

## **3.- OBJECTIUS**

## OBJECTIUS

Els objectius principals d'aquest estudi van ser els següents:

1. Posar a punt les tècniques moleculars i bioquímiques necessàries per a dur a terme l'estudi molecular i funcional del receptor d'insulina.
2. La caracterització a nivell molecular i funcional del receptor d'insulina en pacients amb resistència a la insulina.
3. Establir una relació estructura/funció del receptor d'insulina amb el genotip/fenotip dels pacients amb dites mutacions.
4. La caracterització *in vitro* del mecanisme mitjançant el qual actua la Metformina sobre el receptor d'insulina.
5. Aportar nova informació sobre el mecanisme global d'acció de la insulina a través del seu receptor.

## **4.- PATIENTS**

## PACIENTS

L'estudi molecular inclou un total de 18 pacients (14 noies i 4 nois) amb hiperinsulinisme i resistència a la insulina, dels quals 5 presentaven hiperandrogenisme.

- ▶ Insulino Resistència no catalogada: 9 pacients
- ▶ Obesitat: 1 pacient
- ▶ Lipodistròfia: 4 pacients
- ▶ Resistència a la insulina Tipus A: 3 pacients
- ▶ Rabson Mendenhall: 1 pacient

Els pacients en els quals es van detectar lesions en el gen del receptor d'insulina es va procedir a fer un estudi familiar.

Així mateix es va analitzar el receptor d'insulina d'una parella, que havien perdut un fill recent nascut que presentava alts nivells d'insulina en plasma i problemes amb la regulació de la glucèmia. Es va voler caracteritzar el receptor d'insulina dels progenitors per descartar una possible síndrome de Leprechaunisme en el nounat, i per poder descartar en futurs embarassos aquest tipus de problema mitjançant la possibilitat d'efectuar un estudi prenatal.

La caracterització bioquímica dels pacients i dels seus familiars està esquematitzada en la **taula 4**.

També es va estudiar un grup control de 10 individus voluntaris sans amb una insulina i glucèmia basals normal.

## CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA

Síndrome	Pacient	Sexe	Edat (anys)	insulina basal (5-25 $\mu$ U/mL)	Pèptid C (1.5ng/mL)	Glucosa (75-115mg/dL)	% unió específica en 3,5-10 <sup>9</sup> hematies (7-12%)
Resist. a la Insulina	1	F	19	15.40	3.1	76	
	2	F					3,8
	4	F		14.50		56	
	9	M		12.50	4.0	106.0	
	12	M		9.50	2.40	91.00	
	17	F	27	760.00			
	18	M	54				
	19	F	16				
	20	F					
Obesitat	5	F					
Lipodistròfia	6	F	19	67.20		150.0	
	7	F		10.40	3.70	83.0	5,54
	8	F		46.10	6.60	90.0	9,77
	14	F		112.10	5.20	266.0	
Tipus A	10 (A1)	F	18	213.00	11.50	13.0	
	11 (A2)	F	17	305.60	12.90	25.0	
	10/11.1*	F		106.30	9.20	22.0	
	10/11.2*	M		123.50	15.40	57.0	
	13 (A3)	F	16	334.20	14.60	101.0	
	13.1*	F	39	26.00	3.10	76.0	
	13.2*	F	14	8.30	2.10	74.0	
	13.3*	M	19	62.80	3.90	77.0	
	13.4*	M	21	53.30	4.40	70.0	
Rabson Mendenhall	3 (RM1)	M	28		4.20	274.0	1,02
	3.1*	M		31.90	4.30	80.0	9,85
	3.2*	F		8.30	3.80	68.0	7,92
Leprechaunisme (?)	15'	F		13.40		101.0	
	16'	M		8.00		91.0	

**Taula 4.-** Caracterització bioquímica dels pacients afectes de resistència a la insulina i dels seus familiars: Resist. a la insulina: Resistència a la Insulina d'etiologia desconeguda. F: Femení. M: Masculí. \* Familiars dels pacients. Pic en la corba d'insulina. ' Pares del nadó a testar per la síndrome de Leprechaunisme.

## **5.- MATERIAL I MÈTODES**

## MATERIAL I MÈTODES

### 5.1.- EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE L'ADN.

L'ADN dels pacients i dels seus familiars es va obtenir a partir de leucòcits de sang perifèrica seguint el mètode descrit per Sambrook i cols. (78).

Després de llegir la concentració de l'ADN en un espectrofotòmetre GeneQuant (Pharmacia Biotech), una alíquota de les mostres d'ADN es va diluir a la concentració de treball (100ng/ $\mu$ L) i es va mantenir a 4°C. La solució mare d'ADN es va guardar a -20°C.

### 5.2.- AMPLIFICACIÓ MITJANÇANT LA TÈCNICA DE LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es va emprar la tècnica de la PCR utilitzant els següents reactius i aplicant el següent protocol.

#### 5.2.1.- REACTIUS I CONCENTRACIONS

Els 22 exons de què consta el gen del receptor d'insulina van ser amplificats mitjançant la tècnica de la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un termociclador automàtic PTC-200 de MJ. Research (Massachusetts, USA). Tots els reactius necessaris per la PCR van ser obtinguts d'Ecogen, excepte els encebadors que van ser obtinguts de Pharmacia Biotech i de Boehringer Ingelheim. Els encebadors utilitzats s'uneixen a les regions intròniques flanquejants a cada exó (**taula 5**). Tant els encebadors com les concentracions dels reactius utilitzats en la reacció estaven descrites per Seino i cols. (79). Cada reacció es va dur a terme en un volum de 50 $\mu$ L que contenia 16,6mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67mM TRIS-HCL (pH 8,8), 0,01% Tween-20, 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 $\mu$ M de dATP, dCTP, dGTP i dTTP, 1 $\mu$ M de cada encebador, 0,3 $\mu$ g d'ADN i 0,1U de Taq ADN polimerasa. L'exó 1 presenta un elevat contingut en G+C, pel què es van haver de modificar lleugerament les condicions d'amplificació; es va utilitzar un 10% de DMSO i es va doblar la concentració de Taq en la reacció (80). La concentració de clorur magnèsic es va modificar per amplificar els exons 13 i 16. Es va utilitzar 1mM  $\text{MgCl}_2$  per poder detectar amplificació en l'exó 13. Per obtenir una banda única i eliminar bandes secundàries inespecífiques en l'exó 16, es va utilitzar el  $\text{MgCl}_2$  a 2mM.

Exó	Encebador sentit (5'→3')	Encebador antisentit (5'→3')	Producte de PCR (pb)
1	CGCGCTCTGATCCGAGGAGA (1786-805)	AGGGTTCTCAGTCCACAAGC (2002-21)	236
2	CCCTGATCCTTCTGATGCAT (2218-37)	GCTTTCTAGAACAAGGCACGA (2874-94)	677
3	ACAGGAATTGGACAAAGCCAT (3098-118)	AGCAGAGACCTCACTCATAGCCAA (3612-35)	538
4	GCCTGAGATGTCTGAAGGAC (3979-98)	GCCACTGAACGACCATCCTA (4321-40)	362
5	CTCACCATGGAGAATCATGA (4550-69)	CTAATACACGAACTTCCTAG (4086-25)	276
6	AGGCACGTAGCACTGAACA (4960-78)	TGTAATGCACTTGAATCATGCTG (5370-92)	433
7	CACCTCTGCCTTCTCACGGT (5630-49)	AAACGTAGCAAGCACAGAGC (5909-28)	299
8	CGGTCTTGTAAGGGTAACTG (6161-80)	GAATTCACATTCCAAGACA (6463-82)	322
9	GCACACTGTTTCTCATGATG (6573-92)	AGAGGTGAAGCAAAGTGCAT (6838-57)	285
10	TGTTCCAGCCGCAGAGACTTG (7101-20)	CGGTCCCTAAGTAATGACCT (7408-27)	327
11	GTGGTCTGTCTAATGAAGTT (7575-94)	GAATTGGTGAAGCATCTGCT (7793-812)	238
12	TGATGGTGATGGTGACATCATA (8000-21)	TGTCCTTGGTCAGCCTTGATGT (8357-78)	379
13	GGATCTCATCCAAGAGTTAC (8735-54)	TACTAATAGCACAGTACCTG (9037-56)	322
14	TGGACACTCCAGATGTGCA (9186-205)	ACCATGCTCAGTGCTAAGCA (9442-61)	276
15	GTGAACTTTGTTGGAAACACATTG (9612-35)	CCTATACCTATATCAAGGCATG (9827-48)	237
16	TCTGCTGGTAAGGGCTGCCA (10191-210)	CTCACTCAATGGTGAAGGCA (10419-38)	248
17	CCAAGGATGCTGTGTAGATTAAG (10650-71)	TCAGGAAAGCCAGCCCATGTC (10946-66)	317
18	CTGGTGAGTCGAATCACGGA (11123-42)	AGCGGGTGCTCCACCGAGTA (11317-28536)	214
19	GATCCCAGTGCTGCTGAAACAC (11379-400)	AC208GGCTCATTATAGACAACCTC (11642-63)	285
20	AGGTTAAGAGCGTGTGAACCT (11811-31)	GAATTCAGCCCAGCGTCCAT (11998-2018)	208
21	TGTTACTACTATCAACTGTC (12121-40)	ACCTGTAACATACAGCATGC (12392-411)	291
22	ACTCACCCAGGACGTGCCTTCT (12537-59)	GAACGATCTCTGAACTCCACT (13026-46)	510

**Taula 5.-** Parelles d'encebadors per amplificar els exons del gen del receptor d'insulina humà. Numeració segons Ebina i cols. (11). Els números entre parèntesi indiquen la posició de l'encebador en la seqüència presentada en la Figura. 9. (taula extreta de la referència (81)).

