

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**EVOLUCIÓ DELS MECANISMES DE CONTROL  
DEL METABOLISME DEL GLICOGEN**

**DANIEL CIFUENTES BUIRA**

Barcelona, maig de 2006

Programa de Doctorat de Biotecnologia  
Bienni 2000-2002

## **F. MATERIALS I MÈTODES**



## BIOLOGIA MOLECULAR

Tot el material fungible utilitzat en biologia molecular està autoclavat i es manipula amb guants. Les etapes que impliquen la manipulació de bacteris s'han fet en condicions d'asèpsia, en una cabina de flux laminar horitzontal o al costat d'una flama.

### PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet obtenir *in vitro* grans quantitats de DNA amb una seqüència concreta. Aquesta amplificació s'aconsegueix imitant el mateix procés que es segueix a la natura. La DNA polimerasa sintetitza una cadena complementària a la del DNA motlle per incorporació de deoxinucleòtids a una cadena preexistent o encebadora. La reacció es divideix en tres fases que es repeteixen cíclicament i determinades per la temperatura a la que es duu a terme la reacció: deshibridació de les cadenes motlle, unió dels encebadors i elongació de la cadena.

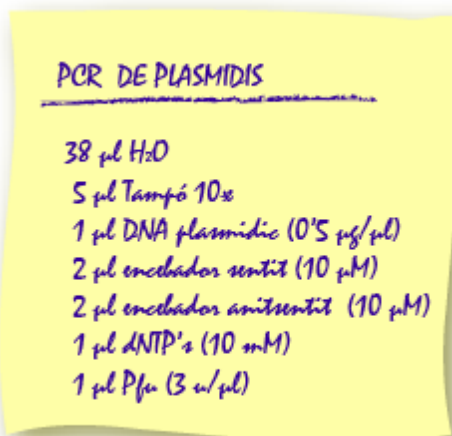
A l'hora de fer una PCR ajustarem els seus paràmetres a les nostres necessitats. Les característiques principals de la PCR són:

- ▶ Fidelitat: és la quantitat de mutacions que incorporen les còpies respecte al DNA motlle original. La DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) incorpora mutacions a un ritme de  $1,3 \cdot 10^{-6}$  mutacions per cada parell de bases, la de *Termophilus aquaticus* (Taq) ho fa amb una freqüència de  $8,0 \cdot 10^{-6}$ .
- ▶ Processivitat: Combina la longitud i la velocitat de síntesi de DNA. La Taq té una velocitat de 2 Kb/min, i la Pfu de tan sols 0,5 Kb/min, tanmateix la Pfu permet amplificar fragments més llargs perquè es manté unida més temps a la cadena elongada que la Taq i perquè incorpora menys mutacions.
- ▶ Especificitat: El fragment de DNA que volem amplificar el definim per la seqüència dels oligonucleòtids o encebadors que utilitzem i que flanquegen el tram de DNA desitjat. Els encebadors acostumen a tenir una longitud d'entre 20

i 35 nucleòtids, amb un alt contingut de G+C (sobretot a l'extrem 3') per afavorir les interaccions amb el DNA motlle.

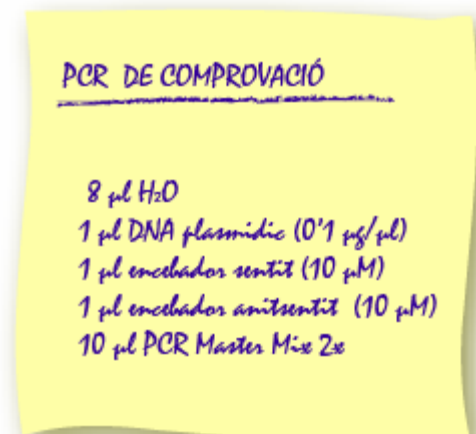
► Quantitat: La quantitat de DNA que es pot obtenir oscil·la entre el rang dels nanograms i els micrograms. Obtindrem més DNA emprant la Taq o augmentant el número de cicles (entre 25 i 35 cicles) però en detriment de la fidelitat de les còpies.

En el projecte presentat en aquesta memòria, la tècnica de la PCR s'ha utilitzat amb quatre finalitats bàsiques:



1.- **Amplificació de gens a partir de plasmidis** com a pas previ a les estratègies de clonació. Volem obtenir el màxim de DNA possible però primant la fidelitat, perquè normalment aquest DNA s'emprarà en l'expressió de proteïna. Per això fem servir la *Pfu* (*Pfu DNA polymerase*, Promega), en reaccions amb 50 µl de volum final i amb el seu tampó que ja inclou MgSO<sub>4</sub>.

2.- **Amplificació de DNA com a eina de detecció i diagnòstic**, per determinar la presència o absència d'un fragment de DNA concret en un plasmidi o en un organisme. En aquest cas el DNA només el visualitzarem com una banda en un

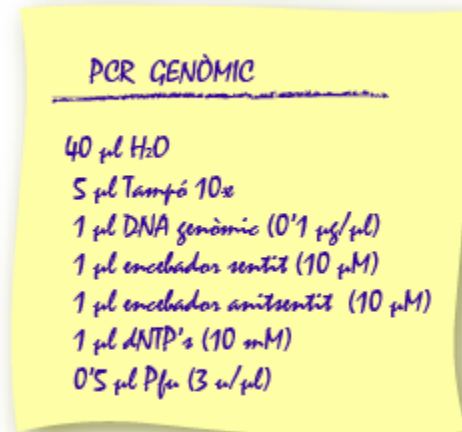


gel d'agarosa, i no l'utilitzarem en cap pas subsegüent d'expressió. Com que no cal ser massa exigents amb la fidelitat, però sí amb la quantitat de DNA, utilitzarem una mescla de *Taq* polimerasa que porta els nucleòtids incorporats (*Taq DNA polymerase Master Mix*, Promega), en reaccions amb

15 µl de volum final.

3.- **Clonació de gens d'interès a partir de DNA genòmic.** Seguirem un procés molt similar a quan volem amplificar gens a partir de plasmidis, però ara haurem d'afinar molt més la temperatura d'hibridació dels encebadors i la quantitat de DNA genòmic per aconseguir amplificar el gen desitjat.

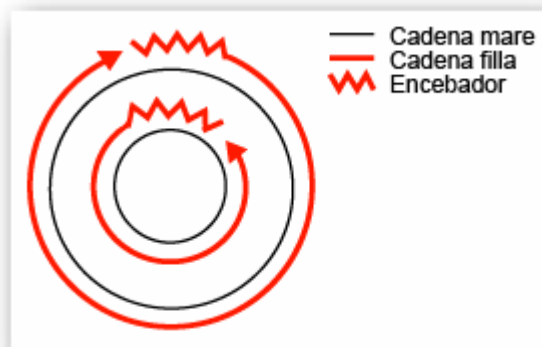
En aquest tipus de PCR el principal problema són les amplificacions inespecífiques degut a que el DNA genòmic té molts més trams de seqüència on es poden hibridar de forma inespecífica els encebadors. Sovint aconseguir la desnaturalització completa del DNA genòmic a l'inici de la PCR pot suposar un inconvenient, afegir  $1/16$  de DMSO ( $\%v$ ) en la mescla de reacció pot ajudar a la correcta deshibridació de les cadenes que volem amplificar.



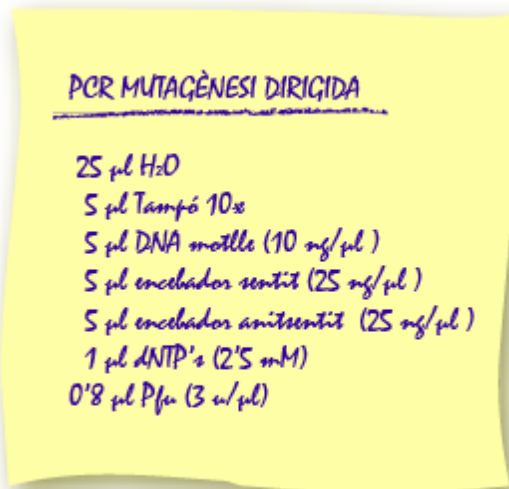
4.- **Mutagènesi dirigida**, permet reemplaçar aminoàcids concrets se la seqüència de la proteïna per uns altres. A diferència de les tres aplicacions anteriors de la PCR, la quantitat de DNA que obtenim no augmenta exponencialment amb el número de cicles sinó que és un procés aritmètic. Això és degut a que els encebadors que utilitzem per fer la mutagènesi són totalment complementaris entre ells.

En aquesta aplicació aprofitem que els plasmidis amplificats en bacteris estan metilats i que hi ha enzims de restricció que només reconeixen les seves dianes de tall quan aquestes estan metilades.

Es dissenyen els encebadors de manera que continguin la mutació que volem introduir just al mig de la seqüència. Per la disposició dels encebadors, quan fem la PCR amb



la polimerasa *Pfu* s'amplificarà tot el plasmidi. Obtindrem així una barreja de plasmidis originals i de plasmidis còpia amb la mutació.



Per eliminar el plasmidi original que hem fet servir de motlle, afegim 1 µl de l'enzim de restricció DpnI (*Promega*) directament al tub on tenim el producte de PCR (no cal cap purificació prèvia ni afegir un tampó diferent). Ho incubem una hora a 37°C, durant aquest temps l'enzim DpnI tallarà només els DNA

metilats, és a dir, els plasmidis parentals que shan purificat a partir de bacteris.

Quan després de la digestió transformem el producte final en bacteris competents, només els bacteris transformats amb els plasmidis amplificats per PCR amb la mutació incorporada podran formar colònies.

Comprovem per restricció o per seqüenciació que els clons obtinguts contenen plasmidis amb la mutació incorporada.

## ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'AGAROSA

Aquesta tècnica permet separar i purificar fragments de DNA de diferent tamany. Sotmetem a les molècules de DNA dipositades en un gel horitzontal d'agarosa (fase estacionària) submergit en tampó d'electroforesi (fase mòbil) a un camp elèctric de corrent continu.

Totes les molècules de DNA notaran el mateix impuls perquè l'acceleració produïda pel camp elèctric és funció de la relació càrrega/massa, que sempre serà constant degut a l'estructura del DNA. Com que la càrrega del DNA depèn dels fosfats de l'enllaç fosfoéster entre els nuclèotids, com més llarga sigui una molècula, més càrrega tindrà però al mateix temps serà més gran. Tanmateix aconseguim separar les molècules de diferent longitud en

funció del pes molecular aparent gràcies a la fricció del DNA amb la matriu porosa del gel d'agarosa. Els fragments més petits de DNA patiran menys fregament i es desplaçaran més que el fragments llargs, formant una banda estreta.

Generalment l'electroforesi es fa amb gels a l'1% d'agarosa ( $\frac{p}{v}$ ). Per preparar-lo pesem 0,5 grams d'agarosa en pols i afegim a un erlenmeyer amb 50 ml d'aigua i 1 ml de tampó TAE 50x (concentrat 50 vegades). Evitarem que l'agarosa s'enganxi per les parets si no agitem l'erlenmeyer. Tapem la boca de l'erlenmeyer amb un manyoc de paper per evitar evaporacions i ho escalfem al microones fins que comenci a bullir. Es pot veure com l'agarosa s'ha hidratat i es comença a fondre. Quan la suspensió sigui totalment transparent la deixarem refredar fins que deixi de cremar al tacte, llavors ho transvasem tot a un recipient de plàstic de 50 ml (no reutilitzable) i li afegim el 5 $\mu$ l de bromur d'etidi d'una solució concentrada de 2mg/ml. Aquesta barreja l'aboquem al motlle que ens servirà per fer el gel, vigilant de no fer bombolles.

