÜÈNCIA DEDUÏDA DE KAP.....</u> | 87 |
| 1.1. ANÀLISI D'HOMOLOGIES..... | 87 |
| 1.1.1. BLASTN..... | 87 |
| 1.1.2. BLASTx..... | 88 |
| 1.1.3. PSI-BLAST..... | 89 |
| 1.2. CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES EN BASE A L'ESTRUCTURA PRIMÀRIA..... | 90 |
| 1.3. PREDICCIONS D'ESTRUCTURA SECUNDÀRIA..... | 92 |
| 1.4. PREDICCIONS DE MODIFICACIONS POST-TRADUCCIONALS..... | 93 |
| 1.5. PREDICCIÓ DE LOCALITZACIÓ CEL·LULAR..... | 93 |
| | |
| <u>2. LA KAP A LA CÈL·LULA EPITELIAL RENAL.....</u> | 94 |
| 2.1. IDENTIFICACIÓ I LOCALITZACIÓ DE KAP..... | 94 |
| 2.2. REGULACIÓ HORMONAL DELS NIVELLS DE KAP I DE LA SEVA DISTRIBUCIÓ AL RONYÓ DE RATOLÍ..... | 96 |
| 2.3. LOCALITZACIÓ DE KAP EN CÈL·LULES EPITELIALS DE TÚBUL PROXIMAL RENAL MURÍ. DIFERENTS MODELS D'EXPRESSIÓ..... | 97 |
| 2.3.1. GFP-KAP..... | 97 |
| 2.3.2. MODEL DE FUSIÓ C-TERMINAL: KAP-FLAG..... | 99 |
| 2.3.3. SISTEMA TET-OFF D'EXPRESSIÓ CONTROLADA..... | 100 |
| 2.4. PRESÈNCIA DE KAP DURANT LA MITOSI..... | 102 |
| 2.5. SÍNTESI I SECRECIÓ DE LA KAP. MARCATGE METABÒLIC..... | 104 |
| | |
| <u>3. IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES QUE INTERACTUEN AMB LA KAP.....</u> | 105 |
| 3.1. POSITIU 5.6..... | 106 |
| 3.1.1. HOMOLOGIES..... | 106 |
| 3.1.2. NIVELLS D'EXPRESSIÓ EN RONYÓ DE RATOLÍ..... | 108 |
| 3.2. POSITIU P5..... | 108 |
| 3.2.1. HOMOLOGIES..... | 109 |
| 3.3. POSITIU B3: CICLOFILINA B..... | 109 |
| 3.3.1. SEQÜÈNCIA I HOMOLOGIES..... | 109 |
| 3.3.2. GST-PULLDOWN..... | 110 |
| 3.3.3. CO-IMMUNOPRECIPITACIÓ DE KAP I CYPB..... | 111 |
| 3.3.4. CO-LOCALITZACIÓ GFP-KAP I CYPB..... | 112 |

3.3.5. IDENTIFICACIÓ DELS DOMINIS RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓ. 113

4. EFECTES DEL TRACTAMENT AMB CSA 114

4.1. EFECTES TRANSCRIPCIONALS DEL TRACTAMENT AMB CSA. 114

4.1.1. EFECTES SOBRE EL RONYÓ DE RATOLÍ..... 114

**4.2. EFECTES POST-TRANSCRIPCIONALS. NIVELLS I DISTRIBUCIÓ DE LA PROTEÏNA KAP.
115**

4.2.1. EFECTES SOBRE EL RONYÓ DE RATOLÍ..... 115

4.2.2. EFECTES DE LA CSA EN LA SECRECIÓ DE KAP..... 116

4.3. EFECTES DE LA CSA EN LA INTERACCIÓ KAP-CYPB..... 117

4.4. EFECTES TÒXICS DE LA CSA. 119

4.4.1. TOXICITAT PER CSA EN CÈL·LULES EN CULTIU. 119

4.4.2. EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DE KAP EN LA TOXICITAT PROVOCADA PER CSA EN PSKV-PCT.
..... 120

1. ANÀLISI COMPUTACIONAL DE LA SEQÜÈNCIA DEDUÏDA DE KAP

La Tesi Doctoral de la Dra. Esther Solé (Solé, E. 1996) inclou els resultats d'un primer anàlisi computacional detallat de la Kidney Androgen-regulated Protein. Els resultats que es descriuen a continuació representen una actualització d'aquelles dades, actualització que considerem necessària donat l'espectacular augment en el nombre de seqüències dipositades i d'eines biocomputacionals que ha tingut lloc en els últims cinc anys.

1.1. Anàlisi d'homologies.

La recerca de seqüències homòlogues s'ha realitzant mitjançant BLAST (2.1.2) (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul 1990 i 1997). Aquest programa enfronta la seqüència problema amb la base de dades del NCBI (*National Center for Biotechnology Infomation*), utilitzant un algoritme que busca parells de seqüències que es puguin alinear sense forats i compleixin certs criteris estadístics.

1.1.1. BLASTn.

La seqüència de mRNA de KAP continguda en l'entrada de GenBank M22810 s'ha enfrontat al conjunt de seqüències nucleotídiques dipositades a les bases de dades del NCBI. A continuació s'enumeren els 7 alineaments amb més homologia.

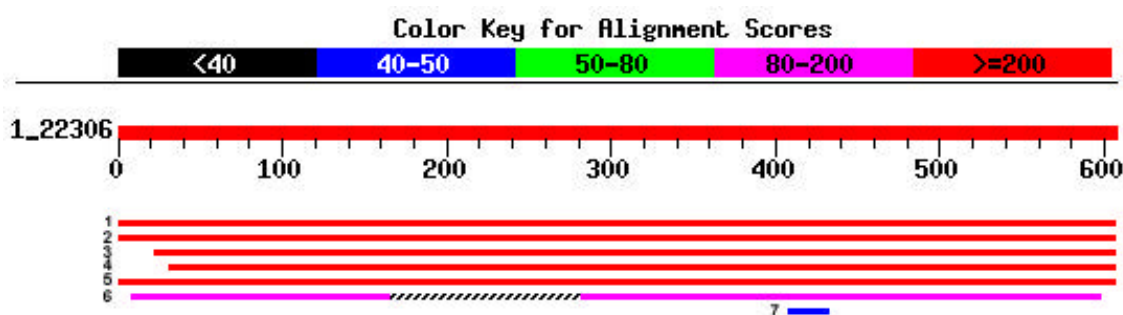


Fig. I-1: Representació gràfica dels alineaments

1. [gi|6754405|ref|NM_010594.1](#) Mus musculus kidney androgen regulated protein (Kap), mRNA. Length = 611. Score = 1203 bits (607), Expect = 0.0. Identities = 607/607 (100%).
2. [gi|198565|gb|M22810.1|MUSKARP](#) Mouse androgen-regulated protein mRNA, complete cds Length = 607. Score = 1203 bits (607), Expect = 0.0. Identities = 607/607 (100%).

3. [gi|12276125|gb|AF319957.1|AF319957](#) Homo sapiens FKSG22 (FKSG22) mRNA, complete cds. Length = 587. Score = 1152 bits (581), Expect = 0.0 Identities = 584/585 (99%).
4. [gi|14250295|gb|BC008576.1|BC008576](#) Homo sapiens, kidney androgen regulated protein, clone MGC:18182, mRNA, complete cds. Length = 591. Score = 1134 bits (572), Expect = 0.0. Identities = 575/576 (99%).
5. [gi|198562|gb|M63707.1|MUSKAPG](#) Mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene, complete cds. Length = 4807 Score = 502 bits (253), Expect = e-139 Identities = 253/253 (100%).
6. [gi|818885|gb|U25808.1|RNU25808](#) Rattus norvegicus kidney-specific androgen-regulated protein KAP mRNA, complete cds Length = 704 Score = 176 bits (89), Expect = 1e-41 Identities = 265/321 (82%), Gaps = 12/321 (3%).
7. [gi|14272181|emb|AL512310.3|CNS07EF1](#) Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-597A11 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens (Human), complete sequence. Length = 185605 Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.42 Identities = 21/21 (100%).