## 5.2.2.- PROTOCOL D'AMPLIFICACIÓ

Majoritàriament les reaccions es van dur a terme seguint les següents condicions: després d'una desnaturalització inicial de 5 min. a 94°C, es van fer 25 cicles de desnaturalització: 1min. a 94°C, unió dels encebadors al motlle: 1min. 30 seg. a 55°C, extensió: 2min 30seg. a 70°C i es va fer un cicle d'extensió final de 10min. a 70°C (79).

El protocol d'amplificació de l'exó 1 va ser: desnaturalització inicial: 5min. a 94°C, seguit de 30 cicles de desnaturalització 1min. a 94°C, unió dels encebadors al motlle: 1min. 30seg. a 55°C i extensió 1min. 30 seg. a 72°C. El cicle d'extensió final va ser de 5min. a 72°C (80).



### **5.3.- ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA**

Per realitzar l'electroforèsi es van emprar els següents reactius i procediments.

#### **5.3.1.- AGAROSA**

Els productes de la PCR es van analitzar en un gel d'agarosa de baixa EEO (Ecogen) al 2% per confirmar l'absència de contaminació en el control negatiu i per assegurar que cada producte de la PCR era una única banda de la mida esperada.

#### **5.3.2.- TINCIÓ AMB BROMUR D'ETIDI**

El gel d'Agarosa es va teyir amb Bromur d'Etidi (Ecogen) a una concentració final de 0.5µg/ml.

#### **5.3.3.- TAMPÓ DE CÀRREGA**

El Tampó de Càrrega utilitzat per carregar els productes en el gel d'Agarosa estava compost per 50% Glicerol estèril, 50% H<sub>2</sub>O estèril, 10µL TAE 50X i 10µL de Blau de Bromofenol (10%) en 15 ml.

#### **5.3.4.- CONDICIONS D'ELECTROFORESI**

Els productes es van carregar en el gel, en una proporció 4:1 en relació al tampó de càrrega i el gel es va sotmetre a un voltatge constant de 120 volts durant 60min.

#### **5.3.5.- VISUALITZACIÓ DELS PRODUCTES I DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR**

El resultat de l'electroforèsi es va visualitzar en un transil·luminador de llum ultravioleta a una longitud d'ona de 312nm.

Es va determinar el Pes Molecular de cada producte contrastant la migració en el gel d'Agarosa amb el Marcador de Pes Molecular X-174-RF Hae III (Pharmacia Biotech) que té un rang de bandes que van des de 72pb a 1358pb, i amb el marcador PBR322/Hae III (ECOGEN), amb un rang de bandes que abarquen des de 124pb fins a 587pb.

## **5.4.- PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR**

Per tal d'eliminar l'excés de nucleòtids, encebadors, polimerases i sals en el producte de PCR, es va utilitzar el Kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanya). Es van afegir 5 volums de Tampó PB per cada volum de producte de PCR i es va barrejar bé, aquesta solució es va transferir a una columna de centrifugat QIAquick i es va centrifugar en una microcentrífuga a 12.000rpm durant 1min. Es va fer un rentat afegint 0,75mL de tampó PE i centrifugant durant 1min. Per eluir l'ADN unit a la membrana de la columna es van afegir 50µL d'aigua destil·lada estèril al centre de la columna i es va centrifugar durant 1min.

## **5.5.- ANÀLISI CONFORMACIONAL DE POLIMORFISMES DE CADENA**

### **SENZILLA: SSCP**

Es va utilitzar aquesta tècnica seguint el mètode descrit per Teschauer i cols. (81). Els 22 productes amplificats del gen del receptor d'insulina són de mides diferents que van des de les 677pb de l'exó 2 (el més llarg) fins les 208pb de l'exó 20 (el més petit). Aquest fet va impedir que per tots els exons les condicions fossin les mateixes, ja que la mida del producte és un factor clau en aquesta tècnica.

### **5.5.1.- CONDICIONS PER LA SSCP**

Es van modificar les condicions òptimes descrites per Teschauer per cada producte.

#### **5.5.1.1.- CONDICIONS ELECTROFORÈTIQUES**

Es va utilitzar una Font d'Alimentació Apelex ST 606T (ECOGEN), es van provar diferents voltatges pels diferents productes i concentracions de poliacrilamida, encara que per cada experiment el Voltatge es mantenia constant.

#### **5.5.1.2.- ACRILAMIDA / BISACRILAMIDA**

Es van testar diferents concentracions de poliacrilamida (Acilamida/Bisacrilamida (Pharmacia Biotech, BioRad) 49:1 (6%), 37,5:1 (14%), 29:1 (12%)) per tal de fer gels de diferent porositat. La mida dels gels de poliacrilamida va ser de 200 x 200 x 1mm.

### **5.5.1.3.- INICIADORS I CATALITZADORS DE LA POLIMERITZACIÓ**

Es va utilitzar el TEMED (Pharmacia Biotech) com a iniciador de la polimerització, seguint les indicacions del Maniatis (78). Es va afegir APS (Pharmacia Biotech) al 10% a una concentració de 2-5mM com a catalitzador de la polimerització.

### **5.5.1.4.- GLICEROL**

En el gel s'hi va afegir sempre un 10% de Glicerol estèril (Merk).

### **5.5.1.5.- EL TAMPÓ**

El tampó utilitzat va ser el TBE (44,5mM Tris/ 44,5mM Borat/ 1mM EDTA) a un pH 8,2-8,3.

### **5.5.1.6.- TEMPERATURA**

Tots els gels es van córrer a temperatura ambient. La cubeta d'electroforesi vertical (20cm x 20cm) (ECOGEN) no tenia sistema de refredament, per tant la temperatura a l'iniciar l'electroforesi i al finalitzar-la no era la mateixa degut a l'escalfament provocat per la corrent. La temperatura final del tampó en la cubeta va ser de 23-27°C.

### **5.5.1.7.- LONGITUD I COMPOSICIÓ DEL PRODUCTE**

Es van analitzar productes d'aproximadament 200pb (exó 2) fins a gairebé 700pb (exó 3). La composició nucleotídica d'aquests productes també era diferent (exó 2 molt ric en G+C, exó 3 ric en A+T).

### **5.5.1.8.- TAMPÓ DE CÀRREGA DESNATURALITZANT**

Es va utilitzar el següent tampó de Càrrega desnaturalitzant: 95% Formamida, 20mM EDTA, 0.05% Bromofenol Blue. El tampó desnaturalitzant es va utilitzar en una relació 1:5 amb el producte a desnaturalitzar. Aquesta barreja es va escalfar a 94°C durant 5min. i ràpidament es va mantenir en gel uns 10min. fins carregar-ho en el gel d'electroforesi.

En la **Taula 6** s'esquematitzen les condicions emprades per a cada producte.

<b>Producte (Exó)</b>	<b>Mida (pb)</b>	<b>Acril/Bisacril (%)</b>	<b>Voltatge (Volts)</b>	<b>Temps (minuts)</b>
1	236	37,5:1 (14%)	320	360
2	677	49:1 (6%)	120	780
		29:1 (12%)	320 / 330	420
3	538	49:1 (6%)	120	780
4	362	49:1 (6%)	120	780
		29:1 (12%)	320 / 330	420
5	276	29:1 (12%)	300	240
6	433	49:1 (6%)	120	780
		29:1 (12%)	320 / 330	420
7	299	29:1 (12%)	320 / 330	420
8	322	29:1 (12%)	320 / 330	420
9	285	37,5:1 (14%)	330	540
		29:1 (12%)	320 / 330	420
10	327	29:1 (12%)	330	420
11	238	37,5:1 (14%)	300	425
12	379	29:1 (12%)	330	420
13	322	29:1 (12%)	330	420
14	276	37,5:1 (14%)	325	360
15	237	37,5:1 (14%)	325	360
16	248	37,5:1 (14%)	325	360
17	317	37,5:1 (14%)	300	480
18	214	37,5:1 (14%)	325	360
19	285	37,5:1 (14%)	325	360
20	208	37,5:1 (14%)	300	425
21	299	37,5:1 (14%)	325	360
22	510	49:1 (6%)	120	780

**Taula 6.-** Condicions per a la tècnica del SSCP.

### 5.5.2.- TINCIÓ DELS GELS DE POLIACRILAMIDA

Per tal de visualitzar els productes en els gels de Poliacrilamida es van emprar dues tincions diferents: Bromur d'Etidi i Nitrat de Plata.

#### 5.5.2.1.- TINCIÓ AMB BROMUR D'ETIDI

Es va deixar el gel de poliacrilamida en tampó TBE i Bromur d'Etidi (4µg/ml) durant 30min. en agitació. Es va fer un rentat amb tampó TBE i es va visualitzar en un transil·luminador de llum ultravioleta.

#### 5.5.2.2.- TINCIÓ AMB NITRAT DE PLATA

Tots els reactius necessaris per la tinció amb Nitrat de Plata van ser obtinguts de MERK. El protocol de tinció va ser com segueix: dos passos de fixació de 3 min. cada un (89% H<sub>2</sub>O destil., 10% Etanol absolut, 1% Àcid acètic), un pas de tinció durant 15min (AgNO<sub>3</sub> 0,1%), revelat amb una solució de NaOH i formaldehid durant 15-20min. i finalment un pas d'aturada de la reacció amb una solució de NaCO<sub>3</sub> durant 10min. El resultat es va comprovar a través d'una font de llum blanca.

