



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Expressió del gen de la proteïna [α]B-cristal·lina: variabilitat dels trànscrips en *Gallus domesticus*

Salvador Macip



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

**EXPRESSIÓ DEL GEN DE LA
PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA:
VARIABILITAT DELS TRÀNSCRITS
EN *GALLUS DOMESTICUS***

Salvador Macip



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700917699

*Dedico aquest a Tesi als meus avis,
que no han pogut veure com l'acabava.*

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES I
GRUP DE GENÈTICA MOLECULAR

**EXPRESSIÓ DEL GEN DE LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA:
VARIABILITAT DELS TRÀNSCRITS EN *GALLUS DOMESTICUS***

Tesi per a optar al grau de Doctor en Medicina que presenta Salvador Macip, llicenciat en Medicina i Cirurgia per la Universitat de Barcelona (1994).

El treball ha estat realitzat sota la direcció del Professor Cristóbal Mezquita i Pla al Laboratori de Genètica Molecular del Departament de Ciències Fisiològiques I de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

El programa de doctorat "FISIOLOGIA I PATOLOGIA MOLECULAR" del Departament de Ciències Fisiològiques I ha estat realitzat durant el bienni 1994-96, essent el tutor responsable el Dr. Ramon Segura.

Barcelona, Setembre de 1998.

Quan la resposta no pot ser posada en paraules tampoc no es pot posar en paraules la pregunta.

Però fins i tot quan s'hagi donat resposta a totes les qüestions científiques possibles, els problemes de la Vida quedaran completament sense tocar.

Ludwig Wittgenstein
Tractatus Logico-Philosophicus (1922)

ÍNDEX

<i>SUMARI</i>	<i>Plana 6</i>
PRESENTACIÓ	Plana 12
INTRODUCCIÓ	Plana 15
OBJECTIUS	Plana 37
MATERIAL I MÈTODES	Plana 42
RESULTATS	Plana 130
DISCUSSIÓ	Plana 149
CONCLUSIONS	Plana 159
BIBLIOGRAFIA	Plana 164
AGRAÏMENTS	

SUMARI

PRESENTACIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA

1.1.1. Les Proteïnes del Cristal·lí

1.1.1.1. El Cristal·lí és un òrgan molt particular

1.1.1.2. Les Proteïnes del Cristal·lí són imprescindibles per a la visió

1.1.1.3. La Proteïna α -cristal·lina té una funció especial en la lent

1.1.1.4. Principals característiques de la Proteïna α -cristal·lina

1.1.1.5. La Proteïna α A-cristal·lina

1.1.2. Característiques principals de l' α B-cristal·lina

1.1.2.1. Localització de l' α B-cristal·lina

1.1.2.2. L' α B-cristal·lina té activitat quinasa

1.1.2.3. El gen de la proteïna α B-cristal·lina s'expressa ben aviat en el desenvolupament

1.1.3. Funcions específiques i generals

1.1.3.1. L' α B-cristal·lina té una funció eminentment estructural al cristal·lí

1.1.3.2. La principal funció de l' α B-cristal·lina radica en la seva capacitat d'actuar com a Xaperonina

1.1.3.3. Altres possibles funcions

1.1.4. Característiques comuns de les Proteïnes d'Estrés Tèrmic de Baix pes Molecular

1.1.4.1. Què són les sHSP?

1.1.4.2. Característiques comuns de les sHSP

1.1.5. El comportament de l' α B-cristal·lina en situacions d'estrés

1.1.5.1. Estrés Oxidatiu

1.1.5.2. Estrés Osmòtic

1.1.5.3. Estrés Tèrmic

1.1.5.4. Altres tipus d'Estrés

1.2. PATOLOGIA ASSOCIADA A LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA

1.2.1. Malalties neurodegeneratives

1.2.1.1. Malaltia d'Alexander

1.2.1.2. Malaltia d'Alzheimer

1.2.2.3. Esclerosi múltiple

1.2.2. Cataractes

1.2.2.1. La pèrdua de la funció de l' α B-cristal·lina es relaciona amb la formació de cataractes

1.2.2.2. Possibles agents inductors de les cataractes

1.2.2.3. Estratègies en al prevenció de les cataractes

1.2.3. Altres Patologies

1.2.3.1. Expressió de l' α B-cristal·lina en cèl·lules transformades

1.2.3.2. Alteracions degudes a la diabetis

1.2.3.3. Condicions d'isquèmia cardíaca

2. OBJECTIUS

2.1. PRIMER OBJECTIU: Seqüenciar els trànscrips de la proteïna α B-cristal·lina en el pollastre

2.2. SEGON OBJECTIU: Caracteritzar l'expressió del gen de la proteïna α B-cristal·lina en diferents teixits del pollastre

2.3. TERCER OBJECTIU: Caracteritzar la variació de l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina en gall davant diferents estímuls i proposar un significat funcional

2.4. QUART OBJECTIU: Comparar l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina i de l'ubiquitina en les diferents etapes de l'embriogènesi

3. MATERIAL I MÈTODES

3.0. INTRODUCCIÓ

3.0.1. Sobre els protocols

3.0.2. Sobre les fonts del material

3.0.3. Sobre els experiments

3.1. OBTENCIÓ D'ÀCIDS NUCLÈICS

3.1.1. Obtenció de DNA

- 3.1.1.1. A partir de sang total
- 3.1.1.2. A partir de Glòbuls Blancs
- 3.1.1.3. A partir de Teixits (I): *Nuclitips*
- 3.1.1.4. A partir de Teixits (II): *DNA Isolator*
- 3.1.1.5. Extracció fenòlica
- 3.1.2. Obtenció de RNA Total a partir de teixits
- 3.1.3. Tractament del RNA amb RNAsa H
- 3.1.4. Obtenció de Primeres Cadenes a partir de RNA
 - 3.1.4.1. Mètode *T-primed*
 - 3.1.4.2. *cDNA Synthesis Kit*
- 3.2. GELS D'ELECTROFORESI I TRANSFERÈNCIES D'ÀCIDS NUCLÈICS
 - 3.2.1. Electroforesi en gels d'agarosa (DNA)
 - 3.2.2. Electroforesi en gels d'agarosa-formaldehid
 - 3.2.3. Transferència d'un gel a una membrana (Northern)
- 3.3. AMPLIFICACIÓ DE PRODUCTES (PCR). AÏLLAMENTS I PURIFICACIÓ.
 - 3.3.1. Amplificació de DNA per PCR
 - 3.3.2. Aïllament i Purificació de DNA o Productes de PCR (I): *Millipore*
 - 3.3.3. Aïllament i Purificació de DNA o Productes de PCR (II): *Clontech*
- 3.4. HIBRIDACIÓ NORTHERN
 - 3.4.1. Marcatge no radiactiu d'una sonda
 - 3.4.1.1. *Boehringer*
 - 3.4.1.2. Per PCR
 - 3.4.2. Quantificació d'una sonda marcada
 - 3.4.3. Hibridació *Northern* no radiactiva
- 3.5. CLONACIÓ DEL DNA
 - 3.5.1. Preparació de Vector BSSK+ liniaritzat i amb extrems 3'T
 - 3.5.2. Lligació
 - 3.5.3. Transformació Bacteriana per Electroporació
 - 3.5.4. Minipreparacions
 - 3.5.4.1. *Promega Wizard Minipreps*
 - 3.5.4.2. Per PCR
 - 3.5.5. Preparació de l'DNA clonat per a seqüenciar
- 3.6. SEQÜENCIACIÓ
 - 3.6.1. Preparació d'un gel de seqüenciació (sisetmes automàtic i manual)

- 3.6.2. Reaccions de Seqüenciació
 - 3.6.2.1. Seqüenciació de productes de PCR (Manual)
 - 3.6.2.2. Seqüenciació automàtica
- 3.7. ANÀLISI FUNCIONAL. SITUACIONS D'ESTRÉS
 - 3.7.1. Cultiu de cristal·lins i exposició a estrés
 - 3.7.2. Exposició a estrés tèrmic de cèl·lules de teixits de gall
 - 3.7.3. Anàlisi de la distribució de mRNA en fraccions de polisomes i en complexos ribonucleoproteics
- 3.8. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES
 - 3.8.1. Obtenció de proteïnes totals a partir de teixits
 - 3.8.2. Obtenció de proteïnes citosòliques a partir de teixits
- 3.9. GELS D'ELECTROFORESI I TRANSFERÈNCIES DE PROTEÏNES
 - 3.9.1. Electroforesi en mini gels d'una sola concentració
 - 3.9.2. Tinció d'un gel de proteïnes amb Coomassie
 - 3.9.3. Transferència d'un gel de proteïnes a una membrana (*Western*)
- 3.10. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES AMB ANTICÓS ESPECÍFIC: SISTEMA DE LA PEROXIDASA

4. RESULTATS

- 4.1. SEQÜÈNCIA DEL mRNA DE LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA EN TESTICLE DE GALL
 - 4.1.1. Caracterització de l'extrem 5'
 - 4.1.2. Caracterització de la regió codificant i l'extrem 3'
- 4.2. EXPRESSIÓ DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA
 - 4.2.1. Obtenció de sondes específiques
 - 4.2.2. Expressió en diferents teixits de gall adult: la sonda codificant dóna dos tamanyes de missatgers
 - 4.2.3. Les dues bandes són en realitat quatre mRNA de diferents llargades
 - 4.2.4. Les sondes 5' i 3' ens permeten diferenciar entre les quatre bandes
 - 4.2.5. La banda de 2'8 kb
- 4.3. VARIACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DAVANT DIFERENTS ESTÍMULS
 - 4.3.1. L'elecció del model
 - 4.3.2. Possibles inductors de l'expressió

- 4.3.3. Resultats de la inducció de l'expressió
 - 4.3.3.1. Embrions de gall
 - 4.3.3.2. Gall Adult
 - 4.3.3.3. Cultiu de cèl·lules de Testicle
 - 4.3.3.4. Cultiu de cristal·lins d'Embrió de Gall
- 4.3.4. Variació dels nivells de proteïnes
- 4.3.5. Distribució dels trànscrips en fraccions polisòmiques
- 4.4. COMPARAR L'EXPRESSIÓ DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA I DE L'UBIQÜITINA EN LES DIFERENTSETAPES DE L'EMBRIOGÈNESI
 - 4.4.1. Expressió en embrions de 4 a 10 dies d'edat
 - 4.4.2. Existeix una tercera llargada de l'extrem 5'
 - 4.4.3. Expressió en embrions de 17 dies d'edat

5. DISCUSSIÓ

5.1. SEQÜÈNCIA DEL mRNA DE LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA EN TESTICLE DE GALL

- 5.1.1. Hi ha tres llargades diferents de la regió 5' dels trànscrips de l' α B-cristal·lina en el pollastre
- 5.1.2. La regió codificant dels trànscrips seqüenciats és diferent a la descrita
- 5.1.3. La regió 3' trobada en els trànscrips és més petita que la descrita, però d'igual seqüència
- 5.1.4. La teoria dels dos gens

5.2. EXPRESSIÓ DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA

- 5.2.1. La RNasa H ha permès ^{detectar} descobrir tots els trànscrips per hibridació
- 5.2.2. La diferència dels extrems 5' i 3'
- 5.2.3. L'estabilitat dels trànscrips i les seves implicacions

5.3. EXPLICACIONS A LES VARIACIONS D'EXPRESSIÓ DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA

- 5.3.1. L' α B-cristal·lina no és comporta com una HSP en el gall
- 5.3.2. Els possibles inductors de l'expressió
- 5.3.3. L'efecte de la Dexametasona
- 5.3.4. Eficiència de la traducció de els diferents formes del missatger

5.4. POSSIBLE RELACIÓ ENTRE L'EXPRESSIÓ DE L' α B-CRISTAL·LINA I DE LA UBIQUITINA

6.CONCLUSIONS

- 6.1. PRIMER OBJECTIU: CONCLUSIONS 1-4
- 6.2. SEGON OBJECTIU: CONCLUSIONS 5-9
- 6.3. TERCER OBJECTIU: CONCLUSIONS 10-16
- 6.4. QUART OBJECTIU: CONCLUSIONS 17-19

7.BIBLIOGRAFIA

AGRAÏMENTS

PRESENTACIÓ

La present Tesi recull els estudis que hem realitzat en el període 1994-1998 sobre l'expressió en el gall (*Gallus gallus*) del gen de la proteïna α B-cristal·lina. En la *Introducció* hem fet un repàs a les principals característiques d'aquesta proteïna per explicar què ens va induir a estudiar-la amb detall, aturant-nos especialment en les dades que ens han servit per a bastir les nostres hipòtesis. Els *Objectius* descriuen quines eren les preguntes que vam decidir respondre amb el nostre treball, que es descriu detalladament en l'apartat de *Resultats*. La *Discussió* debat una mica el possible significat d'aquests resultats tenint present tot el que s'ha dit en apartats anteriors. La secció de *Mètodes* és un recull de tots els protocols experimentals usats per obtenir els citats resultats. Finalment, les *Conclusions* resumeixen les dades que hem considerat més importants del treball realitzat.

Els nostres experiments han donat com a fruit els següents articles i comunicacions:

- Mezquita,C. Mezquita,J. López-Ibor,B. Macip,S. Pau,M. and Vilagrasa,X.
Ubiquitin and apoptosis
Journal of Neuropathology and Experimental Neurology Supplement 8S-9S, 1995
(Review)
- Mezquita, J. Mezquita,P. Macip,S. Pau,M. and Mezquita,C.
Alternative promoters to "TATA box" in meiotic and postmeiotic male germ cells
Mol. Biol. Cell, 7:677, 1995
(Póster per al 35th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology)
- Macip,S. Mezquita,C. and Mezquita,J.
cDNA Nucleotide Sequence of α B-crystallin Gene Isolated from Mature Chicken Testis
(Seqüència de EMBL/GenBank Data Libraries, 1995, Codi d'Accés U26661)

- Macip,S. Mezquita,C. and Mezquita,J.

Alternative transcriptional initiation and alternative use of polyadenylation signals in the α B-crystallin gene expressed in different chicken tissues

Gene (187:253-257, 1997)

- Macip,S. Mezquita,C. and Mezquita,J.

Expression of α B-crystallin gene in different chicken tissues

Cytogenetics and Cell Genetics, 77 S1: 31-32, 1997

(Póster per a *International Conference on Chromosome 21 and Medical Research on Down Syndrome*)

CONSIDERACIONS LINGÜÍSTIQUES

Aquesta tesi ha estat escrita en català, seguint les indicacions ortogràfiques de l'Institut d'Estudis Catalans (*Què cal saber? Fitxes lexicogràfiques de la Societat Catalana de Biologia*, Recull 1-100, Barcelona 1996). Hem procurat usar els termes científics catalans sempre que ha estat possible i hem trobat una traducció adequada, excepte quan les normes indicaven el contrari (per exemple en els acrònims DNA i RNA, entre altres). En els termes no ressenyats en la referència anterior i sense especificació al Diccionari General de la Llengua Catalana, així com en altres situacions especials, hem emprat els següents criteris:

- Hem usat la paraula *Gall* sempre que ens hem referit a l'animal adult, i *Pollastre* quan hem parlat de l'animal sexualment inmadur o de l'embrió.

- Hem usat el terme *Aus* encara que l'IEC recomana usar el sinònim *Ocells* en el seu lloc.

- No hem trobat cap referència de traducció en català de la paraula *chaperone* (o *chaperonine*). En castellà es tradueix amb el neologisme *chaperona* (o *chaperonina*), a partir del mot original, encara que la traducció més encertada lingüísticament seria "carabina" o "acompañante". Hem decidit no usar la forma anglesa original, sinó proposar la nostra pròpia traducció al català, seguint la idea usada en castellà. Hem escrit, per tant, *Xaperonina* per a referir-nos a la proteïna i *Xaperó* per a referir-nos a la seva funció específica.

- Per una qüestió de correspondència amb els termes usats normalment al laboratori, hem optat per mantenir la paraula anglesa *primer* per referir-nos al DNA encebador.
- Hem usat el mot Aspirina, tot i que al nostre país sigui una marca registrada, per referir-nos a l'Àcid Acetil Salicílic.

ABREVIACIONS

Aquestes són les principals abreviacions i sigles usades en aquesta tesi, a part de les habituals:

HSP: *Heat Shock Protein* (proteïna d'stress tèrmic).

sHSP: *small Heat Shock Protein* (proteïna d'stress tèrmic de baix pes molecular).

O/N: *Overnight* (tota la nit).

pb, bp: parells de bases.

kb: kilobases, o mil parells de bases.

rpm: revolucions per minut.

UV: radiació UltraViolada

Els formats dels textos d'aquesta Tesi i de la Bibliografia segueixen les propostes fetes pel *International Committee of Medical Journal Editors* recollides sota el títol *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* en la seva revisió de 1997 (Ann. Intern. Med. 1997; 126:36-47)

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA

L' α B-cristal·lina és una proteïna que, juntament amb l' α A-cristal·lina, forma part d'un dels principals complexos protèics que es troben a la lent dels ulls dels vertebrats, conegut com la proteïna α -cristal·lina. Aquest complexe està implicat de forma important en el manteniment de la transparència de la lent. L' α B-cristal·lina es pot trobar també sola i també en altres teixits de l'organisme a part del cristal·lí, realitzant altres funcions. La principal característica de l' α B-cristal·lina és l'homologia estructural i funcional que guarda amb les Proteïnes d'Estrés Tèrmic de Baix pes Molecular (*small Heat Shock Proteins* o sHSPs), un grup de proteïnes que es sobreexpressen quan es sotmet la cèl·lula a certs tipus d'estrès. Per altra banda la proteïna α B-cristal·lina apareix incrementada en una sèrie de patologies d'origen molt divers, sense que normalment se'n conegui bé la causa. Tot plegat fa de l' α B-cristal·lina una proteïna de gran interès, més enllà de les seves funcions dins el cristal·lí.

1.1.1. Les Proteïnes del Cristal·lí

1.1.1.1. El Cristal·lí és un òrgan molt particular

El cristal·lí és un òrgan avascular, encapsulat i transparent que té com a missió enfocar la llum a la retina amb el mínim de distorsió, i que ha de mantenir la màxima estabilitat al llarg dels anys [vegeu Figura 1]. La seva estructura està formada per una sola capa de cèl·lules epitelials que a la regió equatorial es diferencien terminalment en les fibres de la lent. Aquest procés fa créixer la cèl·lula a la vegada cap als pols anterior i posterior del cristal·lí. La formació de noves fibres és ràpida en l'etapa prenatal i els primers dies de vida, però després descendeix considerablement i es manté a un nivell baix però estable la resta de la vida.

Les cèl·lules noves creixen sobre les velles; d'aquesta manera augmenta el volum de la lent i es desplacen cap al centre les cèl·lules més antigues. Per tant, la

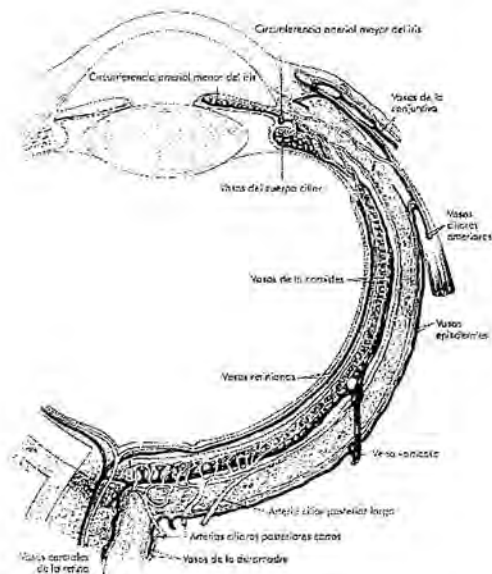


Figura 1a Situació del cristal·li a l'ull.

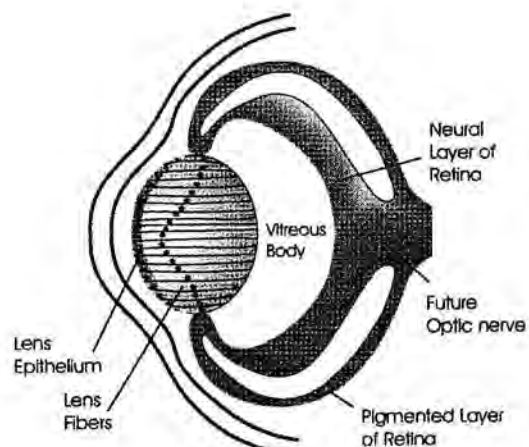


Figura 1b. Formació del cristal·lí (102). Representació del cristal·lí en fases finals de l'embriogènesi del ratolí. L'epiteli està format i ocupa la part anterior d'ella, mentre que la part posterior està formada per les cèl·lules fibroses elongant-se.

regió interior de la lent, el nucli, representa la part més vella del teixit, corresponent a l'edat embrionària, mentre que la perifèria, el còrtex, és la part jove i metabòlicament activa. Els nuclis, mitocondris i altres orgànuls cel·lulars es degraden durant la diferenciació terminal, de forma que les fibres de la lent ja madures han perdut la capacitat de sintetitzar proteïnes i mantenir el procés metabòlic. Es creu, doncs, que només les cèl·lules epitelials són plenament funcionals.

D'aquesta manera, les cèl·lules madures no poder reemplaçar les proteïnes que hagin estat malmeses en algun moment de la vida de l'organisme. Només poden reparar-les en cert grau usant els mecanismes dels quals disposin en aquell moment. El cristal·lí, per tant, és molt sensible a les agressions externes i depèn en gran mesura de l'epiteli per a mantenir la seva estabilitat i transparència. El fet d'estar encapsulat i separat de la circulació sanguínia manté el cristal·lí lliure d'infeccions virals o bacterianes, però molts altres processos poden afectar la seva estructura.

Aquestes característiques peculiars del cristal·lí fan que sigui necessari mantenir les seves proteïnes el més estable possible: la lent ha de romandre sempre transparent per a que es pugui dur a terme la visió. Per això cal un sistema que eviti la formació de grans agregats o la desnaturalització de les proteïnes, que donin lloc així a opacitats que entorpeixin el pas de la llum.

1.1.1.2. Les Proteïnes del Cristal·lí són imprescindibles per a la visió

Les Proteïnes Cristal·lines pertanyen a tres grups principals: les α , les β , i les δ . Cada grup té diferents subunitats, cadascuna d'elles derivada d'un gen diferent: dos l' α (αA i αB), set la β i dos la δ . També s'han descrit la γ , la ϵ (lactat deshidrogenasa B), la τ (α -enolasa) i la ζ (NADPH:Quinona oxidoreductasa, abundant en conills d'indies). Aquestes proteïnes van ser descobertes en les lents dels vertebrats per Mörner l'any 1894 (1).

Les Proteïnes Cristal·lines constiuteixen el 90% de les proteïnes que podem trobar al cristal·lí. Possiblement es tracti de les proteïnes de vida més llarga de tot l'organisme ja que la composició protèica del cristal·lí no varia durant tota la existència de l'individu. Formen part del medi de difracció que travessa la llum en el seu camí cap a la retina, per tant la seva funció és eminentment estructural. L'alt component protèic del cristal·lí (fins a 60% de la seva massa) porta a interaccions

protèiques de curta distància i un ordenament regular que assegura la transparència. Com que també es poden trobar la majoria de les Proteïnes Cristal·lines en altres teixits (normalment en petites quantitats), se sospita que durant l'evolució de l'ull es reclutaren certes proteïnes funcionals per a que participessin en el manteniment de l'estructura de la lent, al marge de les seves funcions metabòliques originals. (2)

Apareixen en l'embriogènesi en aquest ordre: δ , β , α (en humans primer la αB i després la αA , en ratolins al revés) i γ (3, 4). Ja al setè dia del desenvolupament de l'embrió de pollastre estan representades les principals cristal·lines, que és just quan el cristal·lí esdevé transparent. Després augmenten molt l' α i la β , que junt amb la γ són la majoria de les proteïnes del cristal·lí, ja que la δ deixa d'expressar-se al principi de l'edat adulta tot i ser la predominant en embrió i els primers dies de vida. La τ -cristal·lí, en canvi, és abundant només en la lent de l'embrió, no en la de l'adult.

Les proteïnes cristal·lines no estan distribuïdes homogèniament dins la lent: hi ha diferències graduals entre l'escorça i el nucli. Totes elles es regulen independentment, però guarden una estreta relació.

1.1.1.3. La Proteïna α -cristal·lina té una funció especial en la lent

De totes les proteïnes cristal·lines, la proteïna α -cristal·lina té, a més a més de la funció estructural, la missió de mantenir les proteïnes de la lent en òptimes condicions. Això ho fa a través de la funció que rep el nom de xaperó, que presenten també cadascuna de les seves subunitats, αA i αB , per separat. Aquesta funció serà detallada més endavant. Mentre l' α -cristal·lina és plenament funcional es garanteix la transparència de la lent, però quan comencen a aparèixer modificacions post-traduccionals en la proteïna, cada cop més freqüents amb l'edat, i la seva funció de xaperó comença a disminuir, les probabilitats que apareguin opacificacions van augmentant. Per això són freqüents les cataractes en les lents de les persones d'edat avançada.

1.1.1.4. Principals característiques de la Proteïna α -cristal·lina

L' α -cristal·lina és la més abundant de totes les proteïnes del cristal·lí (35-50% del total). Es troba principalment formant agregats de 800 kDa de pes mitjà (en un rang de 280-10.000 kDa). L'agregació d' α -cristal·lina depèn directament de la concentració: a baixes concentracions es troben només formes monomèriques o oligomèriques, a més alta apareixen les formes tetramèriques i després els típics agregats de 800 kDa. Es troba associada a la membrana del cristal·lí i també als filaments intermitjos del citoesquelet. La seqüència té un 40% d'homologia amb les SHSPs, el que fa que s'inclogui dins d'aquesta família i es cregui que evolutivament deriva d'ella. Possiblement l' α -cristal·lina originàriament hagués estat codificada per un sol gen que s'hauria duplicat després en els gens αA i αB (5). L'estructura dels seus gens està molt conservada en diferents animals.

Té dues subunitats, d'uns 20 kDa cadascuna, amb un 57% d'homologia (6), sobretot a l'extrem N-terminal: l' αA (acídica, de 173 aminoàcids, que es troba principalment a cristal·lí) i l' αB (bàsica, de 175 aminoàcids, que es troba a cristal·lí però també a molts altres teixits). Formen homo o heterodímers entre elles de 30-40 subunitats, interaccionant pels extrems N-terminal (7). 30% d'ambdues subunitats es troba fosforil·lat en el cristal·lí.

La seva estructura secundària presenta un 14% d'hèlix α , i un 35% de fulla β . Amb augment de temperatura augmenten també les hèlix α . L'estructura terciària només s'ha pogut estudiar teòricament ja que la proteïna es resisteix a la cristal·lització. Tampoc es coneix, doncs l'estructura quaternària, per bé que s'han proposat alguns models [vegeu la Figura 2]. (8)

1.1.1.5. La Proteïna αA -cristal·lina

La subunitat αA , té dues formes diferents derivades del processament alternatiu (*alternative splicing*) del seu gen. Una d'elles conté un exó de més que codifica un polipèptid de 23 aminoàcids de llarg (αA_{ins}). Fora del cristal·lí es troba principalment a melsa i cor (en quantitat inversament proporcional a la de la subunitat αB), però la seva presència extralenticular és poc relevant comparada amb la de l' αB -cristal·lina. (9)

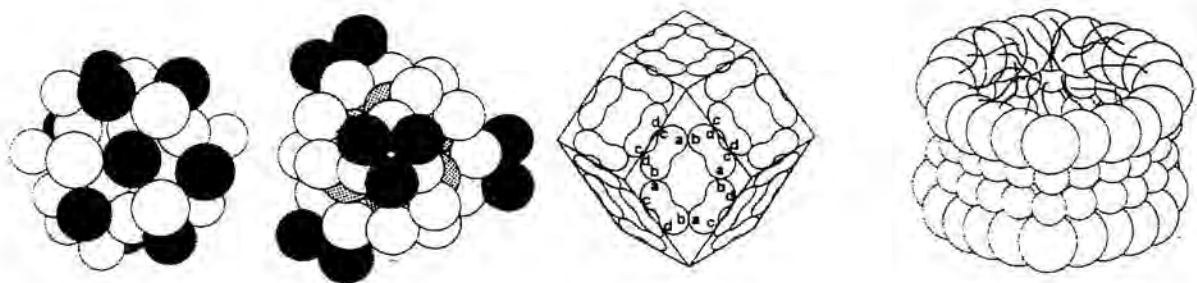


Figura 2. Representació esquemàtica de la possible estructura quaternària de la proteïna α -cristal·lina (8). En el primer i el segon models es proposa una estructura formada per tres capes de subunitats α A (boles blanques) i α B (boles negres). En el tercer es proposa una estructura rombododecaèdrica de 28 subunitats i el darrer és una estructura basada en la de la xaperonina GroEI

L' α A-cristal·lina contribueix a mantenir la transparència de la lent possiblement assegurant que l' α B-cristal·lina es mantingui soluble i pugui realitzar així les seves funcions, com demostren els experiments fets en ratolins deficientes en el gen de l' α A. (10)

1.1.2. Característiques principals de l' α B-cristal·lina

1.1.2.1. Localització de l' α B-cristal·lina

La proteïna α B-cristal·lina és segregada per les cèl·lules de l'epiteli del cristal·lí. Es pot trobar sola a la lent, igual que als teixits extra-lenticulars, o bé formant part dels agregats de proteïnes cristal·lines.

Fora de la lent, la proteïna es localitza preferentment a teixits amb alta activitat enzimàtica oxidativa mitocondrial i teixits amb reorganitzacions citomorfològiques majors (sobretot als estadis inicials de l'embriogènesi) (11). Cor, múscul esquelètic, cervell (principalment a la glia), ronyó, pulmó i testicle són els principals òrgans on es pot trobar a més alta concentració. També es pot trobar a l'iris, l'endoteli corneal, el cos ciliar, múscul estriat, tiroides, colon, cèl·lules de Schwanz de nervis perifèrics, i cèl·lules deciduals de placenta (12, 100).

1.1.2.2. L' α B-cristal·lina té activitat quinasa

Tant la proteïna α A-cristal·lina com l' α B-cristal·lina tenen activitat autoquinasa (fosforil·len les serines, per un procés independent d'AMPc) i són susceptibles també de ser fosforil·lades per altres serinquinases dependents d'AMPc (13). α B és fosforilada in vivo a les serines 45, 59 i 19 o 21, possiblement per dos tipus de quinases diferents. La proteïna fosforil·lada té un lleuger increment de l'activitat protectora de xaperó (especialment en el cas d' α A) però per la resta es comporta igual que la no fosforil·lada. Aquesta fosforil·lació fa que a vegades els anticossos reconeguin dues bandes en la immunodetecció de la proteïna: les diferents alçades d'aquestes bandes en les immunodeteccions són degudes als diferents graus de fosforil·lació. (14)

Es postula que l'autofosforil·lació de les subunitats d' α -cristal·lí pot estar implicada en mecanismes regulatoris de l'expressió de les altres proteïnes cristal·lines (sobretot la γ), però encara no es coneixen bé les seves veritables funcions. També se sap que algunes condicions d'estrés poden augmentar la fosforil·lació, com l'estrés tèrmic o l' H_2O_2 (37, 38). Els tetràmers d' α A-cristal·lina, que també es fosforil·len, són 10 vegades més susceptibles de fosforil·lació que les formes lliures, però els d' α B no presenten aquesta peculiaritat (15).

1.1.2.3. El gen de la proteïna α B-cristal·lina s'expressa ben aviat en el desenvolupament

El gen de l' α B-cristal·lina es troba al cromossoma 11 (11q12-11q23) en humans i presenta dos introns en posicions homòlogues als que apareixen en el gen de l' α A (que es troba en el cromossoma 21) [vegeu la Figura 3]. L'expressió del gen ja es pot detectar en el cor de l'embrió de ratolí als 8'5 dies d'edat i al miotom de les somites als 10'5 dies. Això implica que l' α B és necessària per a la diferenciació miogènica i la morfogènesi cardíaca a l'embriogènesi inicial (16). A la retina del ratolí s'expressa també a fases inicials del desenvolupament, però als 15 dies d'edat es perd. Durant els 10 primers dies de vida del ratolí es podrà detectar a la nansa de Henle, mentre s'està elongant i adquireix la funció tubular, però també acabarà per desaparèixer. En el cervell fetal, en canvi, no apareix, però sí en l'adult.

És un gen evolutivament bastant conservat en els vertebrats. Hi ha, però, unes quantes diferències importants entre els gens de l' α B-cristal·lina en mamífers i en l'ànec, com a exemple més estudiat d'au, que s'han de tenir presents a l'hora d'interpretar els resultats dels experiments (17):

- en mamífers, la seqüència del promotor està molt conservada, i no s'assembla gaire a la del promotor en l'ànec.
- en mamífers hi ha elements promotors d'estrés tèrmic a la seqüència de la regió 5' i en l'ànec no.
- en mamífers augmenta l'expressió en l'estrés tèrmic mentre que en l'ànec s'ha demostrat que no.
- en l'ànec hi ha dues senyals de poliadenilació en la regió 3' i en mamífers no.

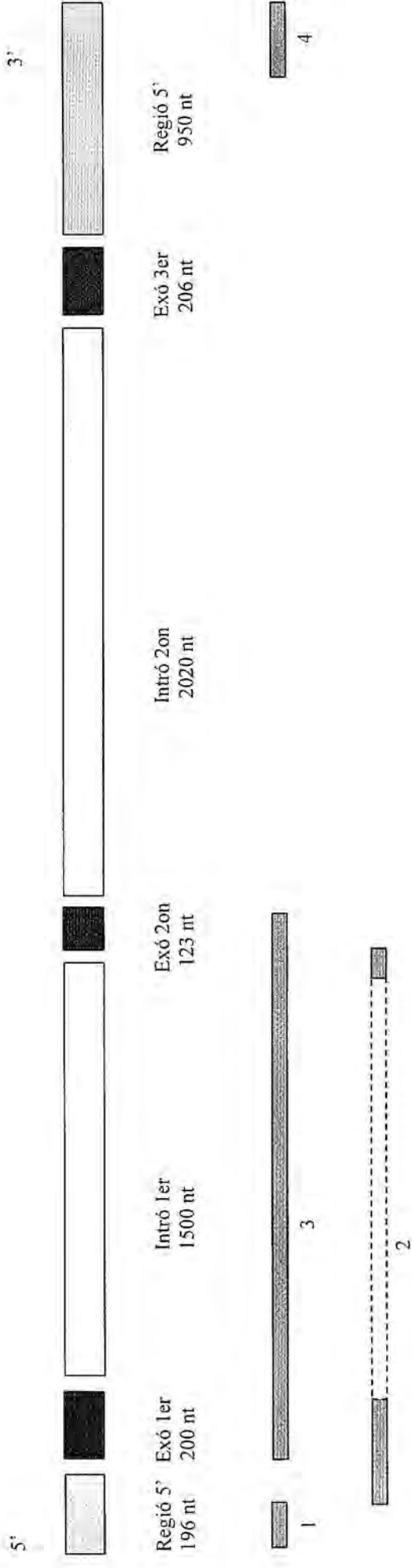


Figura 3. Estructura del gen de l' α B-cristal·lina. El gen té tres exons (en vermell) i dos introns (en verd) a la regió codificant, que junt amb les regions 5' i 3' (en groc) sumen un total de 4935 nucleòtids. A sota, la posició de les sondes utilitzades en els nostres experiments: Sonda 5' (1), Sonda Codificant (2); Sonda Intró (3) i Sonda 3' (4)

1.1.3. Funcions Específiques i Generals de l' α B-cristal·lina

1.1.3.1. L' α B-cristal·lina té una funció eminentment estructural al cristal·lí

La funció estructural de la proteïna α B-cristal·lina a la lent és formar part del medi de refracció com a part de la proteïna α -cristal·lina i conjuntament amb les altres proteïnes cristal·lines. Però la seva funció principal, dins i fora el cristal·lí és la de prevenir l'agregació i desnaturalització protèica a través de la seva activitat com a xaperó. El fet que interaccioni amb estructures del citoesquelet suggereix que també deu protegir l'estructura cel·lular.

Totes les Proteïnes d'Estrès Tèrmic (*Heat Shock Proteins* o HSPs) i les principals sHSPs tenen funcions protectores de les altres proteïnes. A més, s'indueix la seva expressió en diverses situacions d'agressió cel·lular. Entre elles trobem, com hem vist, l' α B-cristal·lina, sola o com a part de l' α -cristal·lina.

1.1.3.2. La principal funció no estructural de l' α B-cristal·lina radica en la seva capacitat d'actuar com a Xaperonina

La funció de xaperó consisteix en la capacitat de reconèixer selectivament proteïnes desnaturalitzades o en situacions prèvies a la desnaturalització i unir-s'hi a través de les superfícies hidrofòbiques. Concretament, les superfícies hidrofòbiques de l'extrem N terminal de l' α B-cristal·lina són les que s'uneixen a les proteïnes en perill. La xaperonina, llavors, torna la proteïna a la qual s'ha unit a la seva estructura original [vegeu Figura 4]. D'aquesta forma s'evita la formació d'agregats protèics irreversibles de les proteïnes desnaturalitzades.

Quan hi ha un augment de temperatura, la xaperonina experimenta un canvi conformacional que porta a una major exposició de les seves superfícies hidrofòbiques, incrementant així la possibilitat d'unió a les altres proteïnes i la seva activitat de xaperó. *In vitro*, aquest canvi té lloc entre 38 i 50°C i és irreversible (18). Per això, la funció de xaperó és dependent de la temperatura: a temperatura ambient, la capacitat d'unir-se a altres proteïnes és gairebé nul·la (19).

La proteïna en fase de desnaturalització s'uneix preferentment a la regió central del complex de les xaperonines. La prevenció de la desestabilització de la proteïna afectada es fa formant un complex soluble d'alt pes molecular amb la

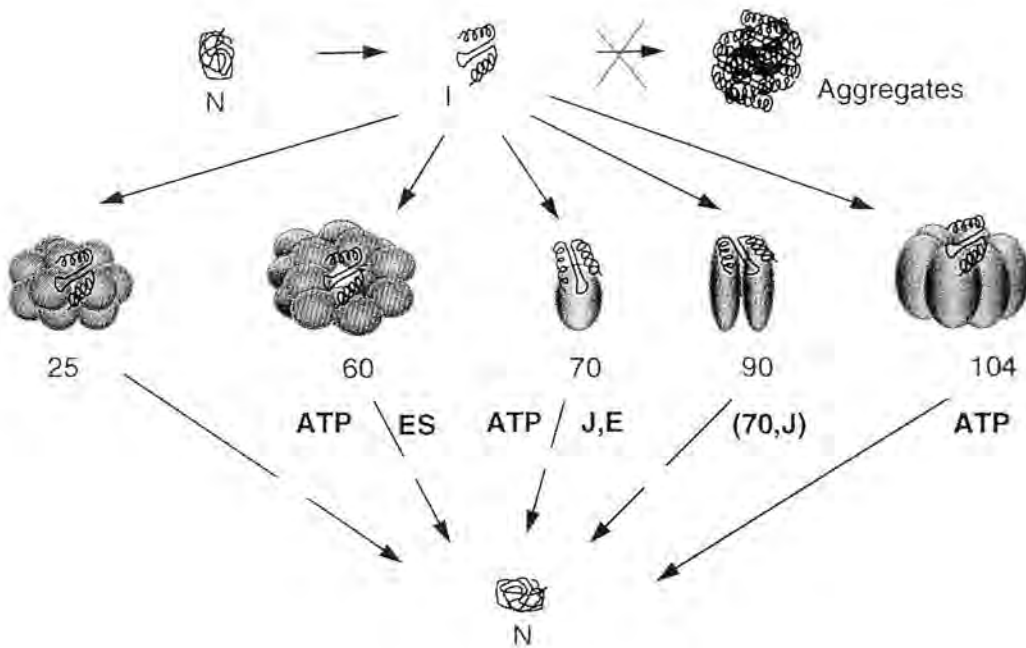


Figura 4. Mecanisme d'acció de les Xaperonines(32). Les proteïnes en el seu estat natural (N) comencen a desnaturalitzar-se en condicions d'estrés, passant a una forma intermitja (I), que és la que pot reconèixer la Xaperonina (HSP25, HSP60, HSP70, HSP90 HSP104). La Xaperonina plega de nou la proteïna deixant-la en el seu estat original. D'aquesta manera s'evita la formació d'agregats.

xaperonina. S'ha pogut comprovar amb l' α -cristal·lina, estudiant les interaccions entre ella i les altres Proteïnes Cristal·lines que protegeix. La capacitat de fer de xaperó, doncs, depèn principalment de l'estructura quaternària de la proteïna.