1.1.2. BLASTx.

La seqüència de nucleòtids de KAP continguda en l'entrada de GenBank M22810 s'ha enfrontat al conjunt de seqüències aminoacídiques dipositades a les bases de dades del NCBI. A continuació s'enumeren els alineaments seleccionats.

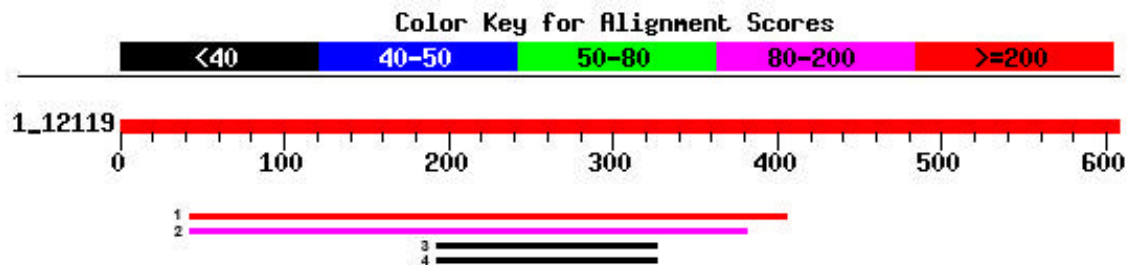


Fig. I-2: Representació gràfica dels alineaments

1. [gi|6754406|ref|NP_034724.1](#) kidney androgen regulated protein [Mus musculus]
[gi|113929|sp|P15267|ANRE_HUMAN](#) KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN
[gi|90296|pir||A40157](#) androgen-regulated protein precursor, renal - mouse
[gi|309418|gb|AAB01364.1](#) (M22810) androgen-regulated protein [Mus musculus]
[gi|1339835|gb|AAB01363.1](#) (M63707) kidney androgen-related protein [Mus musculus]
[gi|12276126|gb|AAG50272.1|AF319957_1](#) (AF319957) FKSG22 [Homo sapiens]
[gi|14250296|gb|AAH08576.1|AAH08576](#) (BC008576) kidney androgen regulated protein [Homo sapiens] Length = 121 Score = 238 bits (607), Expect = 2e-62 Identities = 121/121 (100%), Positives = 121/121 (100%)

2. [gi|818886|gb|AAA67078.1](#) (U25808) KAP [*Rattus norvegicus*] Length = 120 Score = 103 bits (257), Expect = 9e-22 Identities = 62/114 (54%), Positives = 77/114 (67%), Gaps = 1/114 (0%)
3. [gi|14210853|gb|AAK57196.1|AF334802_1](#) (AF334802) OL-protocadherin isoform [*Gallus gallus*] Length = 1030 Score = 34.3 bits (77), Expect = 0.67 Identities = 19/45 (42%), Positives = 25/45 (55%)
4. [gi|13876380|gb|AAK21987.1](#) (AY013874) protocadherin 10 [*Homo sapiens*] Length = 896 Score = 33.5 bits (75), Expect = 1.1 Identities = 19/45 (42%), Positives = 25/45 (55%)

1.1.3. psi-BLAST.

El programa psi-BLAST (*position specific iterative BLAST*) construeix, de manera automàtica a partir d'un resultat de BLAST inicial, una matriu específica on les posicions conservades adquireixen un valor més elevat. Aquesta matriu s'utilitza per a les següents iteracions de recerca, resultant en una elevada sensibilitat del programa en la recerca d'homòlegs remots.

El valor E (*Expect*) és indicatiu de la probabilitat que l'alineament es doni de manera aleatòria, i s'utilitza com a barem per incloure o no una seqüència en la següent iteració. Així, si l'usuari ha fixat el valor E = 0,005, només s'inclouran en la següent iteració d'anàlisi aquelles entrades amb E < 0,005. Els resultats d'una primera ronda de psi-blast amb E = 0,005 s'indiquen a continuació.

Sequences with E-value BETTER than threshold

| Sequences producing significant alignments: | (bits) | Value | Score | E |
|--|--------|------------|-------|-------|
| gi 6754406 ref NP_034724.1 kidney androgen regulated protein [M... | | <u>211</u> | | 1e-54 |
| gi 818886 gb AAA67078.1 (U25808) KAP [<i>Rattus norvegicus</i>] | | <u>82</u> | | 8e-16 |

Sequences with E-value WORSE than threshold

| | | |
|---|-----------|------|
| gi 14210853 gb AAK57196.1 AF334802_1 (AF334802) OL-protocadherin... | <u>33</u> | 0.41 |
| gi 14210851 gb AAK57195.1 AF334801_1 (AF334801) OL-protocadherin... | <u>32</u> | 0.77 |
| gi 7243181 dbj BAA92638.1 (AB037821) KIAA1400 protein [<i>Homo sap...</i> | <u>32</u> | 0.80 |
| gi 7242169 ref NP_035173.1 protocadherin 10 [<i>Mus musculus</i>] >gi ... | <u>32</u> | 0.85 |
| gi 13876380 gb AAK21987.1 (AY013874) protocadherin 10 [<i>Homo sap...</i> | <u>32</u> | 0.95 |

Dues seqüències presenten alineaments significatius (KAP de ratolí i KAP de rata). Altres seqüències superen el valor de E fixat per a que l'alineament sigui significatiu. Es tracta de protocadherines de diferents espècies que presenten una homologia baixa amb KAP (42% identitat i 55% d'homologia en un fragment de 45 aminoàcids).

Si augmentem considerablement el valor de E (E = 0,5) per tal d'incloure una d'aquestes entrades en la següent iteració, la homologia amb les protocadherines es fa altament significativa. Si, en canvi, no augmentem E i procedim a una segona (o tercera o quarta) iteració, no només no apareixen noves seqüències amb alineaments significatius sinó que les protocadherines desapareixen de l'anàlisi.

1.2. Característiques físico-químiques en base a l'estructura primària.

Les característiques físico-químiques de la KAP en base a la seqüència lineal d'aminoàcids deduïda a partir del mRNA, s'han analitzant mitjançant el programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-gin/protparam>) i TagIdent (<http://www.expasy.ch/cgi-gin/tagident>) i es detallen a continuació:

- Nombre d'aminoàcids: 121
- Pes molecular teòric: 13262,8 Da
- Punt isoelèctric teòric: 3,92

Es tracta d'un punt isoelèctric (PI) força baix. Els resultats de la recerca de proteïnes de mamífer amb punts isoelèctrics i pesos moleculars similars es troben a la taula I-1.

| Nom | pl | Pes Molecular |
|---|------|---------------|
| KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN PRECURSOR (KAP). | 3.92 | 13262.8 |
| GLYCOPHORIN HA. | 4.14 | 12439.88 |
| IG KAPPA CHAIN V REGION EV15 PRECURSOR | 4.02 | 10458.53 |
| ONCOMODULIN (OM) (PARVALBUMIN BETA). | 4.11 | 12025.12 |
| MASTOCYTOMA PROTEOGLYCAN CORE PROTEIN | 4.16 | 14115.26 |
| SALIVARY ACIDIC PROLINE-RICH PHOSPHOPROTEIN | 4.14 | 11019.61 |
| DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE II 14.4 KDA POLYPEPTIDE | 4.11 | 14478.08 |
| 16.5 KDA SUBMANDIBULAR GLAND GLYCOPROTEIN PRECURSOR | 3.79 | 12893.99 |
| PROTHROMBIN PRECURSOR | 4.06 | 12795.75 |
| PARATHYMSIN. | 4.09 | 11325.61 |
| TROPHOBLAST-SPECIFIC PROTEIN PRECURSOR. | 4.15 | 12117.36 |

Taula I-1: Diferents proteïnes de mamífer amb pl i pes molecular semblants als de KAP.