### 5.6.- SEQÜENCIACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR

Els encebadors utilitzats van ser els mateixos que es van utilitzar per la reacció de PCR. Es van utilitzar a una concentració de 3,2 pmol/µl i es va emprar el Kit de seqüenciació de ABI (Perkin Elmer) ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq ADN Polymerase FS. Les reaccions es van fer segons les instruccions dels fabricants i les seqüències es van llegir en un seqüenciador Perkin Elmer 3.10.

Per l'exó 1, es va utilitzar un 5% de DMSO en la reacció i una temperatura de desnaturalització de 95°C.

Es va emprar com a seqüència estàndard la publicada per Seino i cols. (79) que segueix la numeració d'Ebina i cols. (11) i que es detalla en la **Figura 9**.

```

1 AGATCTGGCCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGAAAACTCCATCTAAAAA
91 GAGAGAGAGAGAGAAACGGAACCTGGGGGAGGATTTCGAAAAAATATGCTT
181 TACGGCCAGGGAAATGCTGGGCAAGCCGAGAGCCAGGAATAGGTTTGGCTT
271 GTTTATTGAATGAAAGAAATGAATGCTTGGCTTGGCTGGGCTTTCTTAAGT
361 CTGGCATGCAAGTATTATTAACCCATTACACAACTGAAACTGCCGACAGAC
451 GGTGGAGGAACCTCCCTCCATTGAGTTCTGGCTTCTATACTGAAAGCCCT
541 CGCCTGTGGTGAATGTGCTTCTAGACTTACAGACATACAGGCTGGCTCTG
631 GTCTGGGGCTCTCTTGGGGTGTCTTGGCCCTTTCAGAAAGCTCTGCACAT
721 AGCCCACTGGGCAAGCCGGGCACTGGCTCTCCAGGGCCCTGGCTTGGGTC
811 TGGGGGCGCCACGCGCTCTGGGACGAGTGTGCTGGCCAGCCCGGACTGAG
901 ATTTAAGCGAGTGAIAAAAAAAAAAAGAAAGAAACCAAAACCACTCGAGT
991 AATCAACAGGAATCTCCAAAGCCCACTATCAACAAAATAGCAAAAATGTA
1081 CCTC GGGGGCTCTGAAACTGGAGGAGACTCGGGGCTGTAGGGCGGGGATC
1171 CGCGGGGGCGGGGACAGGGAGGCGGGGAGGGGGCGGGGCGGGGGGACGG
1261 CTCTGGGGCTCTCCGGGGCGAGAGTCTCTTCTAGGCCAGATCCGGGGCC
1351 CGCGTGTCTTACGGGGCGAGAGCTCTCTCTCCGGCGCCGGCCGACCCGG
1441 TCGGTCCGGCGCTCCCTCTGTCCGGAGCCCGAGATCCGGACCCAGAGCC
** *Exon 1
1531 CCGAGCTCCGGCCCGGAGATCTCGGAGCGGGCCCGGGCCGAGCGCCCGG
1621 TTTGTAGCTGGGAGCCCGCGCGCCCTTCGCGGGGCTGGCTCTGGCCCTC
1711 GGAAGAGAGGACCGCGCCCTCCAGCCCTCTTGGTGGCCGCTCGGAGCAT
-27
MetGlyThrGlyGlyArgArgGlyAlaAlaAlaAlaProLeuIleuValIleValIleAlaLeuLeuL
1801 GGAGACCDCGCTCCCGCAGCCATGGCCACCGGGGCGGGGAGCGGGCCGCG
1
7
suGlyAlaAlaGlyHisLeuTyrProGlyGluV(al)
1891 TGGGCGCCCGGGCCAGCTGTACCCCGGAGAGG GTGAGCTGGGGGGGGGG
1981 CCAAGCGAAAATGCAATCCCGCTTGTGGACTGAGAACCCTCCCAAGGGCG
2071 GGGGAGCGGGAAGC: : : : : -25 kb : : : : : TACTTACAGAAAGCT
2161 CAGGGCCCGGATGAAACACAGGGCCAGTTCCTGTCTCATGAAGCCGGCT
7
Exon 2 (V)alCysProGlyMetAspIleArgAsnAsnLeuThrArgLeuHisGluLeuGl
2251 GCTCACCTGTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
uAsnCysSerValIleGluGlyHisLeuGlnIleLeuLeuMetPheLysThrArgProGluAspPheArgAspLeuSerPheProLysLe
2341 GAATGCTCTGTGATCGAAGGACACTTCCGATACTTGTATGTTCAAAACGAG
uIleMetIleThrAspTyrLeuLeuLeuPheArgValTyrGlyLeuGluSerLeuLysAspLeuPheProAsnLeuThrValIleArgGl
2431 CATCATGATCACTGATTAATGCTGCTCTCCGGCTCTATGGCTCGAGACCCT
ySerArgLeuPhePheAsnTyrAlaLeuValIlePheGluMetValHisLeuLysGluLeuGlyLeuTyrAsnLeuMetAsnIleThrAr
2521 ATCAGACTGTTCTTAACTAGCGGCTGGTCACTCTCGAGATGGTTCAGCTCA
gGlySerValArgIleGluLysAsnAsnGluLeuCysTyrLeuAlaThrIleAspTrpSerArgIleLeuAspSerValGluAspAsnTy
2611 GGTCTCTGCCATCGAGAAGAACAAATGAGCTCTGTACTTGGCCACTATCCAC
rIleValLeuAsnLysAspAspAsnGluGluCysGlyAspIleCysProGlyThrAlaLysGlyLysThrAsnCysProAlaThrValIl
2701 CATGCTGTGAACAAAGATGACAACGAGGAGTGTGGAGACTCTGTCCGGGTAC
191
eAsnGlyGlnPheValGluArgCysTrpThrHisSerHisCysGlnLysV(al)
2791 CAACGGCCAGTTFGTGGAAGATGTTGCACTCATAGTCACTGCCAGAAAG
2881 TTCTTCTAGAAAGCTTAAATGTTTTATGGCTTAAAAATGTTAAATGCTCAT
2971 TAGCCACGGGAGTGGCAGACATTTCTGTAAGACTCAGATAGTAGACTTTCAG
3061 : : : : : GATCCAGAATGCTGCATATGCAGACAGGAATGGACAAAGCATT
191
Exon 3 (V)alCysProThrIleCysLysSerHisGlyCysThrAlaGluGlyLeuCysCysH
3151 TTATTTATTTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
IleSerGluCysLeuGlyAsnCysSerGlnProAspAspProThrLysCysValIleCysArgAsnPheTyrLeuAspGlyArgCysValG
3261 ACAGGAGTGCCTGGCAACTGTTCTCAGCCGAGAGCCGACCAAGTGGCTGGCT
IleThrCysProProProTyrTyrHisPheGlnAspTrpArgCysValAsnPheSerPheCysGlnAspLeuHisHisLysCysLysAsnS
3331 AGACCTGCCCCCGCCGCTACTACCCTCCAGGACTGGCGCTGTGTGAACCTC
298
erArgArgGlnGlyCysHisGlnTyrValIleHisAsnAsnLysCysIleProGluCysProSerGlyTyrThrMetAsnSerSerAs(n)
3421 CCGGAGCCAGGGCTGCCACCAATACGTCATTCAACAACAAGTGCATCCCTG
3511 CAGTCTGCAATGCTGGCTCTGGGGCCAGCCGAGGAGAAAGGAGCGGGTGGT
3601 CCCAGGTTAATTTGCTATGAGTGAAGTCTCTGCTCTCAGATGCTACTTTT
3691 CTACCTTTTCTCTAAGGACC: : : : : >15 kb : : : : : CCAACATG
3781 ATTAGCCAGCCAGCTGCGGGGCACTATAATCCAGCTACTGTGAGGCTGAG
3871 CAGTGAAGTGAACCACTGCACTCCAGCTCCAGCCAGGAGGCACTCTGTCA
3961 CATATCAGCCAGAAAGATGCTGAGATGCTGAAGGACCTGGATACCGTGAC
298
Exon 4 (Asn)LeuLeuCysThrProCysLeuGlyProCysProLysValCysHisLeuLeuGluGlyGluLysThrIleAspSerValTh
4051 CGTCTTAG CTTGCTGTGCAACCCATGCCTGGTCCCTGTCCAAAGTGTGCC

```

Figura 9.- Seqüència parcial del gen del receptor d'insulina humà. Els aminoàcids i els nucleòtids que els componen es mostren en la figura. També s'assenyala l'inici i el final de cada exó amb el número d'aminoàcid. (La figura continua en les tres pàgines següents).