La mostra de DNA es carrega en uns pous que hem fet amb un motlles similar a una pinta. Com que el gel està cobert amb el tampó d'electroforesi, barregem el DNA amb tampó de càrrega en una relació 1:5 ( $\frac{v}{v}$ ) per donar-li densitat i evitar que s'escampi per la cubeta. A més, el tampó de càrrega també incorpora el blau de bromofenol, que ens servirà per indicar on està el front d'electroforesi.

Un cop tenim el gel carregat amb les mostres, connectem el circuit de manera que el pol on hem carregat les mostres sigui el negatiu i el DNA pugui desplaçar-se cap al pol positiu, vigilant que el sistema no es sobreescalfi i es fongui el gel d'agarosa.

Per visualitzar el DNA aprofitem que el bromur d'etidi és una molècula orgànica que s'intercala entre les bases del DNA i emet una fluorescència taronja quan l'excitem amb llum ultraviolat. Així sabem que el nostre DNA es situa allà on observem una banda ataronjada. Cal manipular amb guants i molta precaució tots els objectes i solucions que hagin estat en contacte amb el



bromur d'etidi, ja que és un potent carcinògen. També ens hem de protegir els ulls amb ulleres de protecció front la llum UV quan visualitzem les bandes de DNA en el transil·luminador.

Si el gel ha corregut correctament, observarem un patró de bandes característic per cada mostra que hem carregat. El pes aparent dels fragments de DNA de la mostra el podem deduir per comparació amb un DNA patró amb fragments de pes conegut, en el nostre cas hem utilitzat el genoma de bacteriòfag  $\lambda$  digerit amb els enzims de restricció EcoRI i HindIII (*Promega*), que rendeixen uns fragments de DNA d'entre 125 i 21000 parells de bases.

Cal tenir present que la relació entre el pes dels fragments de DNA i la distància correguda és logarítmica. Ajustant el % d'agarosa en el gel podem resoldre una gran diversitat de pesos moleculars.

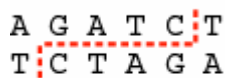
### DIGESTIÓ DE DNA AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ.

Per prevenir l'incorporació de DNA forani, molts organismes expressen enzims de restricció (ER), anomenats així perquè degraden específicament el DNA intrús. La característica principal dels enzims de restricció amb aplicació a la biologia molecular és que tallen en llocs molt específics del DNA, cada enzim de restricció reconeix una seqüència única que serà per on tallarà el DNA.

Usualment els llocs de tall són seqüències palindròmiques, i la manera en que tallen el DNA es pot resumir en tres grups principals:



- Tall rom: l'ER talla les dues cadenes pel mateix lloc.



- Tall amb protrusió 3': l'ER talla les dues cadenes per llocs diferents però sempre sobresurt l'extrem 3' en els fragments resultants.



- Tall amb protrusió 5': l'ER talla les dues cadenes per llocs diferents però sempre sobresurt l'extrem 5' en els fragments resultants.

Per digerir amb èxit el DNA cal ajustar les concentracions d'enzim i DNA per evitar la degradació d'aquest darrer. Distingirem dos tipus de restricció, la preparativa i la de verificació.

En la digestió preparativa modifiquem el DNA per fer-lo servir en estratègies de clonatge posterior, per això treballem amb 5-10 µg de DNA i 1 µl d'ER, en un volum final de 50 µl.

La digestió de verificació ens serveix per identificar molècules de DNA segons el seu mapa de restricció. En aquest cas treballem en un volum final de 20 µl amb 1 µg de DNA i 0,5 µl d'ER.

Cada enzim de restricció s'adquireix juntament amb el seu tampó idoni deu vegades concentrat.

La majoria de les reaccions de digestió es duen a terme en estufes atemperades a 37°C per un període d'entre 4 i 16 hores, en funció de la quantitat de DNA. Excepcionalment trobem enzims que treballen a temperatura ambient, com per exemple *SmaI* o a 50 °C com *SfiI*.

## CONSTRUCCIONS I MUTANTS:

El plasmidi pEGFP-*HsMGS* (Ferrer et al., 1997) que codifica per la glicogen sintasa muscular fusionada a l'extrem C-terminal de la proteïna GFP es va fer servir com a motlle per generar els mutants emprats en aquesta memòria (Cid et al., 2005). A continuació es detallen el nom, la seqüència directa dels encebadors utilitzats per generar els mutants i la diana de restricció que es genera o es destrueix segons cas.

- **E510A:** CCTCCTACTATGCGCCATGGGGCTACAC +*NcoI*
- **E518A:** CACACCGGCTGCATGCACGGTTATG +*SphI*
- **22a:** CCGCACTTTAGCGATGTCAGCCTTGCCGGGCC –*ClaI* –*HindIII*
- **45:** CACGACACTCGGCGCCGCACCAGGTTCGAGGACGAGGAGG +*NarI*
- **3abc:** CCACGGCCAGCCGCGGTGCCACCGGCCCCCTCGCTGG  
CACGACACTCC +*SacII*
- **1a:** CCGCGCCGAGCGGCATGCACCTCCTCCACC +*SphI*

- **1b:** GCAAGCGCAACGCTGTCGACACGGCCACC +*Sall*
- **R1:** TCAGCAGAGCGCGGCGCAGGCTATCATCCAGC
- **R2:** TATCATCCAGGCGAACGCCACGGAGGCCCTCTCCGACC

De forma resumida es detallen les estratègies de clonatge dels diferents mutants de deleció d'*HsMGS*.

- **pEGFP-*HsMGS*:** pTAC2-*HsMGS* (*NdeI/Klenow/Sall*), el fragment que contenia el cDNA de l'enzim es lligà a pEGFP-C1 (*BglII/Klenow/Sall*).
- **Sal tail i -Sal tail:** pEGFP-*HsMGS* (*Sall*), el fragment de la cua es lligà amb pEGFP-C1 (*Sall*) (mutant Sal tail) i la resta es relligà (-Sal tail).
- **t1 i  $\Delta$ t1:** pEGFP-*HsMGS* (*KpnI*), el fragment de la cua es lligà amb pEGFP-C1 (*KpnI*) (mutant t1) i la resta es relligà ( $\Delta$ t1).
- **t2 i  $\Delta$ t2:** pEGFP-*HsMGS* (*BamHI*), el fragment de la cua es lligà amb pEGFP-C1 (*BamHI*) (mutant t2) i la resta es relligà ( $\Delta$ t2).
- **t3:** pEGFP-*HsMGS* (*HindIII*), el fragment de la cua es lligà amb pEGFPC1 (*HindIII*).
- ***HsMGS-RnLGS*:** pEGFP-RLGS (*Sall*), el fragment de la cua C-terminal es lligà al vector pEGFP-*HsMGS*-Sal (creat per mutagènesi i digerit amb *Sall*) un cop eliminat el fragment C-terminal de l'enzim muscular.

## PREPARACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS

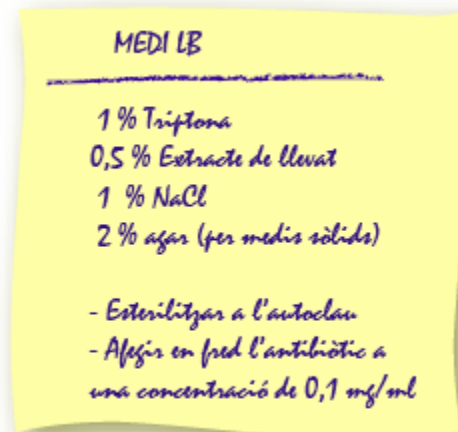
El bacteris s'utilitzen en biologia molecular com a bioreactors per obtenir grans quantitats de DNA i proteïnes d'interès. Prèviament però, cal haver introduït els gens que volem amplificar o expressar.

Això s'aconsegueix per mitjà de la transformació, la tècnica que permet als bacteris incorporar DNA exogen, generalment DNA plasmídic. Però per a que acceptin el plasmidi, els bacteris han estat sotmesos a un tractament que les fa "competents" per acceptar DNA forani. Bàsicament aquest procediment consisteix en ralentitzar el metabolisme dels bacteris i en debilitar la paret

cel·lular, per crear porus en la paret i la membrana per on pugui entrar el plasmidi.

En aquest projecte hem utilitzat la soca d'*Escherichia coli* DH5α com el bacteri idoni per transformar en les estratègies de clonatge o produir DNA plasmídic en grans quantitats. El seu genotip distintiu és  $F' \phi 80d\text{lacZ} \Delta(\text{lacZYA-argF}) \text{U169 } \text{deoR } \text{recA1 } \text{endA1 } \text{hsdR17 } (\text{rk}^-, \text{m } \text{k}^+) \text{phoA } \text{supE44 } \lambda^- \text{thi-1 } \text{gyrA96 } \text{relA1}/F' \text{proAB+ } \text{lacIqZdeltaM15 } \text{Tn10}(\text{tetr})$ . Aquestes deleccions de gens que presenta la soca DH5α estan dirigides a optimitzar i maximizar la producció de DNA plasmídic, al mateix temps que eviten recombinacions amb el DNA genòmic del bacteri.

En medi de creixement dels bacteris és el medi LB (brou Luria Bertrani), tant per a cultius líquids com sòlids. El medi es complementa amb l'antibiòtic (ampicil·lina o kanamicina) a una concentració final de 0,1 mg/ml, just abans de fer-lo servir.



Durant tot el procediment per preparar les cèl·lules competents és molt important respectar les temperatures de treball. També és important que els medis que es fan servir estiguin atemperats prèviament per evitar retards en el creixement. Amb protocol de preparació de bacteris competents s'obtenen unes cèl·lules amb una eficiència de transformació  $>10^7$  colònies/ $\mu\text{g}$  DNA. Els passos a seguir són els següents:

- ▶ Inoculem *E. coli* DH5α en un erlenmeyer de 250 ml amb 30 ml de medi LB i ho deixem créixer tota la nit 20 °C amb agitació orbital vigorosa (250-350 rpm).
- ▶ Controlem la densitat del cultiu (absorbància a 550 nm; el blanc és medi LB fresc). Quan observem terbolesa ( $\text{DO}_{550} < 0.1$ ) transferim tot el cultiu a un erlenmeyer de 500 ml amb 70 ml de medi LB atemperat a 37°C (100 ml de volum final de medi).

► Augmentem la temperatura d'incubació a 37 °C i es manté l'agitació vigorosa. Quan tornem a observar terbolesa ( $DO_{550} < 0.1$ ) transferim tot el cultiu al darrer erlenmeyer, d'un litre de capacitat i amb 100 ml d'LB atemperat a 37°C (volum final de 200 ml).

► Mantenim les cèl·lules en creixement a 37 °C i amb agitació vigorosa fins que arriben a una  $DO_{550}$  entre 0,45-0,5. Llavors retirem el cultiu de l'incubador i el refredem ràpidament sense deixar d'agitar en un bany de gel amb sal. A partir d'aquest pas són crítics la velocitat i la temperatura de treball (idealment a 4 °C).

TFBI (100 ml)

3 ml de KOAc 1M  
5 ml de MnCl 1 M  
10 ml de RbCl o KCl 1M  
1 ml de CaCl<sub>2</sub> 1M  
15 ml de Glicerol  
- Afegir aigua fins a 100 ml  
- Esterilitzar per filtració

► Repartim els 200 ml de cultiu entre quatre tubs estèrils de plàstic de 50 ml prèviament atemperats a -20° C, i els centrifuguem 5 minuts a 2500 rpm a una temperatura de 4° C en una centrifuga refrigerada o en absència d'aquesta, amb un rotor prèviament atemperat a 4 °C.

► Descartem els sobrenedants, resuspenem cadascun dels pellets en 15 ml de TfBI a 4 °C amb una pipeta i tornem a centrifugar 5 minuts a 2500 rpm i a 4 °C.