- Composició aminoacídica:

| Aminoàcid | n | % | Aminoàcid | n | % |
|-----------|----|------|-----------|----|------|
| Ala (A) | 5 | 4,1 | Met (M) | 3 | 2,5 |
| Arg (R) | 1 | 0,8 | Phe (F) | 8 | 6,6 |
| Asn (N) | 7 | 5,8 | Pro (P) | 6 | 5,0 |
| Asp (D) | 10 | 8,3 | Ser (S) | 13 | 10,7 |
| Cys (C) | 1 | 0,8 | Thr (T) | 12 | 9,9 |
| Gln (Q) | 4 | 3,3 | Trp (W) | 0 | 0 |
| Glu (E) | 9 | 7,4 | Tyr (Y) | 2 | 1,7 |
| Gly (G) | 5 | 4,1 | Val (V) | 10 | 8,3 |
| His (H) | 0 | 0 | Asx (B) | 0 | 0 |
| Ile (I) | 7 | 5,8 | Glx (Z) | 0 | 0 |
| Leu (L) | 13 | 10,7 | Xaa (X) | 0 | 0 |
| Lys (K) | 5 | 4,1 | | | |

Taula I-2: Composició aminoacídica de KAP, en valor absolut i com a percentatge del total.

Nombre total d'aminoàcids carregats negativament (Asp + Glu): 19

Nombre total d'aminoàcids carregats positivament (Arg + Lys): 6

- Vida mitja estimada: Segons el que s'anomena la "regla de l'extrem amino", el residu de la posició amino-terminal d'una proteïna juga un paper important en la seva estabilitat *in vivo*. En el cas de la KAP aquest aminoàcid és metionina i per tant, segons la predicció, la seva vida mitja és de 30 hores en reticulòcit, >20 hores en llevat i >10 hores en bacteri.
- Índex d'instabilitat: La presència de determinats dipèptids en una proteïna condiciona l'instabilitat de la mateixa (Guruprasad, K. 1990). Així el programa assigna un valor a cada proteïna, resultat del sumatori dels valors d'instabilitat de cada dipèptid. Una proteïna amb un índex d'instabilitat inferior a 40 es considera estable. Un valor per sobre de 40 prediu que la proteïna podria ser inestable. La KAP presenta un índex d'instabilitat de 35,8.
- Presència de regions PEST: Una quantitat important de proteïnes amb vides mitges intracel·lulars de menys de 2 hores, contenen regions riques en prolina,

glutàmic, serina i treonina (PEST). Aquestes regions PEST es troben generalment flanquejades per blocs d'aminoàcids carregats positivament. La seqüència d'aminoàcids de KAP presenta una regió PEST consens entre els residus 53 i 80, i una possible segona regió entre el 80 i el 109 (Meseguer, 1989). Això suggereix que la KAP es una proteïna de vida mitja curta.

1.3. Prediccions d'estructura secundària.

La majoria dels servidors de predicció d'estructura secundària es basen en alineaments múltiples de seqüències (PHDsec, NSSP, SOPM, DSC, SSPRED, MultiPredict). Altres servidors realitzen la predicció en base únicament a la seqüència aminoacídica (PSA, NNPREPREDICT, les adreces i característiques d'aquests i altres servidors de predicció d'estructura es poden trobar a http://cmgm.stanford.edu/WWW/www_predict.html). Donat el reduït nombre de seqüències homòlogues a KAP, molts dels servidors no poden fer la predicció mitjançant alineaments múltiples. En altres casos la predicció es realitza, però amb baixa fiabilitat.

El que tots aquests programes prediuen per a la KAP, amb més o menys consens, és una regió relativament estructurada com a hèlix entre els aminoàcids 21 i 46, seguida d'un llaç relativament llarg i una regió C-terminal molt flexible i menys estructurada a partir de l'aminoàcid 69. La figura I-3 mostra la probabilitat segons PSA d'estructura secundària.

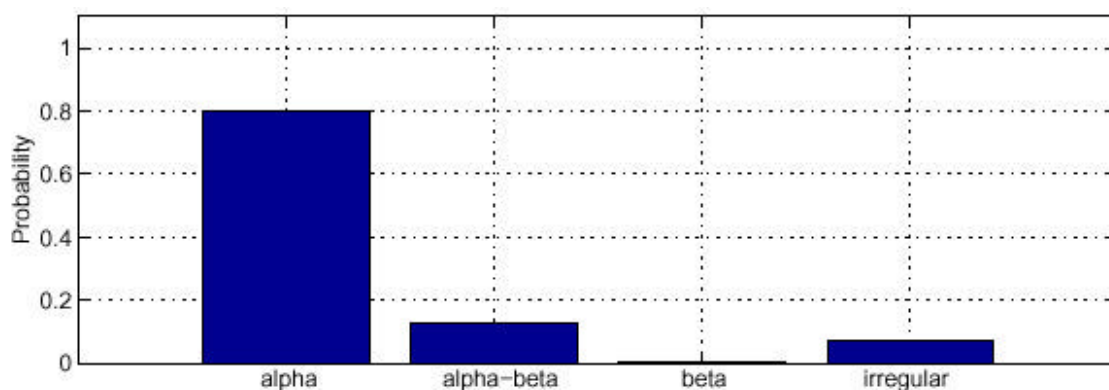


Fig. I-3: Representació gràfica de les probabilitats, per a la proteïna sencera, de cada una de les estructures secundàries.

1.4. Prediccions de modificacions post-traduccionals.

L'anàlisi computacional de les possibles modificacions post-traduccionals de la KAP ens indica la presència d'un pèptid senyal que comprendria els primers 18 aminoàcids de la proteïna (segons el mètode von Heijne's, von Heijne, G. 1986). L'anàlisi de les característiques físico-químiques de la proteïna resultant de l'escissió del pèptid senyal, no varien substancialment de les descrites als apartats anteriors. Destaca la disminució de la vida mitja estimada, 1,1 hores en reticulòcit, 3 min en llevat i 2 min en *E.coli*, i l'augment del seu índex d'inestabilitat fins a 42,87.

Pel que fa a la predicció de llocs de fosforilació, el programa NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) prediu 7 serines fosforilables, 2 treonines i 1 tirosina. La distribució d'aquestes modificacions en la seqüència de KAP s'indica a la figura.

TMHMM/FKALVITVFCCLTVAFPLSELVSNKELQASILLLSVFDQLSRYRQTKAPLEDYTDCLLSDISEGMDPTFRANKQZSEFSTCVETVSSQFLSEPTENTDTYKPLAGHPVSPISDGG

Fig. I-4: Residus fosforilables segons NetPhos 2.0.

El programa PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) en canvi, fa la predicció en base a la quinasa que fosforila cada residu i prediu 2 llocs de fosforilació per a PKC i 5 llocs de fosforilació per a CK2.

TMHMM/FKALVITVFCCLTVAFPLSELVSNKELQASILLLSVFDQLSRYRQTKAPLEDYTDCLLSDISEGMDPTFRANKQZSEFSTCVETVSSQFLSEPTENTDTYKPLAGHPVSPISDGG

Fig. I-5: Residus fosforilables segons PROSITE. Blau, CK2; Vermell PKC.

El mateix programa PROSITE també informa de 2 possibles llocs de miristilació als residus 14 i 47.

1.5. Predicció de localització cel·lular.

La predicció de localització cel·lular s'ha realitzat mitjançant el programa PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp:8080/psort>). Aquest programa analitza, utilitzant diferents algorismes, la presència de: pèptid senyal, regions transmembrana i la seva topologia, senyals de localització nuclear, mitocondrial, peroxisomal, vacuolar o reticular. Identifica també motius d'unió a RNA, a DNA o a actina així com possibles patrons de

miristilacions o prenilacions. Finalment analitza aquests resultats i ofereix una predicció de localització cel·lular.

En el cas de la KAP, tots els motius estudiats han resultat negatius, tret de la presència del pèptid senyal. El programa prediu que la KAP és, amb molta probabilitat, extracel·lular.

2. LA KAP A LA CÈL·LULA EPITELIAL RENAL

2.1. Identificació i localització de KAP.

La disponibilitat d'anticossos específics resulta imprescindible per a la identificació i localització d'una proteïna. Els anticossos monoclonals anti-KAP es van obtenir als laboratoris MERCK FARMA Y QUÍMICA (en col·laboració amb l'Ana Carceller i el Dr. Jaume Piulats) en immunitzar ratolins BALB/c amb els pèptids pKAP1 i pKAP2 (dissenyats i sintetitzats pel Dr. David Andreu, departament de Química Orgànica, Facultat de Químiques, Universitat de Barcelona). A la figura II-1 s'indica la posició dels pèptids a la proteïna.