348

rSerAlaGlnGluLeuArgGlyCysThrValIleAsnGlySerLeuIleIleAsnIleArgGlyGlyA(an)  
 4141 GTCTGCCAGGAGCTCCGAGGATGCACCGTCATCAACGGGAGTCTGATCATCAACATTGAGGAGGCCA GTGAGTGTCTCTGTGGGGCGT  
 4231 CGGGGGTGCCGTGTGGGCTCCATGTCCCTCTGAGCTGTGAGCGGGAAGAAAAGCAGTGCAGACCCCTGCTGCTGCTCTACAGCACTTT  
 4321 TAGGATGGTGTTCAGTGGCTCCCATGGATAGAACCATGCTGGGAGTCTGCTTCAAAACCTGAAATGAACAGCTCAGTCTTCC:|||||  
 4411 :||||| ~3 kb :|||||:|||||:GGGCAGAGTATGCTTGACCCATTTAAGGAATGCTAAGGACTTCAGATTGTGTCTTAAGCATGAT  
 4501 GAGTTTGGAGCTGGATGTGCAGTCAITTCAGGCTCAGGGTTATCTTCTCACCATGGAGAAATCATGAGAAGATTGAATATGCTATA

348

Exon 5 (A)snAsnLeuAlaAlaGluLeuGluAlaAsnLeuGlyLeulleGluGluIleSerGlyTy  
 4591 GAAACCCACTOGATATTCTCTCTTTCTTCTAG ACAATCTGGCAGCTGAGCTAGAAGCCAAOCTCGGCTCATTGAAGAAATTCAGGGTA  
 396  
 rLeuLysIleArgArgSerTyrAlaLeuValSerLeuSerPhePheArgLysLeuArgLeuIleArgGlyGluThrLeuGluIleCl(y)  
 4681 TCTAAAAATCCCGCATCTCTGCTGCTCCTCTTCTTCCGGAAGTTACGTCTGATTCAGGAGAGACCTTCGAAATTCG GTA  
 4771 CCTGGGCTGATTTGTTGATGAGCTGACTGTAACTAGGAAGTCTGCTGATTAGAACAACTTAAGGATTTTTTT:|||||:|||||  
 4861 : -1 kb :|||||:GGGCATGAAAACCTTCTCAACTTCTCTGTTATCCACATTCACAAATATGTCTGAGTATGTCCCAAGCAAGTC  
 4951 GAGAGGATTAGCCAGCTAGCAAGATCAACTCCAGCATGGCCACACCATCTTGGAGTTGTAGAAGACCAGGCTTGAATGACT

396

Exon 6 (G)lyAsnTyrSerPheTyrAlaLeuAspAsnGlnAsnLeuArgGlnLeuTrpAspTrpSerLysHisAsn  
 5041 AGATGTGTGTGTTTTTCCATAG CAACTACTCTTCTATGCTTGGACAACGAGAACCAGGACCTTCCGACTGGGCAACACACA  
 LeuThrIleThrGlnGlyLysLeuPhePheHisTyrAsnProLysLeuCysLeuSerGluIleHisLysMetGluGluValSerGlyThr  
 5131 CTCACCATCACTCAGGGAAACTCTCTTCCACTATAACCCAAACTCTGCTTGTCCAGAAATCCACAAGATGGAGAAGTTTCAGGAACC

468

LysGlyArgGlnGluArgAsnAspIleAlaLeuLysThrAsnGlyAspGlnAlaSerC(ys)  
 5271 AAGGGGCGCCACAGAGAAAGCACAATGGCCGAGACCAATGGGACTAGGCACTCCT GTANGTCACTGGTCCCAACCTTTTGGCAGG  
 5311 AGGGACCGGTTTATGGAAGATGGTTTTTCCATGGACTGGTGGGCGGGGATGGTTTCAGCATGATTCAGTGCATAGATTACTAT  
 5401 GCACCTTATTCTTATTATGATTGATTTG:|||||:||||| -1 kb :|||||:|||||:TTGGGCGGTACAGACTCCGCTTATTCACTT  
 5491 GACTGTCTGGCTCAGTCAAGTCATTGGCTTACGTGAGTGTGAGTGGCCAAAGTTCAAAACCTGGCTTACCTTTGAATCTTCCGCCATTC  
 5581 ATACTCAGCCAGCCACATGGGAGGAGACCTTAAAGGGAATAGCAGCATCACCTCTGCCTTCTCAGGCTCCCTCAGGAGTGTGGGGGT

468

Exon 7 (C)ysGluAsnGluLeuLeuLysPheSe  
 5671 CCCAGGCTTTGGCTCAAACTACACTGAATAGCTCATTTTTGCTTTTTGTTTAACTTTTTCCAG GTGAAATGACTTACTTAAATTTTC  
 rTyrIleArgThrSerPheAspLysIleLeuLeuArgTrpGluProTyrTrpProProAspPheArgAspLeuLeuGlyPheMetLeuPh  
 5761 TTACATTCGGACATCTTTTGACAGATCTTGTCTGAGATGGGAGCGTACTGGCCCGCGACTTCGGAGACCTCTTGGGTTTCATGCTGT  
 510  
 wTyrLysGluAl(a)  
 5851 CTACAAAGAGCC GTAAGTAGAGGTTACAGAGAGCGCTGAGAGCGGAGCGCTGGCTGGCTGTGCTGCTACGTTTGTCTCCAAATCT  
 5941 GCGCTCTTGGGTTCTGTCTATCTCCCTCCTCCTGGAATAAATATCTTAGGTTCTTTTTACAATCTCACCAGTCGATGGCATGCA  
 6031 AAGTCAATAGTGTCTGCTTTT:|||||:||||| ~3 kb :|||||:|||||:CATAGATTGTGGGTGACTAAACATGTGACCCCTATGGGA  
 510

Exon 8 (Al)aProTy

6121 TGTAACTTCCAGGCTCATCTGCAGCCACTCAGTGTGAGCGTCTTGTAAAGGTAAGTGGCTTCTGCTGTTTCTGTGAAG CCTTA  
 rGlnAsnValThrGluPheAspGlyGlnAspAlaCysGlySerAsnSerTrpThrValValAspIleAspProProLeuArgSerAsnAs  
 6211 TCAGAATGTGACGGAGTTGATGGGAGGATGCGTGTGTTCCAACAGTTGGACGGTGGTAGACATTGACCCACCCCTGAGTCCCAAGCA

pProLysSerGlnAsnHisProGlyTrpLeuMetArgGlyLeuLysProTrpThrGlnTyrAlaIlePheValLysThrLeuValThrPh  
 6301 CCCCCAAATCACAGAACCACCCAGGCTGGCTGATGGGGGTCTCAAGCCCTGCAGCCAGTATGCCATCTTTGTGAGAGCCCTGGTCACTT  
 594  
 eSerAspGluArgArgThrTyrGlyAlaLysSerAspIleIleTyrValGlnThrAspAlaThrA(an)  
 6391 TTCGATGAACCCCGACCTATGGGCCAAGAGTGCATCATTTATGTCCAGACAGATGGACCA GTGAGTGTGCTTGGGATGTGAAT  
 6481 TC:|||||:||||| ~3 kb :|||||:|||||:GGTCCCTCATGATGCTTTAACTTGTGTCTCCCGCCATCCTCCACAGCTTTCT  
 594

Exon 9 (Al)snProSerValProLeuAspProIleSerValSerAsnSerSe

4571 TTGCACACTGTTTCTCATGATGACCCGTTTCTTCTCCCTGGCAG ACCCTCTGTGGCCCTGGATCCAAATCTCACTGTCTAAGTCTATC  
 rSerGlnIleIleLeuLysTrpLysProProSerAspProAsnGlyAsnIleThrHisTyrLeuValPheTrpGluArgGlnAlaGluAs  
 6661 ATCCAGATATTCTGAGTGGAAACCCCTCCGACCCAAATGGCAACATCACCCACTACTCTGTTTCTGGGAGAGGACGGGGAAGA  
 650  
 pSerGluLeuPheGluLeuAspTyrCysLeuLysC(ly)  
 6751 CAGTGAAGCTGTTCGAGCTGATTTGCTCAAG GTGAGTGCAGGCAGCTCTGCTAGGATCGGTGGGTTTGCACAGCTGTCTCGATG  
 6841 CACTTTGCTTCACCTCTAGGGAGCACTATCTCTCTGCTCTCAGTGTCCGAAGGCACACACACACTCCATTCTATCTCATATGA  
 6931 AA:|||||:||||| >11 kb :|||||:|||||:TTTGTGCTGTGTATGTGTGGTGTGTTGCTGATGTGTGCTGTGTGTGGGGG  
 7021 GTGTGCTGTGTGTATGCTGTGTGTGTGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGGGGGGTGTGTGTGTGTCTGATGCTGTCTTCAAGCCG  
 650

Exon 10 (G)lyLeuLysLeuProSerArgThrTrpSerProProPheGluSerGluAspSe

7111 CAGAGACTTGAGCCCGCTTTTCTGTTTCTTCTCCAG GGCTGAAGCTGCCCTCGAGGACTGGTCTCCACCATTCGAGTCTGAAGATTC  
 rGlnLysHisAsnGlnSerGluTyrGluAspSerAlaGlyGluCysCysSerCysProLysThrAspSerGlnIleLeuLysGluLeuGl  
 7201 TCAGAAGCACACAGAGTGNATGAGGATTCGGCGGGGAAATGCTGCTCTGTCCTCAAGACAGACTCTCAGATCTGAAGGAGCTGGA  
 715  
 wGluSerSerPheArgLysThrPheGluAspTyrLeuHisAsnValValPheValProAr(g)  
 7291 GGAGTCCCTGCTTTAGGAGACGTTTGGAGATTACCTCCACACGGTGTGTTTCTGCCAG GTCCAGACTTGGGCTGGGCTCTTATGTC  
 7381 GGTGCCAATTTGGCTTGTGTGGTGGAGGTCATTACTTAAGGACCCAGAGGTAGTGGGACCCAGAGACCGGAGAGGGTGGGTGGACTC