TFBII (100 ml)

1 ml de NaMOPS 1M (pH = 7)  
7,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 1M  
1 ml de RbCl o KCl 1M  
15 ml de Glicerol  
- Afegir aigua fins a 100 ml  
- Esterilitzar per filtració

► Descartem els sobrenedants i resuspenem amb cura cadascun dels pellets en 2 ml de TfbII a 4 °C.

► Aliquotem les suspensions en eppendorfs prèviament refrigerats a -20° C, 50 µl de cèl·lules competents en cada tub, i les congelem amb nitrogen líquid. Les alíquotes preparades i congelades es guarden a -80 °C fins al moment d'utilitzar-les.

## TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS PER XOC TÈRMIC

Per a la transformació utilitzem una alíquota de 50  $\mu$ l de bacteris competents. Aquestes alíquotes es guarden a  $-80$  °C, i durant les primeres etapes de la transformació és imprescindible que en tot moment estiguin en gel.

Afegim el DNA suaument, evitant superar la proporció 1:10 ( $V/V$ ) respecte al volum dels bacteris. Incubem la mescla de DNA i bacteris 30 minuts en gel, per permetre la interacció dels bacteris amb els plasmidis. A continuació fem un xoc tèrmic de 90 segons a  $42$ °C en un bloc sec. Aquest és el pas crític on s'obren porus en la membrana a causa de la diferència de temperatura.

Immediatament després del xoc tèrmic tornem a refredar els bacteris en gel i passats 2-3 minuts afegim 1 ml de medi LB a eppendorf i deixem recuperar els bacteris durant 1 hora a  $37$ °C amb agitació orbital.

Durant aquest temps els bacteris es refaran del xoc tèrmic i també començaran a expressar el gen procedent del plasmidi i que els confereix resistència als antibiòtics. Si escurcem el temps de recuperació, reduïrem el nombre de cèl·lules viables perquè no hauran reconstituït la paret i la membrana cel·lular i no hauran expressat prou els gens de residència als antibiòtics. Per altra banda, si allarguem massa el temps d'incubació a  $37$ °C, com que els bacteris estan en medi ric començaran a dividir-se, complicant el procés de selecció dels clons amb el DNA d'interès.



Passat el xoc tèrmic i el temps de recuperació, alguns dels bacteris hauran incorporat el plasmidi tot i que la gran majoria no s'hauran transformat. Per seleccionar només aquells bacteris que han incorporat el DNA plaquegem 100  $\mu$ l de bacteris en una placa de Petri de  $\varnothing$ 100 mm amb medi LB agar més l'antibiòtic de selecció. Incubem la placa amb els bacteris a  $37$ °C tota la nit,

amb la precaució de dipositar la placa cap per avall per evitar que les gotes de condensació caiguin sobre l'agar.

L'endemà es poden observar colònies de bacteris que han crescut sobre la superfície de l'agar. Cada colònia representa un bacteri transformat amb el DNA exogen i que s'ha multiplicat per expansió clonal fins a formar una colònia de bacteris, tots ells amb el plasmidi i resistents a l'antibiòtic de selecció.

Si prolonguem l'incubació a 37°C, al voltant de les colònies de bacteris resistents a l'antibiòtic de la placa començaran a sorgir unes colònies més petites anomenades microsatèl·lits. Aquestes colònies no incorporen el plasmidi però poden créixer gràcies a que la colònia central ha degradat l'antibiòtic al seu voltant.

Un cop han crescut les colònies a la placa, podem procedir a la verificació de les colònies o desar la placa a 4°C segellada amb parafilm.

### **PURIFICACIÓ DE DNA**

S'ha fet servir aquest protocol per obtenir quantitats importants de plasmidi (100-500 mg). El plasmidi purificat obtingut és d'alta puresa i es pot utilitzar tant en reaccions de restricció, lligació, etc. com per seqüenciar o transfectar. El fonament del mètode és una lisi alcalina del cultiu cel·lular, seguida d'una purificació mitjançant cromatografia d'intercanvi iònic en columna (QIAGEN Plasmid Maxi prep o Concert High Purity Plasmid Maxiprep System). Abans de començar l'aïllament del DNA, s'ha guardat un petit volum del cultiu bacterià (1 ml) amb el qual s'ha preparat un estoc de cèl·lules afegint-hi un volum de glicerol al 50% estèril per tal que quedi a una concentració final del 15%. Aquest estoc es manté congelat a -80°C i servirà per a créixer més cultiu bacterià sense necessitat de transformar. Els plasmidis finals han estat finalment dissolts en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0.

## PURIFICACIÓ D'RNA

L'RNA es pot utilitzar tant per clonar el cDNA d'un gen concret com per quantificar la seva expressió relativa. En qualsevol dels dos casos, cal purificar l'RNA i el protocol variarà segons el material de partida sigui teixit o cèl·lules en cultiu.

En totes les manipulacions d'RNA cal extremar les precaucions per evitar degradació per RNAses. Sempre s'haurà de treballar amb guants i el material autoclavat també haurà estat manipulat amb guants.

El protocol que exposem a continuació per purificar RNA té dos parts. La primera consisteix en una purificació d'RNA total pel mètode del TRIzol i la segona és una re-purificació i neteja de l'RNA total que fem amb columnes RNeasy (*RNeasy Total RNA Isolation Kit, QIAGEN*). Si partim de mostres de teixit haurem de fer les dues purificacions, en canvi si la nostra mostra prové de cèl·lules en cultiu només cal fer la purificació en minicolumneta.

### Purificació d'RNA total amb TRIzol

- ▶ Homogeneïtzem 50-100 mg de teixit en 1ml de TRIzol utilitzant el politró o un homogeneïtzador Dounce. El volum de la mostra no ha d'excedir el 10% del volum de TRIzol emprat en l'homogeneïtzació.
  
- ▶ Centrifuguem a 12.000 x g durant 10 minuts a 4 °C per eliminar el material insoluble, greix, polisacàrids i restes de teixit. Transferim el sobrenedant a un tub eppendorf net.
  
- ▶ Incubem les mostres homogeneïtzades 5 minuts a temperatura ambient (TA) per permetre la dissociació completa dels complexos de nucleoproteïnes. Afegim 0,2 ml de cloroform per cada 1 ml de TRIzol utilitzat. Tanquem els tubs amb compte de que la tapa no toqui el cloroform, en cas contrari la tapa no tancaria hermèticament i podríem perdre mostra. Agitem els tubs vigorosament sacsejant-los a mà i després els deixem reposar 3 minuts a TA.



- ▶ Centrifuguem les mostres a 12.000 x g durant 15 minuts a 4 °C. Després de la centrifugació, la mescla es separa espontàniament en una fase orgànica de color vermell situada en la part inferior del tub i una fase incolora que conté tot el nostre RNA.
- ▶ Transferim la fase aquosa a un tub net (té aproximadament el 60% del volum del TRIzol utilitzat en la homogeneïtzació). Procedim a precipitar l'RNA afegint 0,5 ml d'isopropanol per cada 1 ml de TRIzol inicial. Incubem les mostres durant 10 minuts a TA i després les centrifuguem 10 minuts a 12.000 x g i 4 °C.
- ▶ Aspirem el sobrenedant amb molta precaució i el descartem. En el cas de teixits amb molt contingut d'RNA es pot observar un pellet de color blanquinós. Rentem el pellet amb 1 ml etanol al 75% per cada ml de TRIzol inicial. Agitem amb el vòrtex i centrifuguem a 7.500 x g durant 5 minuts i a 4 °C.
- ▶ Després de la centrifugació aspirem el sobrenedant i deixem assecar l'RNA a l'aire durant uns 10 minuts. Quan ja no observem restes d'etanol, dissolem l'RNA en 100 µl d'aigua lliure d'RNAses. El desem a -80 °C.

### **Purificació d'RNA total en columna d'afinitat (*RNeasy*)**

- ▶ Si comencem la purificació a partir de cèl·lules en cultiu (fresques o congelades) afegirem 350 µl de tampó RTL i rascarem amb una espàtula de plàstic d'un sol ús i ho passem tot a un eppendorf. El lisat cel·lular el fem passar 5 vegades per una xeringa amb agulla de 5 gauges per acabar de trencar les cèl·lules i reduir la viscositat de la mostra deguda al DNA genòmic. Si continuem la purificació d'RNA a partir de teixit només cal afegir 350 µl de tampó RTL.
- ▶ Afegim 350 µl d'etanol al 70% per precipitar l'RNA. Si hi ha molta quantitat d'RNA s'observarà una terbolesa lletosa.

- ▶ Passem tot el contingut del tub (precipitat inclòs) a una minicolumneta amb recol·lector i centrifuguem 1 minut a 10.000 rpm.
  
- ▶ Descartem l'eluit i afegim 700 µl de tampó RW1 a la minicolumneta. Tornem a centrifugar 1 minut a 10.000 rpm.
  
- ▶ Canviem la minicolumneta de tub recol·lector, li afegim 500 µl de tampó de rentar RPE i centrifuguem 2 minuts a 10.000 rpm.
  
- ▶ Descartem l'eluit i tornem a centrifugar 1 minut a 10.000 rpm sense afegir res a la columna, així aconseguim eixugar la reïna de qualsevol resta d'etanol que podria interferir en aplicacions posteriors.
  
- ▶ Per eluir l'RNA afegim 50 µl d'aigua lliure d'RNAses, incubem la columna 1 minut a TA i centrifuguem 1 minut a 12.000 rpm. Quantifiquem l'RNA purificat i el desem a -80 °C.
  
- ▶ És recomanable comprovar l'integritat de l'RNA. Per això fem una electroforesi en un gel d'agarosa a l'1% amb 0,5 µg d'RNA i verifiquem que la relació entre les dues bandes més visibles, les d'RNA ribosomal 28S i 18S, és de 2:1.

## **RETROTRANSCRIPCIÓ: OBTENCIÓ DE cDNA A PARTIR D'RNA**

En la reacció de retrotranscripció sintetitzem una cadena de DNA complementària (cDNA) a partir d'un RNA motlle. Aquest cDNA, al contrari de l'RNA, es pot amplificar per PCR i és el material de partida que utilitzem en la clonació de gens i la Quantificació per PCR en Temps Real (QRT-PCR).

L'elecció dels encebadors que farem servir dependrà de l'aplicació per a la qual volem el cDNA. Per clonar un gen determinat ens interessa amplificar només els RNA missatgers (mRNA), que representen aproximadament el 2%

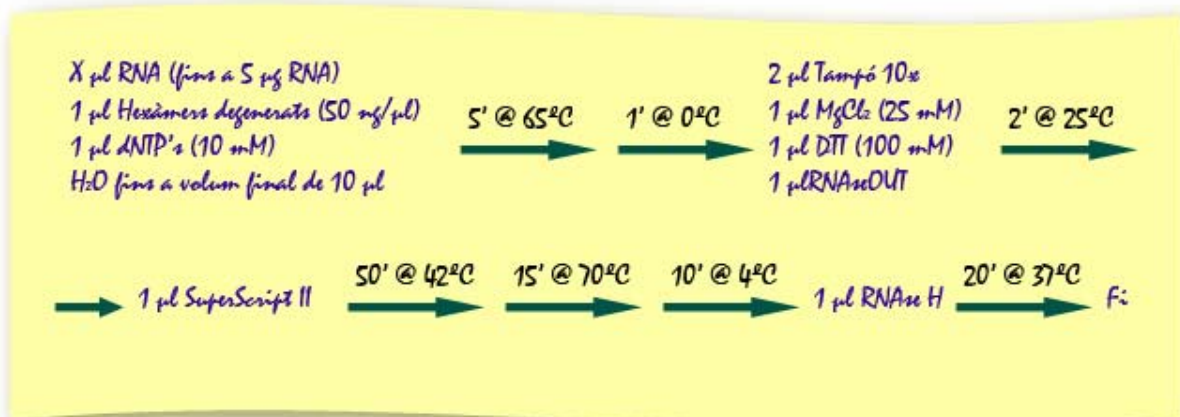
de l'RNA total. En aquest cas farem servir com a encebador un polímer de deoxitimidines (poli-dT) que hibridarà amb la cua poli-A dels mRNA i no amplificarà els RNA ribosomals.