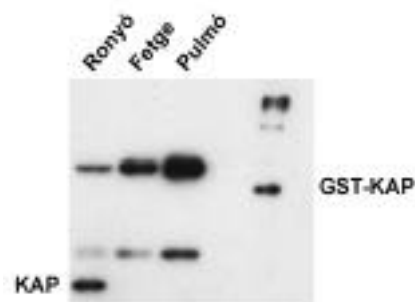


Fig.II-1. Seqüència d'aminoàcids de la KAP amb les modificacions post-traduccionals segons la predicció. En gris s'enquadren els aminoàcids corresponents als pèptids pKAP1 i pKAP2.

Els anticossos purificats a partir del medi dels hibridomes 377-1B8 i 388-1D7 pertanyen a l'isotipus IgG1,k i es van anomenar abKAP1 (reconeix específicament el pèptid pKAP1) i abKAP2 (reconeix pKAP2) respectivament. Aquests han estat els anticossos utilitzats en la identificació de KAP.

Com es demostra en els assaigs de Western blot, els anticossos abKAP1 i abKAP2 detecten la KAP a partir d'extracte total de teixit. A l'igual que el seu mRNA, la proteïna està abundantment expressada a ronyó de ratolí, essent absent a altres teixits com el fetge o el pulmó (figura II-2). Tanmateix, mitjançant Western blot també ha estat possible la identificació de la KAP procedent d'expressió heteròloga (figura II-2).

Fig.II-2. Western blot amb anticòs abKAP1 (5µg/ml) utilitzant 50 µg de teixit (ronyó, fetge i pulmó de ratolí mascle) per carril i 0,2 µl de resina GST-KAP respectivament.



Malauradament, la utilització dels anticossos abKAP1 i abKAP2 en assaigs de immunoprecipitació no ha estat possible donat el baix rendiment immunoprecipitador d'ambdós anticossos.

Els assaigs d'immunohistoquímica amb abKAP1 i abKAP2 confirmen la presència de la proteïna al túbul proximal renal murí, així com l'especificitat dels anticossos per als seus pèptids respectius (figura II-3). S'evidencia el marcatge a bona part dels túbuls, però no tots, amb absència de KAP a la zona medul·lar i als glomèruls.

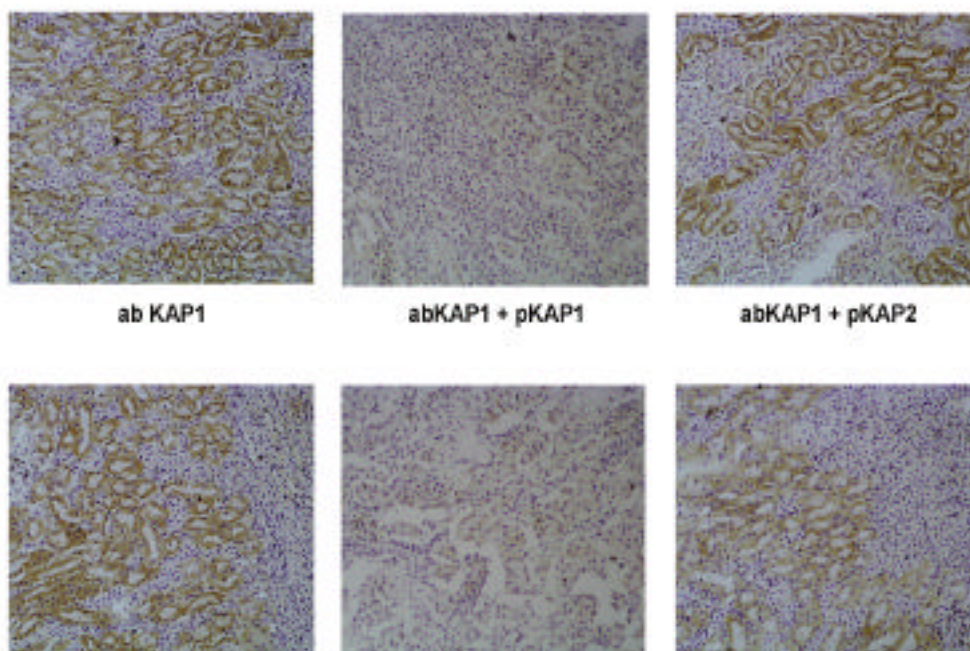


Fig. II-3: Immunohistoquímica de ronyó de ratolí (talls de 5µm) amb 20 µg/ml de abKAP1 i abKAP2 preabsorbts amb els pèptids pKAP1 i pKAP2 (1:10 en pes ab:pèptid).

Per altra banda, hem procedit a la síntesi *in vitro* de la KAP utilitzant un sistema de transcripció i traducció acoblada. Amb l'objectiu d'identificar les possibles modificacions post-traduccional de la KAP es va incubar la proteïna sintetitzada *in*

in vitro amb membranes microsomals canines. L'autoradiografia del producte d'aquesta reacció ens mostra una disminució d'intensitat en la banda corresponent a la KAP, sense que apareguin formes amb migració electroforètica diferent (Fig. II-4). L'anàlisi per Western blot d'aquestes mateixes mostres confirma la presència de KAP en el producte de síntesi *in vitro*.

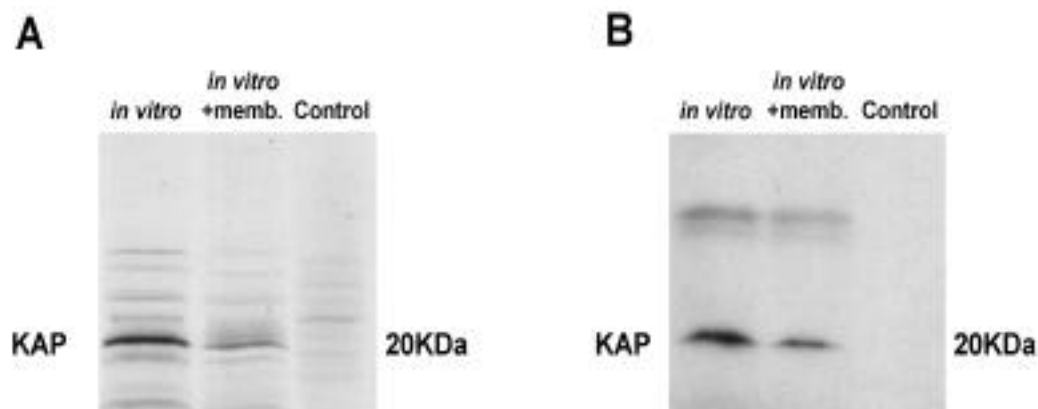


Fig. II-4: A, la KAP sintetitzada *in vitro* en el sistema TNT-PROMEGA de transcripció i traducció acoblada amb i sense membranes microsomals. B, Western blot de les mateixes mostres (abKAP1, 5µg/ml).

2.2. Regulació hormonal dels nivells de KAP i de la seva distribució al ronyó de ratolí.

La KAP s'expressa i es localitza al llarg del túbul proximal renal seguint el patró androgen-dependent del seu mRNA. Així, mitjançant Western blot es demostra que els nivells de proteïna són clarament més elevats en ronyó de ratolí mascle que en femella o en mascle castrat, presentant aquest últim els nivells més baixos d'expressió.

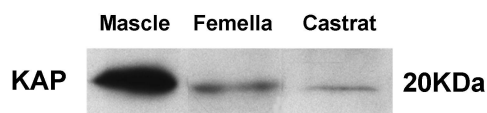


Fig. II-5: Western blot d'extracte total de ronyó de mascle, femella i mascle castrat (50 µg/carril) amb abKAP2 (1µg/ml).

Tanmateix, la distribució de la proteïna al llarg del túbul també es troba sota regulació androgènica. Utilitzant immunohistoquímica s'evidencia que, mentre femelles i mascles castrats tenen una expressió restringida al segment S3 del túbul proximal, el

mascle intacte presenta, a més, un clar marcatge cortical corresponent als segments S₁/S₂ (figura II-6).