IleIleLysGlyGluAlaGluThrArgValAlaValLysThrValAsnGluSerAlaSerLeuArgGluArgIleGluPheLeuAsnGlu  
 10801 ATCATCAAGGGTGAGGCAGAGACCCCGTGGCGGTGAAGACGGTCAACGAGTCAGCCAGTCTCCGAGAGCGGATTGAGTTCTCAATGAG  
 1059  
 AlaSerValMetLysGlyPheThrCysHisHisVal  
 10891 GCCTCGGTCATGAAGGGCTTACCTGCCATCACGTG GTGAGTCCAGTGGGGTGGGACATGGGCTGGCTTTCCTGACCCTTCCCTTTCTC  
 10981 TCCCTCCTCCTCTGCACAGACGACAGAGGACACAGGGTGTAACTCCTA:~::~::~: -2 kb ~::~::~:ACGCTGCAT  
 11071 CCAGCCACAGGCTGCTGTGTGACATAGACACCAGGGAGGAGAACCTGCTGAGTGAATCAGGACCCTCTCCAAGAACCT  
 1060  
 Exon 18 ValArgLeuLeuGlyValValSerLysGlyGlnProThrLeuValValMetGluLeuMetAlaHisGlyAsp  
 11161 GGTGCTTCTCTGCAG GTCCGCTCCTGGGAGTGGTCCAAGGCCAGCCACGCTGGTGGTGGTGGAGCTGATGGCTCAGGGAGAC  
 1096  
 euLysSerTyrLeuArgSerLeuArgProGluAlaGlu  
 11251 TGAAGACTACCTCCGTTCTCTCGGCCAGAGGCTGAG GTAAGCTGCTTCGGGGACCCAGCGGGTACTCGGTGGAGCACCCGCTCCTC  
 1097  
 Exon 19 AsnAsnP:  
 11341 GCCTCCTC:~::~::~: -0.5 kb ~::~::~:GATCCAGTGGCTGCTGAAACACCAACCCCGTGTCTCTTTAG AATAATC  
 oGlyArgProProProThrLeuGlnGluMetIleGlnMetAlaAlaGluIleAlaAspGlyMetAlaTyrLeuAsnAlaLysLysPheVa  
 11431 TGCCGCCCTCCCTACCTTCAAGAGATGATTGATGGCGGACAGAGATTGCTGAGGGGATGCCTACGTGAACGCCAAGAAGTTGT  
 1150  
 lHisArgAspLeuAlaAlaArgAsnCysMetValAlaHisAspPheThrValLysIleGlyA(sp)  
 11521 GCATCCGGACTCGCAGCGAGAACTGCATGGTCCGCCATGATTTTACTGTCAAAATGGAG GTTCGCTGGCTTTCTGCTTTGAAAACI  
 11611 TAACGACCCAGGCCAGGTTTGTATTTCAGAAAGAGTTGCTATATAGAGCGGTAAGTCTTTCTGATAATATAAGGGGCAAGTACTTC  
 11701 ~::~::~: -0.5 kb ~::~::~:GACGTGGCCAGGTGAACCCCTCTTACGGCTCTGTGAGAGGTGGGGCAGTCAAGGTGGCA  
 1150  
 Exon 20 (A)spPheGlyMetThrArgAspIleTyrGluThrAsp  
 11791 GATGCTAGGACCAAGGCTGAAGGTTAAGACCGTGTGAACCTTTTGTGTGTCAG ACTTTGGAATGACCAGAGACATCTATGAACGGAT  
 yrTyrArgLysGlyGlyLysGlyLeuLeuProValArgTrpMetAlaProGluSerLeuLysAspGlyValPheThrThrSerSerAspM  
 11881 ACTACCGAAAGGGGCAAGGCTGCTCCCTGACGGTGGATGCCACCGAGTCCCTGAAGCATGGGCTTCCACTTCTCTGACA  
 1193  
 etTr (p)  
 11971 TGTG GTGAGTTGTGTGGATCGCTGGATGGACCGTGGCTTGAATTC:~::~::~: -1 kb ~::~::~:TTCCGTGTGTG  
 1193  
 Exon 21 (Tr)ps  
 12061 GTCCGTTTGGGTGTGTGTTTGGCGCGCGCGTGTGTGTGTGTCTAAATGGCTTCTTGTACTACTATCAACTGTCATCGCCAG GT  
 erPheGlyValValLeuTrpGluIleThrSerLeuAlaGluGlnProTyrGlnGlyLeuSerAsnGluGlnValLeuLysPheValMetA  
 12151 CCTTTGGCGTGTCTTGGAAATCACCAGCTTGGCAGAACAGCCTTACCAAGGCCTGTCTAATGAACAGGTGTGAAATTTGTCTAGG  
 1238  
 spGlyGlyTyrLeuAspGlnProAspAsnCysProGluArgVa (l)  
 12241 ATGGAGGTATCTGGATCAACCCGCAACTGTCCAGAGAGAT GTAACTGTAGAAAGGGTTAAGGTGTGTGAGGTGTCGTTGAAAGGC  
 12331 TATTGCCCTTACACGTGTGCTTGGTTTGGCTTTCCTATGCTACACGGTCCACCGTGTTCATGCTGTATGTTACAGGTGTGTTTGTG  
 12421 TTTGCATAGCTTGTCTTTACATGCATGCTTGCATT:~::~::~: -2 kb ~::~::~:CTGCAGGGACAAGAGTGGGGTTT  
 1238  
 Exon 22 (Va)lThrAspLeuMetArgMetCysTrpGlnPhe  
 12511 GGGAGGATGCGTGGCAGGGCCCCAGACTCACCCAGGACGTCTCTTCTGCCCGCAG CACTGACCTCATGGCATGTGCTGGCAATTC  
 snProLysMetArgProThrPheLeuGluIleValAsnLeuLeuLysAspAspLeuHisProSerPheProGluValSerPhePheHisS  
 12601 ACCCAAGATGAGGCCAACCTTCTCGAGATTGTCAACCTGCTCAAGGACGACCTGCACCCAGCTTCCAGAGGTGCTGTTCTTCCACA  
 erGluGluAsnLysAlaProGluSerGluGluLeuGluMetGluPheGluAspMetGluAsnValProLeuAspArgSerSerHisCysC  
 12691 CGGAGGAGAACAAGGCTCCCGAGAGTGGAGGCTGGAGATGGAGTTTGGAGACATGGAGAATGTGCCCTGCACCGTCTCTGCCACTGTC  
 lnArgGluGluAlaGlyGlyArgAspGlyGlySerSerLeuGlyPheLysArgSerTyrGluGluHisIleProTyrThrHisMetAsnG  
 12781 AGAGCGAGGAGGGCGGGGGCGGATGGAGGTCCTCGCTGGGTTTCAAGCGGAGCTACGAGGAACACATCCCTTACACACACATGAACC  
 1355  
 lyGlyLysLysAsnGlyArgIleLeuThrLeuProArgSerAsnProSerOC  
 12871 GAGGCAAGAAAACGGCGGATTCTGACCTTGCTCGGTCCAACTCTTCTAACAGTGCCTACCTGGCGGGGGCGGGCAGGGTTCCCA  
 12961 TTTTCGCTTCTCTGTTTGAAGCCCTCGGAAAACAGGATTCACGACTCTACCATGTCCAGTGGAGTTCAGAGATCGTTCCTAT  
 13051 ACATTTCTGTTCATCTTAAGGTGGACTCGTTTGGTTACCAATTTAACTAGTCTGCAGAGGATTTAACTGTGAACCTGGAGGGCAAGGGG  
 13141 TTTCCACAGTTGCTGCTCTTTGGGCAACGACGGTTTCAAACAGGATTTTGTGTTTTTTCGTTCCCCCCACCCGCCCCAGCAGATGG  
 13231 AAAGAAAGCACCTGTTTTTCAAAATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTTGTCTGAGCTTCAATATAAAGACAAAAC  
 13321 TCTGTTTGTGGAACAAAATTTCAAGAAAACAAA

## 5.7.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA

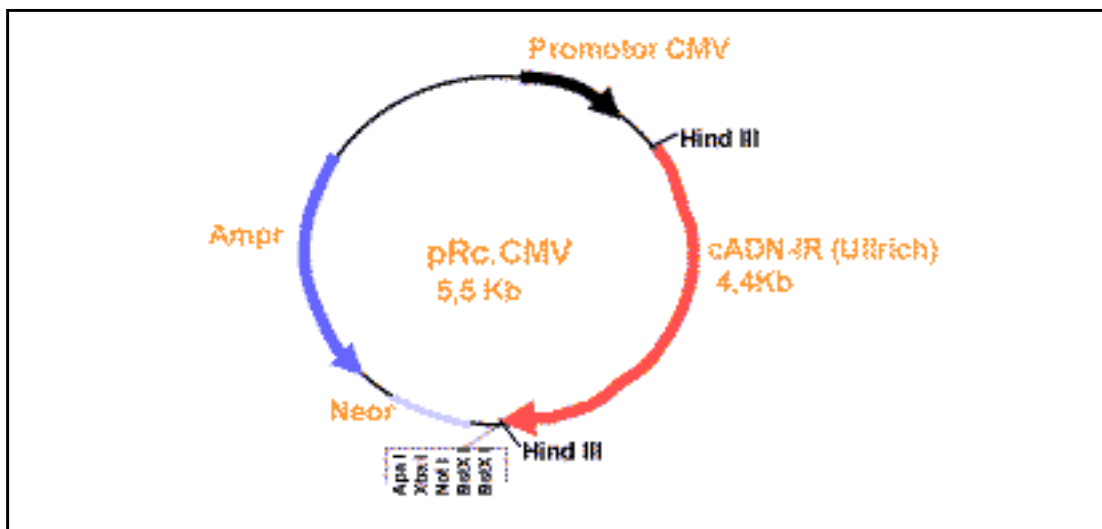
Per la tècnica de mutagènesi es va emprar el següent material.

### 5.7.1.- ADNc DEL RECEPTOR D'INSULINA

Es va utilitzar l'ADNc del receptor d'insulina estàndard segons Ullrich i cols. (10).