L' α -cristal·lina té especial especificitat per a protegir les β - i γ -cristal·lines (20, 21), i proporcionalment menys les altres proteïnes, com la insulina o l'anhidrasa carbònica (22), de la qual s'ha estudiat bé el complex que forma amb l' α -cristal·lina quan hi ha estrès tèrmic. El grau de capacitat de prevenció depèn de l'afinitat amb l'estructura de cada proteïna.

A diferència d'altres proteïnes que també actuen són xaperonines (GroEL, DnaKm, SecB i altres HSPs), l' α -cristal·lina només interacciona amb proteïnes que estan a punt de precipitar (les que ja estan severament compromeses) i que porten un cert temps en aquest estat desorganitzat, i no amb proteïnes ja desplegadas i hidrofòbiques però estables, que són l'objectiu de les altres xaperonines (23). Interacciona, doncs, amb formes intermitges de la via de desnaturalització abans no entrin en els processos d'agregació i precipitació. No ho fa tampoc amb proteïnes en la via de renaturalització, en canvi, com passa també amb les restants xaperonines.

Alguns factors interfereixen o potencien aquesta funció de xaperó. Els cations divalents redueixen l'eficiència de la funció mentre que el EDTA la recupera (24). L'ATP augmenta l'activitat de xaperó (25) i l'ibuprofen inhibeix processos que afecten l'activitat xaperó de la proteïna evitant modificacions post-traduccionals (26).

L'altra subunitat de la proteïna α -cristal·lina, l' α A, es comporta també com a protectora, però no s'ha demostrat la inducció per estrès. Les dues formes d' α A (amb o sense la inserció de l'exó extra) funcionalment són pràcticament equivalents, excepte que la forma amb l'inserció té menys activitat protectora de xaperó (per ser més gran i perquè els aminoàcids de més bloquegen possibles llocs d'unió a proteïnes). (27, 28)

1.1.3.3. Altres possibles funcions

Pel que fa a altres possibles funcions, s'ha vist que la proteïna α -cristal·lina bovina inhibeix (*in vitro*) els següents enzims: l'elastasa pancreàtica porcina (competitivament), l'elastasa neutròfila humana (no competitivament), algunes serinproteases, i parcialment la tripsina (29). És una acció no relacionada amb l'activitat de xaperó, encara que els inhibeix unint-se a ells de forma similar. Això pot

tenir un efecte de protecció de la matriu ocular davant els canvis que tenen lloc de forma espontània amb l'envelliment. La resta de proteïnes del cristal·lí no tenen aquestes funcions inhibidores.

A nivell de l' α B-cristal·lina, s'ha demostrat que aquesta proteïna en humans confereix resistència, juntament amb altres sHSPs, contra la mort cel·lular apoptòtica induïda per l'estaurosporina, un inhibidor de la proteinquinasa C (30). També protegeix la cèl·lula de la mort induïda per $\text{TNF}\alpha$, H_2O_2 o menadiona, disminuint el nivell intracel·lular dels radicals lliures d'oxigen i augmentant el nivell de glutatió (31). El glutatió és un dels "tampons" que té la cèl·lula per contrarestar els radicals lliures de l'oxigen; el balanç entre la quantitat dels radicals i la quantitat de tampó és el que decideix si la cèl·lula serà resistent a l'estrés o pel contrari sofrirà apoptosi o necrosi.

En la seva localització al múscul, la proteïna α B-cristal·lina interacciona amb l'actina (els filaments de desmina, en concret) i la miosina. Pot tenir una funció protectora en certes condicions, com l'isquèmia cardíaca, estabilitzant les miofibrilles.

1.1.4. Característiques comuns de les Proteïnes d'Estrés Tèrmic de Baix Pes Molecular

1.1.4.1. Què són les sHSPs?

Les Proteïnes d'Estrés Tèrmic de Baix Pes Molecular (sHSPs) són un dels 4 principals grups de les HSPs (conjuntament amb els grups, més abundants, anomenats HSP60, HSP70 i HSP90) caracteritzat principalment per la seva grandària d'entre aproximadament 12 i 43 kDa i per ser xaperonines que prevenen l'agregació protèica. Tots els organismes tenen almenys un gen de sHSP, des del llevat i el pollastre (1 gen) fins a la drosòfila i algunes plantes superiors que en tenen fins a 30. Excepte l' α -cristal·lina, totes les altres sHSPs han demostrat no ser imprescindibles per a la cèl·lula (32). La família de les sHSPs és la més variable de la molt conservada família de les HSPs, i també la que s'expressa menys en condicions fisiològiques. Totes elles es troben en estat lliure, però s'agrupen en grans estructures multimèriques heterogènies amb forma d'anell (*Heat Shock Granules*) amb un valor de sedimentació al voltant de 17S, requisit imprescindible

per a poder portar a terme la seva funció. Les principals són l'HSP25, l'HSP27 i l' α -cristal·lina. α B-cristal·lina i HSP25 s'assemblen molt en l'estructura secundària i es troben sovint en heteropolímers. L' α B-cristal·lina i l'HSP27 formen un complex que es dissocia amb l'estrés tèrmic. Cap de les HSPs té cofactors coneguts per realitzar les seves funcions.

Recentment s'ha descobert una altra sHSP (HSPB2) que es troba preferentment a múscul esquelètic i cor, però no a la lent, i que podria compartir elements reguladors amb l' α B-cristal·lí per la disposició del seu gen a menys d'1kB de distància de la de l' α B (33).

1.1.4.2. Característiques comuns de les sHSPs

Les sHSPs tenen totes elles algunes característiques comuns, com tenir subunitats d'uns 20 kDa de pes, formar agregats d'uns 800 kDa, ser termoestables i conferir termoestabilitat a les cèl·lules, ser susceptibles de fosforil·lació i glicosilació, o ser xaperonines (100). Contenen una regió conservada d'uns 90-100 aminoàcids (anomenada precisament domini α -cristal·lí o *α -crystallin domain*) que es troba a l'extrem C-terminal i és molt estable; a vegades fins i tot apareix duplicat. Les sHSPs són molt diferents, en canvi, pel que fa a la resta de la proteïna, a diferència de les altres HSPs, que són totes semblants. La regió C-terminal és funcionalment la més important perquè es relaciona amb la seva capacitat d'actuar com a xaperó. L'extrem N-terminal, en canvi és important per la oligomerització, imprescindible per a la unió a proteïnes i d'aquesta manera també important per a la funció de xaperó, si bé no imprescindible.

L'expressió de les sHSPs s'indueix per diferents tipus d'estrés (tèrmic, osmòtic, metalls pesants, hipòxia, etanol, arsenats...). Es demostra que l'estrés afecta la transcripció perquè si es posen les cèl·lules amb contacte amb Actinomicina D (un inhibidor de la transcripció) simultàniament a l'estímul agressiu, la inducció queda bloquejada (34). Els gens de la resta de proteïnes de la cèl·lula no es veuen alterats en aquests tipus d'estrés, com el tèrmic, i com a molt poden presentar un descens de la seva expressió. A altes temperatures les HSPs es troben al nucli de la cèl·lula, mentre que en condicions fisiològiques es troben al citoplasma, on realitzaran les seves funcions (35, 100).

1.1.5. El comportament de l' α B-cristal·lina en situacions d'Estrés

El fet de ser part de la família de les HSPs fa que la proteïna α B-cristal·lina (a diferència de l' α A) es sobreexpressi en nombroses situacions d'estrés, no només tèrmic, si més no en mamífers. Això té com objectiu facilitar la protecció de la resta de proteïnes del teixit on es trobi a través de la seva funció de xaperó. Factors que experimentalment indueixen la sobreexpressió de l' α B-cristal·lina són l'estrés osmòtic o el tèrmic, la dexametasona, el cadmi, l'arsenat sòdic o l'expressió d'alguns oncogens (Ha-ras, v-mos), així com simplement l'estirament en les cèl·lules del múscul esquelètic (100). Els següents són els principals.

1.1.5.1. Estrés Oxidatiu

En l'Estrés oxidatiu, per exemple, l' α -cristal·lina protegeix les altres proteïnes de l'oxidació (36). En aquesta situació, hi ha un increment de la fosforil·lació de 2 a 4 vegades en l' α B però també en l' α A-cristal·lina, sense que això representi un increment evident de l'activitat xaperó (37). La fosforil·lació augmenta també davant altres estímuls, com l'estrés tèrmic, el sorbitol, l'arsenat o altes concentracions de NaCl (38).

Una altra forma d'estrés oxidatiu que ha demostrat induir espectacularment l'expressió d' α B-cristal·lina en ratolins és la contracció muscular continuada, produïda per estimulació elèctrica a nivell del múscul tibial anterior. Altres proteïnes d'estrés, com l'HSP27 no augmenten de la mateixa manera (39). També en la recuperació després de l'exercici augmenta l'expressió d' α B-cristal·lina, aquest cop acompanyada de *c-fos* i HSP70 i en menor grau de mioglobina i citrat sintasa.

1.1.5.2. Estrés Osmòtic

Altes concentracions de NaCl, indueixen també l'expressió d' α B-cristal·lina en cèl·lules glials, com a defensa davant l'estres osmòtic (40). És un mecanisme independent dels factors de HS. Altres possibles inductors de l'expressió són la ceramida (apareix elevada en les cèl·lules en la recuperació després d'un estrés tèrmic) o l'augment de la concentració de K^+ (incrementa a la vegada el missatger i la proteïna) en cèl·lules de glioma de rata. La dosi farmacològica de prostaglandines,

a la vegada, estimula la síntesi d' α B-cristal·lina i altres HSPs, activant el factor de transcripció relacionat amb l'estrés tèrmic (*Heat Shock Transcription Factor* o HSF) (41). En l'estrés produït per les radiacions Ultra Violades, l' α B-cristal·lina inhibeix l'agregació protèica.

1.1.5.3. Estrés Tèrmic

En l'estrés tèrmic la proteïna augmenta considerablement d'expressió i concentració, com fan totes les altres HSPs. L' α B-cristal·lí, però, no s'indueix per l'estrés tèrmic en cèl·lules d'ànec en cultiu (42) possiblement per la manca dels elements de resposta a aquest estrés que sí que es troben en els mamífers. S'ha demostrat que dóna termoresistència en en cultius cel·lulars (com les cèl·lules L929 murines), evitant la seva mort deguda a l'augment de temperatura (43).

En el cristal·lí es pot escalfar experimentalment el conjunt de proteïnes fins a 60°C sense que es comencin a agregar, mentre que això no es pot fer si s'elimina selectivament l' α -cristal·lina. Quinze minuts després de l'estrés tèrmic, l' α -cristal·lina desapareix de la fracció soluble citosòlica de les proteïnes cel·lulars i passa a trobar-se a la fracció insoluble (proteïnes nuclears i citoesquelet) durant les següents 2 hores de l'estrés tèrmic; aquest fet suggereix que intervé activament en la reorganització dels filaments intermitjos després de l'estrés.

1.1.5.4. Altres tipus d'Estrés

La dexametasona, a dosis fisiològiques durant un període d'uns quants dies, augmenta l'expressió d' α B-cristal·lí (en els fibroblasts murins NIH 3T3, per exemple): s'acumula el mRNA i la proteïna, d'igual manera que en l'estrés tèrmic (44). En altres experiments s'ha vist que dosis de dexametasona més puntuals actuen també de manera similar que les dosis mantingudes (45). L'expressió sostinguda de l'oncogèn *ras* suprimeix aquest augment d'expressió degut a dexametasona; una expressió puntual de *ras*, en canvi el que fa és induir ell mateix l' α B-cristal·lina.

En cert nombre de situacions d'estrés l' α B-cristal·lina s'uneix a filaments intermitjos i a la tubulina. La formació del dímer α B-cristal·lí/tubulina indica que protegeix les subunitats de tubulina dels microtúbuls (46). En casos d'acidosis es pot trobar unida a les miofibrilles.

1.2. PATOLOGIA ASSOCIADA A LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA

A part de les seves importants funcions, tan al cristal·lí com a la resta de l'organisme, i tan en condicions fisiològiques com en diferents tipus d'estrés, la proteïna α B-cristal·lina té un especial interès pel fet que es troba incrementada o alterada en un gran nombre de patologies de diversos orígens, moltes d'elles relacionades amb el sistema nerviós. En la majoria d'aquestes malalties se suposa que la variació és conseqüència del procés principal que provoca la patologia, més que no una causa d'aquesta, i que podria estar relacionada amb la funció de xaperó de la proteïna, que protegiria les cèl·lules contra la deterioració deguda a l'estrés. Troballes recents en l'estudi de l'Esclerosi Múltiple han fet canviar aquest punt de vista.

L' α B-cristal·lina apareix associada a bastantes de les malalties degeneratives importants. En la majoria d'elles forma part dels cossos d'inclusió, sovint ubiquitinitzats, que apareixen associats a filaments intermitjos, sense que se'n conegui bé la causa o l'efecte. Això pot suggerir alguna relació encara desconeguda de l' α B-cristal·lina amb la degradació protèica o directament amb l'agregació dels filaments intermitjos (100). Reduir les alteracions de la proteïna en molts casos podria, si més no, ajudar a millorar la simptomatologia del pacient.

Aquestes són algunes de les patologies en els quals s'ha detectat una alteració de l' α B-cristal·lina (100):

·Malalties Neurodegeneratives: Malaltia d'Alexander, Malaltia d'Alzheimer, Esclerosi Múltiple, Malaltia Degenerativa Cortico-nigra, *scrapie*, Malaltia de Parkinson, Malaltia de Pick, Paràlisi Supranuclear Progressiva, Esclerosi Lateral Amiotròfica familiar, Atròfia Sistèmica Múltiple (inclusions citoplasmàtiques gials junt amb ubiquitina a Síndrome de Shy-Drager, degeneració estratonigra i atròfia olivopontocerebel·lar), Malaltia de Huntington.

·Tumors: hemangioblastoma, cordoma, hamartoma, retinoblastoma, sarcoma (al citoplasma dels fibroblasts, perinuclear), carcinoma d'ovari, tumors pineals (pineocitoma, pineoblastoma), tumors astrocítics (sobretot en els estadis més agressius), schwannoma, oligodendroglioma, glioblastoma multiforme.

Altres: cataractes, diabetis, cardiopaties i miopaties familiars (augment d' α B-cristal·lina i desmina, acúmuls granulo-filamentosos), Esclerosi Tuberosa, malaltia alcohòlica (al fetge), adrenoleucodistrofia, algunes malalties infeccioses, síndrome de Werner.

A continuació veurem amb més detall algunes de les principals patologies que presenten alteracions en els nivells d' α B-cristal·lí.

1.2.1. Malalties Neurodegeneratives

Les Malalties Neurodegeneratives són les principals patologies extra-lenticulars associades a alteracions en els nivells d' α B-cristal·lina. El motiu es creu que pot ser la reacció del teixit nerviós (principalment glia) a l'estrés que representa la malaltia. No es coneix del tot l'abast clínic dels cossos d'inclusió, que contenen l' α B-cristal·lina i altres proteïnes, que apareixen en aquests casos.

Una proposta per explicar aquesta inducció d'origen desconegut de l' α B-cristal·lina en els cervells malalts és tenir en compte que qualsevol procés destructiu cerebral causa elevació de les concentracions de potasi a l'espai extracel·lular. S'ha demostrat en cultius cel·lulars que l' α B-cristal·lina augmenta quan hi ha excés de potasi en el medi de forma dependent de la dosi, i que a més confereix a aquestes cèl·lules una resistència davant l'estrés que representa aquest excés de potasi. L'excés de la proteïna en aquestes patologies cerebrals, doncs, podria no ser més que un mecanisme de protecció de la glia davant un augment de la concentració de potasi extracel·lular. (47)

Dintre aquest grup de malalties neurodegeneratives amb increment d' α B-cristal·lina, les tres principals són la Malaltia d'Alexander, per ser la primera on es va descriure la intervenció de l' α B-cristal·lina (48), la Malaltia d'Alzheimer, per la seva creixent incidència en la població i l'Esclerosi Múltiple, on el paper de la proteïna va més enllà del simple acúmulo que hem descrit fins ara.

No totes les malalties degeneratives cerebrals, però, presenten aquestes alteracions. No apareix augmentada, per exemple en l'encefaloaptia de Wernicke.

Però sí que es detecta la presència d' α B-cristal·lina en astrocits de cervells dels afectats per la malaltia de Creutzfeldt-Jacob, molt augmentada respecte cervells normals de la mateixa edat. Això pot ser, de nou, simplement degut a la resposta glial a l'estrés, però té certa importància perquè relaciona la proteïna amb les malalties causades per prions, com l'*scrapie*, que presenta un increment semblant (49).

Últimament s'ha descrit una nova patologia que presenta expressió selectiva d' α B-cristal·lina a l'oligodendroglia de totes les àrees del sistema nerviós, sense que hi hagi mutacions al gen (50). S'acompanya de cataracta congènita, deteriorament intel·lectual, i en alguns casos desordres motrius i disfàgia. Segurament és autosòmica dominant.

1.2.3.1. Malaltia d'Alexander

La Malaltia d'Alexander és un trastorn neurometabòlic infreqüent de causa desconeguda, sense incidència familiar, d'inici infantil, progressió constant i mort inevitable en 1 o 2 anys (51). Hi ha deteriorament intel·lectual i psicomotor, atacs epilèptics, macrocefàlia precoç i progressiva, espasticitat i retard en el creixement. Es creu que poden aparèixer també casos en adults, de clínica i evolució més benignes.

A nivell histopatològic, hi ha dilatació dels ventricles laterals del cervell, proliferació d'astrocits amb el cos cel·lular allargat (a la substància blanca del cervell i a la blanca i la grisa de la medul·la), canvis semblants a la leucodistrofia i pèrdua de mielina. Apareixen dipòsits granulars (anomenats fibres de Rosenthal, que són immunoreactius a l' α B-cristal·lina) de disposició perivascular, subependimals i subpials (i dintre els astrócits). Són alteracions destructives, sobretot als lòbuls frontals (52).

Les fibres de Rosenthal són dipòsits de cossos hialins insolubles rics, en α B-cristal·lina. Els nivells d' α B-cristal·lina en els cervells afectats pot arribar a ser de 7 vegades respecte al cervell de controls. Les fibres de Rosenthal poden ser productes de degradació glial, i poden tenir un alt grau d'implicació en la clínica, si bé encara no s'ha pogut demostrar. Tant el promotor com la regió codificant del gen de l' α B-cristal·lina són normals però hi ha un augment del mRNA del gen. A més a més, l' α B-cristal·lina implicada podria acumular possibles modificacions post-

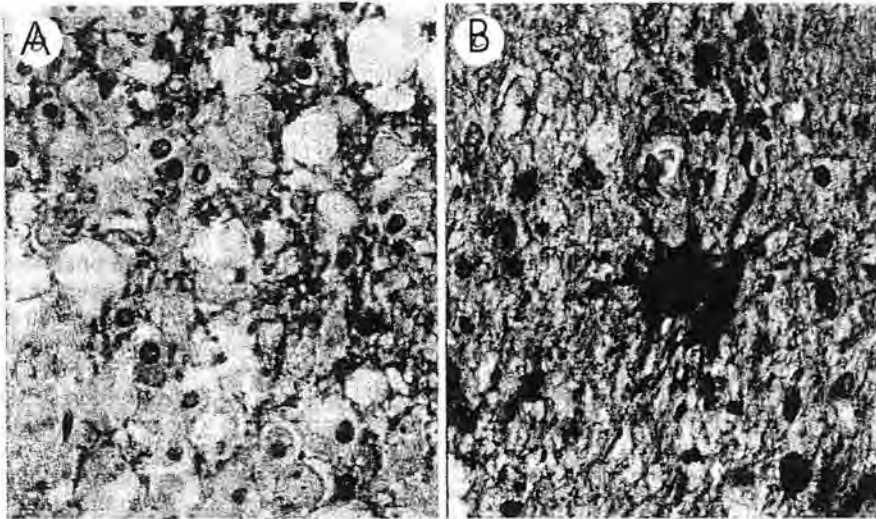


Figura 6. Lesions de l'Esclerosi Múltiple (57). Els Oligodendrocits (A) i els Astrocits (B) tenyits demostren que són els responsables de la producció d' α B-cristal·lina en les lesions actives d'Esclerosi Múltiple.

transcripcionals que alteressin la seva solubilitat (53). Els conjugats d' α B-cristal·lina es troben mono i poliubiquitinats, com altres proteïnes també presents en els agregats.

1.2.3.2. Malaltia d'Alzheimer

La concentració d' α B-cristal·lina està incrementada en la Malaltia d'Alzheimer principalment a les zones de plaques senils. Apareix en astrocits, microglia i oligodendrocits, demostrant que tots els tipus de glia responen a l'estrés associat a aquesta patologia. Probablement es trobi unida a la substància amiloide que apareix en la Malaltia d'Alzheimer.

L' α B-cristal·lina forma complexes amb l'HSP27 (54) i s'expressa junt amb altres HSPs a la gliosi reactiva a la malaltia (55), com succeeix amb altres tipus de demència. Es troba també ubiquitinada com a part dels filaments insolubles que formen els acúmul de neurofibrilles. (56, 86)

1.2.3.3. Esclerosi Múltiple

La proteïna α B-Cristal·lina és l'antigen immunodominat en les lesions actives d'Esclerosi Múltiple (57); activa específicament les cèl·lules T, que alliberen citokines proinflamàtores (γ -interferó, interleuquina 1). Aquesta és la primera vegada que es descobreix la implicació directa de l' α B-cristal·lina en la patogènia d'una malaltia, més enllà de formar part de la reacció dels teixits a l'estrés. Falta per veure si també en altres malalties es pot detectar una relació així.

En les altres malalties neurodegeneratives en les quals és present (la d'Alzheimer i la de Parkinson, per exemple), l' α B-Cristal·lina no és immunogènica, per tant no es pot relacionar amb cap factor d'autoimmunitat. La causa que fa que en els malalts d'esclerosi actui com a autoantigen és desconeguda. A l'Esclerosi Múltiple s'indueix l'expressió exagerada a la substància blanca afectada, però no a la substància blanca sana, ni tan sols dels afectats per la malaltia [vegeu Figura 6]. S'expressa en astròcits i oligodendroglia, junt amb altres HSPs.

Ja als primers estadis de les lesions una subpoblació d'oligodendrocits expressa l' α B-cristal·lí. En les lesions actives, 5-10% dels oligodendrocits l'expressen, mentre que en les inactives són deu vegades menys els que ho fan. 40-50% dels astrocits l'expressen, en qualsevol tipus de lesió, activa o no.

1.2.2. Cataractes

1.2.2.1. La pèrdua de la funció de l' α B-cristal·lina es relaciona amb la formació de cataractes

Certes modificacions post-traduccionals de la regió terminal de de les dues subunitats (α A i α B) de la proteïna α -cristal·lina apareixen espontàniament a partir dels 40 anys d'edat. Es creu que aquestes modificacions poden estar implicades en la pèrdua de la funció de xaperó i, d'aquesta forma, en la pèrdua de transparència del cristal·lí per la formació d'agregats protèics (58). Aquesta podria ser una explicació de l'increment d'aparició de cataractes amb l'edat.

La cataracta es podria iniciar per l'agregació de components de la lent com l'enolasa, la gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa o l'aldehid deshidrogenasa, començant l'opacificació del cristal·lí. Les modificacions post-traduccionals principals implicades serien les pèrdues d'aminoàcids, però també són freqüents altres com la racemització, la isomerització i l'oxidació.

La proteasa Calpaïna II és una de les principals implicades en aquest procés modificatiu de les proteïnes cristal·lines, perquè actua eliminant aminoàcids de l'extrem COOH, el més important per la funció de xaperó com hem vist, tot i que es manté l'estructura secundària de la proteïna (59). Per altra banda, la flexibilitat molecular està també reduïda degut a l'aparició espontània de ponts disulfur.

Un altre canvi important que apareix amb l'edat és l'augment del pes molecular mitjà dels agregats d' α -cristal·lina, encara que no se sap si això afecta la funció. L'edat augmenta també l'associació no covalent de les proteïnes cristal·lines a les membranes, amb proporció superior a la fisiològica. Això és un factor que incrementa la capacitat d'agregació, superior a quan estan lliures. D'aquesta manera, es formen agregats d' α -cristal·lí units a membrana només per una part, enlloc de circular lliures (60). Les proteïnes unides a membrana, però, conserven intacta la seva funció de xaperó.

1.2.2.2. Possibles agents inductors de les cataractes

El mateix estrés oxidatiu pot ser responsable en gran part de les cataractes senils, oxidant proteïnes i lípids de la lent de forma irreversible (61). Es detecten alts nivells d' H_2O_2 a les lents i l'humor aquós de pacients afectats de cataractes, per tant segurament és l' H_2O_2 la responsable principal de l'estrés oxidatiu en aquest cas. En aquests casos comença havent-hi necrosi i apoptosi a l'epiteli, i després s'esté cap a la resta de la lent. Per això és important que l' α -cristal·lina, que com hem vist conferia protecció davant l'estrés oxidatiu, mantingui les seves funcions intactes.

S'ha demostrat també que el precursor de la proteïna β -amiloide i la mateixa proteïna (ambdós implicats en la malaltia d'Alzheimer) augmenten com a resposta a l' H_2O_2 (62). Aquest podria ser un dels mecanismes pels quals l' H_2O_2 fa el seu efecte nociu al cristal·lí: incrementant la proteïna β -amiloide i facilitant la formació d'agregats.

La radiació Ultra Violada (UV), responsable d'un tipus de cataracta induïda, també té l'efecte de disminuir la capacitat de xaperó (63) i d'augmentar el precursor de la proteïna β -amiloide i la mateixa proteïna. A més a més, la radiació altera la fisiologia de l'epiteli de la lent, produint canvis en la funció de la membrana que inclouen alteracions del transport de cations, augment de la permeabilitat i alteracions en la biosíntesi. El dany després es propaga a la resta de les cèl·lules del cristal·lí, possiblement a través de l'elevació de la concentració de calci, un factor crític en l'inici de les cataractes (64). Per altra banda, la proteïna α -cristal·lina protegeix contra la radiació UV, com demostren experiments en les quals dóna resistència a cultius cel·lulars sotmesos a aquesta radiació. Si l' α -cristal·lina es pre-irradia amb UV abans, aquesta funció protectora desapareix, el que indica que la radiació UV pot fer el seu dany in vivo també afectant la funció de l' α -cristal·lina (65).

Altres agents externs també facilitarien l'aparició de cataractes: lesions de l'epiteli, augment del nivell de calci per diferents motius, etc. Malalties com la Insuficiència Renal provoquen que s'afegeixin residus de glutatió a les cisteïnes de l' α -cristal·lina, cosa que també altera la seva funcionalitat perceptiblement.

S'ha demostrat, usant ratolins transgènics deficientes en la subunitat α A-cristal·lina, que la manca d'aquesta proteïna provoca opacificació de les lents, que també són més petites que les normals. El mecanisme de producció d'aquestes cataractes està possiblement relacionat amb la funció de l' α A de mantenir sobretot

l' α B-cristal·lina soluble. Els agregats que apareixen en els cristal·lins d'aquests transgènics són fortament reactius als anticossos de l' α B (66).

1.2.2.3. Estratègies en al prevenció de les cataractes

Els esforços per prevenir les cataractes es dirigeixen principalment a trobar alguna forma d'evitar les modificacions de l' α -cristal·lina, que d'aquesta manera podra seguir lluitant contra l'agregació de les altres proteïnes cristal·lines. L'ibuprofen, per exemple, frena la pèrdua de la capacitat de xaperó de l' α -cristal·lí unint-se als grups de lisina i prevenint així modificacions post-traduccionals (67). Encara no s'ha trobat, però, un sistema clínicament eficaç de prevenció de les cataractes en aquest camp.

1.2.3. Altres Patologies

En altres malalties el paper de l' α B-cristal·lina és encara menys conegut. És sorprenent la seva relació amb patologies d'origens tan diferents. Per exemple, l'Arteriopatia Cerebral Autosòmica Dominant amb Infarts Subcorticals i Leucoencefaloopatia (CADASIL) és una arteriopatia no ateroscleròtica ni amiloidòtica que afecta preferentment les petites arteries i arterioles del cervell. Els miocits vasculars de les arteries afectades presenten increment simultani de l'HSP70 i l' α B-cristal·lina, que es diposita també extracel·lularment (68).

També s'ha descrit una miopatia de cossos esferoides que conté α B-cristal·lina junt amb desmina i ubiqüitina dins aquests cossos que la defineixen. El fet que l' α B-cristal·lina estigui relacionada amb els filaments intermitjos fa que s'acumuli també en altres miopaties com la Cardiomiopatia i Miopatia Familiars (69), on es troba formant part d'un material granulo-filamentós amb la desmina i la distrofina.

Tres tipus importants de patologies tenen també una relació especial amb l' α B-cristal·lina. Són els càncers, la diabetis i la isquèmia miocàrdica.

1.2.3.1. Expressió de l' α B-cristal·lina en cèl·lules transformades

Els carcinomes de teixits que normalment expressen α B-cristal·li (carcinoma colorectal, carcinoma de tiroides...) són immunoreactius a la proteïna en diferents graus. En carcinomes de cèl·lules renals, en canvi, hi ha una reacció positiva constant i molt més elevada que en cèl·lules no transformades, i s'ha especulat que això es podria usar com a prova per ajuda al diagnòstic (70). Aquest és un dels casos pels quals s'ha proposat l' α B-cristal·lina com a marcador tumoral, però encara no s'ha arribat a cap conclusió a nivell clínic.

Les metàstasis de tumors cerebrals produeixen proteïnes d'estrés; la Srp27 i l' α B-cristal·lina, per exemple, es coexpressen en almenys un terç de les metàstasis de glioblastomes (71). Es podria usar també en aquest cas com a marcador per detectar selectivament aquestes metàstasis.

En les cèl·lules dels gliomes, l' α B-cristal·lina intervé conferint termoresistència i probablement contribueix també a la estabilitat de l'organització del seu citoesquelet. Reduint els nivells d' α B-cristal·lina d'aquestes cèl·lules s'aconsegueix que es redueixi la seva mida, es desorganitzi la seva xarxa de microfilaments i perdin capacitat d'adherència (72). Se sap que en astrocits se sobreexpressa quan hi ha un estrés tèrmic, conjuntament amb l'HSP27, i en altres processos reactius. En processos neoplàsics d'astròcits i oligodendròcits també apareix sobreexpressada, possiblement per les mateixes causes. Recentment s'ha observat que hi ha més concentració de la proteïna en els neuroblastomes que han rebut quimioteràpia que en els que no (73). Un cop més, això pot ser degut a la reacció cel·lular a l'estrés.

L' α B-cristal·lina ha estat immunohistoquímicament detectada en hamartomes. L'expressió anormal en els hamartomes pot ser deguda a una relació entre el gen de l' α B-cristal·lina i el possible causant de l'Esclerosi Tuberosa al cromossoma 11q22-23.

En el càncer de mama, en canvi, no es detecta l'expressió d' α B-cristal·lina, tot i que la mama en condicions fisiològiques és un teixit que sí que l'expressa. Aquesta neoplàsia presenta sobreexpressió d'una altra proteïna d'estrés, l'HSP27 (74).

1.2.3.2. Alteracions degudes a la Diabetis

La relació de l' α B-cristal·lina amb la diabetis és a nivell de la formació precoç de cataractes. La diabetis produeix una augment de glicació i oxidació de les proteïnes en general de 3 a 4 vegades superior al normal (75). Aquests canvis influeixen alterant la funció de xaperó de l' α B-cristal·lina (76), que com hem vist, porta a la formació d'agregats i cataractes. També apareix una unió de les proteïnes β i γ cristal·lines a la regió central de l' α B-cristal·lina sense que se sàpiga quin efecte té.

Tal i com es fa en les cataractes senils, s'estan buscant protectors de l' α -cristal·lina davant aquestes modificacions. Alguns experiments demostres que l'Aspirina, l'Ibuprofèn i el Benzadac podrien protegir davant la glicació. (77)

1.2.3.3. Condicions d'Isquèmia Cardíaca

Durant la isquèmia cardíaca, s'acidifica el citosol dels miocits i això és suficient per causar l'agregació de l' α B-cristal·lina amb les miofibrilles. (78)

La proporció d' α B-cristal·lina agregada augmenta en cors reperfundits després d'isquèmia severa; aquesta agregació és proporcional a la quantitat d'activitat de la lactat deshidrogenasa i inversament proporcional a la capacitat del cor per recobrar l'activitat contràctil després de la isquèmia. La quantitat d' α B-cristal·lina agregada, doncs, podria servir com un marcador de la intensitat del dany isquèmic al cor (79).

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Quan ens vam plantejar començar aquesta recerca vam escollir la proteïna α B-cristal·lina per ser un element d'evident importància biomèdica que encara no tenia ben explicada l'expressió del seu gen. També vam tenir present la seva relació amb les proteïnes d'estrés tèrmic i sobretot amb la ubiquitina, una proteïna sobre la qual s'han fet diversos estudis en el nostre Laboratori.

L'acúmul de la proteïna α B-cristal·lina, com hem vist, s'acompanya en algunes patologies neurodegeneratives d'un augment del RNA missatger corresponent però no s'han detectat mai alteracions en la regió codificant ni en la regió promotora del gen. Això ens suggerí que els mecanismes post-transcripcionals podrien ser d'importància en el control d'aquest gen i vam decidir estudiar l'expressió i les seves possibles variacions. Aquests són els objectius que ens vam marcar en començar el nostre treball.

2.1. Primer Objectiu: Seqüenciar els trànscrits del gen de la proteïna α B-cristal·lina en el gall

El model de treball del Laboratori és l'espermatogènesi i els estudis es realitzen en el gall. La seqüència completa dels trànscrits del gen de la proteïna en el testicle del pollastre no era coneguda (sí que estava descrita en el cristal·lí, però) i ens proposàrem començar determinant-la a partir del cDNA que obtinguéssim dels nostres animals. Aquest pas era imprescindible per als estudis posteriors, ja que la seqüència exacta ens determinaria la construcció de sondes específiques que ens permetessin l'estudi de l'expressió.

2.2. Segon Objectiu: Caracteritzar l'expressió del gen de la proteïna α B-cristal·lina en diferents teixits del gall

Vam decidir començar estudiant en quins teixits del gall s'expressava el gen i en quins no. De pas, comprovaríem si hi havia diferències en l'expressió a cada teixit. Consultant la bibliografia, no quedava clar quantes formes de missatger del gen existien i quines eren les diferències entre elles, i això era una de les principals qüestions a resoldre. Com a mínim hi havia descrites en el ratolí dues formes principals de 1'2-1'4 i 0'8-0'9 kB, segons inicis de transcripció alternatius distal o proximal (80), que també havien estat descrites en el gall (81). Altres treballs (82, 83) ocasionalment descrivien més bandes, però no hi havia unanimitat en el seu número, grandària i significat.

2.3. Tercer Objectiu: Caracteritzar la variació de l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina en gall davant diferents estímuls i proposar un significat funcional.

Prèviament s'havia descrit en l'ànec que la proteïna no es comporta augmentant la seva expressió davant l'estrés tèrmic, com fan les HSP (42). Un dels nostres propòsits va ser comprovar si en el gall passava el mateix que en l'ànec. Això ens podria portar a la conclusió que en les aus el comportament de l' α B-cristal·lina era diferent als mamífers.

A part de l'estrés tèrmic, altres inductors de l'expressió de l' α B-cristal·lina han estat descrits, com hem vist en la introducció. Ens vam proposar utilitzar els principals per aconseguir una inducció de missatgers i veure com aquestes situacions alteraven les característiques de l'expressió. El fet que la cèl·lula usi missatgers de diferents tipus ens portà a pensar que aquestes formes podien tenir diferents funcions en diferents moments de la vida cel·lular. Diversos tipus d'estrés podrien afavorir la síntesi d'una o altra forma, assenyalant-nos així la seva utilitat per a la cèl·lula. Els canvis d'expressió podien donar-nos una explicació de com es

regula l'augment de la proteïna en aquests casos a nivell del control dels missatgers, i també explicar el perquè de les seves diferents formes.

Per acabar de trobar un significat funcional a les diferents formes del missatger, ens plantejarem estudiar en condicions fisiològiques l'eficàcia de la traducció de les diferents formes dels missatgers: quines formes de mRNA estaven estabilitzades, esperant ser traduïdes, i quines altres estaven essent traduïdes activament per la cèl·lula.

2.4. Quart Objectiu: Comparar l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina i de l'ubiquitina en les diferents etapes de l'embriogènesi.

El nivell i l'expressió d'ubiquitina es troben augmentats en les malalties on també augmenta l'expressió de l' α B-cristal·lina, com la d'Alzheimer, la de Parkinson o la d'Alexander (56). Les inclusions protèiques intracel·lulars insolubles d'aquestes patologies contenen, entre altres, l' α B-cristal·lina conjugada a vegades amb la ubiquitina (86), com ja hem vist. En condicions fisiològiques també s'ha observat la presència simultània de la proteïna α B-cristal·lina i de la ubiquitina en cèl·lules embrionàries que experimenten dràstiques reorganitzacions morfològiques (87).

Precisament, treballs previs del grup han demostrat que un dels gens de poliubiquitina (l'UbII) presenta un elevat índex d'expressió en les mateixes fases de l'embriogènesi en les quals s'acumula ubiquitina i la proteïna α B-cristal·lina (88). La hipòtesi de treball va ser plantejada assumint que podia existir una expressió coordinada del gen de la proteïna α B-cristal·lina i el gen de poliubiquitina UbII en les cèl·lules de l'embrió.

Ens vam proposar comparar l'expressió d'ambdós gens, UbII i α B-cristal·lina, en embrions de diferents edats per veure si l'expressió variava de la mateixa manera, començant en fases inicials (4 dies, 6 dies) i seguint per fases més avançades (8 dies, 10 dies). Això podria indicar una relació entre la regulació dels dos gens.

En resum, aquests són els objectius de la present Tesi:

- 1. Seqüenciar els transcrits del gen de la proteïna α B-cristal·lina en el gall.***
- 2. Caracteritzar l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina en diferents estadis de l'espermatogènesi del pollastre (testicles madurs i immadurs) i en diferents teixits del gall adult.***
- 3. Caracteritzar la variació de l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina en gall davant diferents estímuls i proposar un significat funcional.***
- 4. Comparar l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina i de l'ubiquïtina en les diferents etapes de l'embriogènesi del pollastre.***

MATERIAL I MÈTODES

3.0. MATERIAL I MÈTODES: INTRODUCCIÓ

3.0.1. SOBRE ELS PROTOCOLS

La secció de Material i Mètodes és un repàs de tots els protocols que s'han seguit en la realització dels experiments que han portat a les conclusions d'aquesta Tesi. Així doncs, es pot trobar més d'una versió per a alguns dels mètodes emprats i en cada cas s'ha procurat explicar que ens va portar a usar un o altre sistema o a canviar-lo per el següent, així com quins avantatges i quina eficàcia en els resultats presenta cadascun.

Cada protocol està descrit seguint la mateixa pauta, que comença amb un petit comentari introductori i la llista del material que s'usarà, primer els aparells i altres estris del laboratori i després les dissolucions, *kits*, enzims i similars. A continuació s'han enumerat detalladament els passos a seguir en el mètode. Finalment s'inclouen les receptes de totes les dissolucions usades.

Aquest esquema està basat en el proposat per la Dra. Jovita Mezquita en el llibre de protocols del curs de postgrau *Bases Moleculares del Cáncer* (1994), d'on han sortit també moltes de les referències inicials d'aquests protocols, amb correccions afegides a partir dels textos del llibre *Protocolos Experimentales* (1998), també de la Dra. Mezquita. L'altre punt important de consulta per escriure els protocols han estat els manuals d'instruccions de cada aparell, *kit* o solució subministrats per la casa comercial responsable, així com el llibre *Short Protocols in Molecular Biology (Third Edition)*, Ausubel et al. editors, Wiley, 1995). En els casos que s'han usat altres fonts, s'indica la referència específica al final del protocol.

Tots els noms de productes comercials que apareixen en els protocols estan registrats per la corresponent empresa que els fabrica i distribueix.

L'esquema bàsic del mètode s'ha anat ampliant amb les anotacions i observacions que han anat apareixent durant la seva realització per cadascun dels membres del laboratori, cosa que ha portat a la modificació o variació d'alguns passos per optimitzar el seu rendiment així com a l'ampliació de la descripció de molts detalls metodològics importants en la millora dels resultats.