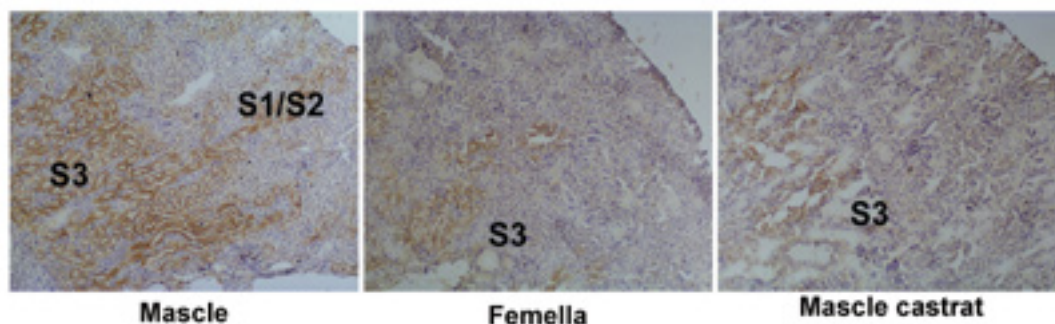


Fig. II-6: Immunohistoquímica sobre ronyó de ratolí mascle, femella i mascle castrat (seccions de 5 µm) amb anticòs abKAP2 (20 µg/ml).

2.3. Localització de KAP en cèl·lules epitelials de túbul proximal renal murí. Diferents models d'expressió.

El mRNA de la KAP s'expressa abundantment al ronyó murí. Malgrat això, el nivell d'expressió en línies cel·lulars és pràcticament indetectable; en concret, en la línia epitelial de túbul proximal renal murí PKSV-PCT, és prou baix com per no detectar-se amb les tècniques clàssiques de Northern blot, requerint-se un sistema més sensible com la RT-PCR. Els anticòs abKAP1 i abKAP2 no han detectat la proteïna en aquesta línia, ni mitjançant Western blot ni amb immunocitoquímica.

La línia PKSV-PCT ha estat de gran utilitat en l'estudi dels mecanismes de regulació cel·lular i teixit específics al nostre laboratori, essent, a aquest nivell, una eina indispensable. És per això que s'ha utilitzat aquesta línia específica com a base cel·lular per a l'estudi de la KAP mitjançant l'expressió exògena de la proteïna.

2.3.1. GFP-KAP.

Des que es va aïllar, el gen de la GFP (*green fluorescence protein*) ha esdevingut una eina d'utilitat per tal d'expressar proteïnes fluorescents. Això s'aconsegueix mitjançant la construcció de gens quimèrics formats pel gen de la GFP lligat al gen de la proteïna d'interès. En el nostre cas hem utilitzat la fusió GFP-KAP que s'ha transfectat transitòriament en cèl·lules PKSV-PCT. Donada la mida de la GFP (220 aa) en comparació amb la de la KAP (121 aa), resulta imprescindible comptar amb la proteïna

control GFP sola per tal de discernir entre els efectes provocats única i exclusivament per la KAP i els deguts a la presència de GFP.

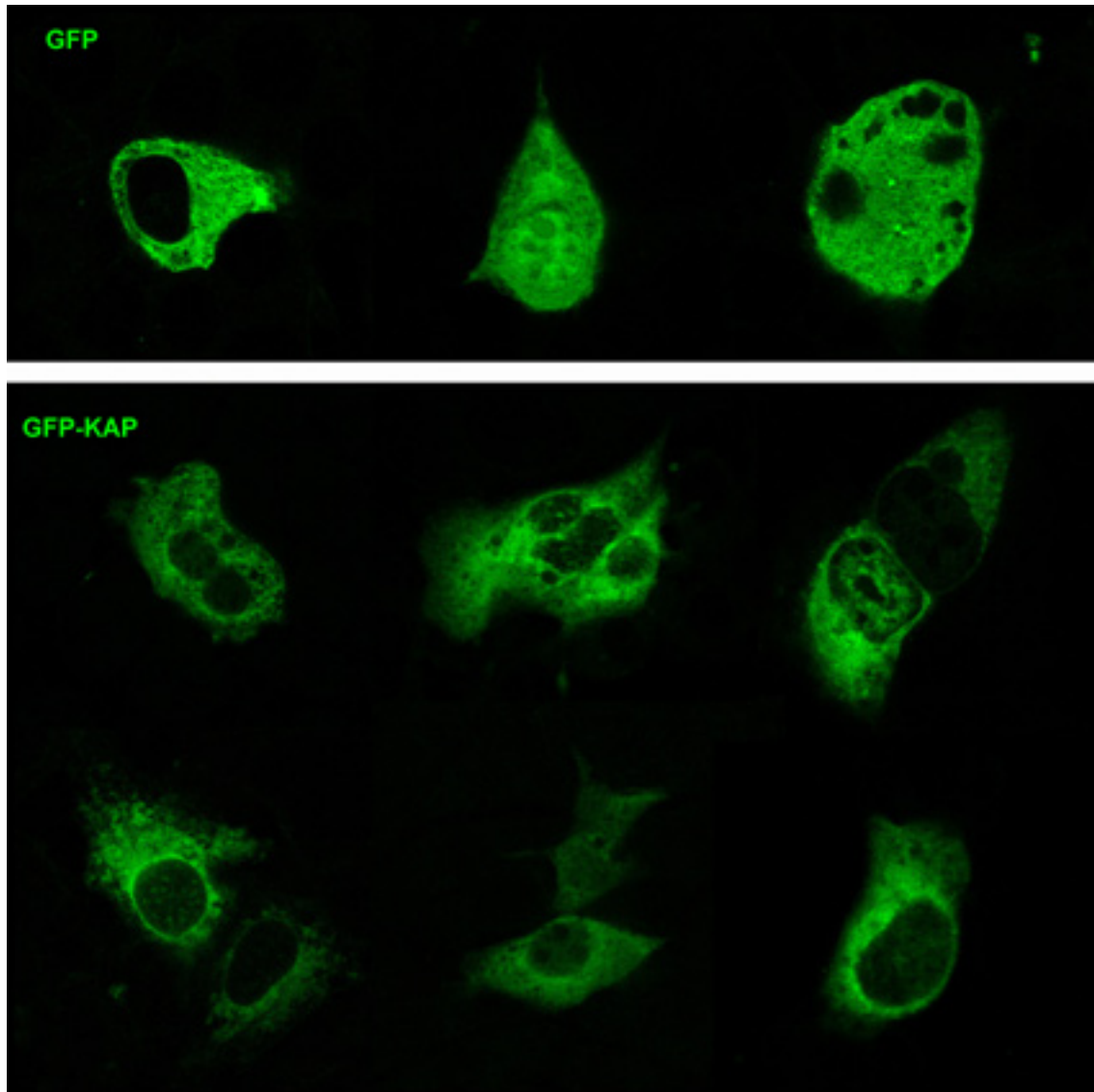


Fig. II-7: Microscopia confocal de les cèl·lules PKSV-PCT transfectades amb GFP i GFP-KAP respectivament.

En el clon PCT3, la GFP transfectada transitòriament es distribueix uniformement en el citoplasma i, en alguns casos, en el nucli de la cèl·lula. La fusió GFP-KAP, en canvi, adopta un patró clarament reticular citoplasmàtic i al voltant del nucli.