#### 5.7.1.1.- PRC.CMV.RI

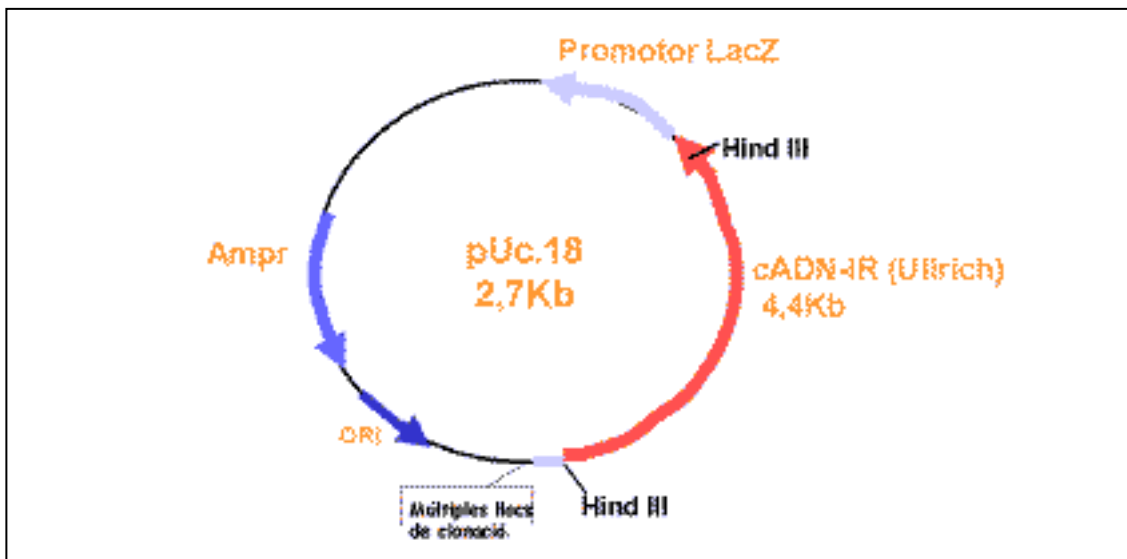
L'ADNc del receptor d'insulina estàndard segons Ullrich i cols. (10) es va subclonar en el vector d'expressió pRc.CMV (Invitrogen, Leek, Netherlands), que té 5,5Kb de longitud, mitjançant els llocs de restricció HindIII. Aquest vector va ser cedit desinteressadament per Jonathan Whitehead (Addenbrooke's Hospital, Cambridge University, UK). Com a característiques generals importants aquest vector conté el promotor CMV (CitoMegalovirus humà), que permet un alt nivell de transcripció en cèl·lules de mamífer, un gen de resistència a l'Ampicilina (Ampr), un gen de resistència a la Neomicina (Neor), que permet seleccionar les cèl·lules transfectades amb aquest vector de manera estable mitjançant l'antibiòtic G418S, i múltiples punts de restricció per permetre la clonació (**figura 10**).



**Figura 10.-** Esquema del vector pRc.CMV amb l'insert Receptor d'Insulina humà (segons Ullrich). Promotor CMV; promotor citomegalovirus. Ampr; gen de resistència a l'Ampicilina. Neor; gen de resistència a la Neomicina

### 5.7.1.2.- pUC18.RI

L'ADNc del receptor d'insulina humana (segons Ullrich) subclonat en el vector fagèmid pUC18, mitjançant els llocs de restricció Hind III, també va ser cedit desinteressadament per Jonathan Whitehead (Addenbrooke's Hospital, Cambridge University, UK). Aquest vector és un vector petit de 2,7 Kb aproximadament. Aquest vector està dissenyat per expressar gens exògens en cèl·lules procariotes en un elevat nombre de còpies. Presenta un gen de resistència a l'Ampicilina (Ampr) i el gen LacZ com a marcador per detectar l'insert (**figura 11**).



**Figura 11.-** Esquema del vector pUC18 amb l'insert Receptor d'Insulina humana (segons Ullrich). Ampr; gen de resistència a l'Ampicilina. ORI; origen de replicació.

### 5.7.2.- ENCEBADORS MUTAGÈNICS

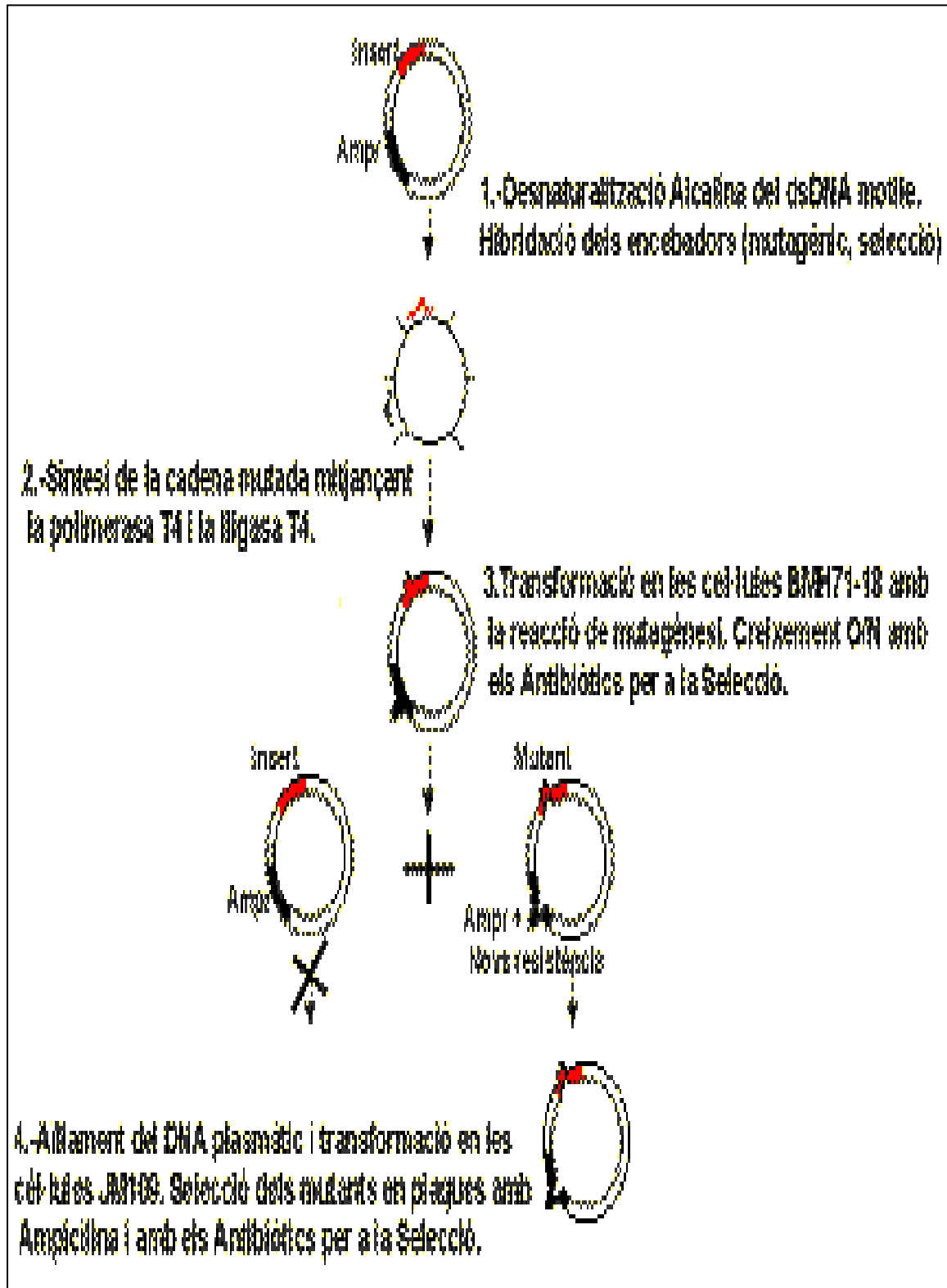
Els encebadors portadors de les mutacions van ser sintetitzats per GIBCO. La **Taula 7** en resumeix les característiques:

ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA	%GC	PB
LEU140 SENSE	5'-C CTG GAT TCC <b>TTG</b> GAG GAT AAT TAC ATC G-3'	44	29
LEU140 ANTI-SENSE	5'- C GAT GTA ATT ATC CTC CA <b>A</b> GGA ATC CAG G-3'	44	29
VAL1028 SENSE	5'- GAG ACC CGC GTG <b>G<b>T</b>G</b> GTG AAG ACG GTC-3'	66	27
VAL1028 ANTI-SENSE	5'- GAC CGT CTT CAC C <b>A</b> C CAC GCG GGT CTC-3'	66	27
1028 ANTI-LONG*	5'- GTT GAC CGT CTT CAC C <b>A</b> C CAC GCG GGT CTC TG-3'	67	32
1028 ANTI-SHORT*	5'- GT CTT CAC C <b>A</b> C CAC GCG -3'	65	17
Stop 1239 sense *	5'- CCT GTC CAG AGA GAG <b>TCT</b> GAG ACC TCA TGC GCA TGT GC -3'	59,9	38
Stop 1239 -sense *	5'- GCA CAT GCG CAT GAG GTC <b>TCA</b> GAC TCT CTC TGG ACA GG -3'	57,9	38

**Taula 7.-** Característiques dels encebadors mutagènics. (\*) indica que els encebadors estan purificats. Els nucleòtids subratllats i en negreta corresponen a la mutació que es vol introduir. La mutació en els encebadors LEU140 SENSE/ANTI-SENSE introdueix una Leu (TTG) en el lloc d'una Val (GTG). En els encebadors VAL1028 SENSE/ANTI-SENSE i 1028 ANTI-LONG/ANTI-SHORT la mutació canvia una Ala (GCG) per una Val (GTG). Els encebadors Stop 1239 sense i antisense introdueixen una Aturada (TGA) en el codó 1239 en comptes de la Thr (ACT).