En l'enumeració del material que cal per a cada protocol s'ha assumit que sempre es necessitarà o es podria necessitar algun dels següents elements bàsics que solen tobar-se en el laboratori:

Aigua Ultrapura Autoclavada

Aigua Ultrapura Tractada amb DEPC i Autoclavada

Balances de precisió (Sartorius)

Cel·lo

Erlenmeyers

Gel

Matrassos

Paper de Plata

pH-metre

Pipetes de diferents volums (de 1 a 1000 μ l)

Probetes

Puntes per a les pipetes amb o sense prefiltr

SaranWrap[®]

Tubs Eppendorf de 1'5 ml i 0'5 ml

Vasos de Precipitats

Vórtex (MS1 Minishaker IKA)

Els noms dels diferents aparells que s'han usat en els protocols corresponen, en el nostre cas, a les següents marques i models, que són les presents en els nostres laboratoris:

Agitadors Kotterman

Assecador de buit Speed Vac Savant

Assecador de Gels Bio Rad Gel Dryer 583

Autoclau Autester 437G

Bany Thermoline

Bomba de buit Bio Rad

Càmera fotogràfica Polaroid MP4 amb filtre taronja Kodak Wratten 22A

Campana de Fluxe Laminar Cruma Captair

Centrífuga Clínica Beckman J2-21

Centrifuga de sobretaula Hermle Z320
Centrifuga Sigma 3K10
Crosslinker UV Bio Rad GS Gene Linker
Espectrofotòmetre GeneQuant de Pharmacia
Espectrofotòmetre Shimadzu UV-120-02
Estufa Heraeus
Fonts d'electroforesi Bio Rad Power Pac 300 i 3000
Forns d'Hibridació Robbins Científic (gran i petit)
Incubador d'aigua HT
Incubador d'aire Hucoa Erlöss
Incubador de CO₂ Narco 6100
Medidor de pH Crison Digit 501
Pel·licules Polaroid 667 (ASA 3000)
Purificador d'aigua MiliQ plus
Seqüenciador automàtic Li-Cor
Termocicladors programables de MJ research Inc. (Minicycler y PTC 100)
Transil·luminador d'UV Fotodyne
UltraCentrífuga Beckman L8-80M

Tots els protocols que inclouen processament del RNA pressuposen que s'usaran guants per a qualsevol manipulació de productes i material que hagi d'estar en contacte amb els àcids nuclèics. Això és útil per a evitar la contaminació de les mostres amb RNases que es poden trobar a al pell humana i que poden degradar el RNA. Degut a l'estabilitat i la gran capacitat d'acció d'aquestes ribonucleases cal també tractar tot el material que s'utilitzarà, fins i tot l'aigua, amb un producte que les destrueixi. S'usa Dietil Pirocarbonat o DEPC (inactiva els enzims per unió covalent, excepte les solucions que tenen TRIS, que anul·la l'efecte del DEPC). Es deixa el material durant unes hores en una solució d'aigua i DEPC i després s'autoclava tot 40 minuts per a inactivar-lo. També cal tractar amb cura les mostres, evitant manipulacions perllongades a temperatures permissives i en condicions de lisi cel·lular.

Tots els protocols que inclouen manipulació de material tòxic, especialment el Bromur d'Etidi, impliquen també l'us de guants, aquest cop per a protegir el qui els manipula dels seus possibles efectes nocius.

3.0.2. SOBRE LES FONTS DEL MATERIAL

Tots els experiments en aquesta tesi s'han fet usant teixits extrets del gall (*Gallus domesticus*). S'han usat galls de la raça *Hubbard White Mountain* de diferents edats (des de 6 a 25 setmanes), proporcionats per la Granja Beral S.A. (Vilanova i la Geltrú) així com d'embrions de gall de la raça *White Leggorn*, proporcionats per la Granja Gibert (Cambrils, Tarragona). Per un problema de subministrament dels de raça *Hubbard*, galls de 6-10 setmanes d'edat de la raça *White Leggorn* van ser usats en els darrers experiments, subministrats per la Granja Bellavista (Lliçà de Munt, Barcelona). S'ha considerat que un gall adult era immadur si tenia menys de 10 setmanes d'edat, i madur a partir de les 10 setmanes, encara que per a més seguretat s'han usat galls de 20 setmanes o més d'edat.

Els animals van ser sempre manipulats amb cura i respecte d'acord amb els principis descrits en *Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals*.

3.0.3. SOBRE ELS EXPERIMENTS

Els experiments portats a terme en aquesta Tesi han seguit principalment tres línies, segons el material que s'estudiava. Per un costat, (1) el treball amb RNA inclou sobretot la hibridació de RNA amb sondes específiques per comparar expressions de mRNA en diferents teixits i circumstàncies; per altra banda, (2) s'ha treballat amb DNA en les amplificacions de material i en les seqüenciacions; i finalment, (3) el treball amb proteïnes ha inclòs la immunodetecció per veure la quantitat relativa d'una proteïna en un teixit o circumstància concreta. Els principals passos (i el número de protocol corresponent) que s'han seguit en cada cas són:

3.0.3.1. RNA

El primer pas és aconseguir extreure el RNA del teixit d'interès del nostre model. Es separa el material en un gel d'electroforesi, segons la seva grandària i després es passa el RNA a una membrana de nylon per a poder treballar amb ell.

Obtenció de RNA (3.1.2.), Gel d'Electroforesi (3.2.2.), Transferència Northern (3.2.3.)

A part, es construeix una sonda específica de DNA que s'unirà al fragment de RNA que nosaltres voldrem. S'usa com a substrat DNA aconseguit a partir d'RNA del mateix animal d'estudi (primeres cadenes) i s'amplifica el fragment desitjat usant el PCR amb *primers* específics que delimitin la zona d'interès. Després es marca aquesta sonda. Finalment es confirma la seva grandària i quantitat amb un gel i també la intensitat del marcatge.

Obtenció de Primeres Cadenes a partir de RNA (3.1.4.1., 3.1.4.2.), Amplificació de DNA per PCR (3.3.1.), Aïllament i purificació del DNA (3.3.2., 3.3.3.), Marcatge no radioactiu d'una sonda (3.4.1.1., 3.4.1.2.), Quantificació d'una sonda marcada (3.4.2.), Gel d'Electroforesi (3.2.1.)

Després s'aconsegueix que s'uneixi selectivament la sonda al RNA de la membrana que l'hi és complementari. El resultat ensenya només els punts on hi ha hagut aquesta unió degut al marcatge de la sonda.

Hibridació Northern no radioactiva (3.4.3.)

Variants dintre aquest grup poden incloure tractar abans el RNA amb RNasa H per treure les cues de poli A (3.1.3.), sotmetre els teixits a diferents estímuls (3.7.1., 3.7.2.), o la separació del RNA segons cada fragment estigui unit o no a polisomes (3.7.3.) per a un anàlisi funcional.

3.0.1.2. DNA

La seqüenciació del DNA comença per l'obtenció de material del teixit d'interès (cDNA, a partir del RNA), l'amplificació selectiva per PCR del fragment que volem seqüenciar, i la seva purificació.

Obtenció de Primeres Cadenes a partir de RNA (3.1.4.1., 3.1.4.2.), Amplificació de DNA per PCR (3.3.1.), Aïllament i purificació del DNA (3.3.2.1., 3.3.2.2.)

Després, a un vector comercial de DNA se li inserta el fragment amplificat. Aquest vector amb el fragment inserit després s'introdueix per electroporació en una bactèria preparada especialment. El creixement d'aquestes bactèries ens assegura que cada colònia (originada a partir d'un sol tipus cel·lular) tindrà només un vector amb una sola

forma de DNA. Extraient el DNA d'aquestes bacteries estem segurs que seqüenciem cada vegada un sol fragment de DNA i no hi ha contaminació per altres fragments. Es comprova abans de seqüenciar si les colònies contenen o no el vector amb el DNA i si aquest té una mida compatible amb el fragment que esperavem amplificar.

Preparació del vector (3.5.1.), Lligació del Vector (3.5.2.), Preparació de les cèl·lules i electroporació (3.5.3.), Minipreparacions (3.5.4.1., 3.5.4.2.), Preparació del DNA clonat per a seqüenciar (3.5.5.)

Finalment, es seqüencia el DNA obtingut. Primer es prepara el gel on es correran les mostres i després es preparen les reaccions de seqüenciació que es carregaran en el gel. Els sistemes varien segons la interpretació dels resultats es faci manualment o la faci un ordinador.

Preparació d'un gel de seqüenciació (3.6.1.), preparació de les reaccions de seqüenciació (3.6.2.1., 3.6.2.2.)

3.0.1.3. PROTEÏNES

El primer pas en l'estudi de les proteïnes és també l'obtenció de material. Com en els treballs amb el RNA, es separen les proteïnes segons la seva grandària en un gel (es pot visualitzar tenyint-lo) i es passen després a una membrana, que serà hibridada, aquest cop amb un anticòs comercial específic per a la proteïna d'interès.

Obtenció de Proteïnes (3.8.1., 3.8.2.), Electroforesi de proteïnes (3.9.1.), Tinció del gel (3.9.2.), Transferència Western (3.9.3.), Immunodetecció (3.10.)

3.1. OBTENCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

3.1.1 OBTENCIÓ DE DNA

3.1.1.1 OBTENCIÓ DE DNA A PARTIR DE SANG TOTAL

L'obtenció de DNA l'hem usada normalment per a comparar amb els nivells de RNA del mateix teixit. Ens ha servit per veure que no hi havia degradació, i en alguns casos (com els cultius de cristal·lins), que la quantitat de material que posàvem era proporcional. El protocol d'obtenció partir de sang l'hem usat quan hem intentat treure material de sang de gall.

En aquest cas, s'han d'extremar totes les precaucions per evitar possibles contagis i llençar tot el material usat en els contenidors de material biocontaminat. Com tots els protocols d'obtenció d'àcids nucleics, es basa en un tampó d'extracció (normalment un preparat comercial) que desnaturalitza el teixit i separa (amb l'ajut de la centrifugació) els àcids nucleics de la resta de components cel·lulars.

Material

Centrífuga, Homogenitzador Omni 1000 (Giralt) o similar, Blocs tèrmics a 56°C i 100°C

Espectofotòmetre, Cubetes per a espectofotòmetre.

InstaGene Matrix

Mètode

1. Mescleu 3-6 ml de sang total amb 1 ml d'aigua autoclavada en un eppendorf. Barregeu invertint el tub unes quantes vegades.
2. Deixeu reposar a temperatura ambient 15-30 minuts.
3. Centrifugueu a 10.000-12.000 rpm durant 2-3 minuts.

4. Elimineu amb cura tot el sobrenadant excepte 20-30 ml, sense tocar el sediment.
5. Afegiu 200 ml de *InstaGene Matrix* (prèviament resuspès mitjançant agitació enèrgica) al sediment i col·loqueu-ho en un bloc tèrmic a 56°C durant 15-30 minuts.
6. Apliqueu vòrtex a alta velocitat durant 10 s. Col·loqueu en un bloc tèrmic a 100°C durant 8 minuts.
7. Apliqueu vòrtex a alta velocitat durant 10 s. Centrifugueu a 10.000-12.000 rpm durant 2-3 min.
8. Useu 20 ml del sobrenadant resultant per a amplificar mitjançant la tècnica de PCR. Conserveu la resta a -20 °C per a futures reutilitzacions (començant a partir del punt 7).

Quantificació de les mostres

Per a quantificar el DNA d'una mostra, sigui quin sigui el mètode d'extracció o el teixit d'origen, cal determinar l'absorció de la dissolució de DNA a 260 nm (OD_{260}) amb l'ajut d'un espectrofotòmetre. Una OD_{260} de 20 U equival a una concentració de DNA de 1 mg/ml, per tant, la concentració en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ és:

$$\frac{50 \times OD_{260}}{\text{volum de l'aliqüota en } \mu\text{l}}$$

Es mesura agafant una aliqüota de la dilució de DNA d'un volum conegut i afegint aigua fins a 1 ml. Es posa el volum total a una cubeta per a l'espectrofotòmetre i es medeix l'absorció a 260 nm. També es pot mesurar a 280 nm per saber la puresa de la mostra (OD_{260}/OD_{280} ha de ser superior a 1'8).

El DNA es pot guardar a -20°C redissolt sense necessitat de precipitar, fins al proper ús.

3.1.1.2. OBTENCIÓ DE DNA A PARTIR DE GLOBULS BLANCS

Si el que interessa és selectivament treure el DNA dels leucòcits evitant possibles contaminacions de les altres cèl·lules de la sang, el *Ficoll* és el medi d'elecció. Els resultats són semblants als del protocol anterior. L'hem usat per experiments amb sang d'animals quan hem volgut comprovar selectivament quan material tenien els glòbuls blancs.

Material

Xeringues de 20 ml i agulles, Tubs Corning de 50 ml, Centrífuga clínica, Pipetes pasteur estèrils, Pipetes pasteur estèrils amb la punta corba, Ficoll HistoPaque, Solució Final, EDTA.

Solucions

1-Solució Final

1 volum de Solució A i 9 volums de Solució B.
Aquestes solucions no poden guardar-se més de 2-3 setmanes a 4°C. Després de preparar-les s'han d'esterilitzar per filtració (porus: 0.2 µm).

2-Solució A:

D-glucosa anhidre	1g/l	(0.1%)
CaCl ₂ dihidratat	7.4 mg/l	(0.05 mM)
MgCl ₂ hexahidratat	199.2 mg/l	(0.98 mM)
KCl	402.6 mg/l	(5.4 mM)
Tris Cl	17.56 g/l	(0.145 M)

3-Solució B:

Na Cl	8.19 g/l	(0.14 M)
-------	----------	----------

Mètode

1. Traieu 10-20 ml de sang de l'animal i poseu-los en un tub Corning amb 10-20 mg d'EDTA.
2. Barregeu bé el Ficoll. Injecteu aire a l'ampolla amb una xeringa, invertiu-la i traieu-ne 10-20 ml. Col·loqueu-los en un tub Corning nou.
3. Afegiu a la sang un volum igual de Solució Final i barregeu-ho.
4. Col·loqueu la sang diluïda sobre el Ficoll usant una pipeta pasteur estèril, procurant de no barrejar les dues fases.

5. Centrifugueu el tub 30 minuts a 2000 rpm.
6. El líquid queda dividit en tres fases: a dalt hi ha el plasma, a sota el Ficoll i els eritrocits i a la interfase els globuls blancs. Elimineu la capa superior usant una pipeta pasteur.
7. Recolliu la interfase usant una pipeta pasteur amb la punta encorbada amb l'ajut d'una flama, procurant no agafar res de cap altra fase. Poseu els limfòcits en un tub Corning nou.
8. Afegiu tres volums de Solució Final i agiteu suaument per a rentar-los.
9. Centrifugueu 15 minuts a 2000 rpm. Elimineu el sobrenedant
10. Repetiu dos cops més el rentat resuspenent el sediment en 7 ml de Solució Final i centrifugant després.
11. Resuspeneu el sediment en 2 ml d'un tampó d'extracció (*DNA Isolator...*). Seguiu el protocol d'extracció corresponent. Amb el tampó corresponent també es pot treure el RNA.

3.1.1.3. OBTENCIÓ DE DNA A PARTIR DE TEIXITS (I): NUCLITIPS®

El sistema de *Nuclitips* és útil quan volem obtenir DNA d'alta qualitat a partir d'un teixit sòlid qualsevol. En aquest cas s'usen unes puntes que, acoplades a una pipeta, retenen el DNA que hi passa. Abans s'han de lisar els teixits amb el tampó adient. L'inconvenient d'aquest sistema respecte a d'altres és que cada cop que s'usi el DNA aconseguit així s'ha de recordar d'afegir-hi un reactiu per bloquejar el SDS present al tampó, o qualsevol reacció enzimàtica no funcionarà.

Material

Tubs Falcon de 50 ml, Puntes Nuclitips, Banys a 55°C i a 80°C.

Tampó de Lisi 1, Tampó de Lisi 2, Reactiu de Neutralització Amersham (reconstituït al 10%), PBS, Proteinasa K

Solucions

1-Tampó de Lisi 1 (per a teixits)

Tris 1M pH 7.5	500 µl (10mM)
Na Cl 4M	125 µl (10mM)
MgCl ₂ 1M	150 µl (3 mM)
N-lauryl sarcosina	0'5 g (1%)
Aigua	Fins a 50 ml

2-Tampó de Lisi 2

Tris 1M pH 8	1 ml (20mM)
EDTA 0'5M	100 µl (1mM)
SDS	0'1 mg (0'2%)
Rnasa A	0'2 mg/ml
Rnasa T	2 U/ml
Aigua	Fins a 50 ml

Abans d'usar afegir:

Proteinasa K 1mg/ml	50 µl
---------------------	-------

Mètode

1. En un tub Falcon, afegiu el teixit a lisar amb un volum igual de Tampó de Lisi 1. Barregeu i incubeu 5 minuts a temperatura ambient.
2. Col·loqueu una punta Nuclitip en una pipeta i pipetegeu la mostra a través d'ella diverses vegades, mantenint sempre la punta en contacte amb la mostra. Els nucis de les cèl·lules lisades seran retinguts a la membrana de la punta en cada passada i es notará un augment de resistència al pas del líquid. Cal evitar l'entrada d'aire per a que no es produeixi escuma.
3. Renteu la punta pipetejant amb PBS fins que quedi neta (3-5 ml).

4. Retireu la punta de la pipeta, col·loqueu-la dins un ependorf i separeu-ne la meitat superior.
5. Afegiu 40 μl de Tampó de Lisi 2 a l'interior de la punta, procurant no introduir-hi bombolles.
6. Tanqueu l'ependorf i incubeu-lo 10 minuts a 55°C.
7. Centrifugueu 2 minuts a 5.000 xg
8. Amb unes pinces, extraieu la punta. Incubeu l'ependorf a 80°C durant 10 minuts.
9. Abans d'usar el DNA, afegiu 1-1'5% de Reactiu de Neutralització.

3.1.1.4. OBTENCIÓ DE DNA A PARTIR DE TEIXITS (II): DNA isolator

L'obtenció de DNA de teixits sòlids se sol fer freqüentment amb un tampó d'extracció similar al que s'usa per el RNA, que es basa també en la separació per fases. Fins i tot alguns tampons (Tripure...) es poden fer servir per a les dues finalitats en un mateix experiment. El *DNA Isolator* és un d'aquests tampons, i el protocol que segueix és bastant semblant als de tots els altres tampons. Hem anat canviant de tampó en funció de la disponibilitat de les cases comercials, i els resultats han estat similars amb tots ells.

Material

Homogenitzador Omni 1000 o equivalent, Centrífuga a 4°C, Speed Vacuum, Bloc tèrmic a 60°C, Tubs Falcon.

DNA isolator, TES, Cloroform, Isopropanol a -20°C, Etanol 75% a -20°C.

Mètode

A) Obtenció del Material

1. Extraieu el teixit de l'organisme amb la màxima rapidesa possible i dipositeu-lo en un tub Falcon amb 1ml de DNA isolator per cada 50-100 mg de teixit. Homogenitzeu el teixit amb un homogenitzador omni 1000.

2. Incubeu 5 minuts a temperatura ambient

B) Extracció del DNA

1. Afegiu 200µl de cloroform. Agiteu vigorosament

Incubeu 5 minuts en gel. Dispenseu l'homogenat en tubs eppendorf.

2. Centrifugueu les mostres 2-5 minuts a 4°C i a 2000-14000 xg. La mescla quedarà separada en dues fases; el DNA es troba a la superior (fase aquosa incolora).

3. Transferiu la fase aquosa a un nou tub eppendorf

Afegiu 1-2 volums d'isopropanol i agiteu suaument per inversió.

Incubeu 10 minuts en gel. El DNA es fa visible en forma de precipitat blanc.

4. Renteu el DNA repetint tres vegades els següents passos:

Centrifugueu les mostres 5 minuts a temperatura ambient i a 2000 xg. El DNA queda al fons del tub.

Decanteu el sobrenadant.

Renteu el pellet amb 1-1.5 ml d'etanol 75%.

6. Després del darrer rentat, assequeu 5-10 minuts a l'Speed Vacuum.

7. Dissoleu el sediment sec en 50-360 μ l d'aigua ultrapura o TE. Incubeu, si cal per ajudar a redissoldre, 5 minuts a 60°C.

A continuació es pot quantificar.

3.1.1.5. EXTRACCIÓ FENÒLICA

Aquest mètode serveix per a purificar àcids nuclèics separant-los de nucleoproteïnes, proteïnes, pèptids i altres elements que puguin estar contaminant la mostra. L'hem usat principalment per completar extraccions d'àcids nuclèics que no hagin quedat prou pures pel sistema normal d'extracció o en protocols de purificació i aïllament de bandes des d'un gel d'Agarosa.

Material

Centrífuga. Fenol, Cloroform.

Solucions

1-Fenol

Escalfar el fenol a 68°C. Barrejar:

Fenol	25 ml
8- Hidroxiquinoleïna	25 µl (0.1%). Colorant i antioxidant
Tris Cl 1M	25 ml

Barregeu exhaustivament. Deixeu reposar. Centrifugueu 3 minuts a 4.000 xg i elimineu la fase aquosa. Afegiu de nou la mateixa quantitat de Tris 1M i barregeu. Centrifugueu de nou i llenceu la part aquosa. Afegiu:

Tris Cl 0.5M	25 ml
β-Mercaptoetanol	50 µl (0'2%)

Barregeu exhaustivament. Deixeu reposar. Centrifugueu. Elimineu la part aquosa, però deixant-ne una certa quantitat mínima. Guardeu a 4°C.

Mètode

1. Afegiu a la dissolució d'Àcids Nuclèics mig volum de Fenol i mig volum de cloroform. Barregeu exhaustivament.
2. Incubeu 2-10 minuts (el mínim si és RNA, per evitar degradació, més si és DNA) a temperatura ambient. Barregeu exhaustivament.
3. Centrifugueu 15 minuts a 5.000 xg a temperatura ambient.
4. Recolliu la fase transparent superior (conté només els àcids nuclèics) procurant no contaminar amb la interfase.

3.1.2. OBTENCIÓ DE RNA TOTAL A PARTIR DE TEIXITS

El mètode més usat d'extracció de RNA en aquest laboratori és el del *RNAzol*. Es basa en un tampó que extreu els àcids nucleics dels teixits. Aquest producte és semblant als d'altres cases comercials (*RNA Isolator, Tripure, UltraSpec...*) que també han estat usats. Tots ells utilitzen un protocol molt semblant al descrit a continuació i tenen resultats similars.

Material

Homogenitzador Omni 1000 o equivalent, Centrifuga a 4°C, Speed Vacuum, Bloc tèrmic a 60°C, Espectofotòmetre o GeneQuant (Pharmacia), Tubs Falcon, Tubs Eppendorf tractats.

Dietilpirocarbonat, RNAzol, TES, Aigua Tractada, Acetat Sòdic 3M tractat, pH 5.2, Cloroform, Isopropanol a -20°C, Etanol 75% i 100% a -20°C.

Mètode

A) Obtenció del Material

Extraieu el teixit de l'organisme amb la màxima rapidesa possible i dipositeu-lo en un tub Falcon amb 1ml de RNA isolator per cada 50-100 mg de teixit. Homogenitzeu el teixit amb un homogenitzador omni 1000.

B) Extracció del RNA

1. Afegiu 100µl de cloroform per cada ml d'homogenat. Agiteu vigorosament

Incubeu 5 minuts en gel. Dispenseu l'homogenat en tubs eppendorf.

2. Centrifugueu les mostres 15 minuts a 4°C i a 12000 xg. La mescla quedarà separada en dues fases; el RNA es troba a la superior (fase aquosa incolora), mentre que el DNA i les proteïnes es troben a la interfase.

3. Transferiu la fase aquosa a un nou tub eppendorf. Afegiu un volum igual d'isopropanol i agitar. Incubeu 15 minuts a 4°C.

4. Centrifugueu les mostres 15 minuts a 4°C i a 12000 xg. El RNA queda al fons del tub.
5. Decanteu el sobrenadant. Renteu el pellet amb 1ml d'etanol 75%, agitant intensament
6. Centrifugueu les mostres 10 minuts a 4°C i a 12000 xg. Decanteu i assequeu 5-10 minuts a l'Speed Vacuum.
7. Dissoleu el sediment sec en 50-360 µl d'aigua tractada, o TE. Incubeu, si cal per ajudar a redissoldre, 5 minuts a 60°C.

C) Quantificació del RNA

Es pot realitzar per dos mètodes:

1. *Espectofotòmetre*: es fa una lectura d'1ml d'aigua tractada a 260 nm per ajustar el blanc; després es dilueix una alíquota de 10µl del material en 1ml d'aigua tractada en una cubeta de quars i es llegeixen els valors d'absorbància a 260 i 280 nm. La concentració es calcula tenint present que a 260 nm un valor de 25 equival a 1 mg de RNA/ml de mostra. El cocient OD_{260}/OD_{280} indica la puresa de la mostra i ha d'estar entre 1'8 i 2. Per comprovar la validesa dels resultats es fa una nova mesura, posant aquest cop a l'alíquota 20µl de mostra.
2. *GeneQuant* (espectòmetre especial de Pharmacia): es fa una lectura de 10µl d'aigua tractada a 260 nm per ajustar el blanc; després es dilueix una alíquota de 1µl de mostra en 9µl d'aigua tractada en un eppendorf, i es transfereix després a la cubeta de l'aparell. El resultat ja apareix en µg/ml i cocient de puresa. Convé també repetir la mesura amb dilucions 2/8 o 0'5/9'5, segons la quantitat de material.

D) Conservació del RNA

Per guardar el RNA cal tenir-lo sec o bé precipitat. Es precipita afegint a la mostra 0.1 volums d'Acetat Sòdic 3M tractat i 2.5 volums d'etanol 100%.

3.1.3. TRACTAMENT DEL RNA AMB RNasa H

A vegades les diferents llargades de les cues de PoliA dels fragments de RNA fan que les bandes que veiem en una hibridació siguin amples i poc definides. Per a concretar una mica aquestes bandes hem d'eliminar aquestes cues per a que tots els fragments iguals tinguin la mateixa llargada i es vegin com una sola banda nítida. Si barregem RNA amb la quantitat suficient d'Oligo dT i deixem temps suficient, aquest s'unirà a la cua de Poli A del fragment de RNA. D'aquesta manera, la cua PoliA quedara com un RNA de doble cadena mentre la resta del fragment segueix essent de cadena senzilla. L'RNasa H és un enzim específic que digereix només RNA de doble cadena. Usant-la llavors, el que aconseguirem seran fragments de RNA sense les seves cues de poli A.

Material

Bany a 65°C i 37°C.

Ribonucleasa H d'E Coli (Pharmacia), Oligo dT (Pharmacia), Tampó RNasa.

Solucions

1- Tampó RNasa

Tris Cl 1M	40 µl
MgCl ₂ 1M	4 µl
DTT 0'1M	10 µl
BSA 1(µg/µl)	30 µl
Glicerol 4%	40 µl
Aigua	Fins a 1 ml

Mètode

1. Mescleu 20-25 mg de RNA total amb 1 mg d'Oligo dT en un volum total de 75 µl.
2. Escalfeu a 65°C durant 2 minuts.
3. Afegiu 25 µl de tampó RNasa. Barregeu.
4. Refredeu 15 minuts en gel.

5. Afegiu 2 unitats de RNasa H. Barregeu.
6. Incubeu a 37°C durant 30 minuts.
7. Realitzeu una extracció fenòlica (veure protocol corresponent).
8. Useu el RNA normalment per a fer un gel.

Referències

Kleene KC, Distel RJ, Hecht NB. Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. Dev Biol 1984;105(1):71-79

3.1.4. OBTENCIÓ DE PRIMERES CADENES A PARTIR D'RNA

3.1.4.1 OBTENCIÓ DE PRIMERES CADENES A PARTIR D'RNA (I):

MÈTODE T-PRIMED

Els mètodes d'obtenció de primeres cadenes usen un enzim (transcriptasa inversa) que sintetitza cDNA a partir del RNA. Enzim i reactius venen normalment junts en un kit comercial. El DNA sintetitzat a partir del RNA serveix llavors per amplificar i usar en altres protocols.

Material

Bloc tèrmic a 37°C i 65°C. Ready-to-go T-primed First strand Kit (Pharmacia)

Mètode

1. Redissolieu la mostra de RNA en 33µl d'aigua tractada ultrapura.
2. Incubeu 5 minuts en un bloc tèrmic a 65°C (desnaturalització del RNA).
3. Incubeu 5 minuts en un bloc tèrmic a 37°C. Pre-escalfeu el *First-Strand Reaction Mix* durant 5 minuts a 37°C.
4. Transferiu el RNA al tub de *First-Strand Reaction Mix* sense barrejar.
5. Incubeu 5 minuts en un bloc tèrmic a 37°C.
6. Barregeu suament el contingut del tub (pipetejant o amb vòrtex)
7. Incubeu 60 minuts en un bloc tèrmic a 37°C. Guardeu a -20°C.

3.1.4.2. OBTENCIÓ DE PRIMERES CADENES A PARTIR DE RNA (II):

cDNA SYNTHESIS KIT

Aquest protocol usa una versió millorada del *kit* del protocol anterior i és el que hem utilitzat més darrerament.

Material

Bloc tèrmic a 65°C i 90°C. *First strand cDNA Synthesis Kit* de Pharmacia

Mètode

1. Redissolieu la mostra de RNA en 20µl d'aigua tractada ultrapura (Pharmacia).
2. Incubeu 10 minuts en un bloc tèrmic a 65°C (desnaturalització del RNA) i transferiu immediatament a gel.
3. Dispenseu en un tub eppendorf estèril i tractat:
 - 11µl de *Bulk First-Strand Reaction Mix* (prèviament barrejat suaument)
 - 1µl de DTT
 - 1µl del *primer* específic escollit
 - Els 20µl d'RNA desnaturalitzatEl volum total serà de 33µl. Barregreu pipetejant amunt i avall diverses vegades.
4. Incubeu 60 minuts en un bloc tèrmic a 37°C.
5. Afegiu 100µl d'aigua tractada ultrapura al tub per tal de diluir la mostra.
6. Incubeu 5 minuts en un bloc tèrmic a 90°C per tal de desnaturalitzar els complexos cDNA-RNA i inactivar la transcriptasa inversa. Transferiu immediatament a gel. Guardeu a -20°C fins al moment d'usar.

3.2. GELS D'ELECTROFORESI I TRANSFERÈNCIES D'ÀCIDS NUCLÈICS

3.2.1. ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA (DNA)

L'electroforesi serveix per a separar els àcids nuclèics segons la seva grandària. El camp elèctric (de voltatge constant) i el tamany del porus del gel són els factors que més intervenen en la mobilitat. Els gels d'agarosa permeten separar fragments d'entre 100 i 25.000 parells de bases. Els gels d'acrilamida són útils fins a 800 parells de bases i la seva resolució permet separar fragments que només difereixin en tamany en un nucleòtid, per això s'usen per a seqüenciar.

Les concentracions del gel d'agarosa variaran segons sigui el tamany del DNA que volem separar. Pot anar des de 0'5% (per estudiar fragments de 30.000 a 1.000 parells de bases) fins a 3% (per veure fragments d'entre 200 i 50 parells de bases; cal usar llavors un 50% d'agarosa *NuSieve* i un 50% *Sea Kem*), passant per 1'5%, el més usat per nosaltres (per separar de 3.000 a 200 parells de bases).

Material

Microones, Sistema d'electroforesi, Font d'Electroforesi, Transil·luminaor d'Ultraviolats

Aparell fotogràfic.

Agarosa Sea Kem LE, Tampó de mostres X10, TAE_x1 amb Bromur d'etidi.

Solucions

1. Tampó de mostres

Ficoll 400	3g	(20%)
EDTA Na ₂ 0'1M pH8	3ml	
Blau de Bromofenol	0'037g	(0'25%)
Xilen Cianol	0'037g	(0'25%)
Aigua	Fins a 15 ml	

Blau de Bromofenol i Xilen Cianol són dos colorants que migren a velocitats diferents en l'electroforesi, l'un amb els fragments de 0'5 Kb i el segon amb els de 5 Kb). Guardeu a -20°C.

2. TAE_x50

Tris-Acetat 2M	242g
EDTA Na ₂ dihidratat	37'2g
Àcid Acètic	57'1 ml
Aigua	Fins a 1 l

3. TAE_x1 amb Bromur d'etidi

TAE _x 50	40 ml
Bromur d'Etidi (10mg/ml)	70 µl
Aigua	Fins a 2l

Mètode

A) Preparació del Gel:

1. Per a preparar un minigel (12'5x6'5 cm) d'agarosa al 1'5% cal dissoldre 0'75 g d'Agarosa en 50 ml de TAE_x1 amb bromur d'etidi dins un erlenmeyer, usant el microones per escalfar fins a l'ebullició i agitant manualment. Cal anar en compte de no perdre volum d'aigua per evaporació; la millor manera de comprovar que no hi ha hagut pèrdues es pesar l'erlenmeyer abans i després del pas pel microones, i afegir l'aigua del tampó que s'hagi evaporat.

2. Deixeu refredar uns minuts a temperatura ambient. Mentrestant, munteu el sistema d'electroforesi i selleu amb cel·lo la safata on anirà el gel.

3. Col·loqueu la dissolució a la safata del gel. Es poden usar de 25 a 50 ml segons el gruix que volem que tingui el gel. Com més prim, més útil serà per diferenciar poques quantitats de DNA. Poseu la pinta del gel i deixeu que solidifiqui a temperatura ambient (15-20 minuts).

A) Preparació de les Mostres:

1. Agafeu la quantitat necessària de mostra (uns 5-10 µg de DNA dissolt en aigua) i afegiu una desena part del volum de Tampó de mostres (volum final màxim de 30 µl en un gel gruixut i mínim d'uns 10 µl; afegiu aigua si cal per arribar al volum mínim).

Els colorants del tampó permetran seguir visualment l'evolució de les mostres en el gel. El blau de bromofenol migra amb els fragments de 0'5 kb i el xilencianol amb els de 5.

B) Electroforesi:

1. Traieu el cel·lo del gel i col·loqueu la safata en el sistema d'electroforesi. Ompliu les cubetes del sistema d'electroforesi amb tampó (TAE_x1) cobrint el gel.
2. Carregueu amb cura les mostres, una a cada pou.
3. Tanqueu el sistema i apliqueu un voltatge constant de 70 V el temps que calgui. Cada hora aproximadament cal renovar el tampó de les cubetes (per evitar canvis de pH).

C) Visualització dels resultats:

1. Acabat el temps d'electroforesi, poseu el gel en un transil·luminador de raigs UV. El bromur d'etidi s'uneix als àcids nucleics i és fosforescent sota els UV; així permet veure les bandes de DNA separades per la mida.
2. Feu una foto usant un filtre taronja (Kodak Wratten 22A) per poder guardar el resultat.

3.2.2. ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA-FORMALDEHID

El RNA se separa per electroforesi en gels d'agarosa que contenen formaldehid com a agent desnaturalitzant. Les molècules de RNA desnaturalitzades, amb càrrega negativa, perden la seva estructura secundària i poden ser així separades en el gel segons la seva longitud: es desplacen més com menor sigui la seva grandària.

Material

Bany a 65-70°C, Microones, Sistema d'electroforesi, Font d'Electroforesi, Transil·luminaor d'Ultraviolats, Aparell fotogràfic.

Agarosa Sea Kem LE, MOPSx10, Formaldehid 37%, Formamida desionitzada, Bromur d'Etidi, Còctel d'Electroforesi, Tampó de mostres.

Solucions

1. MOPSx10

MOPS	41'86g (0'2M)
Acetat Sòdic anhidre	4'1g (50mM)
EDTA 0'5M	20 ml (10mM)
Aigua	Fins a 1l

Ajusteu el pH a 7. Protegiu de la llum.

3. Còctel de Mostres

(per a 100 mostres)	
MOPSx10	25 µl
Formaldehid 37%	40 µl
Formamida desionitzada	125 µl
Bromur d'Etidi (1mg/ml)	5 µl

Conserveu a -20°C.

2. Tampó de mostres

Glicerol	50%
Blau de Bromofenol	0.1%
Aigua tractada	

Conserveu a -20°C

Mètode

A) Preparació del Gel:

1. Per a preparar un minigel (12'5x6'5 cm) d'agarosa-formaldehid al 1'6% cal dissoldre 0'8 g d'Agarosa en 37 ml d'aigua tractada dins un erlenmeyer, usant el microones per escalfar fins a l'ebullició i agitant manualment. Cal anar en compte de no perdre volum d'aigua per evaporació; la millor manera de comprovar que no hi ha hagut pèrdues es

pesar l'erlenmeyer abans i després del pas pel microones, i afegir l'aigua que s'hagi evaporat.

2. Deixeu refredar uns minuts a temperatura ambient. Mentrestant, munteu el sistema d'electroforesi i selleu amb cel·lo la safata on anirà el gel.

3. Afegiu després 5 ml de MOPSx10 i 8ml de Formaldehid 37% a la dissolució d'agarosa. Mesclar agitant suaument i col·locar a la safata del gel. Posar la pinta del gel i deixar que solidifiqui a temperatura ambient (15-20 minuts).

B) Preparació de les Mostres:

1. Centrifugueu l'ependorf que contenia el RNA precipitat. Assequeu el sediment 5 minuts a l'Speed-Vacuum. Dissoleu acuradament el RNA sec en aigua tractada de forma que la concentració final sigui de 20 $\mu\text{g}/6 \mu\text{l}$

2. Afegiu a la mostra 19'5 μl del Còctel d'Electroforesi.

3. Poseu els eppendorfs amb el RNA dissolt en un bany a 65-70°C per a desnaturalitzar les mostres durant cinc minuts. En acabar, dipositeu en gel.

4. Afegiu 2'5 ml de tampó de mostres a cada eppendorf i barrejar. Deixeu en gel fins el moment de carregar.

C) Electroforesi:

1. Traieu el cel·lo del gel i col·loqueu la safata en el sistema d'electroforesi. Ompliu les cubetes del sistema d'electroforesi amb tampó (MOPSx1) sense que arribi a cobrir el gel (per tal de minimitzar la difusió del formaldehid del gel). Ompliu els pous del gel amb tampó.

2. Carregueu les mostres una a cada pou amb cura.

3. Tanqueu el sistema i aplicar un voltatge constant de 70 V durant 2-3 hores segons les necessitats. Cada hora aproximadament cal renovar el tampó de les cubetes (per evitar canvis de pH).

D) Visualització dels resultats:

1. Acabat el temps d'electroforesi, poseu el gel en un transil·luminador de raigs UV. El bromur d'etidi que contenen les mostres permet veure les bandes de RNA separades per la mida. Pràcticament l'únic RNA visible són les dues bandes dels RNA ribosòmics (28S i 18S, 4'7 i 1'8 Kb respectivament), en proporció 2:1. La seva integritat permet valorar l'estat del RNA.

2. Feu una foto sota un filtre taronja (Kodak Wratten 22A) per poder guardar el resultat.

3.2.3. TRANSFERÈNCIA D'UN GEL A UNA MEMBRANA (NORTHERN)

Un cop el RNA ha corregut suficientment en un gel i hem visualitzat els resultats, es transfereix el RNA a una membrana de nylon per poder treballar amb ell en un medi menys fràgil que el gel. Els sistemes de transferència han anat evolucionant fins a aquest que s'usa ara. Abans la transferència necessitava un joc de pesos i es feia cap amunt. Aquest sistema aprofita la gravetat i fa la transferència cap a baix, estalviant haver de muntar el sistema de pesos.

Material

Cubetes, Agitador Orbital, Aparell de Transferència, Kit de transferència (20 papers gruixuts, 8 de prims, pont, membrana), Pipeta de vidre autoclavada, Crosslinker, SSCx10.

Solucions

1. SSCx20

Na Cl	175'3g (3M)
Citrat Sòdic dihidratat	88'2g (0.3M)
Aigua	Fins a 1l

Mètode

1. Acabada l'electroforesi i feta la fotografia, poseu el gel en una cubeta amb 150 ml d'aigua tractada. Agiteu suaument per a rentar-lo durant 20 minuts. Canvieu l'aigua i repetir el rentat.

2. Feu dos rentats més de 10 minuts amb SSCx10

3. Munteu la piràmide de transferència a l'aparell segons les instruccions d'aquest. Per no deixar bombolles entre el gel i la membrana, passeu una pipeta de vidre humida en tampó. Cal tenir cura de manipular sempre la membrana i els papers amb guants.

4. Ompliu la cubeta del sistema amb SSCx10. Deixeu transferir entre 2 hores i O/N.
5. Desmunteu el sistema. Deixeu assecar la membrana 5 minuts a temperatura ambient. Mentrestant es pot comprovar en el transil·luminador si el RNA s'ha transferit en la seva totalitat a la membrana. Es convenient marcar d'alguna forma la cara de la membrana que estava en contacte amb el gel (la que conté el RNA), perquè serà la que haurà d'estar en contacte amb la sonda en la hibridació.
6. Sotmeteu la membrana al programa de *crosslinking* (125 mJ) del Crosslinker d'UV, per a fixar el RNA a la membrana. Per a més seguretat, es pot escalfar després la membrana 5 minuts a 90°C.