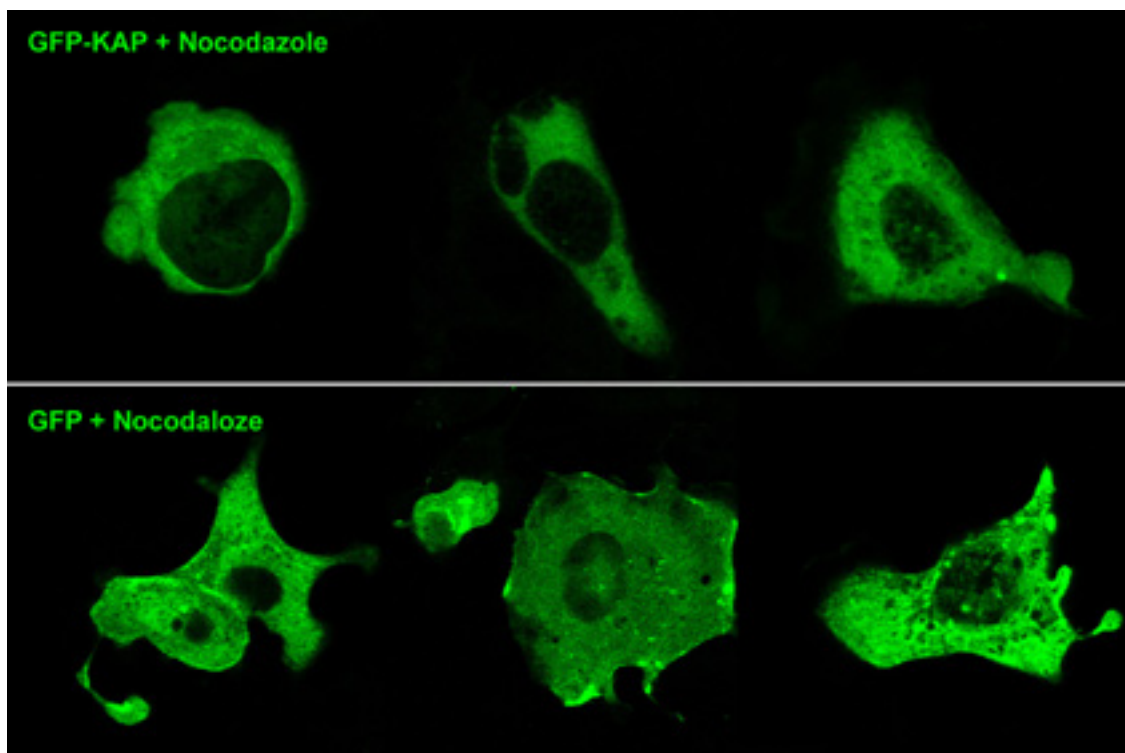


Fig. II-8: Microscopia confocal de les cèl·lules PKSV-PCT transfectades amb GFP i GFP-KAP respectivament i tractades amb Nocodazole (400 ng/ml).

La presència d'un disruptor reversible dels microtúbuls (Nocodazole 400 ng/ml durant 24 hores) en el medi provoca la desaparició del patró reticular, quedant la proteïna distribuïda segons un patró anàleg al de la GFP.

2.3.2. Model de fusió C-terminal: KAP-FLAG.

La presència del pèptid senyal i l'anàlisi computacional de localització cel·lular apunten la possibilitat que KAP sigui una proteïna secretada. El sistema de fusió amb GFP no és un model vàlid per estudiar aquesta possibilitat ja que la GFP en l'extrem amino-terminal de la proteïna emmascara el pèptid senyal. En canvi el sistema KAP-FLAG és útil donat que disposem d'anticossos capaços d'immunoprecipitar eficientment la proteïna del medi.

El sistema FLAG de Sigma es basa en la fusió de només 7 aminoàcids (DYKDDDK) en l'extrem carboxi-terminal de la KAP, contra aquest epítot es disposa

d'un anticòs (abFLAG-M2) conjugat a resina que facilita la immunoprecipitació. Així hem immunoprecipitat la proteïna de fusió (KAP-FLAG) a partir de medi (48 h post-transfecció) i de cèl·lules. Com a control hem transfectat el plàsmid que codifica per a la fusió BAP-FLAG (fosfatasa alcalina bacteriana-BAB) i hem procedit igualment a la immunoprecipitació de medi i de cèl·lules. Els resultats s'indiquen a la figura II-9.

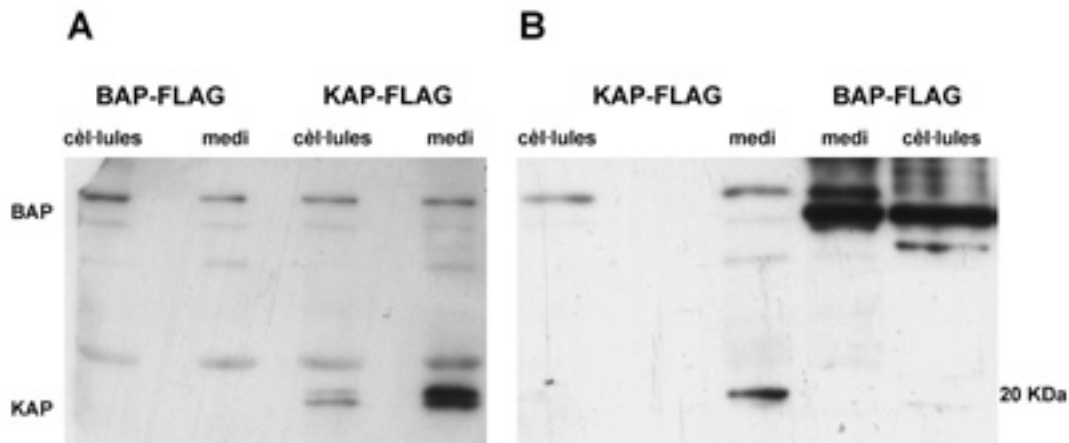


Fig. II-9: Western blot del producte de la immunoprecipitació amb resina abFLAG. La detecció s'ha realitzat tant amb (A) anticòs abKAP1 (2 µg/ml) com amb (B) anticòs abFLAG-M2 (5 µg/ml). 15 µl /carril.

Tant anticòs abKAP1, com l'anticòs comercial abFLAG-M2 detecten de manera específica la KAP. Així mateix, la presència de la proteïna al medi confirma la secreció de KAP per part de la cèl·lula epitelial de túbul proximal renal murí. La quantitat de mostra carregada a cada pou és la mateixa, i prové de l'immunoprecipitat de tot el medi i totes les cèl·lules d'una placa de 10 cm.

Les dues bandes específiques amb pesos moleculars d'aproximadament 21 i 22 kDa, observades en l'immunoprecipitat cel·lular, són igualment presents a l'immunoprecipitat de medi, sense que es faci evident un canvi en la mobilitat electroforètica o en la intensitat relativa de les dues formes de la KAP. Malgrat que no s'observi a la figura, l'anticòs abFLAG-M2 també reconeix dues bandes tant a cèl·lules com a medi.

2.3.3. Sistema tet-off d'expressió controlada.

Encara que GFP sola i GFP-KAP presentin patrons de distribució cel·lular diferents, encara queda oberta la possibilitat que la GFP estigui emmascarant la distribució real de KAP.

El sistema d'expressió controlada Tet-Off representa un model estable, i alhora controlat per tetraciclina, d'expressió de la KAP sense cap tipus de fusió. De tots els clons doblement transfectats es van seleccionar el 3-26-37, el 3-26-71 i el 3-26-310 per presentar uns valors basals baixos i uns nivells d'inducció alts, com es demostra mitjançant RT-PCR a la figura II-10.

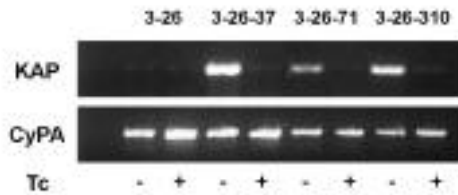


Fig. II-10: RT-PCR dels clons seleccionats. Utilitzem l'amplificació de la CyPA com a control de càrrega i integritat.

Alhora es va estudiar la capacitat d'inducció del clon 3-26-310 en retirar la tetraciclina i observant l'aparició del mRNA i la proteïna (figura II-11). L'augment en els nivells de mRNA es fa evident a les 3 hores de retirar la tetraciclina. En el cas de la proteïna, en canvi, no és fins a les 4 o 5 hores que no la detectem, assolint-se nivells màxims entre les 12 i les 24 hores.