### 5.7.3.- GENE EDITOR™ *IN VITRO* SITE-DIRECTED MUTAGENESIS SYSTEM

Es va utilitzar el sistema GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (PROMEGA, Southampton, UK). La reacció de mutagènesi inclou la hibridació de l'encebador de Selecció i de l'encebador Mutagènic a l'ADN motlle, seguit de la síntesi de la cadena mutada mitjançant l'ADN polimerasa T4 i l'ADN lligasa T4. L'ADN heterodúplex és transformat en la soca reparació *minus d'E. Coli* BMH-71-18 *mutS*. Les cèl·lules es van fer créixer en un medi selectiu per seleccionar els clons que contenen el plàsmid mutant. Els plàsmids resistents a la barreja d'Antibiòtics de Selecció GeneEditor, són aïllats i transformats en la soca JM109, utilitzant les mateixes condicions de selecció (**figura12**).



**Figura 12.-** Esquema del procediment de mutagènesi amb el sistema GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System.

### 5.7.3.1.- DESNATURALITZACIÓ ALCALINA DE LA DOBLE CADENA D'ADN

Es van desnaturalitzar 0,5pmol (2µg aprox.) de l'ADN de doble cadena (ADNdc) motlle afegint 2µL de NaOH 2M/EDTA 2mM en un volum final de 20µL, durant 5min. Seguidament es van afegir 2µL d'acetat amònic 2M (pH4,6) i 75µL d'Etanol 100%, i es va mantenir a -70°C durant 30min. per precipitar l'ADNdc. Es va obtenir el pellet mitjançant centrifugació durant 15 min. a 4°C a màxima velocitat en una microcentrífuga. Es va rentar el pellet amb Etanol al 70% i es va repetir el pas de centrífuga. Un cop obtingut el pellet es va assecar al buit. El pellet va ser resuspès en 100µL de tampó TE (pH 8,0). Per comprovar la desnaturalització es va fer córrer una alíquota de 10µL de la mostra en un gel d'Agarosa al 0,8%. El marcador de Pes Molecular va ser el 1KB Ladder (GIBCO) que té un rang de bandes que van des de 100pb fins a 12.000pb (amb increments de 100pb).

### 5.7.3.2.- HIBRIDACIÓ DELS ENCEBADORS AL MOTLLE

S'obté un increment significatiu en el nombre de mutants quan els encebadors estan 5' fosforilats. Així doncs es van fosforilar els encebadors abans de començar amb la reacció d'hibridació. Es van preparar dos tipus de reacció d'hibridació: la control i la de mutagènesi.

#### 5.7.3.2.1.- FOSFORILACIÓ DELS ENCEBADORS

Els encebadors Control i de Selecció estaven prèviament 5'-fosforilats. Els encebadors mutagènics van ser sotmesos a la següent reacció de fosforilació:

Encebador	100 pmol
Tampó Quinasa 10X	2,5µL
T4 Polinucleòtid Quinasa	5U
ATP, 10mM	2,5µL
H <sub>2</sub> O desionitzada estèril	fins a volum final 20µL

Aquesta barreja es va incubar a 37°C durant 30min., i seguidament 10min. a 70°C per tal d'inactivar l'enzim T4 Polinucleòtid Quinasa. Un cop finalitzada la reacció es va guardar a -20°C o es va afegir directament a la reacció d'hibridació.

**5.7.3.2.2.- REACCIÓ CONTROL**

En la reacció Control es va utilitzar:

---

Vector pGEM -Zf(+) alcalino-desnaturalitzat	10µL (0,05pmol)
Encebador de Selecció (cadena sentit)(2,9ng/µL)	1µL (0,25 pmol)
Encebador Control Knockout LacZ (cadena sentit) (13,2ng/µL)	1µL (1,25 pmol)
Tampó d'Hibridació 10X	2µL
H <sub>2</sub> O desionitzada estèril	fins a volum final
	20µL

---

**5.7.3.2.3.- REACCIÓ DE MUTAGÈNESIS**

En la reacció de mutagènesi es va utilitzar:

---

ADNdc motlle	10µL (0,05pmol)
Encebador de Selecció (2,9ng/µL) fosforilat	1µL (0,25 pmol)
Encebador Mutagènic fosforilat	1,25 pmol
Tampó d'hibridació 10X	2µL
H <sub>2</sub> O desionitzada estèril	fins a volum final
	20µL

---

Es van incubar, tant la reacció Control com la de Mutagènesis, durant 5min. a 75°C i seguidament es van refredar lentament (1,5°C / min.) fins a 37°C per tal de minimitzar la hibridació inespecífica dels encebadors.

**5.7.3.3.- SÍNTESI DE LA CADENA MUTADA**

Un cop les reaccions d'hibridació van estar a 37°C, es va fer un pic de centrifuga per tal de recollir tota la reacció al fons del tub. Es van afegir els següents reactius segons l'ordre indicat:

---

Reacció d'hibridació	20µL
H <sub>2</sub> O desionitzada estèril	5µL
Tampó de Síntesi 10X	3µL
T4 ADN Polimerasa	1µL (5-10u)
T4 ADN Lligasa	1µL (1-3u)
Volum final	30µL

---

Aquesta reacció es va incubar a 37°C durant 90min per sintetitzar la cadena mutada i perquè es dugués a terme el procés de lligació.

#### **5.7.3.4.- TRANSFORMACIÓ EN LES CÈL·LULES COMPETENTS BMH71-18 MUTS**

Es va refredar, en gel, un tub de polipropilè (17 x 100mm) per a cada reacció d'hibridació. Un cop les cèl·lules BMH71-18 van estar descongelades, se'n va al·licotar 40µL a cada tub pre-refredat. A les cèl·lules s'hi va afegir 2µL de cada reacció de mutagènesi o de control i es va remenar suaument picant amb els dits als tubs. Es van mantenir els tubs en gel durant 10min., passat aquest temps, les cèl·lules van ser sotmeses a un xoc tèrmic de 47seg. a 42°C i posades en gel durant 2min. Es va afegir a cada tub 900µL de medi de cultiu LB sense antibiòtics, i es va incubar a 37°C durant 60min. en agitació (225rpm). Passat aquest temps es van afegir 4mL de medi LB amb la barreja d'Antibiòtics de Selecció i es van mantenir en cultiu O/N (16-18 hores) a 37°C en agitació.

#### **5.7.3.5.- PURIFICACIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC**

Per la purificació de l'ADN plasmídic es va utilitzar el kit Wizard *Plus SV* Minipreps ADN Purification System (PROMEGA, Madison, USA) seguint les instruccions del fabricant.

Es va centrifugar 1,4mL del cultiu O/N durant 2min. a 10.000xg i es va descartar el sobrenedant. Es van afegir 250µL de solució de resuspensió, i es va resuspendre el pellet totalment mitjançant vortex. Es van afegir 250µL de solució de lisis, es va barrejar per inversió i es va incubar de 1-5min. Un cop el llista es va aclarir es van afegir 10µL de solució de proteasa alcalina, es va barrejar per inversió i es va incubar durant 5min.

Ràpidament es van afegir 350µL de solució neutralitzant, es va barrejar per inversió i es va centrifugar durant 10min. a 14.000xg. Es va recuperar el sobrenedant, tenint molta cura de no tocar el pellet, i es va passar a una columna de centrifugat. Es va centrifugar durant 1min. a 14.000xg i es va descartar el fluid obtingut en el tub col·lector. Després d'afegir 700µL de solució de rentat es va repetir una centrifugació d'1min. a 14.000xg i es va tornar a descartar el fluid recollit. Es va fer un altre rentat amb 250µL de solució de rentat seguit d'una altra centrifugació de 2min.

Per últim es va eluir l'ADN en 60µL d'H<sub>2</sub>O sense nucleases centrifugant les columnes durant 1min. a 14.000xg. L'ADN obtingut va ser sotmès a una electroforesi en gel d'agarosa al 0.8%, per tal de comprovar-ne la recuperació i la qualitat.



El marcador de Pes Molecular va ser el 1KB Ladder. La concentració i la puresa d'aquest ADN van ser mesurades en un espectrofotòmetre GeneQuant (Pharmacia Biotech).

#### **5.7.3.6.- TRANSFORMACIÓ EN LES CÈL·LULES JM109**

Es van refredar, en gel, dos tubs de polipropilè (17 x 100mm) per cada reacció i s'hi van aliquotar 100µL de cèl·lules Competents JM109. Després d'afegir de 5-10ng d'ADN plasmídic i de barrejar-ho suaument, es va incubar a 4°C durant 30min. Passat aquest temps, les cèl·lules es van sotmetre a un xoc tèrmic de 47seg. a 42°C i 2min en gel. Es va afegir 900µL de medi SOC a cada reacció de transformació i es va incubar durant 60min. a 37°C en agitació (225rpm aprox.).

Per cada reacció es van preparar dues plaques de cultiu que contenien 100µL de la barreja d'Antibiòtics de Selecció i 125µg/mL d'Ampicilina. Per les mostres Control es va afegir a les plaques, a més dels antibiòtics, 100µL d'IPTG a 85mM i 40µL de X-Gal a 20mg/mL (per detectar la inactivació del gen LacZ, les colònies mutades són blanques, mentre que les normals són blaves).

De cada reacció es va sembrar una placa amb 100µL del cultiu directament (placa diluïda), i una altra placa amb 150µL, aproximadament, del cultiu un cop centrifugat, descartat el sobrenedant i resuspès el pellet amb la resta de medi que queda en el tub (placa concentrada). Les plaques van ser incubades O/N a 37°C.