Si ens interessa quantificar l'expressió d'un gen determinat normalitzant-la respecte als nivells de l'RNA 18S ribosomal haurem de fer servir com a encebadors hexàmers degenerats per poder amplificar també el 18S ribosomal que no té cua poli-A.

La retrotranscripció és similar a la PCR en el sentit que fem servir dNTP's i encebadors, però en aquest cas com a polimerasa afegim la transcriptasa reversa del virus MML, que incorpora deoxinucleòtids a un encebador fent servir RNA com a motlle.

El procés de síntesi de cDNA també inclou un pas de desnaturalització del motlle, hibridació dels encebadors i elongació de la cadena, però al contrari que en la PCR, només es fa un cicle d'amplificació. Tots els passos d'incubació els realitzem en eppendorfs de 0,5 ml i en un termociclador.

Un cop ha acabat la reacció afegim RNAsaH per eliminar l'RNA motlle i obtenir el cDNA de cadena senzilla.



## PCR QUANTITATIVA EN TEMPS REAL

La tècnica de la PCR quantitativa en temps real (QRT-PCR) permet quantificar l'expressió d'un gen d'interès, relativa a un gen control. Amplifiquem per PCR el cDNA procedent de l'RNA de la mostra amb sondes específiques per al gen que volem quantificar.

Les sondes es basen en la tecnologia TaqMan (*Applied Biosystems*). Per cada gen es dissenyen un parell d'encebadors i una sonda que hibrida en la regió que amplifiquen. Aquesta sonda és un oligonucleòtid amb un fluorocrom i un amortidor de la fluorescència, un a cada extrem. Només quan l'activitat 3'-5' exonucleasa de la DNA polimerasa la degradi perquè està amplificant la regió on hibrida, es separaran el fluorocrom i l'amortidor i llavors emetrà fluorescència.

La fluorescència serà proporcional a la quantitat de DNA amplificat i aquest al seu torn serà proporcional al número de còpies de cDNA inicial en la mostra. Determinar la fluorescència a temps final no és correcte perquè la PCR es pot haver saturat i la quantitat de DNA final que s'obté (i per tant de fluorescència) depèn de l'eficiència de la reacció.

Per evitar això seguim l'amplificació en temps real, acoblant un detector de fibra òptica al termociclador. Així podem determinar la fluorescència que hi ha en el tub a cada cicle. El perfil que obtindrem serà el d'una corba sigmoidal. El punt que ens interessa determinar és el cicle de la PCR en el qual es troba el punt d'inflexió d'aquesta corba i que només depèn de la quantitat de mostra inicial. El valor que obtenim simplement és el número de cicle ( $C_T$ ) en que això succeeix.

Un factor important és l'elecció del gen control. En els experiments de QRT d'aquesta memòria hem emprat com a control intern l'RNA 18S ribosomal, perquè està molt conservat en rata, ratolí i humà, la qual cosa permet utilitzar la mateixa sonda i comparar mostres d'organismes diferents.

Això ens obliga a preparar el cDNA utilitzant hexàmers degenerats en la reacció de retrotranscripció. Cada mostra l'analitzem de la següent forma:

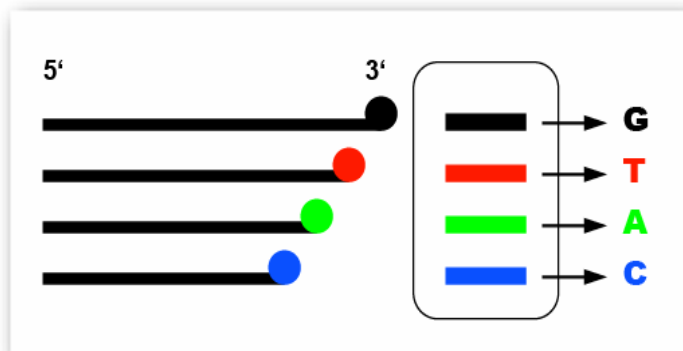
- ▶ En un tub eppendorf afegim 30  $\mu\text{l}$  de la mescla de reacció *Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*) que ja incorpora el tampó, els nuclèotids i la DNA polimerasa, 3  $\mu\text{l}$  de la sonda TaqMan per al nostre gen d'interès i 27  $\mu\text{l}$  de mostra que continguin 9 nanograms de cDNA.
- ▶ Vortegem 15" i fem un pols de centrífuga per recuperar tot el volum. Aliquotem aquesta barreja en tres pous d'una placa de QRT-PCR de 96 pous (*Applied Biosystems*), 20  $\mu\text{l}$  en cada pou.
- ▶ Repetim tota la operació però ara afegirem la sonda específica per al gen control.
- ▶ Quan tenim la placa preparada, amb els triplicats per al gen d'interès i del control, la posem en el termociclador ABI Prism 7700 (*Applied Biosystems*) ubicat a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona en el Parc Científic de Barcelona. La reacció de PCR realitza 40 cicles amb els paràmetres de 15" a 95 °C per desnaturalitzar el DNA i 1' a 60 °C per hibridar la sonda i els encebadors i amplificar.
- ▶ Els resultats els analitzem amb el programa SDS per calcular les  $C_T$ . Les mostres i gens que volem comparar s'han d'analitzar al mateix temps i amb els mateixos paràmetres, malgrat que s'hagin amplificat en plaques diferents.
- ▶ El valor de  $C_T$  del gen d'interès li restem el valor de  $C_T$  del gen control, l'expressió del qual no varia en l'experiment i obtenim  $\Delta C_t$ . Aquest valor el tornem a normalitzar, ara prenent com a referència una de les mostres que volem comparar, obtenint  $\Delta\Delta C_t$ . El resultat final que ens permetrà comparar quants cops s'expressa un gen en una mostra respecte a un altre és funció de l'expressió  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## SEQÜENCIACIÓ DE DNA

Els plasmidis que s'han construït i utilitzat en aquest projecte, tant les construccions amb proteïnes de fusió a GFP com els plasmidis sotmesos a mutagènesi dirigida, han estat seqüenciats per verificar la seva integritat, pauta correcta de lectura i absència de mutacions no desitjades.

En la primera etapa de seqüenciació seguim el mètode ideat per Sanger i modificat per Prober et al. Consisteix en fer una reacció de PCR amb un sol encebador i afegint dideoxinucleòtids (ddNTP) barrejats amb els deoxinucleòtids. Quan la polimerasa incorpori a la cadena de DNA un ddNTP, aquesta no trobarà cap grup hidroxil 3' lliure sobre el qual més afegir nucleòtids per continuar elongant la cadena. Al final de la reacció de PCR obtindrem una població de cadenes de DNA de longituds diferents i amb increments d'una base cada cop, amb la característica comuna de que totes hauran incorporat un ddNTP en el seu extrem 3'.

La potència de la tècnica consisteix en que cada un dels quatre ddNTP's (ddA, ddT, ddC, ddG) està marcat amb un fluorocrom diferent, de manera que podem separar els fragments de DNA i detectar el color corresponent a cada fragment. Obtenim la seqüència del nostre DNA d'interès simplement llegint per ordre el gel d'electroforesi i traduint el color de cada banda al nucleòtid corresponent.



Per fer la PCR de seqüenciació utilitzem µl de la mescla de reacció *ABI-PRISM DNA Sequencing kit (Applied Biosystems)* que ja incorpora la DNA polimerasa, els dNTPs i els ddNTP's marcats en el tampó adequat. Afegim 1,2 picomols de l'encebador i 500 nanograms del DNA que volem seqüenciar, tot això en un volum final de 10 µl.

La reacció de seqüenciació la realitzem durant 25 cicles de PCR en un termociclador amb els següents paràmetres: 10'' a 96 °C, 5'' a 50 °C, 4' a 60°C.

Quan ha acabat la reacció, passem els 10 µl de la PCR a un tub de 1,5 ml amb 26 µl d'aigua i 64 µl d'etanol al 95%. Deixem precipitar el DNA en aquesta barreja 15 minuts a temperatura ambient, després centrifuguem 20 minuts a 4 °C. Aspirem el sobrenedant i rentem el pellet de DNA (pot ser no visible) amb 250 µl d'etanol al 70%. Finalment deixem assecar el pellet, que estarà llest per a la electroforesi.

L'anàlisi per electroforesi capil·lar dels productes de seqüenciació es realitza en un seqüenciador de DNA *ABI Prism 3700 (Applied Biosystems)* ubicat a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona en el Parc Científic de Barcelona.

Els cromatogrames resultants els hem analitzat amb l'aplicació ContigExpress del programa Vector NTI 9.0.

## ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES

### Obtenció de seqüències

Totes les manipulacions de seqüències i la creació de bases de dades es van realitzar amb el programa Vector NTI (InforMax, 2003).

Per obtenir el màxim de seqüències eucariotes d'un enzim concret, seguïem diversos passos, amb graus creixents de dificultat i aprofitant les plataformes de l'NCBI i l'ENSEMBL:

► En primer lloc realitzàvem una cerca pel nom del gen en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide)) i recopilàvem les seqüències del nostre enzim que ja havien estat descrites per altres autors.

► Amb la seqüència de la proteïna humana executàvem una cerca per homologia amb el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) (Altschul et al., 1997) contra les bases de dades de proteïna. La raó d'escollir la seqüència d'aminoàcids en lloc de la de nuclèotids com a encebadors de la cerca rau en el fet que la seqüència d'aminoàcids està més conservada entre espècies i facilita la tasca de trobar per homologia seqüències d'organismes molt allunyats evolutivament. Així obteníem noves seqüències que ja havien estat descrites però que encara no tenien una funció assignada i no per tant no havien aparegut en una senzilla cerca per nom. Ocasionalment repetíem el BLAST amb una seqüència més ancestral (de llevats per exemple) per acabar d'abastar tot l'espectre eucariota.

► Després d'aquestes cerques generalistes, passàvem a buscar les seqüències que ens faltaven d'organismes representatius en els seus genomes concrets. Accedíem als genomes de vertebrats a través de la plataforma ENSEMBL ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) i buscàvem la isoforma desitjada fent un BLASTN amb la seqüència coneguda de l'espècie evolutivament més propera. Els resultats s'estudiaven a través del navegador genòmic i es recollia la seqüència anotada pels programes de predicció automàtica.

► Si la seqüència obtinguda no era completa, es feia un pas més que consistia en analitzar amb el programa fgenesh+ (<http://sun1.softberry.com>) (ref) tota la regió genòmica on el BLAST havia trobat homologia. Aquest programa compara la seqüència genòmica amb una proteïna coneguda i busca possibles mRNA codificats en el fragment del genoma que encaixin amb la proteïna de mostra. Les prediccions de seqüències obtingudes amb aquest programa eren molt més fiables que les subministrades pel programes de predicció automàtica perquè realitzava una cerca molt més dirigida.

Aquestes cerques ens proporcionaven seqüències putatives dels enzims d'interès. L'assignació final de la funció de cada seqüència putativa es feia per alineament amb les seqüències conegudes i la seva posició en l'arbre filogenètic corresponent (per exemple, un transportador putatiu de glucosa d'un



organisme que es situa en la branca dels GLUT2 i en el lloc que li correspon com a espècie, s'assignava com a tal).

### **Alineament de seqüències**

Els alineaments de seqüència es realitzaven amb ClustalW (ref) des de la plataforma del Vector NTI o des del propi programa ClustalW. Els paràmetres per als alineaments múltiples de proteïnes emprats per defecte eren 10 punts (d'un rang possible d'1 fins a 100) de penalització per obrir forats en l'alineament i 0.2 per allargar aquests forats. Com a matriu de ponderació es feien servir les matrius de la sèrie BLOSUM.