3.3. AMPLIFICACIÓ DE PRODUCTES PER PCR.

AÏLLAMENTS I PURIFICACIÓ

3.3.1. AMPLIFICACIÓ DE DNA PER PCR

La Reacció en Cadena de la Polimerasa permet obtenir grans quantitats de DNA a partir de mostres relativament petites. S'usa un enzim (polimerasa termoestable) que és sotmès a una sèrie de canvis de temperatura mitjançant un aparell (termociclador) i fa múltiples còpies d'un fragment de DNA, exponencialment, a partir d'un substrat (primera cadena) i uns *primers* (d'uns 20 nucleòtids, orientats l'un cap a l'altre i complementaris a cadascuna d'elles cadenes del DNA) que delimiten el tros a ampliar.

Es recomana fer servir puntes amb prefiltrat i pipetes netes i que no s'usin per a res més per a evitar contaminacions, que són freqüents degut a la potència d'amplificació de la tècnica. L'ús d'una capa d'oli és per evitar l'evaporació de la mostra, però alguns aparells permeten estalviar-ho usant un sistema de *hot-cap*. Cal treure després l'oli amb una pipeta amb cura abans de purificar o usar la mostra. Per facilitar el procés es pot congelar el tub: l'oli no es congela i es pot treure fàcilment sense emportar-se el DNA, que està congelat.

Per augmentar el grau de fiabilitat de l'amplificació es poden afegir a les polimerases termoestables altres polimerases d'alta fiabilitat amb activitat exonucleasa 3' que permet corregir els nucleòtids erronis introduïts en el procés de còpia.

Material

Termociclador. Tampó per a PCR, dNTP Mix, Primers específics, Polimerasa, Taq extender i Taq extender additive (opcional), Mescla PCR-Master (opcional), Oli.

Mètode

1. Prepareu un eppendorf amb els següents components (per ordre):

ddH ₂ O	fins a 50 µl
Tampó PCR (x10)	5 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
Primers 5'	1-2.5 µl
3'	1-2.5 µl
Polimerasa	0.4 µl
DNA	250 ng

Si s'utilitza Taq Extender per augmentar la quantitat d'amplificació la recepta és:

ddH ₂ O	fins a 50 µl
Taq Extender	5 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
Primers 5'	1-2.5 µl
3'	1-2.5 µl
Polimerasa	0.4 µl
Taq Extender additive	0.4 µl
DNA	250 ng

Una altra opció és substituir l'enzim, dNTPs i el tampó per la mescla ja preparada que inclou el kit *PCR-Master* de Pharmacia.

2. Coloqueu l'eppendorf al termociclador, afegir un parell de gotes d'oli per evitar l'evaporació i posar en marxa el programa addient. Ha d'incloure:

94°C 30 segons (preparació)
30 vegades 94°C 30 segons (desnaturalització)
 63°C 30 segons (hibridació o annealing)
 68°C 2 minuts (extensió)

4°C infinit (per a que es guardi fins que es tregui com si estigués en gel)

Per calcular la temperatura adequada d'*annealing* cal saber el T_m dels *primers*, que es calcula:

$T_m = 69.4 + 0.41 (\text{percentatge de Cs i Gs del primer}) - 650 / (\text{longitud del primer})$

L'*annealing* es farà a la temperatura corresponent al T_m mitjà dels dos *primers*, amb un màxim de 5 °C per sobre.

3. Un cop finalitzat el programa, per tal de comprovar el nivell de l'amplificació, prepareu un gel d'agarosa del percentatge adequat (1-3%) i carregueu-lo amb:

Marcador (100 ng/ml) 3 µl

Mostra (una alíquota 5 µl) + Colorant (0.5 µl)

Deixeu córrer l'electroforesi uns 30 min. Visualitzeu els resultats. Si hi ha més d'una banda, es pot aïllar usant el protocol corresponent.

Conserveu el DNA a -20°C fins a la seva utilització

3.3.2. AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE DNA O PRODUCTES DE PCR

(I): SISTEMA MILLIPORE

Aquest sistema és útil per aïllar una banda concreta d'un producte de PCR que contingui altres bandes que no siguin del nostre interès. Es fa córrer la mostra en un gel d'agarosa fins que quedi ben separada la banda que busquem de les altres i després es purifica per eliminar l'agarosa. Si no hi ha altres bandes contaminant, el protocol de purificació es comença directament al segon apartat, amb la columna blava, i serveix per eliminar les restes de la reacció de PCR que no siguin el DNA del nostre interès (nucleòtids lliures, etc.).

Material

Material per a un gel d'agarosa i electroforesi, Microcentrífuga, Speed Vacuum, Bisturí, Bloc tèrmic a 37°C, Filtres Ultrafree-MC de Millipore (30.000 NMWL i 0.45 µm), TRIS-EDTA 1:10 (TE).

Mètode

A) Aïllament d'una banda de DNA

1. Carregueu la mostra que conté la banda que desitgem aïllar en un gel d'agarosa normal. Per a què hi càpiga tot el material obtingut d'un PCR és necessari ajuntar dos o tres pous petits de la pinta amb cinta adhesiva per tal de formar un sol pou més gran.

Realitzeu l'electroforesi fins que la banda que volem aïllar estigui visiblement separada de les altres en el gel.

2. Amb l'ajuda d'un bisturí i sota la llum ultraviolada, retalleu la banda d'interès del gel procurant incloure la mínima quantitat d'agarosa possible.

Reduiu la peça d'agarosa a petits trossets i traspasseu-los a un tub eppendorf.

Apliqueu un pic de microcentrífuga per concentrar els fragments a la part baixa del tub.

3. Congeleu el tub amb la mostra a -20°C durant 60 minuts.

4. Incubeu el tub amb la mostra en un bloc tèrmic a 37°C durant 5 minuts

5. Amb l'ajuda d'una micropunta, l'extrem distal de la qual ha estat cremat per tal d'ocluir-lo, transferiu les peces d'agarosa a la columna d'un filtre Ultrafree-MC de Millipore de 0.45 μm (tap vermell) i barregeu amb cura per tal de no malmetre el filtre.
6. Centrifugeu la mostra 20 minuts a un màxim de 5000xg a temperatura ambient.
7. Afegiu 200 μl de TE a la columna, que conte encara restes d'agarosa, i barregeu de nou amb una micropunta.
8. Incubeu la mostra 30 minuts en un bloc tèrmic a 37°C.
9. Centrifugeu 20 minuts a un màxim de 10.000 rpm a temperatura ambient.
El DNA aïllat queda a la part baixa del tub, i la columna amb les restes d'agarosa es pot eliminar.

B) Purificació del material aïllat o d'un producte de PCR

1. Transferiu la mostra a la columna d'un filtre Ultrafree-MC de Millipore (30.000 NWL, de tap blau).
Si la mostra prové directament d'un PCR tindrà un volum total d'uns 50 μl . Cal afegir llavors 350 μl d'aigua ultrapura a la columna.
2. Centrifugeu 5 minuts a 2000 xg a temperatura ambient. El volum que quedi a la columna serà d'uns 20 μl . Si n'hi ha en excés es pot centrifugar de nou 5 minuts més.
3. Afegiu a la columna 200 μl d'aigua ultrapura
4. Centrifugeu 5-10 minuts a 2000 xg a temperatura ambient. El volum que queda a la columna és d'uns 10 μl .
5. Transferiu el volum retingut a la columna a un eppendorf.
Renteu la columna amb 30 μl d'aigua ultrapura per assegurar d'arrossegar tot el material i transferiu-ho a l'eppendorf. El volum resultant que haurem obtingut serà d'uns 40 μl de DNA purificat; si n'hi ha en excés es pot reduir assecant-ho a l'speed vacuum.

3.3.3 PURIFICACIÓ D'ADN I PRODUCTES DE PCR (II): SISTEMA CHROMA SPIN DE CLONTECH

Aquest sistema de purificació es basa en la separació per gel-filtració de les molècules, en funció de la grandària. Així, el DNA i el RNA es poden separar de sals, nucleòtids, solvents, proteïnes, etc. El tamany del porus determina el tamany d'exclusió: les molècules més petites que el tamany del porus són retingudes i separades de les més grans, que migren al llarg de la columna. L'avantatge d'aquest sistema és que existeixen diferents tipus de columna segons la grandària del fragment que volguem purificar. Per a la purificació de productes de PCR de gran tamany s'usen columnes S-400, per a productes de més de 350 parells de bases les S-300, i per a més de 140, les S-100. En qualsevol cas, el volum de mostra aplicat ha d'estar entre 40 i 75 μ l.

Material

Centrífuga. Columnes Chroma-spin de Clontech.

Mètode

1. Sacsegeu la columna suament per a resuspendre completament la resina. Es pot usar un vòrtex.
2. Afluixeu el tap superior de la columna un quart de volta per evitar que es faci el buit. Trenqueu l'extrem inferior de la columna. Dipositeu la columna sobre un eppendorf sense aplicar-hi cap pressió, per evitar així que s'atrapin bombolles d'aire. De la columna anirà sortint espontàniament un líquid (tampó) que caldrà descartar.
3. Centrifugueu durant 3 minuts a 700 xg a temperatura ambient.
4. Treieu amb cura la columna de la centrífuga. En el tub s'haurà recollit tot el tampó expulsat, que caldrà descartar. La part superior de la resina de la columna haurà quedat inclinada de gut a la centrifugació.
5. Repetiu els passos 3 i 4.

6. Descarteu l'ependorf i dipositeu la columna sobre un tub nou.
7. Apliqueu la mostra amb cura al centre de la resina, sense tocar-la. Cal evitar que la mostra passi pels costats de la resina, ja que no es filtraria.
8. Centrifugueu durant 5 minuts a 700 xg a temperatura ambient.
9. Descarteu la columna i conservar el contingut de l'ependorf, que conté la mostra ja purificada. Cal guardar-la al congelador fins al moment que es vagi a usar.

3.4. HIBRIDACIÓ NORTHERN

3.4.1. MARCATGE NO RADIACTIU D'UNA SONDA

3.4.1.1. MARCATGE NO RADIACTIU D'UNA SONDA (I): BOEHRINGER

La sonda que s'usarà en la hibridació es dissenya a partir de la seqüència coneguda del gen. Es busca una zona d'una certa longitud i que compleixi unes certes característiques i es delimita a dalt i a baix per uns *primers* específics, que s'encarregaran a una casa comercial. Per PCR s'amplificarà aquesta zona de DNA delimitada, que serà la sonda específica que s'unirà al seu fragment homòleg de RNA en la hibridació.

El marcatge no radioactiu del DNA per obtenir la sonda es realitza amb Digoxigenina. La digoxigenina és un haptè esteroide que s'acopla a dUTP (DIG-11-dUTP). El marcatge es fa pel sistema de *random primed*: es desnaturalitza el DNA sonda de doble cadena, s'hibrida amb oligonucleòtids no específics i s'esté amb l'enzim Klenow mitjançant desoxirribonucleòtids, un d'ells (el dUTP) marcat. L'estructura DIG-dUTP és sensible al pH bàsic; això facilita la seva destrucció (per *stripping*) quan ens interessa rehibridar un mateix filtre amb una altra sonda.

Material

Bany a 100°C i 37°C, Kit de marcatge Boehringer, Columnes de separació de nucleòtids Sephacril-300, EDTA 0.2M pH8, TE 10.1 pH8.

Solucions

1-TE 10.1 pH8 (Guardeu a la nevera)

Tris 1M	0'5 ml (0'1 mM)
EDTA 0'5M	10 µl (10mM)
Aigua	Fins a 50 ml

Mètode

1. Desnaturalitzeu 10ng-3µg del DNA sonda (100°C durant 10 minuts). Deixeu en gel.

2. Afegiu:

Mescla hexanucleòtids	2 µl
Mescla dNTPs	2µl
Klenow	1µl
Aigua	fins a 20 µl

3. Agiteu i incubeu a 37°C 1-20 hores.

4. Afegiu 2 ml de 0.2M EDTA pH8 per a parar la reacció

5. Elimineu els nucleòtids lliures amb una columna de gel filtració:

- Mescleu el contingut de la columna agitant intensament.
- Talleu la part inferior de la columna.
- Acopleu la columna a un tub eppendorf i centrifugueu 1 minut a 3000xg per a eliminar el tampó. Canvieu l'eppendorf per un de nou.
- Augmenteu el volum de la mostra fins 70 µl i apliqueu-la al centre de la columna.
- Centrifugueu 2 minuts a 3000xg. A l'eppendorf quedarà la sonda purificada, sense colorant.

6. Useu la sonda per a hibridar o guardeu-la a -20°C

3.4.1.2. MARCATGE NO RADIACTIU D'UNA SONDA (II): PER PCR

Aquesta variant de marcatge no radiactiu permet marcar alhora que s'amplifica la sonda, usant nucleotids ja marcats en la reacció de PCR. És més còmode i eficaç, per això l'hem usada més darrerament.

Material

Termociclador. Kit Boehringer PCR DIG Probe Synthesis Kit.

Mètode

1. Poseu un eppendorf de 0'5ml en gel i afegiu-hi:

Tampo 10X	5 µl
MgCl ₂	5 µl
DIG Mix	5 µl
Taq Polimerasa	2 µl
DNA (Sonda)	quantitat necessària
Aigua	Fins 50 µl

2. Barregeu i poseu en un termociclador amb el següent programa:

95°C	7 minuts (desnaturalització)
30 cicles de	95°C 45 segons (desnaturalització)
	60°C 1 minut (<i>annealing</i>)
	72°C 2 minuts (estensió)

3. Feu un gel de DNA amb 5 µl del resultat per a comprovar la quantitat aproximada de DNA present. Deprés es pot quantificar la quantiat de sonda marcada amb el protocol corresponent.

3.4.2. QUANTIFICACIÓ D'UNA SONDA MARCADA

Abans d'hibridar amb la sonda marcada és convenient comprovar si aquest marcatge s'ha fet correctament. Aquest mètode de quantificació ens permet també calcular aproximadament quants mil·lilitres de producte necessitarem per usar la quantitat de sonda que es necessita per a cada hibridació. El sistema es basa en comparar la sonda amb mostres successivament diluïdes de concentració ja coneguda.

Material

Kit Boehringer PCR DIG Probe Synthesis Kit, Membrana marcada positivament.

Mètode

1. Amb un gel de DNA, calculeu aproximadament la quantitat ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de sonda a quantificar que tenim (comparant amb una mostra de concentració coneguda). Dilueu una alíquota de la sonda a una concentració propera a $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.
2. Dilueu el DNA Control Marcat (1:5), aproximadament igual que la Sonda.
3. Feu 5 dilucions progressives del Control i de la Sonda començant amb $1 \mu\text{l}$ en $9 \mu\text{l}$ d'aigua i agafant després un μl d'aquesta dissolució per afegir-la a $9 \mu\text{l}$ d'aigua, i així successivament. Aconseguirem així concentracions decreixents de $1\text{ng}/\mu\text{l}$, $100 \text{pg}/\mu\text{l}$, $10 \text{pg}/\mu\text{l}$, $1\text{pg}/\mu\text{l}$ i $0.1 \text{pg}/\mu\text{l}$.
4. Retalleu un tros de membrana d'hibridació carregada positivament, d'uns $2 \times 5 \text{ cm}$. Apliqueu $1 \mu\text{l}$ de cada dilució de Sonda i Control en dues columnes separades, posant al costat les concentracions que teòricament són iguals. Deixeu assecar.

5. Escalfeu la membrana 30 minuts a 90°C.

6. Seguiu el protocol d'hibridació no radioactiva a partir de la Detecció Immunològica. Exposeu l'autoradiografia 1 o 2 hores.

7. Compareu la intensitat de les dilucions per estimar la concentració de la Sonda.

3.4.3. HIBRIDACIÓ NORTHERN NO RADIATIVA

El mètode d'Hibridació No Radiativa per quimioluminiscència és una variant dels que usen P^{32} com a marcador. Les sondes porten nucleòtids marcats amb digoxigenina; l'acció de la fosfatasa alcalina descomposa els substrats de dioxietà i s'emet llum que pot ser detectada per autoradiografia. El protocol es basa en unir la sonda marcada als fragments de RNA complementaris que hi ha a la membrana (hibridació), rentar els fragments que no s'han unit i exposar la membrana a un sistema de detecció per quimioluminiscència que revelarà on s'ha unit la sonda.

Material

Agitador, Bany a 100°C, Tubs Falcon de 50 i 15 ml, Forn d'Hibridació amb tubs de vidre petits i grans, Cubetes, Caset i autoradiografies, Transparències, Paper de Filtre.

Membrana de Nylon (carregada positivament) amb RNA, Sonda específica marcada no radioactivament, Solució de Prehibridació (Boehringer), Tampó Malèic, Tampó de Blocking, Tampó Conjugat, Solució de Rentat, Tampó de Substrat, Solució de Detecció, AntiDIG, CSPD.

Solucions

1. Tampó Malèic

Àcid Malèic 11'61 g/l (0'1M)

NaCl 175 g/l (3 M)

Dissoleu acuradament.

Ajusteu el pH a 8'3 amb NaOH.

Autoclaveu i afegiu:

Tween 3g/l (0'3%)

2. Tampó de Blocking

Tampó Malèic 1 l

Reactiu de Blocking 5 g

Dissoleu agitant durant 1 hora. Autoclaveu.

Deixeu refredar agitant i filtrar després amb gases estèrils. Guardeu a 4°C.

3. Tampó Conjugat

Tampó de Blocking 12 ml

AntiDIG 0'8 µl

Prepareu immediatament abans d'usar.

4. Solució de Rentat

Na₂HPO₄ 2M 10 ml/l (20 mM)
(o 3'56 g en sòlid)

EDTA Na₂ 0'5M 2 ml/l (1 mM)

Dissoleu i autoclaveu. Afegiu:

SDS 10 g/l (1%)

5. Tampó de Substrat

Tris Cl 1M 100 ml/l (0'1 M)

NaCl 4M 25 ml/l (0'1 M)

Ajusteu el pH a 9'5 amb NaOH. Autoclaveu.

Deixeu refredar completament. Afegiu:

MgCl₂ 1M 50 ml/l (50 mM)

6. Solució de Detecció

Tampó de Substrat 10ml

CSPD 100 ml

Prepareu immediatament abans d'usar. Es pot guardar immediatament a 4°C i reutilitzar.

Mètode

Abans de començar cal escalfar la solució de prehibridació i posar el forn d'hibridació a la temperatura corresponent. Tots els volums han estat calculats per una membrana de 10x7cm o menys.

A) Hibridació

1. Poseu la membrana que volem hibridar dins un tub Falcon de 50 ml. Afegiu-hi 7 ml de solució de prehibridació escalfada. Poseu el tub falcon dins un tub de vidre i col·loqueu-lo en el forn d'hibridació.

2. Incubeu amb rotació suau durant 30 minuts a 65°C (pre-hibridació)

3. Una estona abans d'acabar, desnaturalitzeu la quantitat de sonda marcada necessària (uns 2'5 ng/ml) posant l'eppendorf 10 minuts a 100°C. Col·loqueu el tub en gel i usar immediatament.

4. Barregeu la sonda desnaturalitzada amb 7ml de solució de prehibridació.

5. Canvieu la solució de prehibridació per la solució amb la sonda

6. Incubeu amb rotació suau durant 1 hora a 65°C (hibridació)

7. Traieu amb unes pinces la membrana del tub i col·loqueu-la en un tub de vidre petit. La solució amb la sonda es pot guardar a -20°C i reutilitzar diverses vegades (cal desnaturalitzar-la 10 minuts 100°C al bany maria abans d'usar).

8. Ompliu el tub fins a dalt amb Solució de Rentat. Incubeu durant 20 minuts a 68°C a màxima velocitat de rotació.

9. Repetiu el rentat dues vegades més canviant la Solució cada cop.

B) Detecció immunològica

1. Traieu la membrana del tub i renteu-la en una cubeta amb 150 ml de Tampó Malèic amb agitació suau a temperatura ambient durant 5 minuts.
2. Incubeu la membrana amb agitació suau a temperatura ambient en una cubeta amb 150 ml de Tampó de Blocking 2 durant 1 hora. Abans d'acabar, prepareu el Tampó Conjugat.
3. Incubeu la membrana amb agitació suau a temperatura ambient en una cubeta més petita amb els 15 ml de Tampó Conjugat durant 30 minuts
4. Renteu la membrana 5x8 minuts a temperatura ambient amb suau agitació en una cubeta amb 150 ml de Tampó Maleic.
5. Equilibreu 5 minuts a temperatura ambient amb suau agitació en una cubeta amb 150 ml de Tampó de Substrat. Prepareu mentrestant la Solució de Detecció.
6. Incubeu 5 minuts a temperatura ambient amb suau agitació en una cubeta amb 15 ml de Solució de Detecció procurant mantenir la membrana aïllada de la llum.
7. Traieu la membrana de la solució i dipositeu-la en un paper de filtre per eliminar l'excés de líquid.
8. Col·loqueu-la en un caset d'auto radiografies entre dues transparències, procurant sempre que la membrana no s'assequi. Exposeu la pel·lícula a una autoradiografia durant 1-20 hores, depenent de cada cas.

Referències

Engler-Bum G, Meier M, Frank J, Müller G. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* 1993;210(2), 235-244.

3.5. CLONACIÓ DEL DNA

3.5.1. PREPARACIÓ DE VECTOR BSSK+ LINIARITZAT I AMB EXTREMS 3'T

Els vectors que hem usat per a transformar són el BSSK+ i el pCR-Script (+). Si volem usar el primer, podem usar aquest sistema de preparació del vector que augmenta l'eficiència del clonatge fins al 80%. Els productes de PCR que es clonaran contenen un extrem 3' PoliA (si han estat amplificats amb la Taq DNA Polimerasa). Afegint una cua de PoliT a l'extrem 3' del vector ja liniaritzat es garanteix que l'unió del fragment i el vector sera més bona.

Si usem el vector el pCR-Script SK(+) el que farem serà preparar directament la mostra tal i com es descriu en el protocol de lligació.

Materials

Bany a 37°C, Termociclador, Speed Vac, Centrifuga a 4°C.

Vector (BSC SK+), EcoRV, Taq DNA Polimerasa, T4-DNA-Lligasa, Tampó per a Eco RV x10, Tampó per a Lligasa x10. BSA, dTTP, Acetat Sòdic, Etanol.

Mètode

1. Digeriu el vector amb l'enzim EcoRV, posant en un eppendorf:

Vector (BSC SK+)	10 µg
Enzim	30-50 Unitats
Tampó x10	10 µl
BSA x10	10 µl
Aigua	Fins a 100 µl

Incubeu 8-12 hores a 37°C

2. Afegiu a la digestió:

dTTP	2mM
Taq DNA Polimerasa	5 Unitats

Incubeu a 72°C durant 2 hores (en un termociclador). Als vectors que han estat liniaritzats abans se'ls afageix una cua a l'extrem 3' de PoliT.

3. Feu una extracció fenòlica (veure protocol) per a aïllar el vector.

4. Precipiteu amb etanol (0'1 volums d'Acetat sòdic, 2'5 volums d'Etanol al 100%). Deixeu 2 hores a -80°C (o 20 minuts en neu carbònica i etanol o 1 minut en nitrogen líquid).

5. Centrifugueu 15 minuts a 4°C, 13.000xg.

6. Elimineu el sobrenedant. Assequeu la mostra 5 minuts a l'Speed Vac.

7. Ressuspeneu el sediment en 44 ml d'Aigua. Afegiu:

Tampó Lligasa x10	10 ml
T ₄ -DNA-Lligasa	2-3 Unitats

Incubeu a 4°C O/N. Els vectors als quals no se'ls ha afegit la cua poliT es recircularitzen per a que no interfereixin.

8. En un gel d'Agarosa a l'1%, poseu i feu córrer tota la reacció en un pou (engrandint-lo juntant dos pous del gel amb cel·lo). Aïlleu la banda d'uns 3 Kb (vector liniaritzats i amb extrem PoliT) seguint el protocol corresponent d'aïllament en agarosa de baix punt de fusió i purificació. Al gel es veura una altra banda més ampla i de més grandària que correspon al vector recircularitzat.

9. Feu una nova extracció fenòlica amb precipitació. Redissolueu el vector en aigua per tenir una concentració aproximada de 20 ng/μl. Useu el vector, liniaritzat i amb el PoliT, en el protocol de lligació amb el producte de de PCR que volem seqüenciar. Per a cada lligació 100 ng de vector són suficients.

3.5.2. LLIGACIÓ

Si usem el vector el pCR-Script SK(+), abans d'unir el vector preparat (veure protocol corresponent) amb el fragment de DNA que volem estudiar (lligació) per formar el DNA recombinant (o *quimera*), hem d'igualar els extrems del producte de PCR (*polishing*) per a que la unió es pugui fer correctament. El pCR-Script SK(+) és tallat per l'enzim *Srf I* en el seu punt de restricció, i així obert està preparat per a què l'enzim T4 DNA-ligasa hi introdueixi el producte de PCR. Aquest fragment, però pot ser que tingui en el seu extrem els nucleòtids extra que incorporen les polimerases i que interferirien en la unió; per això el *polishing* iguala aquests extrems usant dNTPs i la *Pfu* DNA Polimerasa.

Si s'usa aquest vector, s'ha de tenir en compte que els *primers* que serviran per amplificar el producte a clonar no poden tenir la seqüència GGGC a l'extrem 5'.

Materials

Termociclador, Bany a 65°C. Vector Preparat, Producte de PCR, PCR Script AMP SK+ Cloning Kit.

Mètode

A) *Polishing*

1. En un tub eppendorf de PCR afegiu, per ordre:

Producte de PCR (ja purificat)	10 µl
DNTP Mix 10mM	1 µl
Polishing Buffer 10x	1'3 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimerasa	1 µl

Barregeu suament la mescla.

2. Incubeu la reacció 30 minuts a 72°C en un termociclador. Useu directament per a lligar.

B) Lligació

1. En un tub eppendorf de PCR afegiu, per ordre:

Vector	1 μ l
PCR-Script Reaction Buffer	1 μ l
rATP 10 mM	0'5 μ l
Producte de PCR preparat	4 μ l
Enzim de restricció <i>Srf</i> I	1 μ l
T ₄ -DNA-Lligasa	1 μ l
Aigua	1'5 μ l

Barregeu suaument.

2. Incubeu una hora a temperatura ambient.

3. Incubeu 10 minuts a 65°C per inactivar els enzims. El vector està a punt per a la transformació.

3.5.3. TRANSFORMACIÓ BACTERIANA PER ELECTROPORACIÓ

És el mètode de màxima eficiència per a l'obtenció de recombinants en el procés de clonatge d'un gen. S'obtenen en teoria entre 10^8 i 10^9 colònies de bacteries transformades per cada μg de DNA usat en la mescla de lligació. En el protocol es sotmeten les cèl·lules preparades a una forta (6-12 kV/cm^2) i breu descàrrega elèctrica que les fa permeables al DNA (electropermeabilització); d'aquesta manera pot entrar una sola còpia el vector recombinant per cèl·lula. Aquest vector es reproduirà dins la cèl·lula independentment del genoma bacterià, degut a les seves característiques específiques, obtenint així entre 50 i 200 còpies per cèl·lula. Això, i les divisions cel·lulars que amb el temps donen lloc a una colònia de clons de la bactèria original, fan que l'amplificació del recombinant sigui al final molt elevada, i així es pugui seqüenciar fàcilment.

Materials

Plaques Mínimes, Plaques per a sembra. Bactèria JM-109, Bluescript BSC SK+ 0.02 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (plàsmid control). ElectroCell Manipulator 600 amb cubetes BTX (Disposable cuvette P/N 620, 2mm ap), Espectofotòmetre, Balança, Agitadors orbitals d'aire i aigua a 37°C , Estufa a 37°C , Campana de fluxe laminar, Centrifuga refrigerada, Estufa de plaques. Tubs estèrils de 50, 15 i 2ml, Cubetes estèrils d'un sol ús per a espectofotòmetre, Cubetes per a electroporador. Nansa de platí, Pipetes Pasteur autoclavades.

Medi Lbroth fresc (menys de 15 dies), Mescla de lligació. reactius de lligació, SOB fresc (menys de 15 dies), SOC fresc (menys de 15 dies), H_2O a 4°C , Glicerol 10% (esterilitz per filtració; no s'ha d'autoclavar ja que molts casos de baixa eficiència són deguts a problemes amb el glicerol; l'autoclavat pot donar lloc a la producció de productes tòxics que redueixen dràsticament l'eficiència)

Solucions

	1-PlaquesTYE		2-Sals M9x10
Bactotripton	10g/l (1%)	Na_2HPO_4	60g/l
Extracte de llevat	10g/l (1%)	KH_2PO_4	30g/l
Na Cl	5g/l (0.5%)	NaCl	5g/l
Bacto -agar	15 g/l (1.5%)	NH_4Cl	10g/l

Autoclaveu 20 minuts. Deixeu refredar i afegiu:

Ajusteu pH a 7'2-7'6 amb NaOH, Autoclaveu.

Ampicilina (esterilitzada per filtració) 4ml/l

IPTG 5ml/l

X-Gal 2ml/l

Dispenseu sobre una placa.

3-Plaques mínimes

Per a una placa de 10cm de diàmetre fan falta aproximadament 50 ml totals de solució.

Sals M9x10	10ml (autoclavades)
Agarosa	1'5g
dH ₂ O	88ml

Autoclaveu 20 minuts. Deixeu refredar fins a 50°C aproximadament. Afegiu (d'stocks estèrils):

MgSO ₄ 1M	200 µl (autoclavat)
CaCl ₂	10 µl (autoclavat)
Glucosa 20%	1ml (esterilitzada per filtració)
Tiamina HCl 1M	100 µl (esterilitzada per filtració)

Dispenseu sobre una placa i deixeu solidificar.

4-Medi LBroth:

Bactotripton	10 g/l (1%)
Extracte de llevat	5g/l
NaCl	5g/l (0.5%)

5-SOB

Bactotripton 2%	20g/l
Extracte de llevat 0.5%	5g/l
Na Cl 4M	2.5 ml/l (10mM)
KCl 1M	2.5ml/l (0.5mM)

Autoclaveu 20 minuts. Afegiu:

MgSO ₄ 1M	10ml/l (10mM)
MgCl ₂ 1M	10ml/l (10mM)

6-SOC

Afegiu 10 µl de glucosa 2M a cada ml de SOB.

Mètode

A) Preparació de les cèl.lules per a electroporació

1. Sembreu les bactèries JM-109 en les plaques mínimes i deixar-les créixer 2-3 dies a l'estufa per a plaques a 37°C. Així es preserven intactes les cèl.lules
2. Transferiu una colònia a 10 ml de medi LB en un tub de 50 ml. Deixeu el tub sense tancar del tot i cubriu el tap amb cinta adhesiva per evitar que salti. Incubeu O/N a 37°C a 270 rpm en l'agitador orbital d'aire.
3. Afegiu 2'5 ml de LB amb colònies a 250 ml de LB autoclavat (opcional: +2'5 ml de MgSO₄ 1M). Incubeu a l'agitador orbital d'aigua a 37°C a 220 rpm.
4. Deixeu créixer fins que OD₆₀₀ estigui entre 0'5 i 1'0 U (aproximadament 1000 cèl.lules/ml, unes 2h d'incubació): useu com a blanc per a l'espectrofotòmetre el medi LB; agafeu la mostra amb una pipeta Pasteur autoclavada i dispenseu-la en una cubeta estèril d'un sol ús per a espectrofotòmetre; llegir OD₆₀₀ a l'espectrofotòmetre.
5. Refredeu en gel durant uns 15 minuts.

6. Renteu les bactèries per eliminar tots els ions presents en el medi (essencial per evitar l'*arcing* –arcs voltàics- durant l'electropoació):

-Dispenseu el medi amb les bactèries en un tub per a centrifuga. Peseu el tub en una balança posant a l'altre plat un tub amb H₂O per a que faci de *balance*. Centrifugeu a 4000 rpm, 4°C, durant 15 minuts.

-Decanteu i resuspeneu el sediment en 250 ml (1 volum) de dH₂O a 4°C.

-Dispenseu, peseu i centrifugeu a 4000 xg, 4°C, 15 min.

-Decanteu i resuspeneu el sediment en 125 ml (0'5 volums) de dH₂O a 4°C.

-Dispenseu, peseu i centrifugeu a 4000 xg, 4°C, 15 min.

-Decanteu i resuspeneu el sediment en 125 ml (0'5 volums) de dH₂O a 4°C

-Dispenseu, peseu i centrifugeu a 4000 xg, 4°C, 15 min.

-Decanteu i resuspeneu el sediment en 5 ml (0'02 volums) de dH₂O a 4°C

-Dispenseu, peseu i centrifugeu a 4000 xg, 4°C, 15 min.

7. Resuspeneu en 500 µl (0'002-0'003 volums) de glicerol estèril al 10%.

8. Feu alíquotes d'uns 40 µl en tubs de 2ml de polipropilè amb tap de rosca.

Si no s'usen d'immediat les bactèries així preparades poden congelar-se a -70°C i descongelar-se en gel 5-10 minuts abans de la seva utilització en l'etapa B.

B) Preparació de la Mescla de Lligació

1. Barregeu en un eppendorf:

Mostra d'ADN a lligar	màxim 7 µl
Tampó x 10 (T ₄ ligase buffer)	1 µl
Vector (pGem)	1 µl
Enzim de lligació	1 µl
dH ₂ O	Fins a 10 µl

2. Deixeu lligant O/N a 4°C (en una gradeta de plàstic amb aigua al forat que contindrà la mescla).

C) Electroporació

1. Programeu l'ElectroCell Manipulator 600:

T 2'5 kV / Resistance High Voltage

R R5 (129 Ω)

S 2'45 kV

Després del pols, els valors que mostraran les pantalles seran:

Desired Field Strength 12.25 kV/cm

Desired Pulse Length t 5-6 msec

2. Col.loqueu cubetes d'electroporar en gel, protegides per a que no s'humitegin en el seu propi envoltori o en Saram-wrap.

3. Descongeleu les bactèries en gel (5-10 min). En aquestes etapes convé sempre actuar a baixa temperatura i amb rapidesa.

4. Diluiu la mescla de ligació 1:5 en dH₂O.

5. Prepareu el plàsmid control (Bluescript): diluiu en TE o H₂O fins aconseguir una concentració de 0'002 ng/ μ l .

6. Mescleu 40 μ l de bactèries amb 1 μ l de la dilució de lligació (o el plàsmid control) en una cubeta d'electroporació, procurant col.locar la mostra en la cubeta de forma que toqui els seus dos laterals. Refredeu immediatament a 0°C durant 1 minut.

La proporció òptima per a lligar ente el DNA i el vector ha de ser entre 40:1 i 100:1.

7. Electroporeu:

-Col.loqueu la cubeta en el dispositiu d'electroporació, comprovant que encaixi completament en el fons.

-Pressionu breument el botó "A" per donar el pols. S'encén un indicador de color verd a l'electroporador.

-Pressioneu el botó "Reset" per a preparar l'aparell per al següent pols.

8. Recuperació:

- Immediatament després d'apagar-se la llum verda de l'electroporador, traieu la cubeta del dispositiu i afegiuu 960 μ l de SOC. És essencial no demorar aquesta etapa.
- Transferiu la mostra a tubs de polipropilè de 2 ml (es poden reutilitzar els mateixos que contenen les alíquotes de les bactèries) usant una pipeta de plàstic especial.
- Poseu els tubs a l'incubador orbital d'aire a 37°C, durant 1 hora, a 250 rpm, lligats amb cinta adhesiva a la gradeta.

9. Dispenseu entre 100 i 300 μ l de la mostra sobre plaques TYE (d'agar, que conté IPTG, X-Gal i Ampicilina), per tal de seleccionar els recombinants.

L'ampicilina fa que només les cèl·lules transformades sobrevisquin (el vector confereix resistència a l'antibiòtic). El vector sense *insert* fa que s'expressi el gen de la β -galactosidasa, que amb l'IPTG i X-Gal dóna un color blau a les colònies. El vector amb *insert* té bloquejada l'expressió de la β -galactosidasa i les colònies queden blanques (i poden ser identificades com a positives, és a dir, que contenen l'*insert*)

10. Incubeu les plaques O/N invertides a l'estufa per a plaques a 37°C. Les plaques usades han d'haver estat preparades menys de 15 dies abans.

D) Interpretació dels resultats

1. Traieu les plaques de l'estufa i localitzeu les colònies blanques.

Depenent de la mida del *insert* pot ser que les colònies que el continguin siguin d'un color intermig si aquest era petit. També pot variar segons el vector usat (pGem-T dóna colònies positives blaves). També poden aparèixer falsos positius per inserció de primers residuals en el vector, presència de DNA contaminant en la lligació, etc.

2. Per a conèixer el rendiment de l'experiment, es pot comptar el nombre de colònies que apareixen a la placa control (Bluescript).

3. Sembreu les colònies blanques en noves plaques TYE, agafant amb una nansa estèril material de les plaques antigues. Incubeu les noves plaques O/N invertides en una estufa de plaques a 37°C. Useu les noves colònies per al protocol de Minipreparacions.

3.5.4. MINIPREPARACIONS

3.5.4.1. MINIPREPARACIONS (I): Promega Magic Minipreps

Aquest protocol serveix per a comprovar quines colònies replatejades tenen el recombinant incorporat després de l'electroporació. Aquest sistema és més útil que no el canvi de color que experimenten les colònies (E.Coli amb factor F', que amb IPTG i x-gal es veuen blanques si tenen el recombinant i blaves si tenen només el vector), que s'ha de prendre només a títol orientatiu. Al final, en un gel de DNA, la minipreparació es compara amb un marcador (el vector mateix super-enrotllat) i per la variació de tamany es pot veure quines tenen l'insert.

Material

Sembrat de bacteries (en placa de Petri). Tubs Eppendorfs, Nanses i metxer, Xeringues de 2 ml, Escuradents autoclavats, Blocs tèrmics a 65°C i 95°C, Vòrtex, Centrifuga a temperatura ambient. STET, Lisozima (10 mg/ml), Kit Magic Miniprep DNA Purification (Promega).

Solucions

1. STET

Sacarosa	8%	<i>Ajusteu a pH 8 i afegiu:</i>	
Triton x100	5%	EDTA	50mM
Tris	50 mM		

Mètode

1. Dispenseu 200 ml de STET en un eppendorf. Recolliu una porció d'un sembrat de bacteries d'una placa de Petri amb una nansa prèviament esterilitzada amb un metxer i deixada refredar, procurant no agafar agar de la placa. Col.loqueu la mostra presa dins l'eppendorf.

2. Apliqueu-ho al vòrtex durant 10 segons i afegir 16 ml de lisozima.

3. Apliqueu-ho de nou al vòrtex durant 10 segons i col·locar-ho en un bany tèrmic a 95°C durant 40 segons. *Immediatament* centrifugueu 10 minuts a temperatura ambient.
4. Elimineu el sediment amb un escuradents autoclavat. Afegiu a l'ependorf 1 ml de *Magic Miniprep DNA Purification Resin*.
5. Extraieu l'èmbol d'una xeringa de 2 ml i col·loqueu-hi una columna (*Magic Miniprep DNA Purification*) al seu extrem distal. Dispenseu el contingut de l'ependorf a l'interior de la xeringa. Col·loqueu de nou l'èmbol i feu-lo baixar a velocitat constant sobre una paperera, per tal de que hi caigui el contingut de la xeringa.
6. Traieu la columna i després l'èmbol. Col·loqueu de nou la columna i dispenseu a la xeringa 2 ml de *Magic Miniprep DNA Purification Column Wash*. Col·loqueu de nou l'èmbol i feu-lo baixar a velocitat constant sobre una paperera, per tal de que hi caigui el contingut de la xeringa.
7. Traieu la columna i col·loqueu-lo sobre un ependorf nou. Centrifugueu el conjunt durant 20 segons a temperatura ambient. Cal que el tap de l'ependorf no sobresurti del rotor (per a això pot tallar-se el tap si cal).
8. Descarteu l'ependorf i conserveu la columna. Col·loqueu la columna sobre un ependorf *nou*. Afegiu directament a la columna 52 ml d'aigua a 65°C i espereu 60 s.
9. Centrifugueu l'ependorf amb la columna durant 30 segons a temperatura ambient, tenint en compte les recomanacions del punt 8. Descarteu la columna.
10. Per comprovar si el vector conté o no l'*insert*, es prepara un gel d'agarosa al 1% (0.5 g agarosa + 50 ml TAE x1) i es carrega els pous amb les mostres següents: Marcador (100 ng/ml) 3 µl; Mostra (2 µl) + TE(10 µl) + Colorant (1 µl). Deixeu córrer l'electroforesi una hora i visualitzeu els resultats.