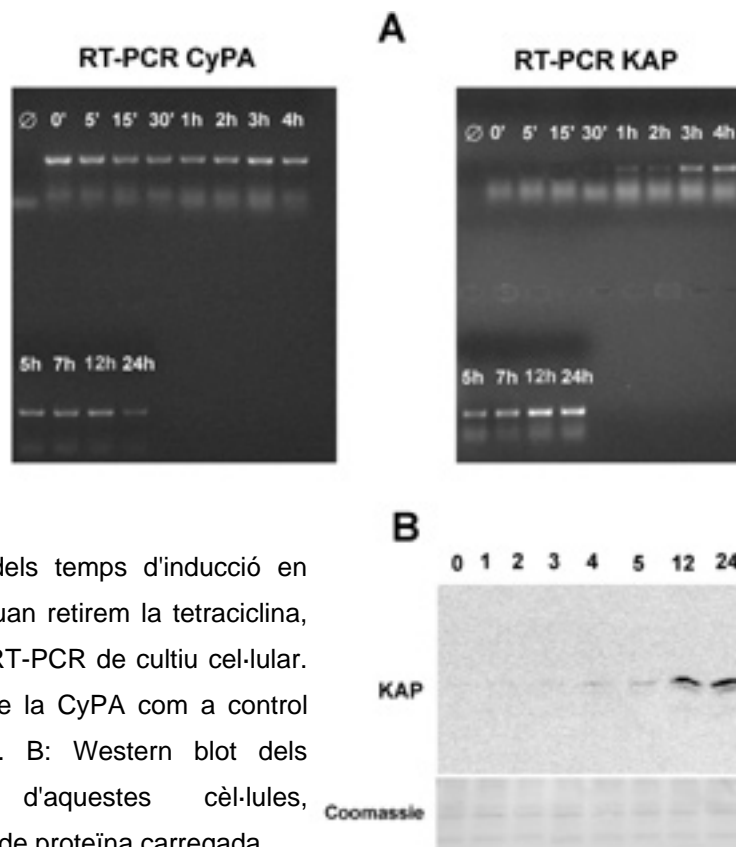


Fig. II-11: Anàlisi dels temps d'inducció en l'expressió de la KAP quan retirem la tetraciclina, clon PCT 3-26-310. A: RT-PCR de cultiu cel·lular. Utilitzem l'amplificació de la CyPA com a control de càrrega i integritat. B: Western blot dels extractes cel·lulars d'aquestes cèl·lules, normalitzat per quantitat de proteïna carregada.

En aquest sistema hem realitzat immunocitoquímica per tal de localitzar la proteïna i contrastar el resultat amb l'obtingut amb GFP-KAP. La figura mostra la imatge corresponent a aquesta immunocitoquímica confirmant-se la localització reticular de KAP (Fig. II-12)

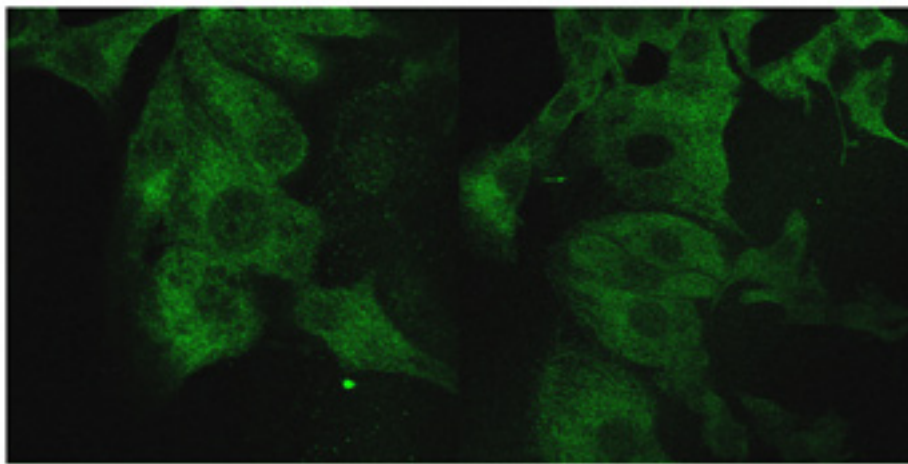


Fig. II-12: Immunocitoquímica de PCT 3-26-310 en absència de tetraciclina (abKAP1 20 µg/ml)

2.4. Presència de KAP durant la mitosi.

En una població cel·lular asincrònica trobem, en major o menor proporció, cèl·lules en cada una de les diferents etapes del cicle. L'anàlisi de les figures mitòtiques dels clons Tet-Off amb sobre-expressió de KAP es mostra a la figura II-13. En aquestes cèl·lules en divisió, la KAP es localitza formant part de l'aparell mitòtic. Concretament, detectem marcatge en alguns nuclis íntegres i a nivell dels microtúbuls en les diferents fases mitòtiques: metafase, anafase i telofase, així com a nivell del solc de segmentació.

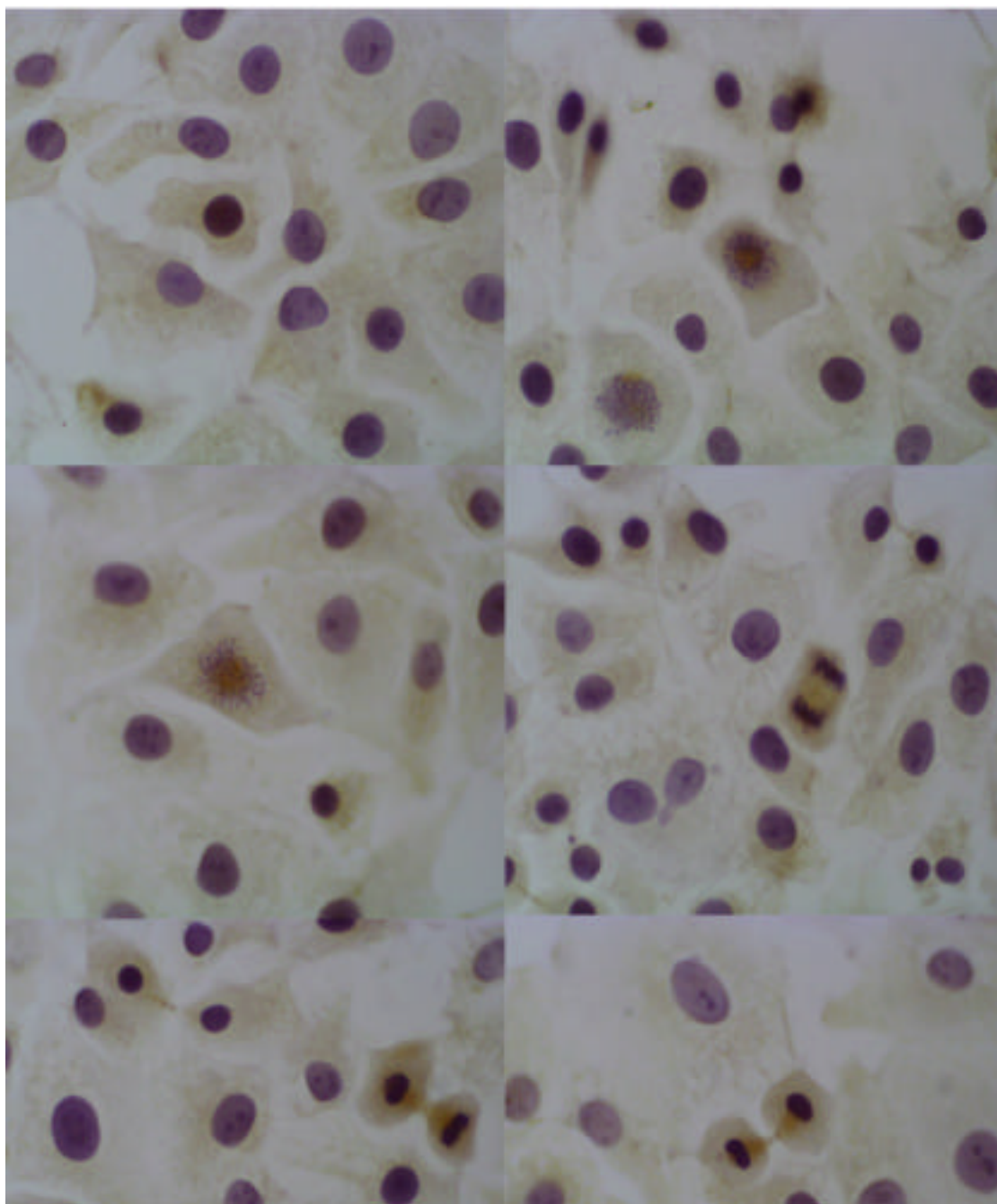
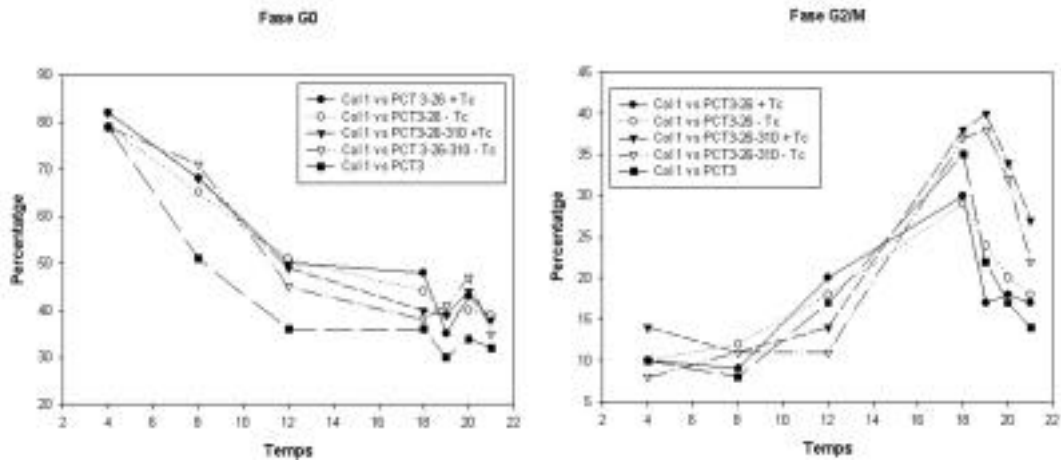