Un consell pràctic per executar ClustalW amb èxit és que l'arxiu amb les seqüències que volem alinear ha d'estar guardat a l'arrel C:\ i en un arxiu text sense format, si no el programa no el reconeixerà.

### **Filogènia**

Les filogènies presentades en aquesta memòria han estat calculades utilitzant el paquet PHYLIP distribuït per Joe Felsenstein i disponible a <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. Més concretament, es van utilitzar els programes Seqboot, Protdist, Neighbor i Consense.

► Per començar cal generar un alineament de seqüències amb el programa ClustalW especificant que l'arxiu de sortida estigui en format PHYLIP (.PHY). Aquest format permet un nombre màxim de 10 lletres en el nom de les seqüències, truncant tot el que sobrepassi aquest valor. Cal vigilar que quan això es produeixi, no hi hagi cap seqüència amb el nom repetit, perquè si no obtindrem resultats abortius en la resta d'aplicacions.

► L'arxiu en format PHY el convertim a un arxiu sense extensió per a que el reconegui la següent aplicació: el programa Seqboot. Aquesta aplicació llegeix el conjunt de dades de seqüència i en produeix múltiples versions fent un remostratge a l'atzar (bootstrap). Ara podem fer els càlculs filogenètics a partir

de múltiples rèpliques del mateix conjunt de dades, la qual cosa ens introduirà un factor estadístic en el resultat final. Com més rèpliques imaginàries presentin en la seva topologia una branca interna determinada, més segurs podem estar que el node en qüestió és estadísticament significatiu. Per als arbres de rutina especificuem 100 remostratges, però els arbres de les figures d'aquesta memòria són el resultat de 1000 rèpliques.

► L'arxiu generat per Seqboot ens serveix com encebador del programa Protdist. Aquesta aplicació ens computa la distància entre seqüències de proteïnes utilitzant unes aproximacions de màxima versemblança basades en una matriu de ponderació, en el nostre cas la matriu Johnes-Taylor-Thornton. Com a resultat obtenim una matriu de distància de les nostres proteïnes, reflex de les distàncies evolutives entre elles. Cal que el número de conjunts de dades que volem que analitzi coincideixi amb el número de rèpliques generades per Seqboot.

► Neighbor és l'aplicació que pròpiament ens calcula a partir de la matriu de distàncies la topologia de l'arbre (sense arrel) que relaciona les nostres seqüències. Segueix el principi de mínima evolució, segons el qual l'arbre més vàlid serà el que minimitzi la suma de les distàncies de totes les branques. L'algoritme heurístic de computació és una implementació del mètode Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987), molt útil per tractar grans conjunts de seqüència. Parteix d'un arbre radial amb totes les seqüències i mesura la distància  $S_{i,j}$  per a totes les parelles de seqüència  $i,j$ . Llavors busca la parella amb el menor valor  $S$ , l'agrupa en la mateixa branca i torna a començar, però ara la parella  $i,j$  computa com un sol objecte. El resultat final serà un arxiu (outtree) amb un arbre per cada matriu de distàncies inicial.

► Els arbres calculats pel mètode Neighbor-joining ens donen informació sobre les distàncies evolutives entre les seqüències però no sabem res de la validesa de la topologia que representen. Per això integrem tots el conjunts de dades (100 o 1000, segons el cas), en un sol arbre consens. Aquest arbre reflexa la topologia majoritària en cada node i ens indica quin percentatge d'arbres presenten aquell node. Els arbres s'escriuen en un arxiu en format Newick.

► Finalment obtenim la representació gràfica dels arbres calculats amb el programa TreeView, o amb el visualitzador d'arbres hiperbòlic HyperTree o el tridimensional Phylo3D en els casos d'arbres molt grans.

### **Càlcul de la pressió selectiva**

La pressió selectiva que modula l'adaptació evolutiva de les seqüències es pot mesurar com un paràmetre en funció de la relació de canvis sinònims i no-sinònims ( $K_A/K_S$ ), és a dir, segons si es depura qualsevol nova mutació de la seqüència o per el contrari es fixa de forma estable.

Hi ha diversos mètodes per calcular la relació  $K_A/K_S$ , el més estès dels quals és el mètode de màxima versemblança dissenyat per Yang & Nielsen 2000, però degut a la seva alta parametrització i la seva intensitat de càlcul no és útil per a grans conjunts de seqüències.

Per això vam fer servir el mètode de parsimònia PBLSB (Li, Wu, & Luo 1985; Pamilo & Bianchi 1993) amb les millores proposades per D.A. Liberles 2001. Aquest mètode calcula la relació  $K_A/K_S$  al llarg de les branques dels arbres filogenètics per reconstrucció de les seqüències ancestrals obtingudes per parsimònia a partir de les seqüències de DNA i proteïna simultàniament. La millora del mètode consisteix en que després aquesta reconstrucció es pondera segons la longitud de les branques per obtenir l'història evolutiva de la família de gens estudiada.

Els càlculs es duen a terme en línia des de la plataforma noruega de bioinformàtica ([www.bioinfo.no/tools/kaks](http://www.bioinfo.no/tools/kaks)). Per encebar el programa s'ha introduir les seqüències de DNA dels gens que volem estudiar alineades gen format FASTA. Cal vigilar que no es perdi mai la pauta de lectura per obertura de forats enmig dels codons perquè si no el programa avortarà la reconstrucció de la seqüència ancestral.

El programa pot generar automàticament un arbre filogenètic per calcular-hi els valors de  $K_A/K_S$  però els valors seran més acurats si nosaltres introduïm l'arbre Neighbor-joining consens generat en operacions anteriors.

Els altres paràmetres per ajustar són el sistema de ponderació de la longitud de les branques (aquí mesurades com distàncies evolutives neutrals, NED Peltier et al. 2000) i la matriu de substitució que es farà servir en la reconstrucció per parsimònia de DNA més proteïna de les seqüències ancestrals. En el nostre cas fem la matriu Grantham (1974 Science 185:862-864).

Els valors de  $K_A$  i  $K_S$  que s'obtenen per a cada node s'analitzen posteriorment amb l'aplicació Excel.

### **Anàlisi del contingut de G+C i ús preferent de codons**

La composició G+C de les seqüències, el contingut de G+C en la tercera posició sinònima dels codons i el nombre efectiu de codons es van determinar amb el programa CodonW (Peden, 1999) des de la plataforma (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/codonw>) que ofereix l'Institut Pasteur. Les seqüències a analitzar s'introdueixen en format FASTA.

### **Sintènia**

El grau de conservació del locus on es troben els gens d'interès el podem analitzar en el servidor <http://genome.lbl.gov/vista> gràcies a l'aplicació GenomeVista que conté els pre-alineaments dels genomes de vertebrats.

Per buscar específicament la regió del locus que ens interessa, introduïm l'identificador del nostre gen o fem una cerca per homologia amb la seqüència de DNA.

Els resultats els analitzem des d'un navegador java. Podem especificar quins genomes volem veure alineats en el locus d'interès.

## DETERMINACIONS D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

### Activitat hexoquinasa i glucoquinasa

Per mesurar l'activitat hexoquinasa i glucoquinasa present en extractes cel·lulars vam seguir el protocol descrit per Kuwajima *et al* (1986). Es determina la capacitat de la mostra de convertir la glucosa inicial en G6P. Com que la G6P no es pot quantificar directament, el que es fa és acoblar una reacció



d'oxidació que generarà NADH, mesurable espectrofotomètricament a 340 nm sense interferències dels altres metabòlits presents en la mescla de reacció. Al conèixer l'estequiometria de les reaccions i donat que els enzims acoblats treballen en condicions saturants podem saber els nmol de G6P produïts per minut i per mg de proteïna (mU/mg proteïna).

Modulant la quantitat de glucosa inicial en el test podem determinar la fracció d'activitat forforiladora de glucosa deguda a la glucoquinasa i la fracció d'activitat corresponent a la resta d'hexoquinases. Això és possible gràcies a les diferències d'afinitat per la glucosa d'aquests enzims.

A concentracions inicials de glucosa 0,5 mM, només mesurem l'activitat de les hexoquinases I, II o III, d'alta afinitat per glucosa, mentre que a 100 mM glucosa mesurem les activitats de totes les hexoquinases, inclosa la glucoquinasa.

La diferència d'activitat mesurada a 100 mM glucosa menys l'activitat a 0,5 mM glucosa és la fracció d'activitat de baixa afinitat per la glucosa i l'assignem a la glucoquinasa.

Les determinacions de l'activitat hexoquinasa i glucoquinasa es feien a partir de mostres de teixit o de cèl·lules FTO2B. El protocol general és el següent:

- ▶ Si partim de cèl·lules en cultiu, les rentem amb PBS i les congelem en nitrogen líquid. Rasquem una placa Ø100 amb 200 µl de tampó GK (Tris/HCl 50 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, 10 % sacarosa (p/v), β-mercaptoetanol 0,1 mM, a pH 7.4) i centrifuguem 10 minuts a 10.000 rpm.
  
- ▶ En el cas de partir de mostres de teixit (per exemple fetge), és important treballar amb mostres fresques i no congelar mai el teixit. Homogeneïtzem aproximadament 100 mg de teixit en 1 ml de tampó GK amb l'ajut d'un polítró, i centrifuguem 10 minuts a 10.000 rpm.
  
- ▶ Separem el sobrenedant i el pellet. A continuació resuspenem el pellet amb un volum de tampó GK igual que el volum del sobrenedant recuperat. Vortegem les mostres i les distribuïm en els cubilets de mesura.
  
- ▶ Les mesures enzimàtiques es realitzen amb l'ajut d'un autoanalitzador COBAS Mira (*ABX Diagnostics*), que consisteix en un braç robotitzat acoblat a un espectrofotòmetre termostatitzat.
  
- ▶ L'autoanalitzador barreja 15 µl de mostra amb 35 µl d'aigua i 250 µl del reactiu i segueix l'aparició del NADH en la reacció atemperada a 37°C segons l'increment d'absorbància a 340 nm durant 10 minuts.
  
- ▶ Per poder establir correctament les activitats enzimàtiques de la mostra, realitzem tres assajos amb la mateixa mostra però amb tres mesclures de reacció que només varien en el seu contingut de glucosa (0 mM, 0,5 mM i 100 mM). El reactiu sense glucosa ens serveix per normalitzar els valors obtinguts amb els altres dos reactius i establir el fons o línia base.

► Representem gràficament les absorbàncies de cada mostra en els tres reactius i fem les línies de regressió de les quals extraurem el pendent. Aquest pendent expressa l'activitat forforiladora de glucosa com  $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$ .

► Transformem  $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$  en mU/mg proteïna. L'activitat hexoquinasa (HK1+HK2+HK3) és l'activitat de la mostra en 0,5 mM glucosa menys l'activitat en el reactiu control sense glucosa. L'activitat glucoquinasa (o activitat fosforiladora de glucosa de baixa afinitat) és l'activitat que queda de restar l'activitat de 0,5 mM glucosa a la de 100 mM glucosa.

### Activitat glicogen sintasa

Mesurem l'activitat glicogen sintasa mitjançant un assaig radiomètric consistent en la mesura de l'UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa incorporada al glicogen per l'acció catalítica de l'enzim, seguint la tècnica descrita per Thomas *et al* (1968). Aquest mètode quantifica l'activitat de l'enzim en absència i presència de l'activador al·lostèric G6P. En absència de G6P mesurem l'activitat de les formes hipofosforilades de l'enzim, que són les més actives. En presència de G6P detectem l'activitat de tot l'enzim present en l'extracte, independentment del seu estat de fosforilació. El paràmetre indicatiu de l'estat d'activació de la

glicogen sintasa s'obté a partir de la relació d'activitats mesurades en absència i presència de G6P.