3.5.4.2. MINIPREPARACIONS (II): per PCR

Aquest és un sistema de minipreparacions alternatiu més econòmic i igual d'eficaç que l'interior. Es tracta d'amplificar per PCR l'*insert* usant *primers* universals que delimiten en el vector la regió d'inserció. Al final, es compara en un gel la grandària dels productes: si no hi ha *insert*, el producte amplificat només té 250 pb, mentre que si n'hi ha, el tamany és de 250 pb més el tamany que tenia el DNA insertat.

Material

Nanses de platí, Metxer Bunsen, Campana de fluxe laminar, Bany a 100°C, Termociclador.
Colònies replatjades, Primers universals (FR i RP), Mescla Master Boehringer 2X, Cocktail PCR, Colorant de mostres de DNA x10.

Solucions

1. Cocktail PCR

(Guardeu-lo a -20°C com a màxim algunes setmanes)

Per a N Minipreparacions, barregeu:

Primer FP	Nx0'7 µl
Primer RP	N µl (5'5 pmol)
Mescla Master	Nx6 µl (5'5 pmol)
Aigua	N µl

Mètode

1. Prepareu tants eppendorfs com mostres a analitzar i poseu en cadascun 15 µl d'aigua.
2. Sota la campana de fluxe laminar, esterilitzeu a la flama una nansa de platí. Espereu que es refredi i agafeu una mica de material de cada replatig (procurant que no n'hi hagi en excés ni en falti). Introduiu la nansa a l'eppendorf amb aigua i sacsegeu fins que la mostra s'hagi després.
3. Agiteu al vòrtex durant 30-50 segons cada tub.

4. Incubeu 10 minuts a 100°C per a lisar el material, amb els tubs protegits per una anella per evitar que salti la tapa. Mentrestant, prepareu el cocktail PCR i aliquoteu-ne 8 µl en tubs eppendorf per a PCR.

5. Centrifugueu el material en una picofuga durant 2-4 minuts.

6. Agafeu 4 µl del sobrenedant i afegiu-los al tub amb el cocktail. Mescleu i poseu al termociclador amb el següent programa:

94°C 3 minuts

30 cicles de:

94°C 30 segons

50°C 30 segons

72°C 2 minuts

72°C 3 minuts

7. Afegiu 1'3 µl de colorant de mostres de DNA x10 a cada tub. Carregueu 7-8 µl en un gel d'agarosa per visualitzar quines colònies contenen l'*insert*.

3.5.5. PREPARACIÓ DEL DNA CLONAT PER A SEQÜENCIAR

Un cop s'ha decidit quines colònies posiblement tenen l'*insert* que ens interessa seqüenciar, aquest protocol serveix per a obtenir el DNA del cultiu de bacteries corresponent. Es lisen les cèl·lules i la fracció soluble s'usa per extreure'n el DNA. S'obté uns 2-4 µg de DNA per cada ml de cultiu.

Material

Nansa estèril, Tubs Falcon de 50ml, Vials de 2-3 ml autoclavables, Bloc tèrmic a 37°C

Aigua a 65°C, Incubador orbital d'aire, Campana de fluxe laminar, Centrífuga clínica.

Tampons de restricció, Enzims de restricció, BSA, 2xYT, Kit Promega Magic Miniprep DNA, Plaques TYE.

Solucions

1-2xYT

Bacto-Triptona 1% (10 g/l)

Extracte de Llevat 1% (10 g/l)

NaCl 0'5% (5g/l)

Autoclavar 20 min i deixar refredar

2-Plaques TYE

Vegeu el protocol de transformació

Mètode

A) Digestió del DNA clonat

1. Determineu els enzims de restricció que convé utilitzar segons el fragment de DNA que es vulgui estudiar (depèn del vector usat), i els tampons que els corresponen.

2. Barregeu: DNA 10 µl (obtingut pel protocol de minipreparacions)

BSA 2 µl

Tampó de restricció 2 µl

dH₂O 5 µl

Enzims restricció 1 µl de cadascun dels dos enzims escollits

3. Incubeu durant 1 hora a 37°C.

4. Feu un gel d'agarosa-formaldehid amb tota la barreja, on es veurà al cap d'una hora el DNA del vector separat del fragment petit que volíem aïllar si és que la transformació ha estat exitosa.

B) Obtenció de material per a la seqüenciació

Sabent ara a quina colònia replatejada pertany la minipreparació que ens interessa la posem a créixer:

1. Dispenseu 7ml de 2xYT en un tub Falcon de 50ml

2. Afegiu-hi, ja sota la campana de fluxe laminar:

Ampicilina	21 μ l
MgSO ₄ 1M	70 μ l
Glucosa 20%	35 μ l

3. Agafeu material amb una nansa estèril de la colònia replatejada que ens interessa i dipositeu-lo en el tub de 50 ml.

4. Incubeu O/N a 37°C en l'incubador orbital d'aire a 220 rpm. Deixeu el tap mig desenroscat i cobriu-lo amb cinta adhesiva.

5. Prepareu stocks en glicerol de les mostres per a futures reutilitzacions (es poden conservar durant anys sempre que no pateixin descongelacions repetides, per això els stocks són de quantitats petites). En vials autoclavables de 2-3 ml es posa:

650 μ l de Glicerol (65%)

25 μ l de Tris-HCl pH8 (0'025M)

Autoclaveu 20 min i afegiu 100 μ l de MgSO₄ (0'1M)

Es barreja i es refreda a 4°C. Després s'afegeix 1ml de les bactèries crescudes, es barreja suaument invertint i es guarda a -20°C (o -70°C) fins la seva reutilització. Cal fer almenys dues alíquotes de cada colònia.

C) Preparació de dobles cadenes

(Segons el protocol *Magic Minipreps DNA Purification System* de Promega)

1. Centrifugueu el líquid que conté les bactèries (tots els ml que hagin quedat després de preparar les alíquotes) a 2500 rpm 10 minuts a temperatura ambient.
2. Resuspeneu el pellet en 200 μ l de *Cell Resuspension Solution*.
3. Transferiu la suspensió a un tub eppendorf nou.
4. Afegiu 200 μ l de *Cell Lysis Solution* i barregeu invertint el tub fins que el líquid es torni translúcid.
5. Afegiu 200 μ l de *Neutralization Solution* i barregeu invertint el tub.
6. Centrifugueu a temperatura ambient durant 5 minuts.
7. Decanteu el sobrenadant a un tub eppendorf nou.
8. Afegiu 1 ml de *Purification Resin* i barregeu invertint el tub.
9. Extraieu l'èmbol d'una xeringa de 2 ml i col·loqueu-hi una columna (*Magic Miniprep DNA Purification*) al seu extrem distal. Dispenseu el contingut de l'eppendorf a l'interior de la xeringa. Col·loqueu de nou l'èmbol i feu-lo baixar a velocitat constant sobre una paperera, per tal de que hi caigui el contingut de la xeringa.
10. Traieu la columna i després l'èmbol. Col·loqueu de nou la columna i dispenseu a la xeringa 2 ml de *Magic Miniprep DNA Purification Column Wash*. Col·loqueu de nou l'èmbol i feu-lo baixar a velocitat constant sobre una paperera, per tal de que hi caigui el contingut de la xeringa.

11. Traieu la columna i col·loqueu-la sobre un eppendorf nou. Centrifugueu el conjunt durant 20 segons a temperatura ambient. Cal que el tap de l'eppendorf no sobresurti del rotor (per a això pot tallar-se el tap si cal).

12. Descarteu l'eppendorf i conserveu la columna. Col·loqueu la columna sobre un eppendorf *nou*. Afegir directament a la columna 52 ml d'aigua a 65°C. Esperar 1 minut.

13. Centrifugueu l'eppendorf amb la columna durant 30 segons a temperatura ambient, tenint en compte les recomanacions del punt 8. Descarteu la columna.

14. Per comprovar la quantitat i qualitat de les preparacions, es prepara un gel d'agarosa al 1% (0'5 g d'agarosa + 50 ml TAE x1) i es carrega els pous amb les mostres següents:

Marcador (100 ng/ μ l) 3 μ l

Mostra (2 μ l) + TE (10 μ l) + Colorant (1 μ l)

Deixeu-ho córrer una hora i visualitzar els resultats.

La resta de les dobles cadenes es pot usar per a les reaccions de seqüenciació corresponents.

3.6. SEQÜENCIACIÓ

3.6.1. PREPARACIÓ D'UN GEL DE SEQÜENCIACIÓ

El protocol descriu la preparació d'un gel per a un sistema de seqüenciació manual. Al final del protocol hi ha la variant per fer gels curts per a un seqüenciador automàtic. Les mostres que es volen seqüenciar es prepararan segons el protocol corresponent i després seran carregades en els pous del gel (aquest cop d'acrilamida i no d'agarosa per a poder diferenciar millor els fragments) i sotmeses a electroforesi durant un temps determinat. Després s'interpretaran els resultats, de forma diferent segons el sistema. En el manual, el gel es posarà amb una autoradiografia (a -80°C almenys durant 2 dies) que detectarà la radiació de les mostres, imprimint-se les bandes. En l'automàtic els resultats es visualitzen immediatament en l'ordiador. Al laboratori ja s'ha abandonat el sistema manual (que és el que utilitzavem al principi de la tesi) degut a la rapidesa i major seguretat de l'automàtic.

Material

PSA 25%, Repel-Silane Temed, TBE x1.

Erlenmeyer, kitasatos, Tub Falcon 15 ml, Pipeta Pasteur, Xeringa 50 ml, Puntetes planes per a carregar el gel, Sistema de buit, Filtre, Estructura per a gel de seqüenciació, Font de 2000V

Mètode

1. Per a un gel de 60 ml, col·loqueu en un erlenmeyer els següents components:

Urea	30 g
Acilamida	9 ml
TBE x5	16'2 ml
H ₂ O	12 ml

Escalfeu l'erlenmeyer col·locant-lo sota l'aixeta d'aigua calenta, per tal de dissoldre el seu contingut.

Filtreu la dissolució en un kitasatos.

Desgasifiqueu durant 15 minuts per tal d'eliminar les bombolles, emprant un sistema de

buit connectat a l'obertura lateral del kitasatos tapat.

2. Mentrestant, cal netejar a consciència el suport del gel, sobretot per les cares dels vidres que estaran en contacte amb el gel. Assequeu les superfícies i apliqueu Repel-Silane en la que va adossada al tanc. Munteu l'estructura.

3. Preneu 3 ml de la mescla anterior en un tub Falcon, afegir-hi 15 μ l de PSA 25% i 10 μ l de TEMED i *immediatament* segelleu la vora inferior de l'estructura amb una pipeta Pasteur que contingui aquesta solució. Comproveu que ha quedat ben segellat.

4. Afegiu a la resta de la mescla 108 ml de PSA 25% i 30 ml de TEMED. *Immediatament* aspireu amb una xeringa 40 ml de la dissolució i introduïu-la a velocitat constant entre els dos vidres, procurant que no quedin bombolles. Un cop ple, col·loqueu la pinta subjectada amb pinces.

Per gelificar, envolteu els extrems de l'estructura amb Saram-Wrap humitejat amb aigua.

5. Un cop gelificat, col·loqueu l'estructura sobre la seva base, ompliu de tampó (TBE x1) i feu la pre-electroforesi (1 h a 2000 V).

6. Carregueu els pous amb les mostres. Deixeu-ho córrer.

SISTEMA AUTOMÀTIC:

1. Per a un gel del 6% de 41 cm el procediment és semblant a l'anterior. Es barreja en un kitasatos Sequagel XR 6% (40 ml) i Sequagel Buffer (10ml). Es desgasifica 5 minuts.

2. Es netegen bé les plaques (no cal Repel Silane) i es fa una darrera passada amb alcohol.

3. Es monta el sistema amb els separadors i els acopladors laterals.

4. S'afegeix el TEMED (20 μ l) i el PSA (400 μ l). Es carrega el gel amb una xeringa de 50 ml al sistema, procurant que no es formin bombolles (es poden treure amb els

caçabombolles). Es posa la pinta sense pous i es deixa gelificar 2 hores.

5. Després es treu la pinta suaument i s'humiteja la part superior amb aigua destilada per treure les restes d'acrilamida. S'assequen bé les plaques de vidre.

6. Es monta el gel a l'aparell. Es posen les cubetes superior i inferior.

7. Es posa el tampó a les cubetes. El tampó d'electroforesi que s'usarà és TBE x1 (500 ml a cada cubeta).

8. Poseu en marxa l'aparell i l'ordinador. En el programa *Data Collection* selecciona *New*. A *Scanner control* posar a *on* el voltage i l'*scan*. Poseu *send* per a que comenci la electroforesi. Es recomana una pre-electroforesi de 50 minuts. Cal ajustar *autogain* i l'enfocament mentrestant.

9. Es posa en off tots els valors. S'obre l'aparell i es carreguen les mostres (1 μ l) als pous. Cal posar la pinta amb les dents i netejar abans els pous amb el mateix tampó.

10. Engueu de nou el sistema. El voltatge ha de ser de 1500V, 35 mA de corrent, 31'5 W de potència 50°C de temperatura. Es llegiran unes 600 bases que tardaran unes 8 hores a registrar-se.

3.6.2. REACCIONS DE SEQÜENCIACIÓ

3.6.2.1. SEQÜENCIACIÓ DE PRODUCTES DE PCR (MANUAL)

Els protocols de seqüenciació es basen en el mètode enzimàtic descrit per Sanger el 1977. Resumidament, es tracta de fer en quatre tubs diferents quatre reaccions d'amplificació del fragment a seqüenciar, usant un *primer* específic com a inici de la cadena còpia i una DNA polimerasa que afegeixi els nucleòtids que hi haurà en el medi. En cada tub, un dels nucleòtids del medi (dATP, dGTP, dCTP o dTTP) tindrà una variant que serà un dideoxinucleòtid. Això fa que la reacció d'elongació es pari perquè falta en grup OH a l'extrem 3'. D'aquesta manera, s'aniran aturant cadenes que acabaran en el nucleòtid en qüestió, aconseguint així a cada tub totes les cadenes possibles acabades en aquella lletra. Posats a córrer en un gel per separat, cadascun dels tubs presentarà una banda per a cada longitud, de forma que es podrà llegir la seqüència base a base.

Aquest protocol de seqüenciació s'usa quan es vol seqüenciar material directament de PCR, sense haver de clonar. És un sistema menys reproducible que seqüenciar a partir d'un recombinant. Les reaccions estan preparades per al mètode de seqüenciació manual.

Material

Termociclador, Micropipetes i puntes, Tubs eppendorf, Cubeta amb gel i aigua, Bloc tèrmic a 37°C. Sequenase PCR Product Sequencing Kit.

Mètode

A) Pre-tractament enzimàtic del producte de PCR

S'usa una exonucleasa per a eliminar els *primers* i qualsevol altre DNA de cadena senzilla que hi pugui haver a la mostra i una fosfatasa alcalina per a eliminar els dNTPs per a que no interfereixin en el labeling. Totes dues són actives en el tampó del PCR.

1. Barregeu en un tub per a PCR:

5 μ l del producte de PCR

1 μ l d'Exonucleasa I (10 unitats)

1 μ l de Shrimp Alkaline Phosphatase (2 unitats)

Cal afegir 0'5 μ l de Tampó de PCR si el producte ha estat prèviament purificat i ja no conté els reactius de la reacció de PCR, per tal que hi hagi la concentració adequada de soluts.

2. Incubeu 15 minuts en un termociclador a 37°C

3. Incubeu 15 minuts en un termociclador a 80°C (per inactivar els enzims)

B) Reaccions de seqüenciació

1. En un eppendorf estèril barregeu:

DNA (Producte de PCR Pre-tractat) 1-9 μ l

dH₂O Fins a 9 μ l

Primer escollit (5-10 pmol/ μ l) 1 μ l

El volum total serà de 10 μ l.

2. Incubeu 2-3 minuts en un termociclador a 100°C.

3. Transferiu immediatament a una cubeta amb una barreja de gel i aigua. Deixeu refredar durant 5 minuts. Després deixeu la mostra en gel fins al pas 5.

Una variant més extrema d'aquest pas és el *Snap Cooling*:

5 minuts en nitrogen líquid

5 minuts en una barreja de gel, etanol i aigua.

4. Mentrestant, afegiu 2'5 μ l de cadascuna de les mescules de terminació a quatre tubs marcats com T, C, G, i A. Deixeu a temperatura ambient fins el pas següent.

Diluiu el *Labeling mix* 1:5 amb aigua. Calen 2 μ l per cada seqüència.

5. Realitzeu la mescla de marcatge afegint a l'eppendorf amb els 10 μl de la barreja de DNA-*primer* guardada en gel els següents productes:

Reaction Buffer	2 μl
DTT (0.1M)	1 μl
Labeling mix 1:5	2 μl
dATP amb ^{35}S	0.5 μl
Sequenase DNA	2 μl

El volum total serà de 17.5 μl

6. Barregeu i incubeu 5 minuts a temperatura ambient.

Pre-escalfeu 1 minut en un bloc tèrmic a 37°C el quatre tubs amb les mescles de terminació.

7. Transferiu 3'5 μl de la mescla de marcatge a cadascun dels quatre tubs amb les mescles de terminació.

Incubeu 5-10 minuts en un bloc tèrmic a 37°C.

8. Afegiu 4 μl de *Stop Solution* a cada tub per aturar les reaccions.

9. Abans de carregar en el gel de seqüenciació una alíquota de 2-4 μl de cada tub, incubeu-les 2 minuts en un bany tèrmic a 75°C .

3.6.2.2. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA

Aquest és el protocol optimitzat per a la preparació de les reaccions de seqüenciació automàtica amb l'aparell Li-Cor que s'usa al nostre laboratori. A diferència dels protocols manuals, no s'usen *primers* marcats radiactivament. La interpretació dels resultats es fa directament a la pantalla de l'aparell, assistida per un ordinador.

Material

Termociclador. Reaccions de Seqüenciació Li-Cor (A,C,T,G), Solució d'Stop.

Mètode

1. Aliquoteu 2 µl de cadascuna de les quatre reaccions de seqüenciació Li-Cor a quatre tubs eppendorf de 0'5 ml.

2. Prepareu a continuació un cocktail amb els següents components:

DNA per seqüenciar (doble cadena)	6-15 µl
Primer T7 (o altres)	1 µl (3 pmol)
Aigua	Fins a 26 µl

3. Afegiu 6 µl de cocktail a cadascun dels tubs del primer punt.

4. Poseu els tubs en el termociclador amb el següent programa:

95°C	3 minuts
30 vegades	95°C 15 segons
	64°C 15 segons (annealing; <i>primers</i> standard FP i RP)
	70°C 30 segons
4°C	quan pari.

5. Un cop acabat el programa, traieu els tubs del termociclador i afegiu-lis 4 ml de la Solució d'Stop.

6. Desnaturalitzeu 2 minuts 80°C al termociclador. Deixeu en gel fins el moment de carregar al gel de seqüenciació.

3.7. ANÀLISI FUNCIONAL. SITUACIONS D'STRESS

3.7.1. CULTIU DE CRISTAL·LINS I EXPOSICIÓ A STRESS

El cristal·lí és un òrgan fàcil d'aïllar i de manipular que sobreviu perfectament en un cultiu amb les condicions adequades. Això fa que sigui un bon model *in vivo* per a sotmetre'l a diferents tipus d'stress. Hem usat cristal·lins d'embrió de pollastre.

Material

Cristal·lins acabats d'extreure de l'animal, Pinces de Teflon. Incubador de CO₂ (5%) a 37°C, Xeringues i filtres Millipore, Gradetes de cultiu estèrils de 24 pous. Medi de Cultiu.

Solucions

1- Medi de Cultiu (Sigma #M3769)

Medi 199 amb Sals d'Earles i sense vermell de fenol

Afegiu el medi en pols a 900 ml d'H₂O i agiteu fins que es dissolgui.

NaHCO₃ 0.9 g

Agiteu fins que es dissolgui. Ajusteu el pH a 7

HEPES Ph 7.0 (25 mM) 6.5 mg

Glutamina 100 mg

Streptomicina 50 mg

Penicil·lina 50.000 Unitats (31 mg)

Enraseu a 1 litre. Filtreu amb un filtre Millipore (0.22 μ).

Incubeu a 37°C (i CO₂ 5%) almenys una hora abans d'usar.

Mètode

1. Introduïu els cristal·lins per separat en pous d'una gradeta de cultiu plens amb de 1'5 a 4 ml de Medi de Cultiu pre-escalfat a 37°C almenys una hora abans. Manipuleu tota l'estona els cristal·lins amb pinces de Teflon, per evitar el contacte amb metalls.

2. Incubeu la gradeta amb els cristal·lins a 37°C (5% CO₂) de 2 a 16 hores. Descarteu les lents que s'opacifiquen espontàniament (estadísticament, 10-15%)

3. Per a l'exposició a l'stress, canvieu el medi de cultiu per medi fresc amb l'agent estressant escollit a la concentració adequada, o canvieu el medi abans de sotmetre a

l'estrés tèrmic. Canvieu cada dia el medi amb l'agent cada dues hores 4 vegades fins completar el temps establert en el protocol d'stress.

Els cristal.lins poden ser cultivats fins a dues setmanes en aquestes condicions canviant el medi cada 3 dies.

Referències

Spector A, Wang GM, Wang RR, Garner WH, Moll H. The prevention of cataract caused by oxidative stress in cultured rat lenses *Cur Eye Res* 1992;12(2):163-179

Kamiya T, Zigler JS. Long-term maintenance of monkey lenses in organ culture: a potential model system for the study of Human cataractogenesis *Exp Eye Res* 1996;63:425-431

3.7.2. EXPOSICIÓ A STRESS TÈRMIC DE CÈL·LULES DE TEIXITS DE GALL

Un altre bon model de cèl·lules *in vivo* és el cultiu breu descrit en aquest protocol: Es tracta de dissociar els teixits i sotmetre'ls immediatament a l'stress corresponent. És un protocol que funciona especialment en teixits tous, com el testicle, que cal descapsular abans de trossejar.

Material

Tubs Falcon 50 ml, Material de Dissecció, Plaques de Petri, Saram Wrap, Incubador Orbital d'Aire a 31-40 °C, Incubador Orbital d'Aigua a 46°C, Centrifuga Clínica, Ampolla autoclavada, Embut autoclavat, Gases estèrils.

Tripsina 2.5% (Flow16-893-49), SBF (Sèrum Boví Fetal), 5-MEM (Minimum Essential Medium with Earls Salt w/o l-glut, Gibco BRL), Aspirina, Actinomicina D.

Mètode

1. Descongeleu la Tripsina i el SBF i poseu-los en gel junt amb el MEM. Prepareu si cal l'aspirina i l'actinomicina D. Rotuleu els tubs Falcon (un per cada mostra). Poseu una placa de Petri sobre Saram Wrap i després sobre gel.

Barregeu el MEM amb la Tripsina 2'5% (de forma que la Tripsina quedi a una concentració final de 0'1%; ex: 86:4) just abans de matar l'animal.

2. Sacrifiqueu l'animal i agafeu el teixit. Peseu-ne 10-20 g per cada 100 ml de Tripsina-MEM que s'usarà en el pas següent. Poseu sobre la placa de petri i trossejeu-lo amb l'ajut de tisores fins que quedi quasi homogeni.

3. Poseu l'homogenat repartit més o menys equitativament en tubs falcon. Afegiu 20-30 ml de Tripsina-MEM per cada tub. Incubeu a 31°C durant 30 minuts per a que es dissociïn els teixits (agitació: 330).

4. Reuniu el contingut de tots els tubs en una ampolla. Amb l'ajuda d'un embut i quatre capes de gasa, filtreu tot l'homogenat i repartiu-lo en parts iguals entre tots els tubs falcon rotulats. Si el teixit és muscular, és preferible no filtrar-lo; com a molt es pot fer passar per una xeringa.

5. Llegiu l'absorció a 550 nm d'una alíquota d'una de les fraccions en una dilució 1:2 (Una OD₅₅₀ de 1 U equival a 4x10⁸ cèl·lules per ml) per tenir una idea aproximada del nombre de cèl·lules que hi ha a les fraccions. Caldrà aproximadament 10⁹ cèl·lules per mostra a analitzar.

6. Afegiu la quantitat adequada de SBF a cada fracció per a obtenir una concentració final del 10% (2 ml/20 ml) i barregeu per començar l'experiment.

7. Seguiu les condicions per a cada tipus de mostra en els diferents incubadors. Les principals variants possibles són:

1. Control a 39-40°C, 2 hores
2. Control a 39-40°C, 4 hores
3. Control a 39-40°C, 2 hores amb Aspirina
4. Control a 39-40°C, 2 hores més 2 hores amb Actinomicina D
5. Heat Shock 46°C, 2 hores
6. Heat Shock 46°C, 2 hores amb Aspirina
7. Heat Shock 46°C, 2 hores més 2 hores amb Actinomicina D a 46°C

- L'Aspirina s'afegeix a raó de 18 mg per mostra de 10 ml (concentració final de 10 mM). S'afegeix sòlida i s'intenta dissoldre al màxim agitant vigorosament.

- L'Actinomicina D s'afegeix a raó de 5 µl per mostra de 10 ml (concentració final de 1 µg/µl).

Acabat els temp d'incubació, la mostra es processa d'immediat seguint el darrer punt d'aquest protocol.

8. Centrifugueu cada mostra a 1000 xg (4000 rpm a la centrifuga clínica) durant 5 minuts. Decanteu i afegiu un mililitre de la solució de processat corresponent. Per trencar el sediment es fa passar diverses vegades per una xeringa amb agulla i es posa en un tub Falcon net. Es guarda l'homogenat a -20°C O/N i l'endemà es continua amb el protocol de processament corresponent (la congelació-descongelació facilita l'aïllament del RNA). A continuació es fa el gel, la transferència i la Hibridació Northern amb la sonda específica.

3.7.3. ANÀLISI DE LA DISTRIBUCIÓ DE mRNA EN FRACCIONS DE POLISOMES I EN COMPLEXES RIBONUCLEOPROTEICS

En aquest protocol es separen els diferents mRNA de la cèl·lula segons estiguin units o no als polisomes (és a dir, estiguin traduïnt-se activament). Permet, doncs, fer un anàlisi funcional de l'activitat de la cèl·lula en una situació concreta. Amb l'ajut d'un gradient s'obtenen diferents fraccions separades segons el tamany: els complexos mRNA-polisomes són més pesats i es troben en les darreres fraccions, mentre que els mRNA lliures surten ja a les primeres fraccions. Primer es fabrica el gradient, després s'extreu el teixit i s'obté el RNA amb l'ajut d'un tampó específic que no destrueix els complexos amb polisomes, i finalment es carrega el RNA en el gradient. Un cop centrifugat, el mRNA s'ha repartit en el gradient segons el seu tamany. Només cal anar recullint per ordre les capes del gradient i separar-les en diferents tubs.

Una variant del procediment usarà EDTA en el tampó i la sacarosa. La presència d'EDTA fa que els complexos polisòmics es separin. La comparació dels resultats obtinguts amb l'experiment i sense EDTA permeten comprovar si el que s'ha identificat com a polisomes en el primer realment ho són (desapareixen cap a l'esquerra en el segon).

Material

Formador de Gradients, Tub Tycon, Receptacles comunicants per a la sacarosa, Agitador magnètic, Ultracentrífuga Beckman (Rotor SW28 i buckets, refredats prèviament a 4°C), Centrífugues a 4°C (de tubs de 1'5 i de 30 ml), Homogenitzador de vidre amb èmbol de Teflon tipus B, Taladrador Black&Decker amb transformador (a 20V).

Tubs eppendorf de 1'5 ml tractats, Tubs Nalgene (3148-0050) tractats i autoclavats, Tubs Beckman d'Ultracentrífuga Polylalomer (14x89 cm), Tubs Cornig 15 ml. Sacarosa, Tampó d'Homogenització, Tritó N-101.

Solucions

1- Sacarosa (15% i 50%)

K Cl Tractat 1M	5 ml (100 mM)
Mg Cl ₂ Tractat 0.5M	25 µl (3 mM)
HEPES Tractat 0.2 M pH 7.5	0.5 ml (20mM)
Sacarosa (15% o 50%)	8 o 21.5 g
<i>Enraseu fins a 50 ml de cada concentració amb H₂O tractada. Guardeu a -20°C.</i>	
<i>Abans d'usar, aliquoteu la quantitat que es farà servir i afegiu:</i>	
Heparina	1 mg/ml
DEPC	0.2 µl/ml

Variant amb EDTA: cal afegir

EDTA Tractat 0.5 M (pH 8)	3 ml (30mM)
---------------------------	-------------

2. Tampó d'Homogenització

K Cl Tractat 1M	5 ml(100 mM)
Mg Cl ₂ Tractat 0.5M	1ml (10 mM)
HEPES Tractat 0.2 M pH 7.5	0.5 ml(20mM)
<i>Afegiu aigua tractada fins a 50 ml. Guardeu a 4°C Just abans d'usar, aliquoteu la quantitat necessària (uns 5 ml) i afegiu:</i>	
Heparina	1 mg/ml
Cicloheximida	90 µg/ml

Variant amb EDTA: cal afegir

EDTA Tractat 0.5 M (pH 8)	3 ml (30mM)
---------------------------	-------------

Mètode

Abans que res, cal preparar les dissolucions a partir dels stocks tractats i tractar amb DEPC tot el material que s'usarà. Per a netejar els tubs de Tycon es fan passar pel circuit uns 25 ml de les següents dissolucions: NaOH 0.1M (es deixa després 10 minuts en repòs amb l'Na OH dins), EDTA 1mM i Aigua tractada.

És recomanable usar un tub per a la formació i un per a la recollida del gradient, i canviar-los sovint.

Abans de començar l'experiment, poseu a refredar el rotor i els *buckets* de la ultracentrifuga i engegueu l'aparell. Prepareu les alíquotes de les dissolucions necessàries i afegiu el que falti.

A) Formació del Gradient

1. Amb les claus de pas tancades, ompliu el receptacle de l'esquerra amb la sacarosa de baixa concentració (7 ml). Obriu la clau de pas de l'esquerra lleugerament, fins que s'ompli el tubet que comunica els dos receptacles, i tanqueu-la de nou. Assegureu-vos que no ha quedat ni una bombolla d'aire en el tubet. Amb una pipeta, traieu tota la sacarosa que hagi passat al segon receptacle.

2. Ompliu el receptacle de la dreta (que conté l'agitador magnètic) amb la sacarosa de 50% (7 ml). Engegueu l'agitador.

3. Engegueu l'aparell. Poseu la velocitat (*Speed*) entre 1 i 2. Amb les posicions *Up* i *Down* del control de la dreta aconseguiu que la sonda es dipositi just a la interfase del tub *Beckman* amb la capa de sacarosa, mentre el control de l'esquerra segueix en *off*.

5. Obriu la clau del receptacle de la dreta. Poseu el Formador en el mode *Deposit* (control de l'esquerra del Formador). Quan tot l'aire que hi havia al circuit hagi sortit i la sacarosa concentrada comenci a dipositar-se en el tub, obriu la clau del receptacle de l'esquerra per a que la sacarosa de baixa densitat comenci a diluir la més concentrada. Simultàniament, poseu el control de la dreta del Formador en la posició *Up*. La sacarosa, progressivament més diluïda, s'anirà dipositant mentre la sonda puja lentament per mantenir-se sempre a la interfase. El procés tardarà uns 10-15 minuts a formar 10 ml que és el total que ha de tenir el gradient.

Guardeu el gradient a 4°C durant un mínim d'una hora abans d'usar-lo. Cal traslladar-lo sempre amb cura per a que no s'agiti.

B) Obtenció del mRNA

1. Extraieu el teixit d'interés de l'animal i homogenitzeu ràpidament 1g de teixit en 5 ml del Tampó, deu passis per l'homogenitzador connectat a un taladrador.

2. Repartiu l'homogenat en tubs eppendorf. Centrifugueu els tubs 5 minuts a 5000xg a 4°C.

3. Ajunteu el sobrenedants en un sol tub *Cornig* de 15 ml i afegir 40 µl/ml de Tritó N-101 al 12'5% .

Es pot guardar a -80°C tot el temps que calgui fins al moment de carregar-lo al gradient.

C) Distribució del mRNA en el gradient

1. Dipositeu suaument 1ml del sobrenedant sobre el gradient acabat de formar amb una pipeta de 1 ml, recolzant-la a la paret del tub i procurant no crear turbulències.

2. Prepareu un tub Beckman amb Sacarosa (o bé amb un altre gradient o amb aigua amb sal) per a fer de contrapès. Poseu els tubs dins dels *buckets* de la ultracentrífuga. Iguaieu els pesos dels dos tubs amb l'ajut d'una balança. Tanqueu els *buckets*.

3. Centrifugueu el tub 110 minuts a 105.000 xg a 4°C (ultracentrífuga Beckman: 28.000 rpm, acceleració: 1, desacceleració: 0).

El mRNA es distribuirà en el gradient segons el seu pes. La fracció unida als polisomes quedarà a la zona de més concentració de sacarosa.

D) Recol·lecció de les fraccions

1. Prepareu 7 tubs *Nalgene* de 30 ml, numerats de l'1 al 7 per a recollir diferents fraccions del gradient. Canviar el tub de Tycon pel de recollida.

3. Un cop acabada la centrifugació, torneu a posar el tub amb el gradient i la mostra al Formador de Gradients, apagat. Poseu la sonda a la interfase pel mateix procediment d'abans.

4. A l'extrem del tub per on sortirà la mostra, col·loqueu el tub numerat amb l'1. Engagar l'aparell amb els controls a *Remove* i *Down* i la velocitat entre 1 i 2. La mostra passarà del tub amb el gradient fins el tub numerat mentre la sonda baixa lentament.

5. Quan el líquid arribi al nivell de 1.5 ml, canvieu el tub pel segon, i així successivament fins arribar al darrer. D'aquesta forma es separaran els diferents mRNA segons a la fracció del gradient on es troben. Guardar els tubs ja plens en gel.

6. Afegiu 3 ml de la solució d'extracció de RNA a cada tub. Barregeu usant una pipeta i una punta. Seguiu el protocol corresponent.

Amb el mRNA de cada fracció després es faran anàlisis per Hibridació Northern, per veure en quina fracció està el missatger del gen que ens interessa.

3.8. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES

3.8.1. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES TOTALS A PARTIR DE TEIXITS

Amb aquest sistema obtenim totes les proteïnes de la cèl·lula. És un sistema ràpid, simple i molt efectiu, que té com a principal problema que no permet la quantificació de les mostres perquè el tampó amb el qual acaben no permet la lectura espectrofotomètrica.

Material

Homogenitzador mecànic, Sonicador. Tampó de Mostres.

Solucions

1- Tampó d'Homogenització		2- Tampó de Mostres (2xSDS)	
Tris Cl pH 7.5	10 ml (50mM)	4x Tris Cl/SDS pH 6.8	2.5 ml
EDTA	2 ml (5 mM)	Glicerol	2 ml
Aigua	Fins a 200 ml	SDS (10%)	4 ml
		DTT	0.31 g
		Blau de Bromofenol	2 mg
		H ₂ O	Fins a 10 ml
		<i>Guardeu a -20°C (màxim 6 mesos).</i>	

Mètode

1. Obtingueu el teixit d'interès; agafeu-ne una petita quantitat. Poseu-lo en un eppendorf. Poseu-lo en gel i afegiu-hi uns 500 µl del tampó de mostres.
3. Soniqueu 30 segons l'homogenat a màxima potència mantenint el tub en gel, per assegurar la destrucció de les cèl·lules.
4. Escalfeu a 100°C durant cinc minuts. Poseu en gel.
5. Carregueu 2-20 µl de la mostra en un gel per a realitzar l'electroforesi segons el protocol corresponent. És convenient fer un gel de prova amb diferents volums de la mostra per a veure quin té la quantitat de mostra més semblant al que necessitem (uns 30-50 µg).

3.8.2. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES CITOSÒLIQUES A PARTIR DE TEIXITS

Amb aquest sistema obtenim per centrifugació les proteïnes del citoplasma de la cèl·lula, separant-les de les nuclears. L'avantatge respecte l'anterior és que es pot quantificar la mostra abans de carregar.

Material

Homogenitzador mecànic, Sonicador, Ultracentrífuga Beckmann a 4°C, buckets, rotor SW28, Espectrofotòmetre. Tubs Corning de 50 ml, Tubs Beckmann polyallomer.

Tampó d'Homogenització, Tampó de Mostres, Kit Bio Rad Proterin Assay (quantificació).

Solucions

1- Tampó d'Homogenització

Tris Cl ph 7.5	10 ml (50mM)
EDTA	2 ml (5 mM)
Aigua	Fins a 200 ml
Guardeu a 4°C.	

2- Tampó de Mostres (2xSDS)

4x Tris Cl/SDS pH 6.8	2.5 ml
Glicerol	2 ml
SDS (10%)	4 ml
DTT	0.31g
(o β-Mercaptoetanol 0.5 ml)	
Blau de Bromofenol	0.01 mg
H ₂ O	Fins a 10 ml
Guardeu a -20°C (màxim 6 mesos).	

Mètode

1. Obteniu el teixit d'interès i pesa-lo. Poseu-lo en un tub Corning de 50 ml. Poseu-lo en gel.
2. Afegir-hi 10 volums del tampó d'homogenització i homogenitzeu acuradament amb l'homogenitzador mecànic mantenint el tub en gel.
3. Soniqueu 30 segons l'homogenat a màxima potència mantenint el tub en gel, per assegurar la destrucció de les cèl·lules.
4. Centrifugueu la mostra 40 minuts a 26.500 rpm (125.000 g) a 4°C a l'Ultracentrífuga.

5. Agafeu el sobrenadant i quantificar-lo. Aliquoteu uns 30 μg , i dissoldre'ls en Tampó de Mostres (volum total: 20-30 μl).

6. Escalfeu a 100°C durant cinc minuts i carregueu la mostra en un gel per a realitzar l'electroforesi segons el protocol corresponent.

Per a quantificar les proteïnes:

1. Prepareu dues dilucions diferents: 1-5 μl de mostra, 200 μl de *Bio-Rad protein Assay* i 800 μl d'aigua. Prepareu un blanc sense mostra.

2. Llegiu l'absorbància a 595 nm (llum de Wolframi) de les dues dilucions.

3. Compareu els resultats en una corba estàndard en paper mil·limetrat (preparada a partir dels reactius subministrats en el kit de Bio-rad) i feu la mitjana. Feu els càlculs adients per saber quants μg hi ha en cada μl .

3.9. GELS D'ELECTROFORESI I TRANSFERÈNCIES DE PROTEÏNES

3.9.1. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES EN MINI-GELS D'UNA SOLA CONCENTRACIÓ

L'electroforesi d'una dimensió en gels desnaturalitzants (per exemple, en presència del 0'1% SDS) permet la separació de proteïnes basant-se en el seu pes molecular i en la seva migració a través del gel de poliacrilamida en direcció a l'ànode. Després de la solubilització de les proteïnes mitjançant ebullició en presència de SDS i 2-mercaptoetanol (2-ME) o ditiotreitòl (DTT) per reduir les proteïnes (per ruptura dels enllaços disulfur) la mostra de proteïnes s'aplica al pou del gel i durant l'electroforesi les proteïnes són separades individualment segons la grandària.

Material

Sistema d'electroforesi vertical per a minigels (X Cell II Mini-Cell, NOVEX), Font elèctrica, Bany a 70 o 100°C, Minigels de poliacrilamida (NOVEX #LC2676), Ganivet de gels, Xeringa plàstic (5-10 ml) i agulla.

Tampó de mostres, Tampó d'electroforesi.

Solucions

1- 4x Tris Cl/SDS pH 6'8

TRIS 91 g

Disoleu en 300ml H₂O.

Equilibreu el pH. Enraseu a 500ml. Filtreu-ho.

SDS 2g

Es pot guardar a 4°C durant un mes.

2- Tampó de Mostres (2xSDS)

4x Tris Cl/SDS pH 6.8 2.5 ml

Glicerol 2 ml

SDS (10%) 4 ml

DTT 0.31 g

(o β-Mercaptoetanol 0.5 ml)

Blau de Bromofenol 0.01 mg

H₂O Fins a 10 ml

Guardeu a -20°C (màxim 6 mesos).

3- Tampó d'Electroforesi (10x)

Tris 29 g

Glicina 144 g

SDS 10g

H₂O Fins a 1000 ml

Mètode

1. Traieu de la bossa de plàstic el cassette que conté el minigel. Netegeu-lo amb aigua destil·lada per eliminar el tampó.