Fig. II-13: Immunocitoquímica (abKAP1 20 µg/ml) sobre cèl·lules PCT 3-26-310 sense tetraciclina.

La possibilitat que la sobre-expressió de KAP alteri el cicle cel·lular s'ha avaluat mitjançant citometria de flux, en col·laboració amb la Dra. Isabel Caragol (servei d'Immunologia, Hospitals Vall d'Hebron). La progressió del cicle del clon PCT 3-26-

310 amb i sense expressió de KAP s'ha analitzat a diferents temps i comparat amb els



clons parental PCT 3 i PCT 3-26. La figura II-13 mostra els resultats d'aquesta anàlisi.

Fig. II-14: Percentatge de cèl·lules en cada una de les fases del cicle.

No hi ha diferències significatives entre la presència o l'absència de la KAP (-Tc / +Tc) pel que fa a la progressió del cicle cel·lular. Sí s'observen, en canvi, diferències entre el comportament del clon PCT 3-26 i el clon PCT 3-26-310 independentment de la presència de KAP, indicant que aquestes diferències estan provocades per efectes insercionals i no per la tetraciclina ni la KAP.

2.5. Síntesi i secreció de la KAP. Marcatge metabòlic.

Mitjançant la utilització del sistema FLAG hem observat la secreció de la KAP per part de la cèl·lula epitelial renal murina. La dinàmica de la secreció de la KAP així com la seva síntesi s'ha estudiat utilitzant igualment el model KAP-FLAG en assaigs de pols i caça (figura II-15).

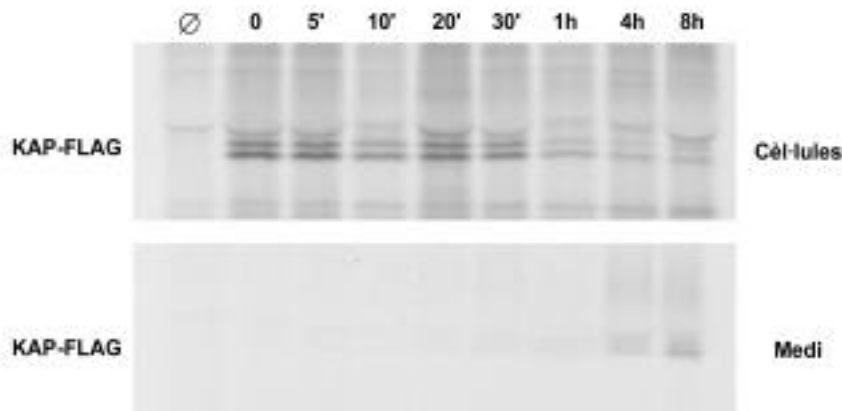


Fig. II-15: SDS-PAGE de l'immunoprecipitat a diferents temps de medi i cèl·lules

transfectades amb KAP-FLAG i marcades radioactivament durant 30 min. La radioactivitat s'ha visualitzat mitjançant Phosphorimager.

S'observen les dues bandes clarament diferencials descrites prèviament amb pesos de 21 i 22 KDa en l'immunoprecipitat a partir de cèl·lules a temps 0. En aquest punt la intensitat de les dues bandes és aproximadament la mateixa; conforme augmenta el temps de caça, les dues bandes perden intensitat, essent la banda de més alt pes molecular la que desapareix més ràpidament. Aquesta esdevé indetectable entre 2 i 4 hores.

En el medi, en canvi, apareix una banda menys definida, corresponent al pes de 21 KDa. Tanmateix, la presència de la proteïna de pes molecular superior sembla intuir-se també en el medi.

A les 8 hores la KAP encara es detecta en l'extracte cel·lular i és clarament present al medi, indicant que la proteïna té una vida mitja superior a 8 hores.

3. IDENTIFICACIO DE PROTEÍNES QUE INTERACCIONEN AMB LA KAP

Les interaccions proteïna-proteïna s'han detectat mitjançant la tècnica del doble híbrid en llevat (Fields, 1989). Aquest sistema, ja clàssic, es basa en la construcció de quimeres; per una banda, el domini d'activació d'un factor de transcripció de llevat (AD-GAL4) es fusiona al conjunt de cDNAs d'una llibreria. Per altra banda el domini d'unió a DNA d'aquest mateix factor (BD-GAL4) es fusiona al cDNA de la proteïna d'interès. La interacció entre aquesta última fusió i qualsevol proteïna de la llibreria, apropa els dos dominis del factor de transcripció que esdevé funcional i activa els gens reportadors d'interacció (síntesi d'histidina i $-gal$).

A cada assaig s'han analitzat un total de $1,5 \times 10^6$ clons independents. D'aquests, aproximadament 6×10^3 van superar la primera ronda de rastreig, creixent en medi selectiu per a la interacció. El primer assaig $-galactosidasa$ de tots aquests clons va reduir el nombre de positius fins a un total de 12, dels quals només 6 van confirmar-se en una segona ronda d'assaig $-galactosidasa$.

Els plàsmids continguts en aquests llevats (pBD-KAP i pAD-positiu) es van purificar i es van identificar per patró de restricció. La qualitat d'aquests positius es va

avaluar de nou en repetir les transformacions amb pBD-KAP i amb altres plàsmids controls. Els resultats es mostren a la taula III-1

| Leu-Trp- Leu-Trp-His- | A1 | 5.3 | 5.6 | B3 | P5 | 3.11 | pSV40 |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ∅ | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - |
| pGALBD-P53 | + - | + - | + - | + - | + - | + + | + + |
| pGALBD-laminC | + - | + - | + - | + - | + - | + + | + - |
| pGALBD-∅ | + - | + - | + - | + - | + - | + + | + - |
| pGALBD-KAP | + - | + - | + + | + + | + + | + + | + - |

Taula III-1: Creixement en medi selectiu del llevat transfectat amb les diferents combinacions de plàsmids. Leu- Trp- selecciona per a la presència dels plàsmids. Leu-Trp-His- selecciona per a la interacció. En blau s'indiquen els positius per a l'assaig -galactosidasa.

Els clons A1 i 5.3 no es confirmen com a positius en aquestes noves transformacions donat que no són capaços de conferir creixement en medi selectiu per a la interacció. Per altra banda, el clon 3.11 és capaç d'activar els gens reportadors d'interacció independentment de la presència de KAP, el considerem, doncs, un fals positiu. En canvi sí es confirmen com a interaccions específiques amb KAP els clons 5.6, P5 i B3.

3.1. Positiu 5.6.

La digestió del plàsmid pADGAL4-5.6 amb els enzims EcoRI i XhoI fa saltar un únic fragment de DNA d'aproximadament 1700 parells de bases.

3.1.1. Homologies.

La recerca d'homòlegs del clon 5.6 mitjançant BLASTn a la base de dades nr (non redundant) ens presenta una regió que compren 400 nucleòtids, homòloga a l'entrada de GenBank (M15881) corresponent a l'extrem 3' de la uromodulina, també anomenada proteïna de Tamm Horsfall (figura III-1). El fragment d'homologia inclou regió traduïda i regió no traduïda o 3'UTR.