#### TAMPÓ D'HOMOGENEÏZACIÓ

Tris/HCl a pH 7,0 10 mM  
KF 150 mM  
EDTA 15 mM  
Sacarosa 600 mM  
2-mercaptoetanol 15 mM  
Leupeptina 10 µg/ml  
Benzamidina 1 mM  
PMSF 1 mM

Per a la determinació de l'activitat glicogen sintasa, homogeneïtzem les cèl·lules crescudes en monocapa amb 100 µl de tampó d'homogeneïtzació.

Per determinar l'activitat glicogen sintasa en presència de G6P s'utilitza una barreja de reacció anomenada assaig T, perquè mesura l'activitat GS total. La radioactivitat específica d'aquesta solució és 150.000 cpm/ $\mu$ mol UDP-glucosa.

L'activitat GS independent de l'activador G6P la mesurem amb una barreja de reacció anomenada assaig I. La radioactivitat específica d'aquesta solució és de 300.000 cpm/ $\mu$ mol UDP-glucosa.

► Atemperem 40  $\mu$ l de la solució d'assaig en un bany termostatitzat a 30°C durant 5 minuts. Tot seguit, afegim 20  $\mu$ l de mostra i la barreja incubem 30 minuts a 30 °C.

► Un cop finalitza la incubació, extreiem 50  $\mu$ l de la barreja de reacció i els dipositem en un fragment de paper 31-ET (Whatman, USA) de 2x2 cm.

► Submergim immediatament el paper en etanol 66% fred (-20°C). Es van fer rentats successius del paper, el primer de 10 minuts i els dos següents de 20 minuts, amb noves solucions d'etanol 66% a temperatura ambient i poder així eliminar qualsevol metabòlit fixat al paper 31-ET.

► Després de l'últim rentat deixem assecar els papers i els introduïm en vials que contenen líquid de centelleig (Toluè amb PPO (2,5-dimetiloxazol, Merck, USA) al 5%), i la radioactivitat es detecta i quantifica en un comptador de centelleig Rack BETA 1217 (LKB, UE). L'activitat glicogen sintasa l'expressem com a activitat específica (mU/mg proteïna), prèvia determinació de la quantitat de proteïna total o com a percentatge de l'activitat total present en el súper i el pellet de l'extracte.

#### ASSAIG GS T

Tris/HCl a pH 7,8 50 mM  
 UDP-[<sup>14</sup>C]-glucosa 1000 cpm/ $\mu$ l  
 UDP-glucosa 6,7 mM  
 Glicogen 10 mg/ml  
 G6P 6,6 mM  
 KF 25 mM  
 EDTA 20 mM

#### ASSAIG GS I

Tris/HCl a pH 7,8 50 mM  
 UDP-[<sup>14</sup>C]-glucosa 2000 cpm/ $\mu$ l  
 UDP-glucosa 6,7 mM  
 Glicogen 10 mg/ml  
 KF 25 mM  
 EDTA 20 mM



**Determinació de la  $M_{0,5}$  de la GS per G6P**

Per quantificar la concentració de G6P necessària per activar al 50% la glicogen sintasa, mesurem l'activitat GS seguint a grans trets la metodologia que hem descrit anteriorment però ara utilitzarem una sèrie de reactius d'assaig amb concentracions creixents de G6P.

Donat que afegim 20  $\mu$ l de mostra sobre 40  $\mu$ l de reactiu, cal tenir en compte aquest factor de dilució a l'hora de preparar els reactius. La concentració en la solució d'estoc i en l'assaig dels reactius comuns és:

	Estoc	[ ] real en l'assaig	[ ] en el test estoc
<b>UDPG (ul)</b>	10 mM	0,2 mM	0,3
<b>Glicogen (ul)</b>	80 mg/ml	6,6mM	10mM
<b>Tampó (ul)</b>	10x	0,66x	1x
<b><math>^{14}</math>C-UDPG (ul)</b>	43550 cpm/ul	1333 cpm/ul	2000cpm/ul

L'assaig el realitzem a set concentracions de G6P diferents. Segons si parlem de la solució test estoc o de la mescla de reacció ja diluïda amb el volum de mostra, les concentracions de G6P són:

<b>[G6P] (mM) en el test estoc</b>	<b>0</b>	<b>0,38</b>	<b>0,75</b>	<b>1,5</b>	<b>3</b>	<b>7,50</b>	<b>10,70</b>
<b>[G6P] (mM) real en l'assaig</b>	0	0,25	0,5	1	2	5	7,13

Per preparar el tubs amb 1ml de reactiu amb concentracions seriadades de G6P, afegim els volums en  $\mu$ l indicats en la taula següent:

	TUBS DE 1ml TEST ESTOC						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>UDPG 10mM (ul)</b>	30	30	30	30	30	30	30
<b>Glicogen 80mg/ml (ul)</b>	125	125	125	125	125	125	125
<b>Tampó 10x(ul)</b>	100	100	100	100	100	100	100
<b><math>^{14}</math>C-UDPG (ul)</b>	46	46	46	46	46	46	46
<b>G6P (10 mM) (ul)</b>	0	37,5	75	150	0	-	-
<b>G6P (100 mM) (ul)</b>	0	0	-	0	30	75	107
<b>H<sub>2</sub>O (ul)</b>	699	662	624	549	669	624	592

Segons la quantitat de GS en les mostres i la concentració de G6P en el test, haurem de modificar els temps d'incubació a 30 °C perquè com més elevada sigui la concentració de l'activador al·lostèric, major consum d'UDPG hi haura. A fi d'obtenir resultats fiables, l'UDPG consumida no pot sobrepassar el 10% de l'UDPG inicial.

A partir de les dades d'activitat GS a diverses concentracions de G6P calculem la velocitat màxima ( $V_{max}$ ) aplicant l'equació d'Eadie-Hofstee. La  $V_{max}$  que obtenim la introduïm en la equació de Hill. El valor que iguala l'equació de Hill a zero és el logaritme de la concentració de G6P corresponent a la  $M_{0,5}$ .

## QUANTIFICACIONS DE METABÒLITS

### Determinació de glicogen

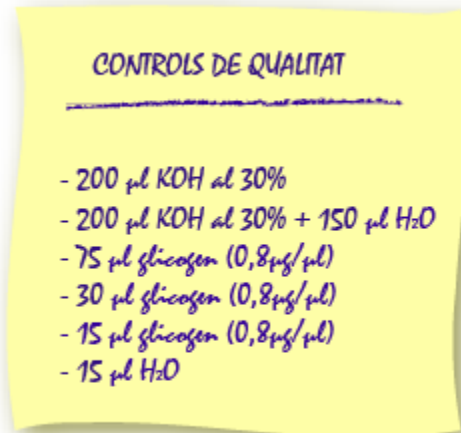
Les quantificacions de glicogen es feien seguint un protocol adaptat del mètode descrit per Chan i Exton (1976). Bàsicament es segueix tot un procés de purificació i digestió enzimàtica del glicogen, per obtenir glucosa, que podrem quantificar espectrofotomètricament per mitjà de les mateixes reaccions enzimàtiques acoblades que hem descrit en la determinació de l'activitat hexoquinasa.

Les determinacions de glicogen es feien a partir de mostres de teixit o de cèl·lules FTO2B. El protocol general és el següent:

- ▶ Si partim de cèl·lules en cultiu, les rentem amb PBS i les congelem en nitrogen líquid. Rasquem sobre gel una placa Ø100 amb 200 µl de KOH al 30% i ho transvasem tot a un tub eppendorf.
- ▶ En el cas de partir de mostres de teixit (fresca o congelada), homogeneïtzem aproximadament 100 mg de teixit en 400 µl de KOH amb l'ajut d'un politró.

- ▶ Bullim els extractes alcalins a 100 °C durant 15 minuts. Si la mostra tenia molta sang, es tornarà de color verd, que no interferirà en la quantificació perquè desapareixerà més endavant en els rentats.
  
- ▶ Apliquem gairebé tot el volum d'extracte sobre un tros de paper 31-ET (*Whatman*) d'aproximadament 2 cm x 2'5 cm. Anotem el volum que hem afegit i la resta de mostra la fem servir per quantificar la proteïna.
  
- ▶ Un cop els papers han absorbit la mostra, tirem els papers en un vas de precipitats amb etanol al 66%, a -20 °C i amb agitació. A aquesta concentració d'etanol, el glicogen precipita en el paper, mentre que la resta de metabòlits més solubles es renten del paper.
  
- ▶ Després de 10 minuts amb l'etanol fred fem dos rentats més, de 20 minuts cadascun i amb etanol a temperatura ambient.
  
- ▶ Deixem assecar els papers sobre una safata. Quan estan ben secs els passem a tubs d'assaig als quals prèviament hem afegit 1 ml d'una solució d'amiloglucosidasa (*Sigma*) 25 U/l preparada en una solució tampó d'acetat de sodi 40 mM a pH 4,8.
  
- ▶ Incubem els tubs 90 minuts a 37 °C. Durant aquest temps l'amiloglucosidasa hidrolitza tot el glicogen a molècules de glucosa.
  
- ▶ Quantifiquem la glucosa en l'autoanalitzador COBAS Mira mitjançant la tècnica de les reaccions acoblades de l'hexoquinasa/glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (Bergmeyer, 1974) Es barregen 70 µl de mostra amb 10 µl d'aigua i 150 µl de la mescla de reacció comercial GlucoQuant (*Boehringer Mannheim*), que conté l'hexoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* i la G6P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, a part de l'ATP i el NAD<sup>+</sup> necessaris per a la reacció. S'incuba a 37 °C i es deixa arribar la reacció a punt final durant 5 minuts. Finalment es mesura segons l'absorbància a 340 nm el NADH aparegut, que serà proporcional a la glucosa inicial de la mostra.

Els resultats s'expressen com a  $\mu\text{g}$  de glicogen/mg de proteïna, o bé com mg glucosa/mg teixit, per comparació amb tres patrons que han servit per fer la recta de calibratge. Aquests patrons tenen 1, 5 i 10 mg de glucosa per decilitre, i s'han preparat dissolent la quantitat adient de glucosa en tampó acetat de sodi 40 mM a pH 4,8, que és la mateixa matriu en que es troben les mostres.



Per validar els resultats s'han afegit uns controls de qualitat, i s'han processat junt amb les mostres. Aquest controls consisteixen en quantitats conegudes de KOH o glicogen que afegim en els papers 31-ET i es tracten com una mostra més. Els resultats del paper que només té KOH al 30% és el blanc i comprovem que els valors dels papers amb el patró de glicogen són proporcionals entre ells.

Els valors de glucosa que hem determinat es relacionen amb el glicogen segons el factor de conversió:  $\mu\text{g Glucosa} \times 0,9 = \mu\text{g Glicogen}$ .

### **Determinació de glucosa-6-fosfat**

La glucosa-6-fosfat es determina mitjançant un mètode descrit per Lang i Michal (1974), el qual es basa en transformar enzimàticament la G6P a 6-fosfogluconat, gràcies a l'acció de la G6P deshidrogenasa, i quantificar a punt final la producció de NADH com en les tècniques anteriors.

Per fer una determinació de G6P de cèl·lules en cultiu és crucial que quan finalitzi l'experiment i ens disposem a congelar la placa amb les cèl·lules, no fem cap rentat amb PBS, simplement s'ha d'aspirar el medi i congelar el més ràpidament possible en nitrogen líquid.

Si rentem les cèl·lules amb PBS, la quantitat de G6P que determinarem no serà un reflex de la situació real en la cèl·lula, perquè en el moment de fer el rentat la concentració de glucosa extracel·lular caurà, però com que la cèl·lula encara mantindrà el flux glucolític actiu, no farà més que consumir la G6P disponible. Així doncs és convenient aspirar bé el medi i congelar directament.