2. Traieu la cinta adhesiva de la part inferior del gel i la pinta de la part superior amb cura. Marqueu la base dels pous amb un rotulador.

3. Munteu el minigel en el sistema segons les instruccions de l'aparell. En el cas de que s'utilitzi només un gel, cal substituir el segon per una placa de plàstic quadrada (inclosa en el sistema).

4. Ompliu la càmera superior fins al màxim amb el tampó d'electroforesi. Comproveu que no passi tampó cap a la càmera inferior Ompliu la càmera inferior fins la meitat.

5. Renteu els pous del minigel usant una xeringa amb el mateix tampó d'electroforesi. Assegureu-vos que no queden bombolles d'aire en els pous.

6. Afegiu un volum igual de tampó de mostres a la mostra de proteïnes que volem analitzar (30-40 μg , en un volum final total de 20 μl). Escalfeu a 70 °C durant 10 minuts (o a 100 °C durant 3-5 minuts). Poseu les mostres en gel si no es procedeix immediatament a carregar-les.

7. Carregueu el gel amb el marcador (10 μl) i les mostres. Connecteu el sistema d'electroforesi. En el cas dels gels Tris-Glicina-SDS, escolliu un voltatge constant de 125 V. Atureu l'electroforesi quan el colorant arribi al final del gel (entre 90 i 120 minuts).

8. Una vegada finalitzada l'electroforesi, desmunteu el sistema. Separeu cadascuna de les dues plaques de plàstic del cassette pels tres costats amb l'ajut d'un ganivet de gels, fent una lleugera presió amunt i avall fins que ambdues plaques quedin totalment separades. Traieu el minigel de la placa amb compte de no trencar-lo.

9. Useu el gel en el protocol de tinció o transferència a una membrana.

3.9.2. TINCIÓ DE GELS DE PROTEÏNES AMB COMASSIE

La detecció de les bandes de proteïna en un minigel es fa per tinció, i depèn de la unió no específica del colorant blau de Coomassie (*Coomassie brillant blue R*) amb les proteïnes. El límit de detecció és de 0'3 a 1 µg per banda de proteïna. Les proteïnes separades en un gel de poliacrilamida són precipitades amb metanol i àcid acètic i es detecta la posició mitjançant la tinció. Un gel tenyit ja no serveix per al protocol de transferència.

Material

Cubetes, Agitador orbital, Assecador de gels amb buit. Paper Whatman 3MM.

Solució de Tinció Coomassie, Solució d'Aclariment, Bossetes destenyidores (opcional).

Solucions

1- Solució de Tinció Coomassie

Metanol	225 ml (50%)
Coomassie Blue	0.25 g (0.25%)

Cal dissoldre bé abans d'afegir la resta de components. Filtreu amb paper de filtre.

Àcid Acètic	50 ml (10%)
H ₂ O	fins a 500 ml

Guardeu màxim 6 mesos.

2- Solució d'Aclariment

Àcid Acètic	75 ml (7'5%)
Metanol	50 ml (5%)
H ₂ O	fins a 1 l

Mètode

1. Poseu el gel en una cubeta amb 3-5 vegades el seu volum de Solució de Tinció de Coomassie (uns 75 ml). Incubeu 5-10 minuts en suau agitació orbital a temperatura ambient.

2. Canvieu la solució per la d'Aclariment. Feu tres rentats de 15 minuts en iguals condicions d'agitació, canviant la solució d'Aclariment cada vegada.

4. Canvieu un cop més la solució d'Aclariment. Opcionalment es pot afegir una bosseta destenyidora en aquest rentat final. Deixeu en agitació fins que el fons blau desaparegui i només quedin marcades les bandes (des d'unes hores a tota la nit).

5. Emboliqueu el gel amb SaranWrap o poseu-lo entre dues fulles de cel·lulosa. Poseu el conjunt entre dues fulles de paper Whatman 3MM i assequeu al buit a 80°C durant 1-2 hores en un assecador de gels. O bé, guardar el gel en solució d'Aclariment procurant que sempre estigui humit.

3.9.3. TRANSFERÈNCIA D'UN GEL DE PROTEÏNES A UNA MEMBRANA (WESTERN)

La transferència de les proteïnes d'un gel a una membrana es fan pels mateixos motius que en el cas del RNA. Aquest cop la transferència es fa amb l'ajut d'un corrent elèctric.

Material

Sistema de transferència Novex (esponges, caset, cubeta...), Font d'Electroforesi, Cubetes.

Kit Novex (Membrana PVDF i Paper Whatman 3MM), Pipeta pasteur, Tampó de Transferència, Metanol.

Solucions

1-Tampó de Transferència (x10)

TRIS	14'5 g (12 mM)
Glicina	72 g (96mM)
Metanol	200 ml (20%)
H ₂ O	Fins a 1 l

Mètode

1. Humitegeu la membrana submergint-la en Metanol uns segons, fins que es torni translúcida. Equilibreu-la 2-3 minuts en tampó de transferència. Useu-la immediatament.

2. Munteu el sistema de transferència en el caset (de càtode a ànode):

- Suport (caset)
- Esponja (ben empapada en Tampó de Transferència) x2
- Paper de filtre (humit en Tampó de Transferència)
- Gel (eliminar bombolles d'aire entre el gel i el paper passant una pipeta; mullar l'altra superfície amb tampó de transferència)
- Membrana
- Paper de Filtre (humit en Tampó de Transferència; eliminar bombolles)
- Esponja (ben empapada en Tampó de Transferència) x2
- Suport (caset)

3. Poseu el sistema a la cubeta d'Electroforesi i omplir el receptacle interior amb Tampó de Transferència just una mica per sobre les esponges. Ompliu el receptacle exterior amb aigua fins la meitat aproximadament.

4. Deixeu transferir a 30V durant 60-120 minuts.

5. Quan es desmonti el sistema, marqueu la cara de la membrana que conté les proteïnes (la que estava en contacte amb el gel). La membrana es pot tenyir (Coomasie, etc) o bé usar en el protocol d'Immunodetecció. També es pot guardar seca (posar-la en un paper de filtre i deixar-la secar a temperatura ambient) fins el moment d'usar-la; mulleu-la llavors amb metanol durant uns segons i seguïu el protocol corresponent.

3.10. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES AMB ANTICÒS ESPECÍFIC: SISTEMA DE LA PEROXIDASA

La hibridació de les proteïnes es fa directament amb anticossos específics comercials. L'anticòs s'uneix a la proteïna que volem estudiar, que es troba transferida a la membrana. Aquest mètode detecta de forma no radioactiva els punts on s'han unit anticòs i proteïna. El protocol també es divideix en dues fases, la unió de l'anticòs al seu substrat específic i la detecció d'aquesta unió.

Material

Cubetes, Agitador orbital, Caset i pel·lícules.

Kit Western Blotting ECL (Anticòs Secundari, Reactius de Detecció), Anticòs primari específic, TTBS, Tampó de Blocking.

Solucions

1- TTBS

Tris Cl pH 7.5	100 mM (100 ml/l)
NaCl	0.9 % (9g/l)
Tween 20	0.05% (450 µl/l)

Guardeu a 4°C

(Alternativament: useu el TBS x 10 de Bio Rad com a solució d'stock, i afegiu-li el Tween)

2- Tampó de Blocking

Llet desnatada en pols	0.5 g (5%)
TTBS	10 ml

Mètode

A) Unió a l'anticòs

1. Humitegeu la membrana amb TBS. Incubeu la membrana a temperatura ambient durant 60 minuts en una cubeta amb 10 ml de Tampó de Blocking (acabat de preparar) amb agitació suau.

2. Renteu 15 minuts amb TTBS a temperatura ambient amb agitació suau. Feu dos rentats addicionals amb TTBS de 5 minuts cadascun.

3. Diluïu l'Anticòs Primari, segons la concentració requerida, en 10 ml de TTBS.

Incubeu la membrana amb l'anticòs com a mínim 1 hora (fins a O/N) a temperatura ambient amb agitació suau.

4. Renteu la membrana 1 x 15 minuts i 2 x 5 minuts amb TTBS, per eliminar l'anticòs no unit.

5. Diluïu 1-2 μ l de l'Anticòs Secundari (monoclonal o policlonal segons l'origen de l'Anticòs Primari) en 10 ml de TTBS.

Incubeu la membrana amb l'anticòs de 30 a 60 minuts, a temperatura ambient amb agitació suau.

6. Renteu la membrana 1 x 15 minuts i 4 x 5 minuts amb TTBS.

B) Detecció

1. Barregeu 1 ml de cadascun dels dos reactius de Detecció (0'125 ml per cada cm^2 de membrana). Traieu la membrana del tampó i elimineu l'excés de líquid posant-la sobre un paper de filtre.

2. Incubeu la membrana amb els reactius de detecció, amb suau agitació durant 1 minut.

3. Elimineu l'excés de líquid posant la membrana entre Saran Wrap o paper de transparències.

4. Exposeu la membrana a una pel·lícula durant 0'5-10 minuts. Repetiu les exposicions variant els temps, fins veure les bandes amb la intensitat desitjada.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. SEQÜÈNCIA DEL mRNA DE LA PROTEÏNA α B-CRISTAL·LINA EN TESTICLE DE GALL

Els primers passos dels nostres experiments van estar dirigits a determinar la seqüència dels missatgers del gen de la proteïna α B-cristal·lina. Per a aquesta finalitat s'obtingueren Primeres Cadenes (cDNA) a partir del mRNA del testicle de gall de 6, 10 i 25 setmanes, i també d'embrió de pollastre de 6 dies.

4.1.1. Caracterització de l'extrem 5'

Vam fer una amplificació per PCR de les Primeres Cadenes usant els *primers* dissenyats a partir de la seqüència publicada (85) del transcrit d' α B-cristal·lina que estava caracteritzat en el cristal·lí de gall:

BCD1 (*down*, direcció de 3' a 5'): CTCTGACTCCTGCAGGTGCT

BCD2 (*down*, direcció de 3' a 5'): CTCCAGTCGCATCTCCGAGAGTCC

El nostre objectiu era delimitar primer la regió 5' dels transcrits i seqüenciar-la. Com a *primer* en direcció *up* (de 5' a 3') es va usar un de comercial específic per a l'extrem més 5' de la Primera Cadena, per tal que s'amplifiqués tota la regió 5' dels missatgers, fos o no fos semblant a la publicada.

Les amplificacions es feien primer amb BCD2 i el comercial, i després s'agafava el producte resultant i s'amplificava de nou, aquest cop amb BCD1 i el comercial. El *primer* BCD2 està en una posició més 3' que el BCD1, que està només uns 100 nucleòtids dins la regió codificant [vegeu Figura 8]. D'aquesta manera asseguràvem que el que anàvem a seqüenciar correspondria sense dubte al transcrit de l' α B-cristal·lina.

Vam començar usant tots els quatre tipus de Primeres Cadenes que teníem, però les que donaven els resultats més clars eren les de testicle immadur de 6 setmanes, i són les que vam usar preferentment. Algunes de les seqüències descrites a continuació han estat també seqüenciades a partir de les primeres cadenes d'embrió per a confirmar els resultats.

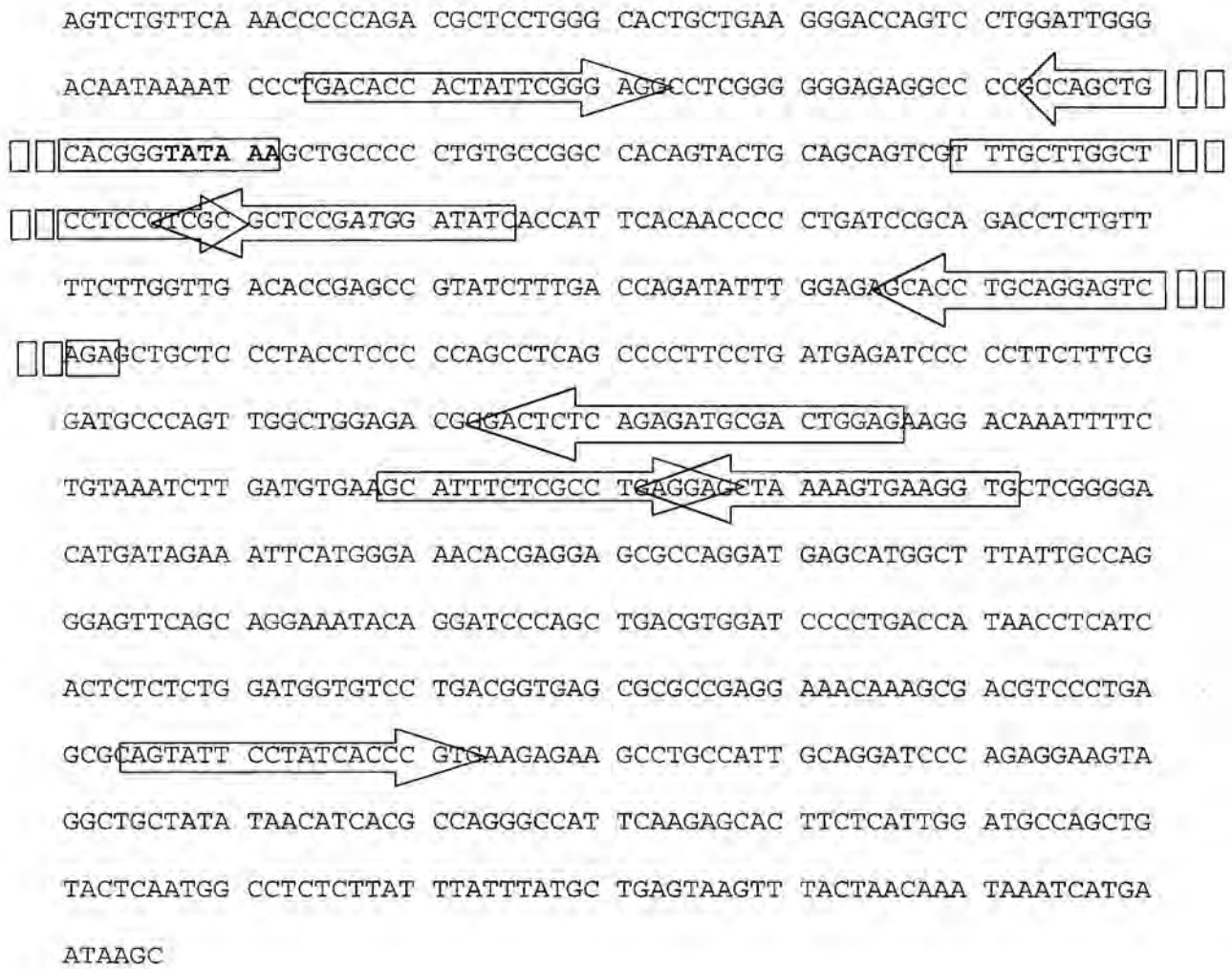


Figura 8. Disposició dels primers en la seqüència descrita per nosaltres del cDNA de l' α B-cristal·lina.

En groc, els primers en direcció 5' a 3' (up) que són, per ordre: BC51U, BC5U, BCCU, BCU3. BCU està basat en la seqüència de la regió 5' publicada anteriorment. BC3LU es troba a la regió 3' llarga publicada anteriorment.

En verd, els primers en direcció 5' a 3' (up) que són, per ordre: BCDTB, BC5D, BCD1, BCD2, BCID. BC3LD es troba a la regió 3' llarga publicada anteriorment.

Després de les dues amplificacions descrites, sorprenentment vam obtenir dues bandes molt clares de cDNA (enlloc d'una, com esperàvem), una propera a 200 nucleòtids i l'altra propera a 400. Totes dues havien de correspondre als trànscrips de l' α B-cristal·lina, tal i com havíem dissenyat els experiments, però havíem de veure perquè eren diferents. Les vam aïllar per separat i les vam clonar. Vam seqüenciar després diferents clons en les dues direccions, per a assegurar que la lectura era correcta.

La banda més petita corresponia a la grandària de la seqüència publicada de cristal·lí de gall, començant uns nucleòtids abans de l'ATG i continuant uns 150 nucleòtids dins la regió codificant. Aquesta curta regió 5', de només 19 nucleòtids, però, era radicalment diferent a la publicada. Per l'altre costat, la banda més gran corresponia a un tros de la regió 5' anterior a l'ATG, que incorporava la TATA box i tenia una mida de 196 nucleòtids, molts més que no els publicats. Els darrers 19 nucleòtids eren els mateixos de la forma petita. [vegeu Figura 7]

Ambdues bandes seguien després de la seva regió 5' amb el mateix tros de la regió codificant. Això indicava que hi havia dos inicis de transcripció diferents, un d'ells degut a un promotor anterior que incloïa la transcripció de la TATA box i que donava com a resultat una regió 5' més llarga.

4.1.2. Caracterització de la regió codificant i l'extrem 3'

Comparant homologies amb els bancs de dades, el tros de la regió codificant que tenien tant la banda de 200 com la de 400 presentava una diferència d'una base amb la seqüència de l' α B-cristal·lina de cristal·lí de gall ja publicada. Totes les comprovacions que vam fer confirmaven aquest resultat.

El següent pas va ser provar de seqüenciar tota la regió codificant dels trànscrips per veure si hi havia alguna diferència més. Com que els trànscrips amplificats amb els *primers* BCD1-BCD2 i el comercial a l'extrem 5' només donaven una regió codificant d'uns 150 nucleòtids, vam amplificar aquest cop les Primeres Cadenes primer amb un *primer* específic a la regió 5' en direcció *up* (BCU51U) i un de comercial inespecífic a la regió 3' (PolidT) en direcció contrària, i després vam amplificar aquest producte amb un *primer* més cap a la regió 3' (BC5U) i el mateix *primer* inespecífic. D'aquesta manera havia d'aparèixer tota la regió codificant i la 3'

```

1   AGTCTGTTCA AACCCCCAGA CGCTCCTGGG CACTGCTGAA GGGACCAGTC CTGGATTGGG
61  ACAATAAAAT CCCTGACACC ACTATTCGGG AGGCCTCGGG GGGAGAGGCC CCGCCAGCTG
121 CACGGGTATA AAGCTGCCCC CTGTGCCGGC CACAGTACTG CAGCAGTCGT TTGCTTGGCT
181 CCTCCGTCGC GCTCCGATGG ATATCACCAT TCACAACCCC CTGATCCGCA GACCTCTGTT
      M D I T I H N P L I R R P L F
241 TTCTTGGTTG ACACCGAGCC GTATCTTTGA CCAGATATTT GGAGAGCACC TGCAGGAGTC
      S W L T P S R I F D Q I F G E H L Q E S
301 AGAGCTGCTC CCTACCTCCC CCAGCCTCAG CCCCTTCCTG ATGAGATCCC CCTTCTTTCC
      E L L P T S P S L S P F L M R S P F F R
361 GATGCCCAGT TGGCTGGAGA CGGGACTCTC AGAGATGCGA CTGGAGAAGG ACAAATTTTC
      M P S W L E T G L S E M R L E K D K F S
421 TGTAATCTT GATGTGAAGC ATTTCTCGCC TGAGGAGCTA AAAGTGAAGG TGCTCGGGGA
      V N L D V K H F S P E E L K V K V L G D
481 CATGATAGAA ATTCATGGGA AACACGAGGA GCGCCAGGAT GAGCATGGCT TTATTGCCAG
      M I E I H G K H E E R Q D E H G F I A R
541 GGAGTTCAGC AGGAAATACA GGATCCCAGC TGACGTGGAT CCCCTGACCA TAACCTCATC
      E F S R K Y R I P A D V D P L T I T S S
601 ACTCTCTCTG GATGGTGTCC TGACGGTGAG CGCGCCGAGG AAACAAAGCG ACGTCCCTGA
      L S L D G V L T V S A P R K Q S D V P E
661 GCGCAGTATT CCTATCACCC GTGAAGAGAA GCCTGCCATT GCAGGATCCC AGAGGAAGTA
      R S I P I T R E E K P A I A G S Q R K
721 GGCTGCTATA TAACATCACG CCAGGGCCAT TCAAGAGCAC TTCTCATTGG ATGCCAGCTG
781 TACTCAATGG CCTCTCTTAT TTATTTATGC TGAGTAAGTT TACTAACA AA TAAATCATGA
841 ATAAGC

```

Figura 7. Seqüència del cDNA d' α B-cristal·lina obtingut a partir de testicle de gall immadur. Inclou la regió 5' més llarga de tots els trànscrips estudiats, tota la regió codificant (i la corresponent seqüència d'aminoàcids deduïda) i la regió 3' més curta. En negreta la TATA box (posició 127). En cursiva, l'inici de transcripció (ATG, posició 197). En un requadre, el senyal de poliadenilació (posició 829). Encerclada, la Isoleucina que és l'únic aminoàcid que canvia respecte la seqüència deduïda del cDNA publicat de cristal·lí de gall.

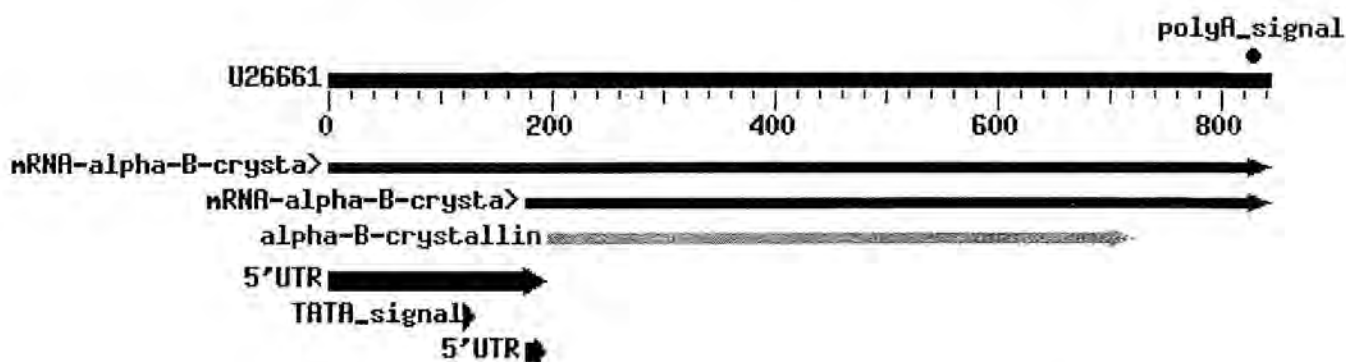


Figura 7. Representació esquemàtica de la seqüència anterior. En blau, les dues llargades de mRNA seqüenciats. En fúcsia la regió codificant. Les fletxes indiquen les dues llargades de la regió 5' i la posició de la TATA box.

```

AGTCTGTTCA AACCCCCAGA CGCTCCTGGG CACTGCTGAA GGGACCAGTC CTGGATTGGG ACAATAAAAT CCCTGACACC ACTATTTCGGG AGGCCTCGGG GGGAGAGGCC
      ↓
CGCCAGCTG CACGGGTATA AAGCTGCCCC CTGTGCCGGC CACAGTACTG CAGCAGTCGT TTGCTTGGCT CCTCCGTCGC GCTCCGATGG ATATCACCAT TCACAACCCC
      TCA---A---G AGCG
      T---CT---
      GCA GCA---C---CCA
CTGATCCGCA GACCTCTGTT TTCTTGGTTG ACACCGAGCC GTATCTTTGA CCAGATATTT GGAGAGCACC TGCAGGAGTC AGAGCTGCTC CCTACCTCCC CCAGCCTCAG
---G---
---C--- G---A---T---
CCCTTCCTG ATGAGATCCC CCTTCTTTTCG GATGCCCAGT TGGCTGGAGA CCGGACTCTC AGAGATGCGA CTGGAGAAGG ACAAATTTTC TGTAATCTT GATGTGAAGC
---A---
---G---
ATTTCTGCC TGAGGAGCTA AAAGTGAAGG TGCTCGGGGA CATGATAGAA ATTCTATGGGA AACACGAGGA GCGCCAGGAT GAGCATGGCT TTATTGCCAG GGAGTTCAGC
---A--- G---G---G---A---
AGGAAATACA GGATCCCAGC TGACGTGGAT CCCCTGACCA TAACCTCATC ACTCTCTCTG GATGGTGTCC TGACGGTGAG CCGCGCCGAGG AAACAAAGCG ACGTCCCTGA
---T--- T---G---A---T--- G---A---T--- T---A---G---T--- G---T--- T---C---
GCGCAGTATT CCTATCACCC GTGAAGAGAA GCCTGCCATT GCAGGATCCC AGAGGAAGTA GGCTGCTATA TAACATCAGC CCAGGGCCAT TCAAGAGCAC TTCTCATTGG
---C--- C---A---G---G---G---G---C---AG---C--- C---G---G---C---G---CA---
ATGCCAGCTG TACTCAATGG CCTCTCTTAT TTATTATGC TGAGTAAAGTT TACTAACAAA TAAATCATGA ATAAGC
---G---G---A---A---T---T---C---
T---G---A---T---A---

```

Figura 7. Comparació de la nostra seqüència amb les seqüències de cristal·lí de Gall (85), en blau, i d'Ànec (107), en vermell. El guió indica nucleòtid idèntic al nostre. La fleixa assenyala l'inici de la traducció. Subratllat, el triplet que codifica la isoleucina, l'únic aminoàcid que canvia respecte la seqüència deduïda del cDNA publicat de cristal·lí de gall. La seqüència de cristal·lí de Gall continua més enllà del final de l'extrem 3' de la nostra seqüència. El final de la seqüència de cristal·lí d'Ànec coincideix amb el de la nostra.

també, Assegurant-nos amb la doble amplificació, com havíem fet per la regió 5', no hi hauria dubte que es tractava d'un transcrit d' α B-cristal·lina.

BC51U: AGACGCTCCTGGGCACTGCT

BC5U: TTTGCTTGGCTCCTCCGTCGC

Els PCRs al final van donar un fragment d'uns 700 nucleòtids que vam passar a clonar i seqüenciar diverses vegades en els dos sentits. Per a seqüenciar vam usar dos *primers* (BCCU i BCU3) encara en posició més 3' que els altres dos que havíem usat en l'amplificació, per tal de poder arribar amb més facilitat a seqüenciar l'extrem 3'.

BCCU: GCATTTCTCGCCTGAGGAGC

BCU3: CAGTATTCCTATCACCCGTG

La seqüència que vam obtenir per a la regió codificant presentava certes diferències respecte la seqüència publicada (99% d'homologia), sobretot ala regió 5'. Això no representava cap canvi en la seqüència d'aminoàcids, exceptuant un sol cas (isoleucina per valina). Les homologies amb la regió codificant d'ànec, arribaven fins a un 94%. [vegeu *Figura 6*]

La regió 3' que vam obtenir era més curta que la publicada, però coincidia en tots els nucleòtids. Això ens indicava que els transcrits que havíem obtingut acabaven abans que els descrits. Vam trobar també transcrits amb la regió 3' més llarga, del mateix tamany que els publicats. Vam decidir no seqüenciar-los, perquè esperàvem similitut total amb els descrits.

En resum, la seqüència final caracteritzada del transcrit té una regió 5' d'uns 300 nucleòtids (en la forma llarga), una codificant d'uns 500 nucleòtids i una 3' de 600 nucleòtids (en la forma llarga, per bé que realment només n'hem caracteritzat uns 150) [vegeu *Figura 7*]. Tota la seqüència, incloent des del 5' més llarg al 3' curt, va ser comunicada al GeneBank/EMBL Data Library i va rebre el codi d'accés número U26661.

4.2. EXPRESSIÓ DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA EN GALL

Per a poder determinar l'expressió del gen ens calia hibridar el RNA obtingut de diferents teixits de gall amb sondes específiques. Vam començar, doncs, preparant tres sondes que reconeguessin les diferents regions d'interès de l' α B-cristal·lina [vegeu Figura 3]. Vam usar com a substrat les Primeres Cadenes de testicle immadur que havíem obtingut anteriorment. Amb aquestes hibridacions esperàvem detectar les diferents formes i quantitats relatives dels trànscrits de l' α B-cristal·lina en el gall.

4.2.1. Obtenció de sondes específiques

Per a la primera sonda vam usar dos *primers* construïts a partir de la seqüència descrita d' α B-cristal·lina de cristal·lí de gall, el BCU i el BCD1 (el mateix que ja havíem usat per a seqüenciar el cDNA). Entre tots dos delimiten la part més 5' de la regió codificant. BCU té tota la seva seqüència a la regió 5' [vegeu Figura 8]:

BCU: CCATCGGAGCGCGATGGATATCAC

Vam amplificar per PCR les Primeres Cadenes de testicle i d'embrió de gall amb els dos *primers*. Vam obtenir 3 bandes d'unes grandàries d'uns 200, 400 i 700 nucleòtids. Per assegurar-nos que no estàvem amplificant DNA genòmic o un altre gen i que totes tres bandes corresponien a l' α B-cristal·lina, vam usar també un segon *primer*, seguint el mateix procediment de doble amplificació que havíem usat en la seqüenciació. El *primer* era de nou el BCD2, en posició més 3' que el BCD. Això ens descartava també la seqüència del primer intró del gen [vegeu Figura 3] ja que BCD2 estava construït a partir de seqüències dels dos límits de l'intró (un fragment que tingués l'intró no podria hibridar amb una sonda construïda a partir d'aquest *primer*) [vegeu Figura 8].

Amplificant les Primeres Cadenes primer amb BCU i BCD2 ens asseguràvem que només s'amplificaria el cDNA, que no té intró. Després amplificàvem el producte d'aquest primer PCR amb els *primers* BCU i BCD1, per a que fos més específic. D'aquesta manera asseguràvem que les amplificacions eren selectives del cDNA de l' α B-cristal·lina.

Després de fer els dos PCRs descrits, vam escollir com a sonda la banda de grandària propera a 200 nucleòtids, i la vam seqüenciar per assegurar-nos. Ens

interessava més en aquest cas una sonda que contingués part de la zona codificant i no una que tingués més tros de la regió 5', com passava amb la banda de 400 que també apareixia en l'amplificació i que també vam seqüenciar. La banda de 200 nucleòtids, que seria la nostra sonda, sortia més clara al carril de les Primeres Cadenes de testicle de 6 setmanes d'edat i l'embrió. Al de 25 setmanes no en sortia gens. Vam construir la sonda específica, doncs, usant aquesta combinació de primers i la vam marcar. La vam anomenar Sonda Codificant.

Per a poder detectar la zona 5' a la hibridació, vam construir una sonda que fos específica de la regió 5' usant un nou primer, el BC5D, situat part a la regió codificant i la resta al final de la 5' [vegeu Figura 7].

BC5D: GATATCCGTCGGAGCGCGAC

Primer vam amplificar les Primeres Cadenes de testicle de 6 setmanes amb el primer BCD1 i un de comercial en direcció *up* (5' a 3') per tal de delimitar el producte incloent la regió 5' més llarga del cDNA. Després vam amplificar aquest PCR amb el BC5D i el mateix primer comercial. Així vam obtenir la sonda que vam anomenar Sonda 5' i que ens permetria diferenciar entre els trànscrips que tinguessin la regió 5' curta dels que tinguessin la més llarga.

Per a la regió 3', vam construir una sonda específica a partir de les Primeres Cadenes de testicle de 6 setmanes. Primer vam amplificar amb el primer BCU3 i un de comercial en direcció *down*, per tal que quedés inclosa tota la regió 3'. El producte d'aquest PCR va ser després amplificat de nou usant un primer en una posició més 3' (BC3LU), per tal d'assegurar el material, tal i com havíem fet a la regió codificant [vegeu Figura 7].

BC3LU: CACTTGAGACAAGGGAAGTG

Vam anomenar-la Sonda 3'.

Finalment, vam construir una sonda específica que incloïa el primer intró del gen (segons la seqüència descrita al banc). Ens havia de servir per descartar que algunes bandes més grans que hibridessin amb les altres sondes no continguessin també l'intró. Vam usar els primers BCID (situat al segon exó) i el BC5U (situat al final de la regió 5', que ja havíem usat a la seqüenciació) [vegeu Figura 7]. La regió delimitada era de 1700 nucleòtids. Vam anomenar-la Sonda Intró.

BCID: CACCTTCACTTTTAGCTCCTC

4.2.2. Expressió en diferents teixits de gall: la sonda codificant dóna dos tamanys de missatgers

Vam obtenir RNA total de diferents teixits de gall adult madur (cervell, ronyó, múscul i cor), així com de testicles de gall immadur (6 i 10 setmanes). El cristal·lí d'embrió de 17 dies ens serviria com a control, ja que la proteïna allà havia d'estar present en grans quantitats. Vam usar cristal·lí d'embrió i no de gall per ser més fàcil d'obtenir. Vam començar hibridant aquests materials amb la Sonda Codificant per delimitar totes les bandes de mRNA que corresponien a l' α B-cristal·lina.

En les primeres hibridacions amb aquesta sonda [vegeu Figura 9] s'observen diverses bandes de contorns poc delimitats d'unes mides aproximades de 0'9 kb i 1'2 kb, tal i com havia estat descrit anteriorment (89, 100). Apareixen a testicle immadur, cervell, ronyó, múscul, cor i cristal·lí d'embrió de gall. Aquestes bandes tenen diferents amplades i intensitats segons els teixits on es troben. A més a més, en alguns dels teixits (fetge i ronyó) està present una banda addicional de uns 2'8 kb.

Els nostres experiments anteriors amb la seqüenciació demostraven que hi havia dos llocs diferents d'inici de la transcripció, representats per les dues grandàries del trànscrip, l'un amb un 5' curt i l'altre amb un 5' més llarg. Aquesta dualitat d'extrems 5' s'havia de reflexar també a les hibridacions. Per altra banda, havíem trobat també trànscrips amb dues longituds de 3', un de curt que havíem seqüenciat i un de llarg de tamany igual al publicat. Combinacions de les diferents mides dels extrems podrien explicar una heterogeneïtat de bandes a les alçades més o menys de 700 (amb 5' i 3' curts), 1000 (amb 5' llarg i 3' curt), 1300 (amb 3' llarg i 5' curt) o 1600 nucleòtids (amb 5' i 3' llargs), amb una variació de fins a 200 nucleòtids més si comptàvem les cues de PoliA de diferents llargades que solen incorporar-se als missatgers. Podíem sospitar, doncs, que per algun motiu les bandes de 700 i 1000 es confonien entre elles, igual que les de 1300 i 1600, donant només dues taques amples a la hibridació.

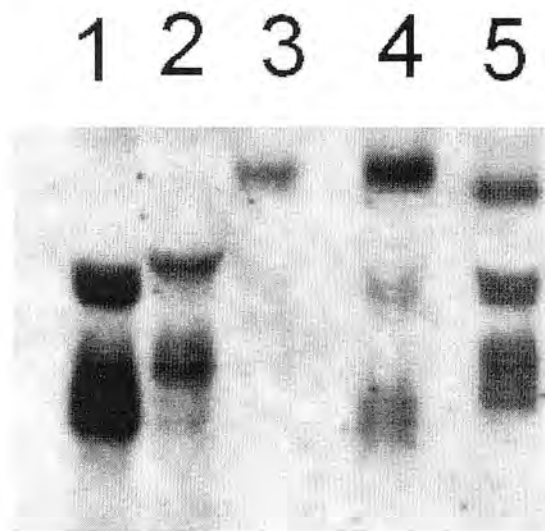


Figura 9. Hibridació de RNA de Teixits diversos de Gall amb la Sonda Codificant. Cervell (1), Cor (2), Fetge (3), Ronyó (4) i Testicle Immadur (5)

4.2.3. Les dues bandes són en realitat quatre mRNA de diferents llargades

Vam pensar que eliminant les cues de PoliA de diferents llargades, habituals en els trànscrips, amb l'ajut d'una Polimerasa H es podria suprimir part de l'heterogeneïtat que vèiem i resoldre el problema que teníem [vegeu Figura 10]. Efectivament, en els RNA tractats amb RNasa H s'observa que les dues bandes borroses es delimiten, desapareixent l'heterogeneïtat observada inicialment. Podem concloure així que la gran amplada de les bandes és deguda a l'alt grau de poliadenilació dels trànscrips.

En el lloc de les dues bandes apareixen després del tractament amb RNasa H fins a dues bandes per a cadascuna de les alçades conegudes inicialment (0'9 i 1'2 kb) a múscul, cor, ronyó i testicle. Al cristal·lí d'embrió, en canvi, es segueix veient només una banda a cadascun dels pesos. [vegeu Figura 11] Hibridacions posteriors en embrions de 6 dies revelaren que també hi ha una sola banda a cadascuna de les dues grandàries.

Les mides de les quatre bandes, en els teixits en els quals eren presents, corresponien bastant bé a les mides teòriques que havíem descrit abans de 700, 1000, 1300 i 1600 nucleòtids. Això indicava que la diferència en la seva llargada segurament venia donada per les diferents llargades de les regions 5' i 3'.

4.2.4. Les sondes 5' i 3' ens permeten diferenciar entre les quatre bandes

Per demostrar definitivament la diferència de grandàries entre les quatre bandes vam hibridar els RNA amb les sondes específiques per a les regions 3' i 5'. Segons els nostres supòsits, dues d'elles havien de tenir regions 5' de diferents mides, i la Sonda 5' assenyalaria les que tenien el més llarg. Les altres dues podrien diferenciar-se per la regió 3', i la Sonda 3' separaria també les que tenien el 3' llarg de les que el tenien curt.

Les hibridacions van demostrar que el parell de bandes de 1'2 kb tenien la regió 3' llarga, mentre que les de 0'9 kb en tenien la versió més curta. A més, dintre de cada parell, la banda més gran tenia l'extrem 5' llarg i la més petita el curt [vegeu Figura 12]. La presència o absència dels dos extrems, doncs, donava tal i com

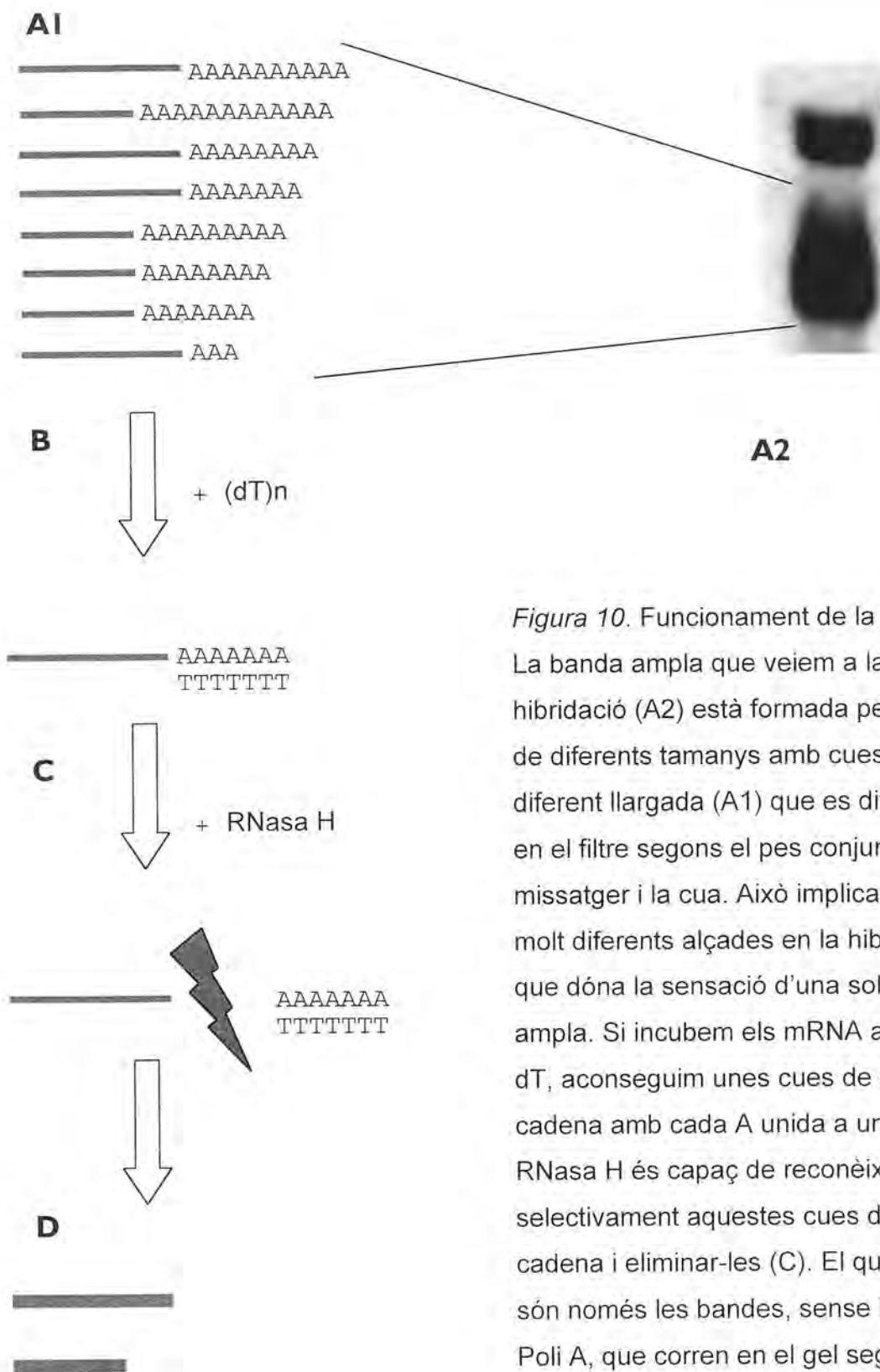


Figura 10. Funcionament de la RNasa H. La banda ampla que veiem a la hibridació (A2) està formada per mRNAs de diferents tamanys amb cues PoliA de diferent llargada (A1) que es distribueixen en el filtre segons el pes conjunt del missatger i la cua. Això implica bandes a molt diferents alçades en la hibridació, el que dóna la sensació d'una sola banda ampla. Si incubem els mRNA amb Poli dT, aconseguim unes cues de doble cadena amb cada A unida a un dT(B). La RNasa H és capaç de reconèixer selectivament aquestes cues de doble cadena i eliminar-les (C). El que queden són només les bandes, sense les cues Poli A, que corren en el gel segons la seva grandària real, agrupats en aquest cas només en dues alçades (D).

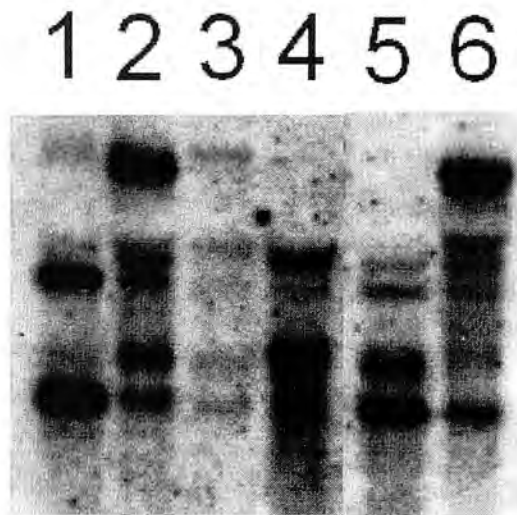


Figura 11. Hibridació amb la Sonda Codificant de RNA de Teixits diversos de Gall tractats prèviament amb RNasa H. Embrió de 6 dies (1), Testicle Immadur (6 setmanes) (2), Testicle Madur (26 setmanes) (3), Cor (4), Múscul (5) i Ronyó (6).

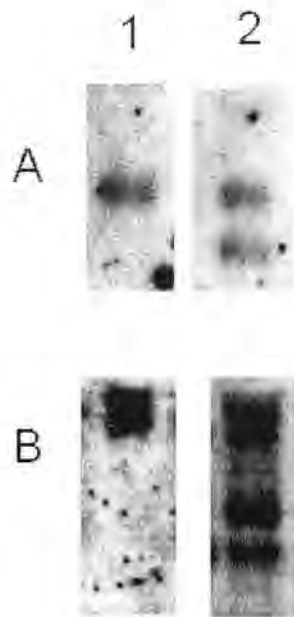


Figura 12. Hibridacions amb les Sondes específiques de les regions 5' i 3'.

- A. Hibridació amb al sonda de la regió 5' (RNA de Múscul de Gall). La Sonda 5' (1) només hibrida amb la banda superior de cadascuna de les parelles de bandes que es veuen en la hibridació amb Sonda Codificant (2).
- B. Hibridació amb la Sonda de la regió 3'(RNA de Testicle Immadur de Gall). La Sonda 3' (1) només hibrida amb la parella de bandes superiors, de les dues parelles de bandes que apareixen en la hibridació amb Sonda Codificant (2).

sospitàvem, quatre possibles combinacions, que segons la grandària, de més gran a més petita, tenien:

- 3' llarg/5' llarg
- 3' llarg/5' curt
- 3' curt/5' llarg
- 3' curt/5' curt

Així doncs, els diferents teixits estudiats tenien diferents patrons d'expressió segons les bandes i les quantitats:

- Cristal·lí d'Embrió: 3' llarg/5' curt i 3' curt/5' curt
- Cervell: 3' llarg/5' curt i 3' curt/5' curt
- Ronyó: totes les quatre bandes
- Múscul: totes les quatre bandes (més de les dues de 3' curt, poc de 3' llarg/5' llarg)
- Cor : totes les quatre bandes (més de 3' curt/5' llarg, poc de 3' llarg/5' curt)
- Testicle immadur: totes les quatre bandes (més de 3' curt/5' llarg)

4.2.5. La banda de 2'8 kb

La forma de 2'8 kb que apareixia en alguns teixits situada entre els RNA ribossòmics hibridava només clarament amb la sonda codificant i no amb les altres. La primera teoria que ens vam plantejar va ser que aquesta banda podria ser un precursor de les formes menors que contingués un intró. Dels dos introns del gen només un tenia la llargada compatible amb aquesta forma [vegeu Figura 3]. L'Intró 1 té 1500 nucleòtids, i l'Intró 2 en té 2010; sumant els extrems, els exons i l'Intró 1 s'obté un resultat proper a 2'8 kb. Així doncs, vam usar una sonda específica que inclogués l'Intró 1 per a detectar la banda.

La hibridació amb la Sonda Intró va resultar negativa. Això descartava la teoria inicial. Davant la impossibilitat de dissenyar cap més sonda específica per aquesta banda, vam optar directament per seqüenciar-la. Com que desconeixiem totalment la seva seqüència, descomptant que per algun lloc tenia la regió codificant de l' α B-cristal·lina, el mètode presentava nombroses dificultats. Vam dissenyar un protocol específic per a aconseguir els nostres propòsits.

Primer vam hibridar una membrana de RNA de testicle amb la sonda codificant. Vam retallar el fragment de membrana on s'havia unit la sonda. D'allà vam poder seqüenciar la sonda unida al mRNA per comprovar si era realment el

corresponent a l' α B-cristal·lina. El resultat fou positiu, el que implicava que s'estava unint a una zona complementària de RNA que corresponia a la seqüència codificant de l' α B-cristal·lina. A continuació vam fer una nova membrana pel mateix procediment, però en vam hibridar només la meitat amb la sonda codificant, per tal de tenir en un costat la localització exacta de la banda gràcies a la unió amb la sonda i per l'altre la banda sola. Vam retallar aquesta segona banda i vam provar de fer-ne primeres cadenes usant el mètode d'Oligo-dT ja que suposavem que tenia un PoliA llarg. Els esforços per aconseguir Primeres Cadenes, però, van ser infructuosos després de mesos d'intents amb diferents sistemes. D'aquesta manera, no vam poder resoldre la identitat d'aquesta banda ni tan sols per seqüenciació.

4.3. VARIACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DAVANT DIFERENTS ESTÍMULS

Vam decidir sotmetre els teixits de gall a diferents estímuls d'estrés que estava descrit en les referències consultades que induïen l'expressió, si més no en altres models animals. L'objectiu principal era entendre com variava el perfil d'expressió dels missatgers en aquestes situacions. Després calia comprovar si l' α B-cristal·lina del gall es comportava com la de l'ànec i no presentava reacció l'estrés tèrmic per poder apuntar que realment existeix una diferència entre aus i mamífers.

Per altra banda, un experiment complementari, l'estudi de la distribució dels missatgers en les fraccions polisòmiques, ens havia d'aportar dades sobre com la cèl·lula usa cadascuna de les formes diferents de missatger: quines es tradueixen activament i quines es mantenen en reserva.

4.3.1. L'elecció del model

Per a l'estudi de l'expressió en condicions d'estrés vam començar utilitzant un model *in vivo*, l'embrió de pollastre *in ovo*, segons els mètodes descrits a les referències (105). Els teixits més interessants d'estudiar de l'embrió, d'acord amb els resultats observats en l'apartat d'expressió, eren el testicle (com a teixit germinal, de comportament diferent a la resta), el cervell (per la seva importància en les patologies en els que intervé l' α B-cristal·lina), el cristal·lí (per ser el teixit amb més α B-cristal·lina) i el cor (per tenir expressades igualment totes quatre bandes). Vam haver d'abandonar el treball amb el cor després de comprovar que no s'observava expressió de l' α B-cristal·lina en l'embrió.

També vam usar diferents models *in vitro*. Un d'ells va ser el cultiu de cristal·lins d'embrió ja que es pot manipular tot l'òrgan com un conjunt sense haver de separar-ne les cèl·lules i per tant mantenint al màxim la seva estructura *in vivo*. Vam utilitzar també suspensions cel·lulars de testicle immadur per observar els efectes a la línia germinal. Vam provar el mateix sistema de la suspensió amb cèl·lules cardíques, però només en vam poder extreure proteïnes, i no el mRNA, per la naturalesa del teixit. Finalment, vam intentar reproduir alguns dels resultats utilitzant animals adults.

Vam provar també d'estudiar la sang. L'objectiu era provar primer amb sang de gall per poder després començar experiments amb les mostres de sang que

arribaven al nostre laboratori de pacients afectats de síndrome de Down. Les cèl·lules d'aquests malalts poden ser particularment susceptibles a l'apoptosi degut a l'estrés, especialment l'oxidatiu (90, 93). Una de les activitats protectores de l' α B-cristal·lina es fa precisament disminuint els radicals lliures de l'oxigen augmentant la concentració de glutatió (91). En els experiments realitzats, però, els leucòcits de gall no presentaren prou nivells d' α B-cristal·lina per ser detectats. Dificultats en el subministrament de les mostres van fer que finalment no poguessim comprovar si hi havia expressió en els limfòcits dels malalts de Síndrome de Down.

4.3.2. Possibles inductors de l'expressió

Els possibles inductors seleccionats per a estudiar van ser:

- **Estrés Tèrmic**: les condicions que vam seguir, basant-nos en treballs anteriors (34, 53, 96, 104), van ser:
 - Embrions: 3 hores a 45-46°C. Amb recuperació (4 hores a 37°C).
 - Suspensió de Cèl·lules de Testicle: 1 o 2 hores a 45-46°C. Amb o sense recuperació (1 o 2 hores a 39°C).
 - Cultiu de Cristal·lins: 20 minuts a 45-46°C (estufa amb CO₂ al 5%). Amb recuperació (20 minuts a 37°C).

El període de recuperació després de l'estrés podria ser important per a l'increment de les proteïnes protectores, com passa en l'estrés oxidatiu (108). Vam fer experiments amb i sense recuperació (1 hora), però els resultats no van variar.

- **Dexametasona**: segons les dades que teníem, la dexametasona podia induir l'expressió de l' α B-cristal·lina (44, 45, 95). Vam aplicar estímuls puntuals (una sola dosi) o crònics (una dosi diària, durant tres dies en embrions o una setmana en adults) ja que no sabíem si l'efecte seria provocat per una dosi única o no. Solubilitzàvem la dexametasona en sèrum salí (per a injectar un total de 100 μ l als ous i 2 ml al gall). Les dosis van ser 1 mg per ou (assumint un volum mitjà de 30 ml cada ou) i 4'2 mg per gall adult (0'5-0'6 mg per kg de pes, assumint un pes mitjà de 7 kg), decidides a partir les dades publicades (44, 45, 94, 95).

- **Aspirina** (Àcid Acetil Salicílic, SIGMA A-6810): la hipòtesi era que l'Aspirina fa el seu efecte protector contra els radicals lliures de l'oxigen induïnt (entre altres coses) l' α B-cristal·lina. L' α B-cristal·lina protegiria dels radicals mitjançant l'augment dels nivells de glutatió (91). Solubilitzàvem l'aspirina en etanol, segons les instruccions de SIGMA. Les dosis van ser de 6 mg per ou i 0'6 g per cada cristal·lí cultivat (assumint que el volum del pou de cultiu era una desena part del de l'ou sencer, 3 ml), puntuals o continuades (una dosi al dia durant tres dies en els embrions, o tres dies d'exposició en els cultius de cristal·lí).

- **Estrés Oxidatiu**: vam preparar els experiments d'estrés oxidatiu segons la bibliografia que referia l'augment d'expressió provocat per l' H_2O_2 (36, 37, 103, 104). Vam sotmetre cultius de cristal·lí d'embrions de gall de diferents edats a diferents concentracions d'aigua oxigenada (4 mM i 12 mM) durant 60 o 90 minuts.

També vam provar combinacions d'estímuls com l'estrés tèrmic i l'Aspirina, per veure si els seus efectes inductors de proteïnes d'estrés tèrmic es potenciaven com suggerien alguns treballs realitzats en mamífers (106, 107).

Per comprovar l'eficàcia de l'estrés tèrmic, es va usar una sonda específica per al missatger de l'HSP70 de gall, una proteïna que ja s'ha demostrat que sí que és d'estrés tèrmic en el gall, i que marca molt selectivament en la hibridació les cèl·lules que han patit l'estrés tèrmic. Si el control tenia significativament menys missatger d'HSP70 que el teixit sotmès a temperatures elevades, consideràvem que aquest havia funcionat correctament.

Els controls dels estímuls que requerien injecció es feien injectant un volum igual de sèrum Ringer (dexametasona) o Etanol (Aspirina) a l'animal control tantes vegades com s'administrava la solució amb l'inductor a l'animal problema.

4.3.3. Resultats de la inducció de l'expressió

Els diferents protocols d'inducció van donar els següents resultats, segons cadascun dels models sobre els quals van ser aplicats:

4.3.3.1. Embrions

Vam començar els experiments d'inducció d'expressió en embrions tardans, de 17-20 dies. Els teixits estudiats van ser cristal·lí, cervell, testicle i ronyó (en substitució del cor, previst inicialment). Els resultats van ser els següents:

- La dexametasona indueix l'expressió en cervell [vegeu Figura 13a] i testicle [vegeu Figura 13b].
- L'estrés tèrmic no té efectes evidents d'inducció. Hi ha fins i tot disminució de l'expressió en cervell [vegeu Figura 13a]. Sumar l'estrés tèrmic i l'Aspirina tampoc no provoca inducció. L'eficàcia de l'estrés es comprova amb la hibridació amb la sonda específica per als transcrits de l'HSP70. [vegeu Figura 13c]
- L'Aspirina no produeix cap increment d'expressió en dosis puntuals ni en dosi continuada.

4.3.3.2. Animals Adults

En el gall només vam provar com a estímul la dexametasona, perquè després dels resultats obtinguts en l'embrió vam considerar que era el que tenia més possibilitats d'induir l'expressió. Vam estudiar cristal·lí, cervell, testicle i especialment el cor. Vam fer experiments amb dosis puntuals de dexametasona i altres amb dosis cròniques (injeccions diàries repartides al llarg d'una setmana).

Les dosis puntuals no van donar cap canvi en l'expressió, i vam suposar que el gall adult tenia mecanismes de regulació que feien que un pic de glucocorticoides no representés una alteració important en el seu metabolisme.

Les dosis perllongades, en canvi, sí que van provocar algunes variacions. El teixit diana que va donar més bons resultats en aquest cas va ser el cor, principalment perquè el seu patró de bandes de l' α B-cristal·lina presentava les quatre variants, i també perquè és un òrgan diana de l'acció dels glucocorticoides.

No hi havia increment de l'expressió de cap de les bandes, però la banda de 3' curt/5' llarg experimentava un increment d'amplada selectiu [vegeu Figura 14a]. Per determinar el seu significat, vam repetir l'experiment posant RNAsa H al RNA per eliminar les cues de poli A. Tal i com sospitàvem, la banda tornava a la seva mida original [vegeu Figura 14b]. Això volia dir que l'augment d'amplada era degut a l'increment de la poliadenilació.

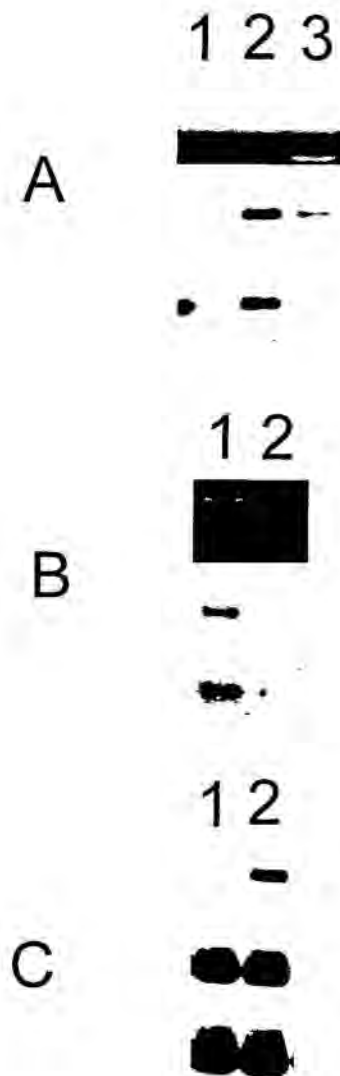


Figura 13. Quantitats relatives de RNA ribossòmic i Hibracions de teixits d'Embrions de Gall de 17 dies.

- A. Cervells hibridats amb la Sonda Codificant. Estrés Tèrmic (1), Dexametasona dosi crònica (2) i Control (3).
- B. Testicle tractat amb RNasa H i hibridat amb la Sonda Codificant. Dexametasona dosi crònica (1) i Control (2).
- C. Cristal·lins hibridats amb la Sonda específica per a la HSP70. Control (1) i Estrés Tèrmic (2).

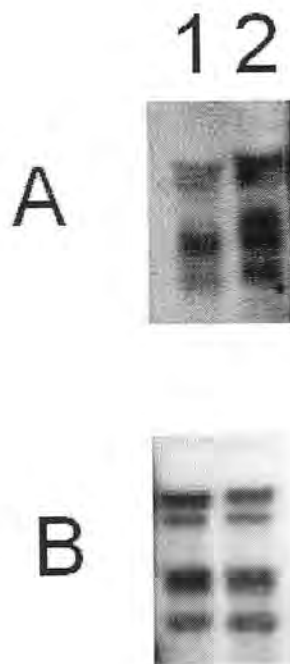


Figura 14. Hibridació amb la Sonda Codificant de RNA de Cor de Gall. Control (1) i Dexametasona dosi crònica (2).

A. Sense RNasa H.

B. Amb RNasa H.

4.3.3.3. Suspensió de cèl·lules de Testicle

El següent model *in vivo* usat va ser el de cèl·lules de testicle de gall immadur, un altre teixit que presenta totes les formes del missatger. El protocol, provat anteriorment en altres experiments del laboratori, el vam usar només per a l'estrés tèrmic. Es basa en extreure el teixit de l'animal, preparar una suspensió cel·lular en un medi específic i sotmetre-la a diferents temperatures.

L'eficàcia del sistema d'estrés tèrmic s'ha controlat de nou amb la hibridació amb la sonda específica per al missatger de l'HSP70. L'increment d'aquest missatger és important i no apareix si bloquegem la transcripció posant Actinomicina D a les cèl·lules quan les incubem, el que demostra que és un canvi degut a un increment de l'activitat de la transcripció. En els controls en embrió i en el cultiu de cristal·lins d'embrió, cal tenir present que en l'embrió constitutivament s'expressa l'HSP70 moderadament (92).

Pel que fa a la hibridació amb la sonda de l' α B-cristal·lina, els resultats demostren que l'expressió no tan sols no augmenta en l'estrés tèrmic sinó que disminueix. Això és un comportament típic de les proteïnes que no són d'estrés tèrmic quan es sotmeten a estrés. [vegeu Figura 15]

4.3.3.4. Cultiu de cristal·lins d'embrió

En els cultius de cristal·lí els resultats han estat semblants als que hem trobat en els cristal·lins extrets dels embrions: l'estrés tèrmic disminueix clarament l'expressió i la dexametasona l'augmenta. [vegeu Figura 16]

Per altra banda, aquest va ser el model que vam escollir per comprovar l'estrés oxidatiu. Vam usar cultius de cristal·lins d'embrions de 17-19 dies i no va aparèixer cap canvi evident.

4.3.4. Variació dels nivells de proteïnes

Per acabar de confirmar els resultats que ens indicaven que l' α B-cristal·lina no era una proteïna d'estrés tèrmic, vam decidir estudiar la variació dels nivells de proteïnes. La raó era que les reserves de missatgers establilitzats podrien donar un augment de proteïna en un moment concret sense que fes falta recórrer a la síntesi de més mRNA. La reacció a l'estrés quedaria emmascarada si miràvem només l'expressió gènica, però en canvi els nivells de proteïna podien augmentar.



Figura 15. Hibridació amb la Sonda Codificant de RNA de Cultius de Cèl·lules de Testicle Immadur de Pollastre. Control (1) i Heat Shock (2).

1 2 3



Figura 16. Quantitats relatives de RNA ribossòmic i Hibridació amb la Sonda Codificant de RNA de Cultius de Cristal·lins d'Embrió de Pollastre. Control (1), Dexametasona dosi crònica (2) i Aspirina dosi puntual (3).

Els experiments es van fer seguint les mateixes condicions d'estrés tèrmic que en l'estudi del RNA. Principalment vam concentrar els esforços en cristal·lí, testicle immadur i cor. El cristal·lí va ser estudiat en cultiu. El testicle immadur va ser estudiat en suspensions cel·lulars tal i com ha estat descrit. El cor va ser estudiat per primer cop també per aquest sistema, obtenint miocits i suspenent-los en el medi abans de sotmetre'ls a l'estrés. Vam usar un anticòs monoclonal comercial contra l' α B-cristal·lina (Stressgene SPA-222) per a fer la detecció immunològica.

Vam usar dos mètodes d'extracció proteïca diferent, per tal de tenir o bé totes les proteïnes cel·lulars o bé només la fracció soluble. En tots els teixits i amb tots dos grups de proteïnes vam observar el mateix que passava en el RNA: hi havia una disminució enlloc d'augment de la proteïna quan s'aplicava un estrés tèrmic [vegeu *Figura 17*]. El control per saber si l'estrés tèrmic era efectiu es va fer una vegada més amb la sonda específica per al transcrit de l'HSP70.

Finalment, vam usar les proteïnes per fer una comprovació més amb els cristal·lins cultivats sotmesos a estrés oxidatiu. Els resultats van ser iguals als del RNA: sense cap canvi evident.

4.3.5. Distribució dels transcrits en fraccions polisòmiques

Després dels experiments d'inducció d'expressió en condicions d'estrés vam provar de veure quines formes dels missatgers estaven essent utilitzades activament per la maquinària de traducció de la cèl·lula i quines altres es guardaven en reserva per si eren necessàries en altres situacions. Això ens podia explicar les diferències de llargades dels mRNA: els extrems dels missatgers poden influir en la seva estabilitat diferencial i per tant en la seva disponibilitat [vegeu 5.2.3.].

Per saber si una forma de mRNA s'està traduïnt activament en un teixit es realitzen els experiments de distribució dels transcrits en fraccions polisòmiques i fraccions ribonucleoprotèiques no polisòmiques: els mRNA actius es trobaran units als polisomes mentre que els estables, que no estan traduïnt-se, es trobaran lliures. Aquests experiments es realitzen separant per grandària en un gradient de sucrosa els grans complexes ribosomes-RNA i els missatgers lliures, més petits.

Es recull el gradient en diferents fraccions (després d'algunes proves vam optar per dividir-lo en 6 fraccions) i s'obté el RNA de cadascuna d'elles pels mètodes d'extracció habituals. Després es prepara una membrana amb les diferents fraccions

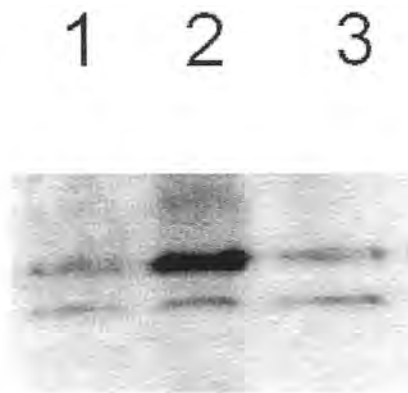


Figura 17. Quantitats relatives de proteïna i Immunodetecció amb anticòs anti α B-cristal·lina de proteïnes Cultiu de Cèl·lules de Cor de Gall. Estrés Tèrmic 1 hora amb 1 hora de recuperació (1), Control (2) i Estrés Tèrmic 2 hores sense recuperació (3).

i s'hibrida amb la sonda específica (en el nostre cas la codificant) que assenyalarà en quina fracció està cada banda. La quantitat de RNA present a cada fracció sol ser constant per a la majoria dels teixits: la primera sol tenir-ne poc o gens i hi ha un pic a la segona o tercera fracció. Per a aquest experiment hem usat cristal·lí d'embrió i testicle immadur i hem comparat els resultats.

En el cristal·lí d'embrió vam trobar el missatger a les fraccions del final del gradient (quarta i cinquena), és a dir, formant complexos amb els polisomes [vegeu *Figura 18a*]. S'està, doncs, traduint activament. La banda més petita (3' curt/5'curt) es troba sola a la primera fracció, però apareix també a les altres.

Aplicant després el RNA a un nou gradient de sucrosa, però amb EDTA (que té l'efecte de separar els polisomes), totes les bandes es concentren aquest cop a les primeres fraccions del gradient, és a dir, queden lliures. Aquest experiment confirma que el que veiem en el primer cas es tractava realment d'unions a polisomes i no un artefacte, que s'hauria mantingut malgrat l'EDTA [vegeu *Figura 18b*]. En cap dels casos, però es veia una utilització diferencial d'una de les dues bandes.

En el testicle de pollastre immadur, apareix la banda de 3' curt i 5' llarg a les primeres fraccions (lliure, és a dir, estabilitzada). A la tercera fracció no hi ha material. A les següents es troben totes les bandes, especialment a la fracció cinquena. Això indica un cop més que s'estan traduint activament als polisomes. [vegeu *Figura 18c*]

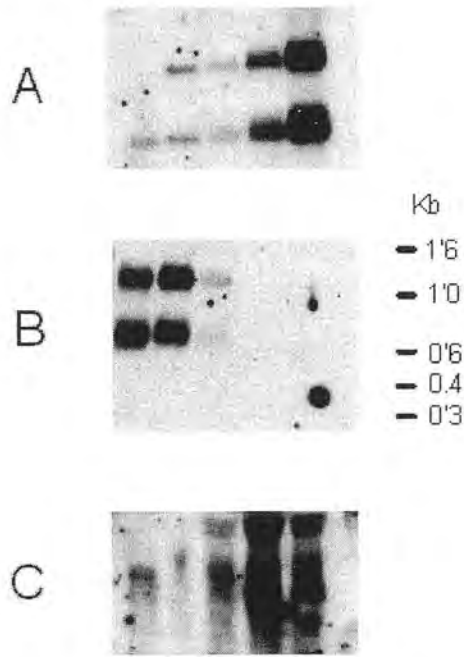


Figura 18. Hibridació amb la Sonda Codificant d'un gradient de polisomes de Cristal·lí d'Embrió de Pollastre de 17 dies (A i B) i de testicle immadur de pollastre.

A. Sense EDTA.

B. Amb EDTA.

4.4. COMPARAR L'EXPRESSIONI DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA I DE L'UBIQÜITINA EN LES DIFERENTS ETAPES DE L'EMBRIOGÈNESI

4.4.1. Expressió en embrions de 4 a 10 dies d'edat

Per estudiar l'expressió de l' α B-cristal·lina vam obtenir RNA d'embrions totals de diferents edats a l'inici del desenvolupament. Vam poder veure a les hibridacions amb la Sonda Codificant un patró semblant al que vèiem al cristal·lí d'embrió de 17 dies: dues soles bandes un cop eliminades les cues de poli A. Són les bandes corresponents a les de 3' llarg/5' curt i 3' curt/5' curt.

Comparant les bandes en embrions de 4, 6, 8 i 10 dies d'edat, vam veure com augmentava l'expressió de l' α B-cristal·lina seguint el mateix patró que el que ja coneixíem del gen Ubi II, tal i com postulàvem en les hipòtesis inicials. Hi ha un pic d'expressió als 6 dies (abans l'expressió és bastant reduïda) i després decreix a partir dels 8 dies. [vegeu Figura 20]

4.4.1. Existeix una tercera llargada de l'extrem 5'

Vam usar les Primeres Cadenes d'embrió de 6 dies i els *primers* corresponents i vam trobar que només s'amplificaven els trànscripats amb el 5' curt. Això confirmava que les formes amb 5' més llarg no es troben en l'embrió en estadis inicials.

Quan vam seqüenciar aquesta regió 5' com a confirmació de la seqüència que havíem obtingut en testicle, vam veure que la llargada no era de 19 sinó de 39 nt. Això representa una tercera grandària de la regió 5' que no havíem trobat abans. Aquesta mida intermitja de 39 nucleòtids no es pot diferenciar amb les nostres sondes del 5' més curt, per tant quedaria sempre confosa en les hibridacions amb la de 19 nt. La llargada de 39 nt, correspon exactament a la llargada de la regió 5' del missatger descrit en l'ànec (107), encara que només hi guarda un 84% d'homologia. Els 39 nucleòtids que vam seqüenciar eren els mateixos nucleòtids exactes que els que apareixen en la mateixa posició als extrems 5' més curt i més llarg trobats al testicle. [vegeu Figura 21]

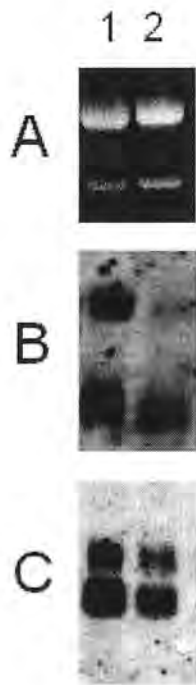


Figura 20. Comparació dels nivells d'expressió d' α B-cristal·lina i UbII a embrió de pollastre de 6 dies (1) i 8 dies (2) d'edat.

A. Quantitats relatives de RNA ribossòmic.

B. Hibridació amb la Sonda Codificant (α B-cristal·lina).

C. Hibridació amb la Sonda UbII.

1. Forma Llarga (Testicle) 196nt 
2. Forma Curta (Embrió) 39 nt 
3. Forma Curta (Testicle) 19nt 



Figura 21. Les tres llargades trobades de la regió 5' del cDNA de l' α B-cristal·lina en gall. Les fletxes assenyalen el punt d'inici de transcripció de cadascuna de les 3 formes de mRNA.. La TATA box esta subratllada; la forma més llarga la inclou en la seva seqüència.

4.4.3. Expressió en embrions de 17 dies d'edat

Per a completar l'estudi de l'expressió en l'embrió, vam obtenir diferents teixits de l'embrió a les fases finals del seu desenvolupament. Vam trobar que el gen s'expressava bàsicament en els mateixos teixits de l'adult que havíem estudiat, exceptuant el cor on, com hem comentat abans, no es detecta el missatger. Els patrons d'expressió eren en cada teixit semblants als que es trobaven en els teixits de l'adult. Això indica que l'expressió en aquests embrions és ja bastant semblant a la que es pot trobar després en l'adult.

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

5.1. SEQÜÈNCIA DEL mRNA DE LA PROTEÏNA

α B-CRISTAL·LINA EN TESTICLE DE GALL

5.1.1. Hi ha tres llargades diferents de la regió 5' dels trànscrits de l' α B-cristal·lina en el pollastre

Els nostres primers resultats de seqüenciació ja demostren que hi ha dues versions de cDNA en el testicle segons la mida de la regió 5': una curta transcrita des de la *TATA box* i amb una regió 5' de 19 nucleòtids, i una llarga transcrita des d'un promotor anterior en direcció 3', amb una regió 5' major que inclou la *TATA box*, i que medeix un total de 196 nucleòtids [vegeu Figura 21]. Això implica que hi ha llocs d'inici de la transcripció alternatius que donen en el testicle dues llargades de la regió 5', per bé que no es pot descartar que la forma curta sigui una artefacte d'extensió de la primera, que hagi estat acabada prematurament.

La forma llarga té seqüències que apareixen conservades idèntiques en els 5' d'ànec, d'home o de ratolí. En concret, hi ha una seqüència de 33 nucleòtids que en té 23 de conservats en aquestes quatre espècies [vegeu Figura 22]. S'ha proposat que aquesta seqüència pot tenir una gran importància en la transcripció (42).

Per altra banda, els trànscrits seqüenciats d'embrió de pollastre tenien encara una tercera llargada, de 39 nucleòtids, suggerint un possible tercer lloc d'inici de la transcripció. Aquesta llargada intermitja no ha estat possible de diferenciar mitjançant les hibridacions específiques ja que és massa semblant a la de 19 nucleòtids. Hem anomenat, per tant, per motius pràctics, forma curta tan el 5' de 19 nucleòtids com el de 39.

Altres gens estudiats en aquest laboratori presenten un comportament semblant, amb diferents llargades dels extrems 5'. Són el de l'Anhidrasa Carbònica II de gall i de ratolí (84), els de poliubiquitina Ubl (97) i UblI de gall (88) i el de la Glicerilfosfat Deshidrogenasa (109). L'ús de promotors alternatius diferents a la *TATA box* comporta que les regions 5' d'aquests trànscrits siguin més llargues i incloguin la *TATA box* i altres promotors, com en el cas de l' α B-cristal·lina. En alguns

Gall	TGGGACAAATAAAATCCCTGACACACACTATTCGGGAGG
Ànec	CAGGACAAATAAAATCCCTGACACACACTATTCAGAGG
Ratolí	TGGGATAATAAAACCCCTGACCTCACCATTCAGAAG
Home	TAGGATAATAAAACCCCTGACATCACCATTCAGAAG

Figura 22. Comparació de les regions conservades de la regió 5' de la seqüència del missategr de l' α B-cristal·lina en diferents espècies. En els requadres blaus, les zones amb total homologia.

5. DISCUSSIÓ

5.1. SEQÜÈNCIA DEL mRNA DE LA PROTEÏNA

α B-CRISTAL·LINA EN TESTICLE DE GALL

5.1.1. Hi ha tres llargades diferents de la regió 5' dels trànscripats de l' α B-cristal·lina en el pollastre

Els nostres primers resultats de seqüenciació ja demostren que hi ha dues versions de cDNA en el testicle segons la mida de la regió 5': una curta transcrita des de la *TATA box* i amb una regió 5' de 19 nucleòtids, i una llarga transcrita des d'un promotor anterior en direcció 3', amb una regió 5' major que inclou la *TATA box*, i que medeix un total de 196 nucleòtids [vegeu Figura 21]. Això implica que hi ha llocs d'inici de la transcripció alternatius que donen en el testicle dues llargades de la regió 5', per bé que no es pot descartar que la forma curta sigui una artefacte d'extensió de la primera, que hagi estat acabada prematurament.

La forma llarga té seqüències que apareixen conservades idèntiques en els 5' d'ànec, d'home o de ratolí. En concret, hi ha una seqüència de 33 nucleòtids que en té 23 de conservats en aquestes quatre espècies [vegeu Figura 22]. S'ha proposat que aquesta seqüència pot tenir una gran importància en la transcripció (42).

Per altra banda, els trànscripats seqüenciats d'embrió de pollastre tenien encara una tercera llargada, de 39 nucleòtids, suggerint un possible tercer lloc d'inici de la transcripció. Aquesta llargada intermitja no ha estat possible de diferenciar mitjançant les hibridacions específiques ja que és massa semblant a la de 19 nucleòtids. Hem anomenat, per tant, per motius pràctics, forma curta tan el 5' de 19 nucleòtids com el de 39.

Altres gens estudiats en aquest laboratori presenten un comportament semblant, amb diferents llargades dels extrems 5'. Són el de l'Anhidrasa Carbònica II de gall i de ratolí (84), els de poliubiquitina Ubl (97) i UblII de gall (88) i el de la Glicerilalhid Fosfat Deshidrogenasa (109). L'ús de promotors alternatius diferents a la *TATA box* comporta que les regions 5' d'aquests trànscripats siguin més llargues i incloguin la *TATA box* i altres promotors, com en el cas de l' α B-cristal·lina. En alguns

d'aquests casos, en l'espermioogènesi s'usa el promotor alternatiu anterior a la TATA box i en teixits somàtics no. En l' α B-cristal·lina hem demostrat que totes dues formes apareixen simultàniament en teixits somàtics i germinals, a diferència dels gens assenyalats anteriorment.

El gen de l' α B-cristal·lina conté una seqüència TATA box en una posició clàssica, uns 20-30 nucleòtids abans del punt d'inici de la transcripció. En el ratolí s'ha trobat una altra seqüència semblant a la TATA en una regió anterior del promotor (-70/-75), que es troba enmig d'un l'Element Específic Regulador de la Lent (LSR2) i que podria ser la responsable de la llargada llarga del 5' dels missatgers.

5.1.2. La regió codificant dels trànscrits seqüenciats és diferent a la descrita

La regió codificant seqüenciada va del nucleòtid 197 al 721 en tots els trànscrits. Presenta 99% d'homologia amb la publicada de cristal·lí de gall i un important 94% amb la de cristal·lí d'ànec (*Anas platyrhynchos*).

Les diferències entre la seqüència de cristal·lí i la de testicle de gall fan que la seqüència deduïda d'aminoàcids varïi en un cas. El nucleòtid diferent de la nostra seqüència fa que hi hagi isoleucina enlloc de valina a la posició 10. Curiosament, aquest aminoàcid diferent correspon exactament al que es troba en l'ànec (i en mamífers) a la mateixa posició, ja que el nucleòtid diferent és igual al descrit per nosaltres.

5.1.3. La regió 3' caracteritzada en els nostres trànscrits és més petita que la descrita, però d'igual seqüència

Totes les formes seqüenciades tenien l'extrem 3' amb una llargada igual de 128 nucleòtids a partir del senyal de terminació. És una llargada més petita que la descrita en els trànscrits de cristal·lí de gall. Hi ha un senyal de poliadenilació 107 nucleòtids més enllà de la senyal de terminació. En la seqüència publicada, que tenia la regió 3' més llarga, hi havia un segon senyal de poliadenilació 669 nucleòtids més enllà del senyal de terminació.

Per les dades obtingudes per hibridació es feia manifest que també hi havia d'haver trànscrits amb un 3' més llarg, que correspon a la mida del ja publicat.

Nosaltres també en vam trobar de la mateixa llargada, encara que de forma minoritària en el testicle. No els vam seqüenciar, però, perquè vam considerar que amb tota probabilitat serien idèntics als ja publicats.

5.1.4. La teoria dels dos gens

El fet que el transcrit seqüenciat per nosaltres a partir de testicle fos diferent al que estava publicat extret del cristal·lí ens va fer pensar que podria haver-hi dos gens diferents per a l' α B-cristal·lina. Un s'expressaria preferentment als teixits somàtics com el de cristal·lí publicat) i l'altre a la línia germinal (el que havíem descrit nosaltres). Aquesta teoria es veia recolzada pel fet que totes les amplificacions fetes a testicle no donaven mai un transcrit que un cop seqüenciat fos idèntic al ja publicat. Això podia fer sospitar que al testicle els transcrits majoritaris provinguessin d'aquest hipotètic segon gen mai abans descrit.

Per a confirmar si realment hi havia possibilitats que existissin dos gens, havíem de comprovar si en teixits somàtics efectivament es trobava preferentment l'altra forma de transcrits. Per a aquesta finalitat vam decidir seqüenciar transcrits obtinguts a partir de primeres cadenes de cristal·lí. Vam fer amplificacions amb primers obtinguts a partir de la seqüència del banc, com en el testicle, i les vam clonar. Després vam seqüenciar diferents clons en els dos sentits. En teoria havia de sortir el transcrit que fos majoritari en el cristal·lí.

Els resultats en tots els casos van donar una seqüència com la que ja havíem trobat i no com la ja publicada. La nostra teoria dels dos gens per tant no es podia confirmar així: el transcrit majoritari al cristal·lí era com el que havíem seqüenciat a testicle.

L'explicació a aquest fet podria ser una altra llavors. Podria ser que el transcrit descrit anteriorment al cristal·lí estigués equivocat. Vam descartar un error en la nostra seqüència després d'haver-la comprovada seqüenciant-la de diferents clons i en diferents direccions. El fet que el nucleòtid decidís per al canvi de l'únic aminoàcid estigui conservat en l'ànec i en la nostra seqüència recolza la idea que l'altra fos incorrecta. La resposta a aquest dubte se sabrà quan s'obtingui una seqüència directa del gen de l' α B-cristal·lina al cristal·lí i al testicle.

5.2. EXPRESSIÓ DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA

5.2.1. La RNasa H ha permès descobrir tots els trànscrips per hibridació

Les hibridacions amb les diferents sondes específiques ens han portat a determinar quins teixits tenien cadascuna de les variants de trànscrips que suposàvem que havien d'existir a partir dels resultats de la seqüenciació. Els primers experiments només donaven dues bandes, que era tal i com s'havia descrit l'expressió del gen fins al moment en la majoria de referències. La gran amplada de les bandes, però, ens feia sospitar que eren en realitat un *conjunt* de bandes i que aquestes havien de ser les que havíem caracteritzat.