Des del moment en que tenim les cèl·lules congelades, el protocol és el següent:

- ▶ Rasquem sobre gel les cèl·lules d'una placa Ø100 amb 200 µl d'HClO<sub>4</sub> al 10%, que precipitarà les proteïnes però deixarà solubles els metabòlits. Passem tot l'homogenat cel·lular amb precipitat inclòs a un tub eppendorf.
  
- ▶ Si treballem amb FTO2B, és molt important sonicar l'homogenat, durant 12 impulsos amb el sonicador al 50% d'intensitat, per alliberar tota la G6P. Aquest pas intermig no és necessari en cas de treballar amb hepatòcits.
  
- ▶ Centrifuguem l'extracte 15 minuts a 10.000 rpm i 4 °C. Separem el sobrenedant i el pellet.
  
- ▶ Bullim el pellet amb 150 µl de KOH al 30% durant 15 minuts. Mesurem la proteïna pel mètode Bradford en l'extracte resultant.
  
- ▶ El sobrenedant conté tota la G6P però en un medi molt àcid. Abans de poder fer determinacions enzimàtiques, cal neutralitzar aquest extractes a pH 7. Per visualitzar els canvis de pH, afegim 10 µl de líquid indicador universal (*Merk*) al tub amb el sobrenedant, que es tornarà de color vermell. Amb molta cura i en increments de 10 µl afegim K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 M a l'extracte i agitem amb el vòrtex cada vegada. Al reaccionar amb l'HClO<sub>4</sub> s'allibera CO<sub>2</sub> i precipita KClO<sub>4</sub>, per això cal fer lentament tot el procés i vigilar que les bombolles no ens facin vessar la mostra del tub. Considerem que la mostra està neutralitzada quan adquireix un color verd-groc pàl·lid. Si basifiquem la mostra, només cal afegir HClO<sub>4</sub> de nou fins que arribem a pH neutre.

- ▶ Centrifuguem l'extracte 15 minuts a 10.000 rpm i 4 °C per eliminar el precipitat de  $\text{KClO}_4$  produït en la neutralització.
- ▶ L'extracte neutralitzat s'analitza amb l'ajut de l'aparell COBAS Mira (ABX Diagnostics). L'autoanalitzador barreja 80  $\mu\text{l}$  de mostra amb 10  $\mu\text{l}$  d'aigua i 50  $\mu\text{l}$  del tampó de reacció (Tris/HCl 90 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM i  $\text{NAD}^+$  1,2 mM). Aquesta solució de reacció es preincuba 5 minuts a 37 °C i llavors s'afegeixen 4  $\mu\text{l}$  de l'enzim G6P deshidrogenasa, aïllat de *Leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim) amb una activitat de 30 U/ml. La mescla es deixa reaccionar 10 minuts a 37 °C, temps suficient per a que reaccionï tota la G6P de la mostra.
- ▶ Un cop ha finalitzat la reacció, l'aparell mesura l'absorció a 340 nm i ens dona un valor de concentració de glucosa-6-fosfat a la mostra. Els resultats s'expressen com a nmols de G6P per mg de proteïna.

En el cas de la determinació de G6P, el nostre control de qualitat que ens servirà per validar els resultats consisteix en afegir 5  $\mu\text{l}$  de G6P 1 mM a un dels duplicats d'una mostra i 5  $\mu\text{l}$  més de G6P 1 mM a un tub extra amb el mateix volum de la mostra en aigua. Podem donar per bons els resultats quan la quantitat de glucosa del tub sense G6P extra coincideix amb la G6P del tub control després d'haver restat la quantitat de G6P que havíem afegit.

### **Determinació de nucleòtids**

La detecció i quantificació dels perfils de nucleòtids es va realitzar per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC). Les condicions cromatogràfiques són les següents:

- ▶ Columna: fase reversa, model Excel 120 ODS b, 3  $\mu\text{m}$  20x0,46.
- ▶ Detector: PDA Waters 2996,  $\lambda=260$ .
- ▶ Flux: 0,6 ml/min
- ▶ Pressió: 1900 psi
- ▶ Volum d'injecció: 20  $\mu\text{l}$

- ▶ Eluent A:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M + Tetrabutil amoni 0,5 mM, pH6,4 amb KOH al 50%
- ▶ Eluent B: 70% d'eluent A + 30% metanol
- ▶ Gradient (minuts, %B): (0-0), (30-100), (33-100), (35-0), (45-0).
- ▶ Temperatura: ambient
- ▶ Temps de cromatografia: 45 minuts

Les mostres que apliquem s'han processat seguint els mateixos passos que hem fet per preparar els extractes neutralitzats on mesuràvem G6P. LA concentració dels nucleòtids la calculem per comparació amb uns patrons de concentració coneguda.

## ANIMALS

Els animals utilitzats en aquest projecte són ratolins (soca OF1) femella prenyades i els seus respectius embrions. Els animals es mantenen en condicions estàndard d'estabulació: dieta equilibrada de laboratori i amb aigua *ad libitum*, temperatura constant entre 22 i 24°C, i en un cicle de llum-fosc de 12 hores (8 del matí a 8 del vespre). En cas de treballar amb animals dejunats, es retira l'aliment 16 hores abans de la realització de l'experiment. Els animals es sacrifiquen al 16è dia de gestació per dislocació cervical, sempre enter les 10 i les 11 del matí per evitar variabilitat.

## CULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS ESTABLES

Les cèl·lules han estat cultivades i mantingudes per expansió clonal en medi complet DMEM amb 25 mM glucosa, 10% de sèrum fetal boví (FBS) (*Biological Industries*) i la barreja d'antibiòtics penicil·lina a 100 U/ml i estreptomycin a 0,1 mg/ml. S'incubaven a 37 °C, al 95% d'humitat i en una atmosfera al 5% de  $\text{CO}_2$  per mantenir el pH neutre dels medis de cultiu.

Les plaques utilitzades per al manteniment de les cèl·lules i en la majoria d'experiments van ser plaques de Petri de plàstic de 100 mm de diàmetre (Ø100). Cada tres dies es tripsinitzaven les cèl·lules, es diluïen i es tornaven a sembrar en plaques noves. Per fer aquest subcultiu, primer es rentaven les plaques amb PBS i es tractaven amb 1 ml tripsina al 0,25% i EDTA 1 mM. Quan la monocapa de cèl·lules s'havia desenganxat del fons de la placa, es recollien amb 10 ml de medi complet amb FBS i es centrifugaven 5 minuts a 800 rpm. El pellet cel·lular es ressuspenia amb medi fresc i es sembraven les plaques noves, a una densitat aproximada de 60.000 cèl·lules/cm<sup>2</sup>.

Les línies cel·lulars estables més utilitzades en aquest projecte són:

- ▶ FTO2B: Cèl·lules derivades d'un hepatoma de rata que mantenen les característiques d'un hepatòcit embrionari (Zvibel et al., 1998). La particularitat que les ha fet tan útils en aquest projecte és que mantenen l'expressió de la LGS però no expressen la glucoquinasa.
  
- ▶ COS-1: Cèl·lules fibroblàstiques derivades de ronyó de mono verd africà, transformades amb SV40 (Ref Gluzman 1981), que expressen la MGS.
  
- ▶ 293: Cèl·lules derivades de ronyó d'embrió humà, clon ATCC 1573 (Ref Graham 1977). La particularitat d'aquestes cèl·lules és que expressen de forma estable el gen AdE1A de l'adenovirus tipus 5, imprescindible per a la replicació vírica. Gràcies a això aquestes cèl·lules es fan servir per amplificar els adenovirus recombinants defectius en aquest gen.

## **TRANSDUCCIÓ DE CÈL·LULES DE MAMÍFER**

A fi d'observar el comportament de les proteïnes amb mutacions puntuals o la localització de les proteïnes fusionades a GFP, calia transformar cèl·lules de mamífer amb els transgens seleccionats.



## Electroporació

La tècnica de l'electroporació consisteix en introduir el DNA exogen dins de la cèl·lula a través d'uns porus de la membrana que s'han creat després d'un pols elèctric.

Per electroporar una sola construcció seguim els passos següents:

- ▶ Tripisinitzem les cèl·lules d'una placa Ø100 i les centrifuguem 5 minuts a 800 rpm.
  
- ▶ Resuspenem les cèl·lules en medi OptiMEM sense antibiòtics (*Invitrogen*) i les tornem a centrifugar 5 minuts a 800 rpm, per rentar-les de qualsevol resta de tripsina, sèrum, antibiòtics o indicador de pH.
  
- ▶ Aspirem el medi de rentat i resuspenem les cèl·lules amb 750 µl d'OptiMEM en un tub eppendorf.
  
- ▶ Afegim 10 µl de DNA de salmó, a una concentració de 10 µg/µl, que ens farà de coadjuvant en el procés de transformació.
  
- ▶ Afegim 100 µg de DNA plasmídic amb la construcció desitjada. Deixem reposar la barreja de DNA i cèl·lules 10 minuts a temperatura ambient, amb agitació ocasional per evitar la sedimentació de les cèl·lules. El volum final ha de ser de 800 µl.
  
- ▶ Transvasem tota la barreja a una cubeta d'electroporació (*BioRad*) amb un espai entre els dos pols de 0,2 cm. Encaixem la cubeta en l'electroporador Gene Pulser (*BioRad*) amb multiplicador de capacítància.
  
- ▶ Ajustem els paràmetres d'electroporació a un voltatge de 200 V, i una capacítància de 950 µF.

- ▶ Desencadenem el pols elèctric quan premem alhora els dos botons vermells de la unitat principal. En la pantalla apareixerà la constant de temps que ens indica el temps que ha durat la descàrrega. Com més baix sigui aquest valor, menys mortalitat observarem.
- ▶ Recuperem les cèl·lules de la cubeta amb l'ajut d'una micropipeta, i les passem a 24 ml de medi DMEM complet. Barregem amb suavitat i sembrem les cèl·lules electroporades en sis plaques Ø60 que les deixem en l'incubador a 37 °C.
- ▶ Després de 4 hores de recuperació, rentem les cèl·lules i afegim el medi DMEM complet fresc.

Generalment després d'aquest procés s'incuben les cèl·lules durant 48 hores abans de fer l'experiment, per deixar temps suficient a que s'expressi el transgen. Passat aquest temps també podem controlar l'eficiència de transformació (en el cas de proteïnes de fusió a GFP) analitzant pel FACS una alíquota de cèl·lules tripsinitzades.

### **Infecció amb adenovirus**

La infecció amb adenovirus ens permet transformar cèl·lules refractàries a la transformació per mètodes tradicionals, com els hepatòcits, i regular els nivells de sobreexpressió del transgen simplement controlant la dosis de virus amb la qual infectem.

La quantitat de virus que necessitem per infectar les cèl·lules la determinem prèviament fent una titulació del virus. Hi ha mètodes de titulació universals per a qualsevol tipus de virus, com és el cas del comptatge de calves, però en el nostre cas hem preferit titular els estocs de virus segons el seu producte final, és a dir, determinant activitats enzimàtiques en cèl·lules infectades amb dosis creixents de virus o quantificant l'expressió del transgen per QRT-PCR.

El procediment d'infecció de cèl·lules FTO2B consta de les següents parts:

- ▶ Descongelem a temperatura ambient l'estoc de virus que es conserva a -80 °C en medi DMEM 25 mM sense FBS. És important no escalfar el virus, ja que es podria produir una pèrdua de la càrrega viral de l'estoc.
- ▶ Diluïm la dosi necessària de virus en medi DMEM 25 mM glucosa. Per infectar plaques Ø100 el volum de la mescla ha de ser de 4 ml, per plaques Ø60 apliquem 1 ml. Apliquem la mescla infectiva a una monocapa de cèl·lules aproximadament al 70% de confluència.
- ▶ Incubem les cèl·lules amb el medi d'infecció durant 2 hores. Passat aquest temps aspirem el medi amb molta cura, doncs les cèl·lules estan molt sensibles. Afegim medi DMEM 25 mM glucosa sense FBS i deixem que les cèl·lules es recuperin i expressin el transgen durant les 48 hores prèvies a l'experiment.

## IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Aquesta tècnica ens permet determinar de forma específica la localització subcel·lular de proteïnes gràcies a l'ús d'anticossos marcats amb fluorocroms.

El procediment estàndard parteix de cèl·lules crescudes en monocapa sobre cubreobjectes de vidre de 10-12 mm de diàmetre que prèviament havíem col·locat en la placa de cultiu.

La manipulació dels cubreobjectes es realitza amb pinces invertides (*A. Dumont & Fils*) a temperatura ambient i els suports on dipositem aquests vidres consisteixen en tapes de tubs eppendorf de 0,5 ml enganxades de cap per avall sobre una placa de Petri. El diàmetre del cubreobjectes ha de superar el de la tapa, així tenim un extrem del vidre que sobresurt per on el podem agafar fàcilment amb les pinces.

Protocol estàndard d'immunofluorescència:

- ▶ **Fixació:** Rentem les cèl·lules amb PBS dues vegades, i afegim paraformaldehid al 4% durant 30 minuts a temperatura ambient. Després de la fixació rentem amb PBS dos cops més per eliminar les restes de paraformaldehid i finalment podem conservar els cubreobjectes en PBS amb azida al 0,01% a 4 °C per evitar la proliferació de fongs.
  
- ▶ **Reducció:** Posem el cubres sobre el suport de plàstic i afegim a cada cubre 50 µl de una solució preparada al moment de NaBH<sub>4</sub> en PBS per reduir i eliminar les restes de paraformaldehid que podrien interferir en la resta del procés. Incubem 10 minuts,
  
- ▶ **Permeabilització:** per permetre la entrada dels anticossos dins de la cèl·lula, eliminem les restes de NaBH<sub>4</sub> rentant els cubres per immersió en PBS i els incubem 10 minuts PBS amb 0,2% del detergent Triton X-100.
  
- ▶ **Bloqueig:** A fi d'evitar l'unió inespecífica dels anticossos, bloquegem els possibles llocs d'unió de proteïna lliures de les cèl·lules amb 50 µl de PBS amb 0,2% del detergent Triton X-100 i proteïna BSA al 3% i incubem 10 minuts més.
  
- ▶ **Anticòs primari:** Diluïm en PBS i BSA al 3% l'anticòs primari en la proporció adequada (és específica per a cada anticòs però generalment és un diluïció entre 1:50 i 1:100). Afegim 40 µl de la mescla en el cubres i incubem 45 minuts.
  
- ▶ **Rentats:** Fem tres rentats dels cubreobjectes per immersió en PBS, de 10 minuts cadascun.
  
- ▶ **Anticòs secundari:** Diluïm en PBS i BSA al 3% l'anticòs secundari que està unit al fluorocrom i el centrifuguem 5 minuts a 1000 g per eliminar els agregats. Incubem les cèl·lules amb 40 µl del sobrenedant. Protegim els cubreobjectes de la llum amb paper d'alumini durant els 30 minuts d'incubació.

► Rentats: Fem tres rentats dels cubreobjectes per immersió en PBS, de 10 minuts cadascun.

► Assecat i muntatge: Esbandim els cubreobjectes amb aigua desionitzada, els deshidratem amb etanol al 96% i els deixem assecar. Un cop estan ben secs, procedim a muntar-los sobre un portaobjectes amb una gota de mowiol. Pressionem bé per eliminar les restes de resina de muntatge i desm les preparacions a 4 °C.

En el cas de preparacions amb GFP només cal fer els passos de fixació i reducció abans de fer el muntatge.

Un mètode de fixació alternatiu consisteix en incubar a les cèl·lules -20 °C amb metanol pur a -20 °C durant 30 minuts. Llavors no cal fer la reducció amb NaBH<sub>4</sub> però pot ser que algunes estructures cel·lulars col·lapsin i no observem la morfologia esperada.

### **MICROSCÒPIA CONFOCAL**

Totes les imatges de microscòpia de fluorescència presentades en aquesta tesi han estat obtingudes en un microscopi confocal invertit DMIRBE amb detecció espectral Leica TCS SPII (Leica Microsystems), capaç d'excitar en la zona UV i tot el rang del visible, i amb un objectiu de Plan-Apo 63x (NA 1,4 oil) de Leitz. Per a les pel·lícules *in vivo* s'acobra una cambra climàtica amb control de temperatura i CO<sub>2</sub>.

### **QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES**

La valoració de la concentració de proteïnes s'ha fet pel mètode Bradford, basat en el canvi de color del seu reactiu en resposta a diferents concentracions de proteïna [Bradford, 1976]. El reactiu Bradford, quan

reacciona amb les proteïnes en una solució àcida, canvia el seu màxim d'absorbància de 465 nm a 595 nm.

Es dilueixen 2 µl de mostra en 48 µl d'aigua, i paral·lelament es prepara una sèrie de 50 µl mostres patró a partir d'albumina de sèrum boví, BSA (*Sigma*), a unes concentracions finals de 5,10,15 i 20 µg/ml. Afegim a tots els tubs 1 ml de reactiu Bradford (*Bio-Rad*), agitem vigorosament i mesurem l'absorbància a 595 nm. Els resultats s'expressen en mg de proteïna per ml.

## TRANSFERÈNCIA DE PROTEÏNES

Aquesta tècnica de transferència elèctrica de proteïnes fou descrita per Laemli 1970. Ens permet, mitjançant l'ús d'anticossos, detectar específicament una proteïna en una mescla proteica que prèviament s'ha separat en funció del pes molecular mitjançant l'electroforesi en gel.

El fonament d'aquesta tècnica de separació és conferir a les proteïnes les propietats físico-químiques que en el cas del DNA afavoreix la seva separació, és a dir, homogeneïtzar les càrregues i les estructures de totes les proteïnes a fi de poder-les separar en un camp elèctric exclusivament en funció de la seva massa molecular aparent.

Per aconseguir aquesta fita cal que totes les proteïnes tinguin una càrrega proporcional a la massa (relació càrrega/massa constant, com en el DNA) i que aquesta càrrega sigui independent de la seqüència primària. A més cal que la interacció i fricció amb la matriu porosa del gel no depengui de l'estructura tridimensional de la proteïna.

El detergent SDS (dodecil sulfat sòdic) ens solventa aquests dos problemes al mateix temps. Per una banda donat el seu caràcter amfipàtic desnaturalitza les proteïnes i per l'altra, a l'unir-se de forma regular al llarg de la seqüència d'aminoàcids dota a les proteïnes d'un nombre de càrregues negatives proporcional a la longitud de la seqüència.

Aquesta uniformització de les característiques de les proteïnes ens permet separar-les totes de cop sota les mateixes condicions en un procés que es compon de tres processos principals: electroforesi en condicions desnaturalitzants, transferència Western i immunodetecció.

### **Electroforesi en condicions desnaturalitzants**

Es desenvolupa en gels de poliacrilamida, ens permeten regular el tamany del porus. De fet, el gel consta de dues parts que varien el seu diàmetre de porus i el pH:

- ▶ Gel apilador: les seus porus tan grans no afecten el moviment de les proteïnes, però aquestes, degut al balanç de càrregues entre el tampó i la mostra, s'agruparan en una banda única.
- ▶ Gel separador: és en aquest tram del gel on pròpiament es produeix la resolució de la mescla de proteïnes. Ara el seu pH de 8,8 i els porus de tamany més petit fan que les proteïnes més petites pugin avançar més en l'electroforesi que les proteïnes de més pes molecular.

Donat que el gel està immers en tampó, cal aplicar les mostres amb 1:5 de tampó de càrrega, que a part de conferir densitat a la mostra, també conté l' SDS tant necessari per la desnaturalització de les proteïnes. La composició exacta d'aquest tampó és glicerol 20%(v/v), 2-mercaptoetanol 4% (v/v), blau de bromofenol 60 µg/ml i Tris/HCl 125 mM a pH 7,8.

Les electroforesis es realitzen en els aparells Miniprotean (*BioRad*) sotmesos a un voltatge de 200 V i amb el tampó d'electroforesi que conté Tris/HCl 25 mM, glicina 0,192 M, SDS al 0,2%, tot ajustat a pH 8,3.

## Transferència Western

Transferim les proteïnes que hem separat per electroforesi a un suport sòlid, una membrana de nitrocel·lulosa. Així facilitem la manipulació i l'accés dels anticossos a les proteïnes.

Per mantenir la resolució de les bandes de proteïna, la transferència de les mateixes des del gel de poliacrilamida cap a la membrana de nitrocel·lulosa es realitza també per electroforesi. En aquesta ocasió el camp elèctric és perpendicular al pla del gel, de manera que en la membrana es transfereix imatge especular del gel.

Aquesta tècnica descrita per Gershoni i Palade 1983 implica un muntatge en el qual la membrana de nitrocel·lulosa es diposita sobre el gel i el conjunt es comprimeix amb unes esponges en un casset per assegurar el contacte directe. El casset es submergeix a la cubeta en tampó d'electroforesi format per Tris/HCl 20 mM, glicina 150 mM i metanol al 20% (v/v) a pH 8,3.

L'electroforesi es duu a terme a un voltatge fix de 100 V i intensitat variable, durant 30 minuts. El sistema té molta resistència i s'escalfa molt, la qual cosa és perillosa deguda a la volatilitat del metanol, per això el muntatge inclou una cubeta amb gel.

## Immunodetecció

És en aquesta etapa on fem els passos adients per revelar específicament la banda de la proteïna d'interès mitjançant l'ús d'anticossos.

► **Bloqueig de la membrana:** Incubem la membrana de nitrocel·lulosa amb una solució de BSA al 3% (p/v) en PBS durant 1 hora, a fi de bloquejar tots aquells punts de la membrana que poguessin tenir una afinitat inespecífica per a qualsevol proteïna. Així evitem que l'anticòs s'uneixi en llocs no desitjats. Alternativament, es pot utilitzar llet desnatada en pols al 3%, que al ser una barreja homogènia de proteïnes pot fer un bloqueig més efectiu.



- ▶ Incubació de l'anticòs primari: Diluïm en PBS amb BSA al 3% el sèrum immune que conté l'anticòs específic contra la nostra proteïna d'interès. La dilució depèn del títol de l'anticòs en el sèrum. Incubem la membrana amb aquesta barreja 1 hora a temperatura ambient i amb agitació constant. Després d'aquest temps procedim a fer tres rentats en PBS amb 0,1% del detergent Tween-20, d'aproximadament deu minuts cadascun.
- ▶ Incubació amb l'anticòs secundari: L'elecció de l'anticòs secundari depèn de l'espècie d'origen de l'anticòs primari. Els anticòsos secundaris reconeixen el fragment constant de la cadena pesada de les immunoglobulines i estan conjugats covalentment a un enzim, la peroxidasa de rave (*Amersham* i *Dako*). Incubem 45 minuts a temperatura ambient i amb agitació constant i després tronem a fer els tres rentats amb PBS i 0,1% de Tween-20.
- ▶ Revelat: La detecció de les bandes específiques s'aconsegueix per un mètode fotomètric. La membrana, un cop rentada, la incubem 5 minuts amb luminol (ECL Plus, *Amersham*). La peroxidasa associada a l'anticòs secundari catalitzarà una reacció quimioluminescent exclusivament en la zona on s'ha unit l'anticòs. Exposem un film d'autoradiografia per contacte amb la membrana i un cop revelat, observarem unes bandes negres allà on es situa la proteïna d'interès.