La clau per a poder demostrar les nostres teories va ser l'aplicació de l'enzim RNasa H als RNA abans de ser hibridats. Aquest enzim elimina les cues dels missatgers, formades per un PoliA, que solen tenir diferents tamanys. Nosaltres sospitàvem que les cues dels missatgers, totes elles de diferents llargades, i que poden arribar fins a 200 nucleòtids, eren les responsables de l'emascament de les bandes. Aquestes cues donaven bandes de molts diferents llargades, que totes juntes semblaven com una de sola però més ampla. Això passava a les regions de 1'2 kb i de 0'9 kb. La RNasa va eliminar el problema i van aparèixer clarament quatre bandes fines i ben delimitades corresponents a les llargades que havien de tenir trànscrips que diferissin només en si tenien l'extrem 5' i/o el 3' llarg o curt.

5.2.2. La diferència dels extrems 5' i 3'

Segons el que hem pogut veure, els missatgers de l' α B-cristal·lí es presentem majoritàriament en quatre formes [vegeu Figura 23]. Per hibridació i seqüenciació hem determinat que les diferències entre les formes venien donades només per les llargades dels extrems 5' i 3', però no per cap canvi en la seqüència. La diferent llargada de les zones 5' és deguda a llocs d'inici de la transcripció alternatius. La diferent llargada de les zones 3' és deguda a l'ús de diferents senyals de poliadenilació; un dels senyals l'hem identificat a a posició 107 després del senyal d'*stop*, i l'altre ja havia estat descrit prèviament a la posició 669.

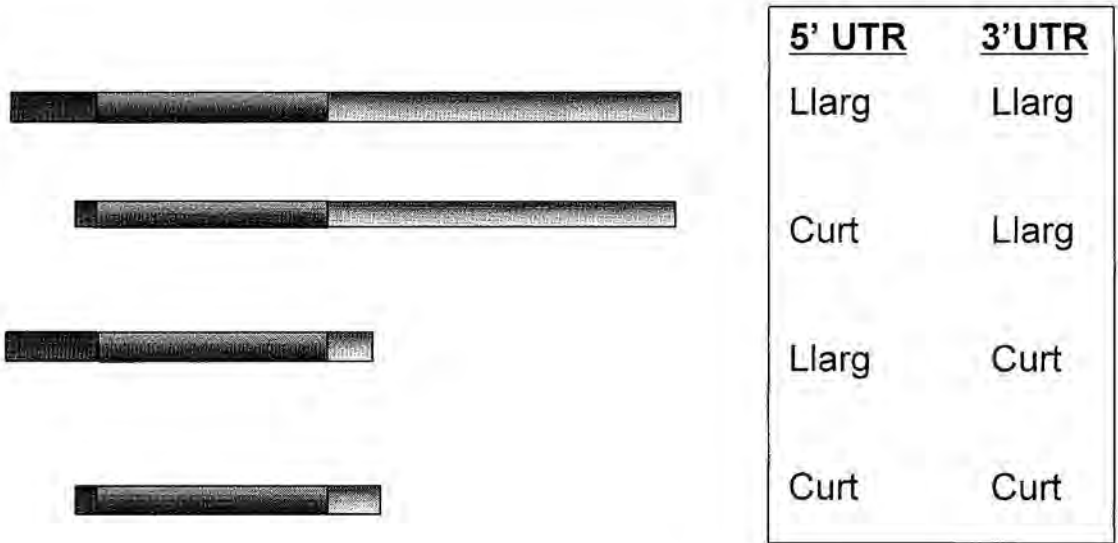


Figura 23. Les quatre formes del missatger del gen de l' α B-cristal·lina segons els tamanys de les seves regions 5' i 3'.

Si es comparen els patrons en els diferents teixits que hem estudiat, es pot veure que cadascun és característic, depenent de quines bandes expressa i en quina quantitat relativa ho fa. Aquest fet podria tenir importància en la funció específica que la proteïna du a terme en cadascuna de les localitzacions. Així doncs, la cèl·lula compta amb aquestes variacions possiblement per a fer diferents usos dels missatgers segons la situació.

5.2.3. L'estabilitat dels trànscrips i les seves implicacions

S'ha demostrat tan *in vivo* com *in vitro* que els missatgers que tenen regions 5' més llargues en els testicles solen ser menys actius traduccionalment parlant (101). La presència d'una regió conservada al 5' dels missatgers de mamífers i d'aus recolza aquesta implicació en un possible paper en l'estabilitat del missatge. Per altra banda, una regió 5' més llarga dóna lloc a estructures del mRNA que podrien estabilitzar el missatge, allargant d'aquesta manera la seva vida mitjana (97) [vegeu Figura 24].

També se sap que la llargada més curta de la regió 3' implica una vida mitjana del mRNA més llarga, possiblement per la pèrdua de seqüències desestabilitzants: la presència d'elements rics en AU en aquesta regió provoca la degradació selectiva del mRNA (98, 99). La reducció de la llargada del 3', doncs, evita la presència d'un excés d'aquestes seqüències i facilita per tant l'estabilitat. En la regió 3' curta de la seqüència, per exemple, es troben 13 parelles AU, mentre que en la resta de la 3' se'n compten 35 més que podrien estar implicades en la degradació. Els 3' curts podrien conferir d'aquesta manera més estabilitat als trànscrips de l' α B-cristal·lina.

L'ús de diferents llocs d'inici de transcripció i de senyals de poliadenilació alternatives podria modular, doncs, l'activitat i eficàcia traduccionals actuant sobre l'estabilitat del missatge. La combinació de 5' llargs i 3' curts assegurarien l'estabilitat i d'aquesta manera una traducció retardada. Això podria ser important en les cèl·lules diferenciades del cristal·lí, que ja no tenen els mecanismes per portar a terme la transcripció. En aquests casos podríem estar davant una traducció diferida a partir d'una reserva de missatgers més estables.

D'aquesta manera, podríem interpretar els patrons d'expressió dels teixits estudiats per hibridació justificant les diferències pels possibles canvis en l'estabilitat del missatge. Són teixits amb importants diferències entre ells pel que fa a la tasa

de divisió cel·lular, i alguns també contenen diferents tipus cel·lulars que poden tenir diferents patrons d'expressió que no haurem diferenciat amb els nostres experiments.

En el *Cristal·lí* i el *Cervell* predominen les bandes de 3' llarg/5' curt i 3' curt/5' curt. Les segones serien unes formes més estabilitzades que podria servir a les cèl·lules com a reserva, mentre que les altres serien les que s'usarien primer. Són teixits amb molt poca diferenciació i divisió cel·lulars.

Ronyó, Múscul, Cor i Testicle són teixits que presenten totes quatre bandes, potser precisament com a conseqüència de la seva heterogeneïtat cel·lular. Un altra possibilitat seria la versatilitat funcional en la utilització dels missatgers que abans proposàvem. El *Ronyó*, per exemple té totes les bandes amb igual proporció, mentre que el *Múscul* en té més de les dues de 3' curt. Això podria indicar diferents necessitats a l'hora de tenir més quantitat d'una banda més estable.

De la mateixa manera, el *Cor* i el *Testicle* tenen més quantitat de la banda més estable (3' curt/5' llarg), el que podria indicar l'existència d'una població de trànscrips que podria ser utilitzada per a la síntesi protèica en absència de transcripció; les altres formes podrien estar-se consumint molt activament en la traducció, per això no es veurien tant.

5.3. EXPLICACIONS A LES VARIACIONS D'EXPRESSIONI

DEL GEN DE L' α B-CRISTAL·LINA

5.3.1. L' α B-cristal·lina no és comporta com una HSP en el gall

Els nostres resultats conclouen que l' α B-cristal·lina no és una proteïna de estrés tèrmic en el gall, a diferència del que s'observa en els mamífers. Estava descrit que l'augment de temperatura provocava una síntesi massiva de HSPs en els embrions de pollastre d'avançada edat (34), però hem comprovat que l' α B-cristal·lina no es pot incloure en aquest grup de proteïnes. Els estímuls d'estrés tèrmic no han provocat cap canvi ni a nivell de missatger ni a nivell de proteïna en els nostres models. Tot i tenir similituts de seqüència amb les sHSPs, és possible que en les aus l' α B-cristal·lina no estigui implicada en la protecció davant l'increment de temperatura, com ja suggerien els estudis fets en l'ànec (17).

5.3.2. Els altres possibles inductors de l'expressió

L'expressió del gen de l' α B-cristal·lina és molt diferent en aus i mamífers. Estudis preliminars en l'ànec ja apuntaven aquestes diferències, que han estat confirmades pels nostres experiments en el gall.

Estímuls com l'estrés oxidatiu o l'Aspirina no han tingut cap efecte positiu en l'expressió, en contra del que es podia esperar. Només la dexametasona ha provocat canvis significatius. Tot això fa replantejar que l' α B-cristal·lina en les aus es comporti com una proteïna d'estrés. A la llum dels presents resultats sembla que l' α B-cristal·lina s'expressa de forma constitutiva en el gall i no augmenta davant les agressions.

5.3.3. L'efecte de la Dexametasona

Un dels òrgans diana de la dexametasona és el cor. Està descrit que els glucocorticoids, per exemple, provoquen un increment de la massa del cor respecte el pes del cos de l'embrió de pollastre (94). Per això vam decidir que aquest seria l'òrgan més important per estudiar en els nostres experiments. Treballs anteriors ja havien descrit que la dexametasona augmentava l'expressió de l' α B-cristal·lina (amb

acúmuls de mRNA i proteïna) en cultius de fibroblastes (95). Per això vam voler comprovar si en el nostre model *in vivo* passaria el mateix.

Els experiments previs amb embrions demostraren que la dexametasona realment actuava com a inductor, i per tant podia ser un bon estímul també en els animals adults. En aquest model, però, no vam veure inducció, sinó un increment d'amplada selectiu d'una banda. L'augment de la banda de 3' curt/5' llarg que provoca la dexametasona en el cor del gall adult és degut a la poliadenilació. La poliadenilació en els missatgers és un senyal d'estabilització i inducció de la traducció. En aquest cas, s'està incrementant encara més l'estabilitat de la banda que, per la seva estructura de 3' i 5', ja és la que se suposa més estable.

Aquests resultats indiquen que la dexametasona fa que el cor estabilitzi selectivament una forma del missatger més que les altres. Una forma de missatger estabilitzada li permetria a la cèl·lula tenir un accés més ràpid a una reserva de mRNAs sense haver de recórrer a la transcripció.

Aquests resultats sobre la poliadenilació són congruents amb altres resultats similars obtinguts al laboratori amb altres gens (109): podria ser un senyal habitual que s'usés en situacions d'estrés per estabilitzar certs trànscrits. En el nostre cas, l'únic estrés que l'ha provocat ha estat la dexametasona.

5.3.4. Eficiència de la traducció de les diferents formes del missatger

El darrer experiment per ajudar-nos a entendre l'ús de les quatre formes de missatgers va ser l'estudi de les fraccions cel·lulars. Amb això preteníem comprovar si la traducció de les bandes es feia de forma diferent, i per això les diferents grandàries significaven variacions en l'eficiència de la traducció degut als canvis en l'estabilitat.

Els resultats indiquen que totes quatre formes són traduïdes d'igual manera pels complexos polisòmics, de forma activa i igual d'eficient. L'estabilització d'una sola de les bandes a la fracció lliure, a més a més d'estar a la fracció traduïda, podria implicar que la cèl·lula l'utilitza com a reserva. Concretament, les bandes de 3' curt/5' curt al cristal·lí i de 3' llarg/5' curt al testicle s'han revelat com les possiblement més estables. Podria ser que cada teixit tingués almenys una d'aquestes formes que estabilitzen selectivament.

5.4. POSSIBLE RELACIÓ ENTRE L'EXPRESSIÓ DE L' α B-CRISTAL·LINA I DE LA UBIQÜITINA

Els resultats de l'estudi de l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina en l'embriogènesi han presentat una corba d'expressió amb un pic a les 6 setmanes, que després descendeix a les 8 setmanes. En experiments anteriors portats a terme en el nostre laboratori s'havia observat un comportament similar del gen de l'ubiqüitina UbII. Les etapes on aquests dos gens estan més expressats coincideixen amb les de major reorganització morfològica cel·lular de l'embrió (11, 88).

L'increment simultani de les dues proteïnes en aquesta fase podria no tenir cap significat especial més enllà del fet que ambdues són importants per a les cèl·lules que experimenten grans canvis en la seva estructura. El descens de la seva expressió, també en paral·lel, pot fer pensar que ambdues proteïnes poden compartir un mecanisme de regulació que fa que l'expressió sigui coordinada.

La relació entre les dues proteïnes és important si tenim present que apareixen sobreexpressats conjuntament els seus missatgers en algunes malalties neurodegeneratives, com s'ha vist en la introducció. Aquest increment podria ser més que una coincidència si tenim present que es dona també en condicions fisiològiques, com hem comprovat a l'embriogènesi. La determinació d'un possible promotor comú en ambdós gens confirmaria aquesta relació.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

6.1. Primer Objectiu: Seqüenciar els transcrits de la proteïna α B-cristal·lina en el pollastre

1. La seqüència del cDNA d' α B-cristal·lina obtingut a partir de testicle difereix importantment a la regió 5' de la seqüència de cristal·lí de gall que estava publicada anteriorment.
2. Els transcrits estudiats es presenten amb tres mides diferents de la regió 5', degut a diferents inicis de la transcripció, un de 19 nucleòtids i un de 196 en el testicle i un de 39 en l'embrió. Fins ara només estava descrit el més curt.
3. La regió codificant de la seqüència presenta 99% d'homologia amb la publicada cristal·lí de gall i 94% amb la de cristal·lí d'ànec (*Anas platyrhynchos*). Les diferències en la seqüència representen un canvi en un aminoàcid en la proteïna deduïda respecte a la de cristal·lí de gall (isoleucina enlloc de valina a la posició 10). En aquesta mateixa posició, l'ànec també té isoleucina. Aquestes diferències suggereixen un error en la seqüència publicada anteriorment de cristal·lí de gall o bé l'existència d'un gen diferent.
4. La regió 3' dels transcrits de testicle és idèntica a la descrita prèviament en els transcrits de cristal·lí en seqüència, però més curta en les formes estudiades.

6.2. Segon Objectiu: Caracteritzar l'expressió del gen de la proteïna α B-cristal·lina en diferents teixits del gall

5. Hem comprovat que l' α B-cristal·lina s'expressa en cristal·lí, cervell, ronyó, múscul, cor i testicle immadur, però no significativament en el testicle madur. S'expressa també en embrions en estadis inicials, i en edats més avançades s'expressa en els mateixos teixits que l'adult, excepte en el cor.

6. Quatre formes de mRNA d' α B-cristal·lina s'expressen en diferents proporcions en teixits de gall degut a l'ús de diferents llocs d'inici de transcripció i senyals de poliadenilació alternatives. Per ordre de la grandària de les bandes en un gel d'agarosa (de més gran a més petita), les diferències a les regions 5' i 3' de les quatre formes són:

- 3' llarg/5' llarg
- 3' llarg/5' curt
- 3' curt/5' llarg
- 3' curt/5' curt

Prèviament només es coneixien dues d'aquestes formes i no se sabia que diferien en les regions 3' i 5'

7. Totes les formes presenten en condicions fisiològiques un alt grau de poliadenil·lació.

8. Hi ha evidents diferències en el patró de bandes segons els teixits. Cristal·lí, cervell i embrió total de 6 dies presenten només les bandes de 3' llarg/5' curt i 3' curt/5' curt. Testicle, ronyó, múscul i cor presenten totes quatre bandes en diferents proporcions.

9. Les diferències de llargades dels extrems 3' i 5' podrien modificar l'estabilitat dels trànscrips i d'aquesta manera la seva utilització per la maquinària de traducció cel·lular.

6.3. Tercer Objectiu: Caracteritzar la variació de l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina en gall davant diferents estímuls i proposar un significat funcional.

10. Ni l'expressió del gen ni el nivell de la proteïna augmenten després de sotmetre a estrès tèrmic cèl·lules de cor o de testicle, sinó que disminueixen. L' α B-cristal·lina, doncs, no es comporta com una proteïna d'estrès tèrmic en el pollastre.

11. L'stress oxidatiu tampoc no produeix canvis ni en l'expressió ni en els nivells de proteïna en embrions.

12. La dexametasona augmenta l'expressió en cervell i cristal·lí d'embrió.

13. La dexametasona no indueix l'expressió en el cor dels animals adults en dosis fisiològiques, ni de forma aguda ni en injeccions mantingudes durant una setmana. En dosis mantingudes augmenta la poliadenilació selectiva de la banda de 3' curt/5' llarg, la qual cosa podria implicar un increment d'estabilitat i capacitat de traducció d'aquest missatger.

14. L'Aspirina no té cap efecte important sobre l'expressió en els diferents models de pollastre, ni a dosis puntuals ni a dosis mantingudes. Si es combina Aspirina i estrès tèrmic disminueix l'expressió, d'igual manera que s'observa amb l'estrès tèrmic sol.

15. Totes les quatre bandes de mRNA de l' α B-cristal·lina del cristal·lí de gall es tradueixen activament en els polisomes.

16. En testicle de gall immadur, la banda de 3' curt/5' llarg es troba també en part lliure i estabilitzada a les fraccions no polisòmiques.

6.4. Quart Objectiu: Comparar l'expressió del gen de l' α B-cristal·lina i de l'ubiquitina en les diferents etapes de l'embriogènesi.

17. El gen de l' α B-cristal·lina i el de la poliubiquitina Ubll s'expressen conjuntament en estats inicials del desenvolupament embrionari del pollastre (6 dies).

18. En etapes més avançades del desenvolupament (8 dies), l'expressió dels gens disminueix simultàniament.

19. Aquest fet i les dades prèvies que indiquen que en certes malalties neurodegeneratives apareixen simultàniament a les inclusions l' α B-cristal·lina i la ubiquitina suggereixen que hi hagi mecanismes reguladors comuns de l'expressió d'aquests dos gens.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Mörner CT. Untersuchung der Proteinsubstanzen in den leichtbrechenden Medien des Auges. Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 1894;18:61-106.
2. Groenen PJTA, Merck KB, De Jong WW, Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone α -crystallin. Eur J Biochem 1994;225:1-19.
3. Oguni M, Setogawa T, Hashimoto R, Tanaka O, Shinohara H, Kato K. Ontogeny of α -crystallin subunits in the lens of human and rat embryos. Cell Tiss Res 1994;276:151-154.
4. Patek C, Head M, Clayton R. Effects of age and genetic growth rate on the crystallin composition of the chick lens. Int J Dev Biol 1994;38(4):717-724.
5. Caspers GJ, Leunissen JAM, De Jong WW. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved " α -crystallin domain". J Mol Evol 1995;40(3):238-248.
6. Vasantha Rao P, Horwitz J. Chaperone-like activity of α -crystallin. The effect of NADPH on its interaction with zeta-crystallin. J Biol Chem 1994;269(18):13266-13272.
7. Groenen JTA, Merck KB, De Jong WW, Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone α -crystallin. Eur J Biochem 1994;225:1-19.
8. Boelens WC, De Jong WW. α -Crystallins, versatile stress-proteins Mol Biol Reports 1995;21:75-80.
9. Kato K, Shinohara H, Kurobe N, Goto S, Inaguma Y, Oshima K. Immunoreactive α A-crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay method. Biochem & Biophys Acta 1991;1080:173-180.

10. Brady JP, Garland D, Robison WG, Groome A, Wawrousek EF. Targeted disruption of the mouse α A crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the sHSP protein α B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997;94(3):884-889.
11. Scotting P, McDermot H, Mayer RJ. Ubiquitin-protein conjugates and α B-crystallin are selectively present in cells undergoing major cytomorphological reorganization in early chicken embryos. *FEBS Lett* 1991;285(1):75-79.
12. Iwaki T, Kume Iwaki A, Goldman JE. Cellular distribution of α B-crystallin in non-lenticular tissues. *J. Histochem Cytochem* 1990;38(1):31-9.
13. Kantorow M, Piatigorsky J. α -crystallin/small heat shock protein has autokinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3112-3116.
14. Bernardini F, Juliano C, Benetti D, Mian M, Chiesi M, Mattana A, Franconi F. α B-crystallin is constitutively expressed in cultures of bovine articular chondrocytes, *Biochem and Biophys Res Comm* 1995;208(2):742-747.
15. Kantorow M, Horwitz J, van Boekel MAM, De Jong WW. Conversion from oligomers to tetramers enhances autophosphorylation by lens α A-crystallin. *J of Biol Chem* 1995;270(29):17215-17220.
16. Benjamin IJ, Shelton J, Garry DJ, Richardson JA. Temporospatial expression of the sHSP/ α B-crystallin in cardiac and skeletal muscle during mouse development. *Developmental dynamics* 1997;208(1):75-80.
17. Wistow G, Graham C. The duck gene for α B-crystallin shows evolutionary conservation of discrete promoter elements but lacks heat and osmotic shock response. *Biochem Biophys Acta* 1995;1263:105-113.
18. Das KP, Surewicz WK. Temperature induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of α -crystallin. *FEBS Lett* 1995;369(2-3):321-325.

19. Raman, B Ramakrishna, T Rao, CM. Temperature dependent chaperone-like activity of α -Crystallin. FEBS Lett 1995;365(2-3):133-136.
20. Horwitz J. α -crystallin can function as a molecular chaperone. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:10440-10453.
21. Boyle D, Takemoto L. Characterization of the α - γ and α - β complex: evidence for an in vivo functional role of α -crystallin as a molecular chaperone. Exp Eye Res 1994;58:9-16.
22. Vasantha Rao P, Horwitz J, Zigler S. α -crystallin, a molecular chaperone, forms a stable complex with carbonic anhydrase upon heat denaturation. Biochem & Biophys Res Comm 1993;190(3):786-793.
23. Carver JA, Guerreiro N, Nicholls KA, Truscott RJ. On the interaction of α -crystallin with unfolded proteins. Biochem Biophys Acta 1995;1252(2):251-60.
24. Koretz JF, Doss EW, Reid GH. Analysis of the factors involved in the loss and restoration of the chaperone like function of α B-crystallin. Biochem & Biophys Res Comm 1997;231(2):270-276.
25. Muchowsky PJ, Clark JL. ATP-enhanced molecular chaperone functions of the sHSP human α B-crystallin. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(3):1004-1009.
26. Platter ML, Goode D, Crabbe MJC. Ibuprofen protects α -crystallin against posttranslational modification by preventing protein crosslinking. Ophthalmic Res 1997;29(6):421-428.
27. van den Ijssel PRLA, Smulders RHPH, De Jong WW, Bloemendal H. α -Crystallin, Molecular chaperone and Heat Shock Protein. Ophthalmic Res. 1996;28 Suppl 1:39-43.

28. Smulders RHPH, Vangeel IG, Gerards WLH, Bloemendal H, Dejong WW. Reduced chaperone-like activity of $\alpha A(\text{ins})$ -Crystallin, an alternative splicing product containing a large insert peptide. *Bioch Biophys Res Comm* 1995;270(23):13916-13924.
29. Ortwerth BJ, Sharma KK, Olesen PR. A comparison of the inhibition of porcine pancreatic elastase and human neutrophil elastase by α -crystallin. *Curr Eye Res* 1994;13(8):561-567.
30. Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. HSP 27 blocks Fas/APO-1 and staurosporine induced death. *J Biol Chem* 1996;271(28):16510-16514.
31. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human αB -crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against $\text{TNF}\alpha$ -induced cell death. *EMBO J* 1996;15(11):2695-2706.
32. Buchner J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* 1996;10:10-19.
33. Iwaki A, Nagano T, Nakagawa M, Iwaki T, Fukumaki Y. Identification and characterization of the gene encoding a new member of the α -crystallin/sHSP family, closely linked to the αB -crystallin gene in a head to head manner. *Genomics* 1997;45(2):386-394.
34. Voellmy R, Bromley PA. Massive Heat Shock Polypeptide Synthesis in late chicken embryos: convenient system for study of protein synthesis in highly differentiated organisms. *Mol Cell Biol* 1982;2(5):479-483.
35. Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schafer R, Aoyama A, αB -crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3652-3656.

36. Wang KY, Spector A. α -crystallin can act as a chaperone under conditions of oxidative stress. *Inv Ophthalmol & Vis Sci* 1995;36(2):311-321.
37. Wang K, Wanchao M, Spector A. Phosphorilation of α -crystallin in rat lenses is stimulated by H_2O_2 but phosphorylation has no effect on chaperone activity. *Exp Eye Res* 1995; 61(1): 115-24.
38. Ito H, Okamoto K, Nakayama H, Isobe T, Kato K. Phosphorylation of α B-crystallin in response to various types of stress. *J Biol Chem* 1997;272(47):29934-29941.
39. Neuffer PD, Benjamin LJ. Differential expression of α B-crystallin and HSP27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. *J Biol Chem* 1996; 271(39):24089-24095.
40. Kegel KB, Iwaki A, Goldman JE. α B crystallin protects glial cells from hypertonic stress. *M J Physiol* 1996;270 3(1): C903-9.
41. Ito H, Okamoto K, Kato K. Prostaglandine stimulated the stress induced synthesis of HSP27 and α B-crystallin. *J Cell Physiol* 1997;179(3):255-262.
42. Fawcett TW, Xu Q, Holbrook NJ. Potentiation of heat stress-induced hsp70 expression in vivo by aspirin. *Cell Stress Chaperones* 1997;2(2):104-109
43. Blackburn R, Galoforo S, Berns CM, Ireland M, Cho JM, Corry PM, Lee YJ. Thermal response in murine L929 cells lacking α B-crystallin expression and α B-crystallin expressing L929 transfectants. *Mol Cell Biochem* 1996;155(1):51-60.
44. Scheier B, Foletti A, Stark G, Aoyama A, Dobbeling U, Rusconi S, Klemenz R. Glucocorticoids regulate the expression of stressprotein α B-crystallin. *Mol Cell Endocrinol* 1996;123:187-198.
45. Aoyama A, Fröhli E, Scahfer R, Klemenz R. α B-crystallin expression in Mouse NIH 3T3 fibroblasts: glucocorticoid responsiveness and involvement in thermal protection. *Mol Cell Biol* 1993;13(3):1824-1835.

46. Arai H, Atomi Y. Chaperone activity of α B-crystallin suppresses tubulin aggregation through complex formation. *Cell Struct Funct* 1997;22(5):539-544.
47. Iwaki T, Iwaki A, Fukumaki Y, Tateishi J. α B-crystallin in C6 glioma cells supports their survival in elevated extracellular K^+ : the implication of a protective role of α B-crystallin accumulation in reactive glia. *Brain Research* 1995; 673(1):47-52.
48. Iwaki T, Kume-Iwaki A, Goldman JE, Ogomori K, Tateishi J, Sakaki Y. α B-crystallin is expressed in non lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 1989;57:71-78.
49. Renkawek K, De Jong WW, Merck KB, Frenken CW, van Workum FP, Bosman GJ. α B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jacob disease. *Acta Neurol Berl* 1992;83(3):324-327.
50. Hudson AJ, Muñoz DG. A familiar syndrome of congenital cataract, mental impairment and dentate gyrus atrophy. *Ann Neurol* 1997;41(4):515-520.
51. Ochi N, Kobayashi K, Maehara M, Nakayama A, Negoro T, Shinohara H, Watanabe K, Nagatsu T, Kato K. Increment of α B-crystallin mRNA in the brain of patient with infantile type Alexander's disease. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;179(2):1030-1037.
52. Iwaki A, Iwaki T, Goldman JE, Ogomori K, Tateishi J, Sakaki Y. Accumulation of α B-crystallin in brains of patients with Alexander's disease is not due to an abnormality of the 5'-flanking and coding sequence of the genomic DNA. *Neurosci Lett* 1992;140(1):89-92
53. Collier NC, Schlesinger MJ. Induction of heat-shock proteins in the embryonic chicken lens. *Exp Eye Res* 1986;43:103-117.

54. Renkawek K, Voorter CE, Bosman GJ, van Workum FP, De Jong WW. Expression of α B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Berl* 1994;87(2):155-160.
55. Renkawek K, Bosman G, De Jong WW. Expression of small heat-shock protein hsp 27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia. *Acta Neuropathol Berl* 1994;87:511-519.
56. Taddei N, Liguri G, Sorbi S, Amaducci L, Camici G, Nassi P, Cecchi C, Ramponi G. Cerebral soluble ubiquitin is increased in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1993;151(2):158-161.
57. van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, el Ouagmiri M, Polman CH, Lassmann H, Ravid R. The sHSP α B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 1995;375(6534): 798-801.
58. Kamei A, Iwase H, Masuda K. Cleavage of Amino Acid residue(s) from the N terminal region of α A and α B crystallins in human crystalline lens during aging. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;231(2):373-378.
59. Andley UP, Mathur S, Griest TA, Petrash JM. Cloning, expression and chaperone-like activity of α A-crystallin. *J Biol Chem* 1996;271(50):31973-80.
60. Chandrasekher G, Cenedella RJ. Protein associated with human lens 'native' membrane during aging and cataract formation. *Exp Eye Res* 1995;60(6)707-717.
61. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* 1995;9(12):1173-1182.
62. Frederikse PH, Gardland D, Zigler JS, Piatigorsky J. Oxidative stress increases production of β -amiloid precursor protein and β -amiloid ($A\beta$) in mamalian lenses, and $A\beta$ has toxic effects on lens epithelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271(17):10169-10174.

63. Borkman RF, McLaughlin J. The molecular chaperone function of α -crystallin is impaired by UV photolysis. *Photochem Photobiol* 1995; 62(6):1046-1051.
64. Hightower KR. The role of the lens epithelium in development of UV cataract. *Cur Eye Res* 1995;14(1):71-78.
65. Borkman RF, McLaughlin J. The molecular chaperone function of α -crystallin is impaired by UV photolysis. *Photochem Photobiol* 1995;62:6.
66. Brady JP, Garland D, Duglastabor Y, Robison WG, Groome A, Wawrousek EF. Targeted disruption of the mouse α A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the sHSP α B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(3):884-889.
67. Plater NL, Goode D, Crabbe MJC. Ibuprofen protects α -crystallin against post-translational modification by preventing protein crosslinking. *Ophthalmic Res* 1997, 29(6):421-428.
68. Rubio A, Rifkin D, Powers JM, Patel U, Stewart J, Faust P, Goldamn JE, Mohr JP, Numaguvhi Y, Jensen K. Phenotypic variability of CADASIL and novel morphologic changes. *Acta Neuropathologica* 1997;94(3):247-254.
69. Goebel HH, Voit T, Warlo I, Jacobs K, Johansen U, Müller CR. Immunohistologic and electron microscopic abnormalities of desmin and dystrophin in familial cardiomyopathy. *Rev Neurol* 1994;150(6-7):452-459.
70. Pinder SE, Balsitis M, Ellis IO, Landon M, Mayer RJ, Lowe J. The expression of α B-crystallin in epithelial tumours: a useful marker? *J Pathol* 1994;174(3):209-215.
71. Kato S, Hirano A, Kato M, Herz F, Ohama E. Comparative study on the expression of stress-response protein srp72, srp27, α B-crystallin and ubiquitin in brain tumours. An immunohistochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993;19(5):436-432.

72. Iwaki T, Iwaki A, Tateishi J, Goldman JE. Sense and antisense modification of glial α B-crystallin production results in alterations of stressfiber formation and thermoresistance. *J Cell Biol* 1994;125(6):1385-1393.
73. Ishiguro Y, Kato K, Akatsuka H, Iwata H, Nagaya M. Chemoterapy induced expression of α B-crystallin in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1997;29(1):11-15.
74. Klemenz R, Scheier B, Muller A, Steiger R, Aoyama A, α B-crystallin expression in response to hormone, oncogene and stress. *Verh Dtsch Pathol* 1994;78:34-35.
75. Swamy-Mruthinti S, Green K, Abraham EC. Scheimpflug densitometric analysis of cataracts in diabetic rats: correlation with glycation. *Ophtalmic Res* 1996; 28(4):230-6.
76. Cherian M, Abraham EC. Diabetes affects α -Crystallin chaperon function. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 212(1):184-189.
77. Cherian M, Abraham EC. Glycation of human lens crystallins: effect of age and aspirin treatment. *Ophtalmic Res* 1993; 25(6):349-354.
78. Barbato R, Menabo R, Dainese P, Carafoli E, Schiaffino S, Di Lisa F. Binding of cytosolic proteins to myofibrils in isquemich rat hearts. *Circ Res* 1996;78(5):821-828.
79. Chiesi M, Bennardini F. Determination of α B-Crystallin aggregation: a new alternative method to assess ischemic damage of the heart. *Basic Res Cardio* 1992;87(1):38-46.
80. Head MW, Orbin E, Goldman JE. Coordinate and independent regulation of α B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress 1994;159:41-50.

81. Lee DC, Kim RY, Wistow GJ. An avian α B-crystallin. Non-lens expression and sequence similarities with both small (HSP27) and large (HSP70) heat shock proteins. *J Mol Biol* 1993;232(4):1221-6.
82. Dubin RA, Wawrousek EF, Piatigorsky J. Expression of the murine α B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol Cell Biol* 1989; 9(3): 1083-91.
83. Frederikse PH, Dubin RA, Haynes JI, Piatigorsky J. Structure and alternate tissue-preferred transcription initiation of the mouse α B-crystallin/small heat shock protein gene. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(25): 5686-94.
84. Mezquita J, Pau M, Mezquita C. A novel carbonic anhydrase II mRNA isolated from mature chicken testis displays a TATA box and other promoter sequences in a leader 5' untranslated region not present in somatic tissues. *Gene* 1994;147(2):231-235.
85. Sawada K, Agata K, Eguchi G. Crystallin gene expression in the process of lentoidogenesis in cultures of chicken lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 1992; 55(6):879-887.
86. Mori H, Kondo J, Yhara H. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 1987;235 (4796):1641-1644.
87. Scotting P, McDermott H, Mayer RJ. Ubiquitin-protein conjugates and α B crystallin are selectively present in cells undergoing major cytomorphological reorganisation in early chicken embryos. *FEBS Lett* 1991; 285(1): 75-9.
88. Mezquita J, Lopez-Ibor B, Pau M, Mezquita C. Intron and intronless transcription of the chicken polyubiquitin gene UbII. *FEBS Lett* 1993;319(3):244-248.
89. Srinivasan A, Bhat SP. Investigations into size heterogeneity of the α B-crystallin mRNA. *Indian J Biochem Biophys* 1994;31:351-357.

90. Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995;378(6559):776-779.
91. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death. *EMBO J* 1996 Jun 3;15(11):2695-2706.
92. Dash A, Chung S, Zelenka PS. Expression of HSP70 mRNA in the embryonic chicken lens: association with differentiation. 1994; *Exp Eye Res* 58:381-387.
93. Peled Kamar-M, Lotem J, Okon E, Sachs L, Groner Y. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome. *EMBO J* 1995; 14(20): 4985-93.
94. Hicks DC, Lee JA, Kilgore BS, Burnett CR, Schedewie HK, Hughes ER, Elders MJ. Glucocorticoid effects on embryonic chick heart. I. Glucocorticoid enlargement of the heart. *Ann Clin Lab Sci* 1982;12:477-483.
95. Scheier B, Foletti A, Stark G, Aoyama A, Dobbeling U, Rusconi S, Klemenz R. Glucocorticoids regulate the expression of the stressprotein α B-crystallin. *Mol Cell Endocrinol* 1996;123:187-198.
96. Kamiya T, Zigler J. Long-term maintenance of monkey lenses in organ culture: a potential model for the study of human cataractogenesis. *Exp Eye Res* 1996;63:425-431
97. Mezquita J, Pau M, Mezquita C. Heat Shock inducible polyubiquitin gene Ubl undergoes alternative initiation and alternative splicing in mature chicken testes. *Mol Repr Devel* 1997;46:471-475
98. Chen CYA, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *TIBS* 1995;20:465-470

99. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3'UTR of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986;46:659-667
100. Sax CM, Piatigorsky J. Expression of the α -Crystallin/sHSP/Molecular Chaperone genes in the lens and other tissues. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1994;69:155-201
101. Gu W, Morales C, Hecht NB. In male mouse germ cells, copper-zinc superoxide dismutase utilizes alternative promoters that produce multiple transcripts with different translation potential. *J Biol Chem* 1995;270:236-243
102. Cvekl A, Piatigorsky J. Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* 1996;18(8):621-630
103. Spector A, Wang GM, Wang RR, Garner WH, Moll H. The prevention of cataract caused by oxidative stress in cultured rat lenses *Cur Eye Res* 1992;12(2):163-179
104. Tamm ER, Russell P, Johnson DH, Piatigorsky J. Human and monkey trabecular meshwork accumulate α B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(12):2402-2413
105. Onoagbe IO. Effects of glucocorticosteroids and insulin on tyrosinase activity in isolated chick embryo hepatocytes and intact embryos in ovo. *Arch Biochem Biophys* 1994; 309(1):58-61
106. Ito H, Hasegawa K, Inaguma Y, Kozawa O, Kato K. Enhancement of stress-induced synthesis of hsp27 and α B-crystallin by modulators of the arachidonic acid cascade. *J Cell Physiol* 1996;166(2):332-339
107. Lee DC, Kim RY, Wistow GJ. An avian α B-crystallin. Non-lens expression and sequence similarities with both small (HSP27) and large (HSP70) heat shock proteins. 1993;*J Mol Biol* 232(4):1221-1226

108. Shang F, Taylor A. Oxidative stress and recovery from oxidative stress are associated with altered ubiquitin conjugating and proteolytic activities in bovine lens epithelial cells. *Biochem J* 1995;307(1):297-303
109. Mezquita J, Pau M, Mezquita C. Several novel transcripts of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expressed in adult chicken testis. *J Cell Biochem* 1998;71(1):127-139

AGRAÏMENTS

M'agradaria poder donar les gràcies a totes aquelles persones que han contribuït d'alguna manera a la realització d'aquesta Tesi:

Al Professor Cristóbal Mezquita per haver estat el meu guia i un exemple a seguir ja des de les classes de Fisiologia del segon curs de la carrera. Ell em demostrà que no m'havia equivocat escollint els estudis de Medicina si la meva intenció era dedicar-me a la investigació i esperonà el meu interès a continuar per aquest camí. També li estic agraït per haver-me acollit en el seu laboratori, per acceptar a dirigir-me la tesi doctoral i per haver-me ensenyat a raonar com un científic.

A la Doctora Jovita Mezquita per ensenyar-me totes les tècniques bàsiques necessàries per a treballar en Genètica Molecular i per dirigir els meus primers passos vacil·lants pel laboratori. Pels seus bons consells, idees i propostes sempre que he tingut un problema a solucionar.

Als meus companys del Laboratori de Genètica Molecular pel seu suport. Al Doctor Pau Mezquita per haver compartit amb mi un munt d'experiències de totes menes durant els darrers deu anys, per haver-me tractat sempre com a un germà i un amic i especialment per haver-me guiat fins al Laboratori. A la Montse Pau per ensenyar-me tot allò que no surt als llibres, per ajudar-me quan he necessitat un cop de mà i per demostrar-me que a la vida no tot és Ciència; pel seu bon humor i per tota l'experiència d'anys de treball que ha compartit amb mi. Al Doctor Xavier Vilagrasa pel seu suport tècnic durant aquests anys, pels consells en els moments adequats i per guiar-me en les bases de la redacció d'una tesi. Al Víctor Francone per aguantar-me de veí de laboratori i donar-me amena conversa sempre que li ha estat possible; també per posar els seus músculs i ingeni al meu servei quan han fet falta i sobretot pel seu companyerisme incondicional. A la Belén Mezquita per la col·laboració en els darrers experiments, per les emocionants excursions a la muntanya a buscar material i per la seva especial habilitat en tractar els galls.

A tots els investigadors dels laboratoris de la Facultat que, com a bons veïns i col·legues m'han ajudat quan els ho he demanat. A la Fundació Universitària Pedro i Pons per haver-me concedit la beca que ha fet possible la realització d'aquesta Tesi. Al Doctor Joram Piatigorski per haver-me acollit un temps al seu laboratori i haver-se preocupat per mi més enllà dels seus deures d'anfitrió. Al Doctor Mark Kantorow per haver-me ensenyat moltes coses més importants que no pas unes tècniques noves.

A la meva família per haver-me fet costat sempre, pel seu amor i per haver-me donat suport pacientment al llarg de tota la meva vida d'estudiant. A la Yolanda per haver decidit compartir la vida amb un científic, amb tots els inconvenients que això comporta.