#### **5.7.3.7.- ANÀLISI DELS TRANSFORMANTS**

Les colònies control es van analitzar directament de *visu*. Les colònies blanques eren mutades i les colònies blaves eren normals. Les colònies de les reaccions de mutagènesi es van analitzar mitjançant seqüenciació directa. La mateixa colònia es va utilitzar per fer un cultiu en placa i per inocular la barreja de la reacció de seqüenciació. De cada reacció de mutagènesi es van analitzar 10-15 colònies.

Els encebadors utilitzats per amplificar la regió on es va introduir la mutació s'esquematitzen en la **Taula 8**.

ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA	%GC	PB
#5	5'- TTCGAGATGGTTCACCTCAAG-3'	47,6	21
#6	5'- CTCAGGGATGCACTTGTT -3'	50	18
#7	5'- TGTCTCGAGAGAAGATCACC -3'	50	20
#8	5'- TGCCATCCACCGTACAGGGAGCAG -3'	62,5	24

**Taula 8.-** Encebadors emprats per amplificar la regió que comprèn les mutacions inserides Leu140, Val1028.

#### 5.7.3.7.1.- SEQÜENCIACIÓ DIRECTA (BIG DYE)

Es va utilitzar el Kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). Les reaccions es van fer de la manera següent:

BigDye Dilution	2µl
BigDye	2µl
Encebador #5	3,2 pmol
ADN motlle	30-90 ng
Volum final	10µl

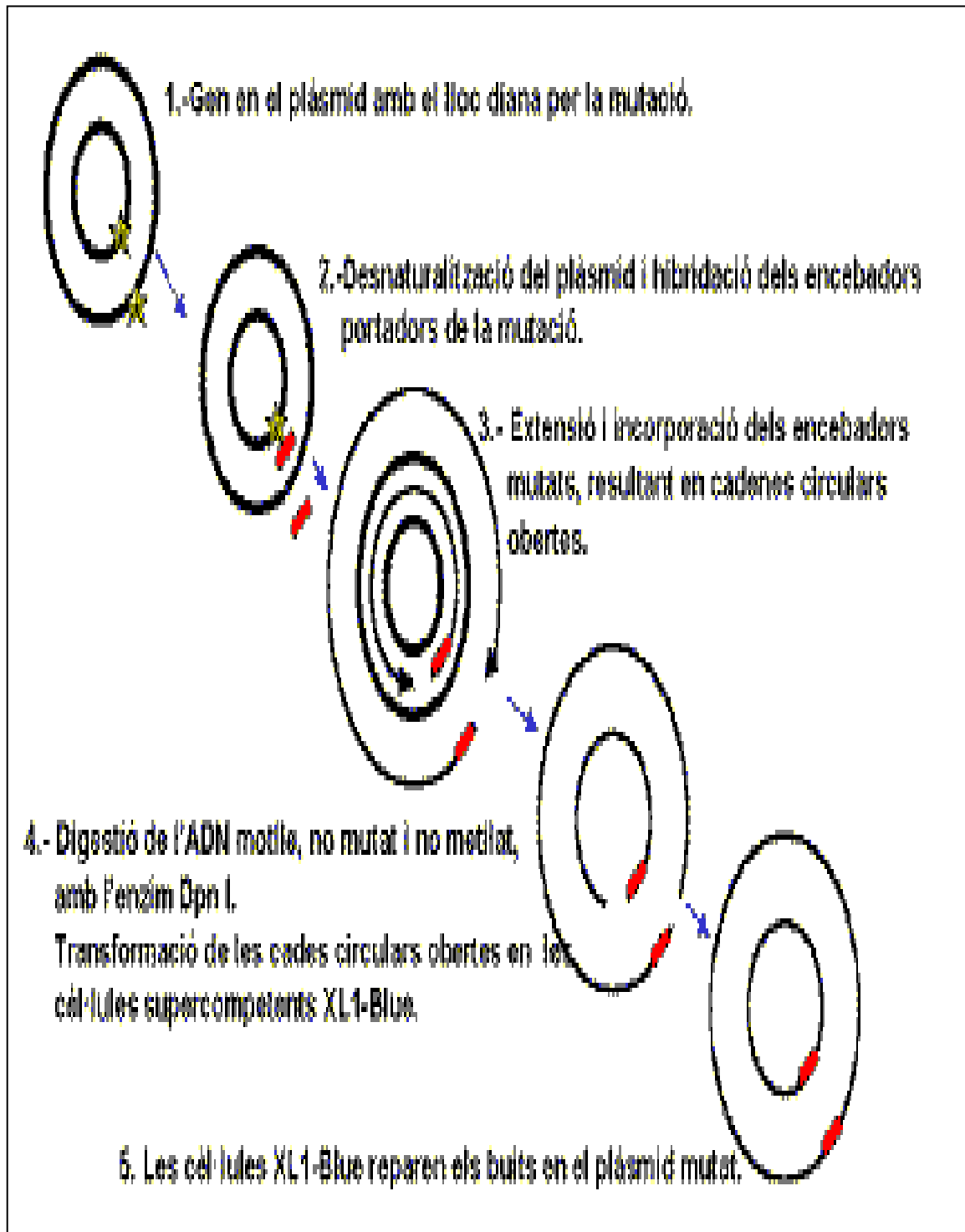
El protocol d'amplificació va ser:

Desnaturalització	96°C	10 segons
Hibridació	50°C	5 segons
Extensió	60°C	4min.
25 cicles d'amplificació a 4°C fins purificar-los		

Es va fer una purificació dels productes mitjançant una precipitació en Etanol/Acetatsòdic i es van carregar en el gel de seqüenciació.

#### 5.7.4.- QUIKCHANGE™ SITE-DIRECTED MUTAGENESIS KIT

Es van fer dos tipus de reacció, la Control i la de Mutagènesi. El procediment s'esquematitza en la **Figura 13**.



**Figura 13.-** Esquema del procediment de mutagènesi emprant el sistema QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit.

**5.7.4.1.- REACCIÓ CONTROL**

Per la mostra Control es va fer la següent reacció:

---

Tampó de Reacció 10X		5µL
Plàsmid Control pWhitescrip (5ng/µL)		2µL
Encebador Control 1 (34-mer (100ng/µL))		1,25µL
Encebador control 2 (34-mer (100ng/µL))		1,25µL
Barreja de dNTPs		1µL
H <sub>2</sub> O bidestilada	fins a volum final	50µL

---

Un cop feta aquesta barreja es va afegir 1µL de *PfuTurbo*<sup>TM</sup> ADN polymerase (2,5U/µL).

**5.7.4.2.- REACCIÓ DE MUTAGÈNESI**

Es va fer la següent reacció de mutagènesi:

---

Tampó de Reacció 10X		5µL
ADNdc motlle		5-50ng
Encebador Mutagènic up		125ng
Encebador Mutagènic down		125ng
Barreja de dNTPs		1µL
H <sub>2</sub> O bidestilada	fins a volum final	50µL

---

Un cop feta aquesta barreja es va afegir 1µL de *PfuTurbo* ADN polimerasa (2,5U/µL).

**5.7.4.3.- PROTOCOL D'AMPLIFICACIÓ**

Les mostres va ser sotmeses al següent protocol d'amplificació:

---

1 cicle de	30seg. a 95°C
12 cicles	{ 30seg. a 95°C 1min. a 55°C

2 min./Kb de plàsmid a 68°C.

---

Després d'aquesta termociclació es van refredar les mostres fins a 37°C.

Per comprovar l'eficiència d'amplificació es va fer córrer una alíquota de cada mostra en un gel d'agarosa al 0,8%. El marcador de Pes Molecular va ser el 1KB Ladder.

#### 5.7.4.4.- DIGESTIÓ DELS PRODUCTES

Per digerir les cadenes parentals no mutades d'ADN es va afegir 1µL de l'enzim de restricció *Dpn I* (10U/ µL) al fons del tub de reacció. Es va barrejar bé i es va incubar durant 60min. a 37°C

#### 5.7.4.5.- TRANSFORMACIÓ EN LES CÈL·LULES SUPERCOMPETENTS E. COLI XL1

##### BLUE

Es va prerafredar un tub de polipropilè (17x100mm) per a cada reacció, i s'hi va aliquotar 50µL de cèl·lules Supercompetents XL1-Blue, i s'hi va transferir 1µL de l'ADN tractat amb l'enzim *Dpn I*. Aquesta barreja es va incubar en gel durant 30min. Després va ser sotmès a un xoc tèrmic de 42seg a 42°C i 2min. en gel. Es va afegir a cada tub de reacció 0,5mL de medi SOC a 42°C i es va incubar durant 60min. a 37°C en agitació (225-250rpm). Passat aquest període d'incubació, es va sembrar cada mostra en dues plaques d'agar amb ampicilina (placa diluïda i placa concentrada, tal i com s'ha explicat en l'apartat 5.7.2.6). Per les mostres control es van preparar plaques amb ampicilina, 100µL IPTG (85mM) i 40µL X-Gal (20mg/ml). Les plaques es van incubar a 37°C O/N.

#### 5.7.4.6.- ANÀLISI DELS TRANSFORMANTS

Les plaques control es van analitzar de *visu*. Les colònies mutades eren de color blau, mentre que les normals eren blanques. Per la mutació Val1028 les plaques amb les mostres problema es van analitzar seqüenciant les colònies directament amb l'encebador #8 tal com s'explica en l'apartat 5.7.3.7. Per la mutació d'splicing es va amplificar el fragment delimitat pels encebadors #9 i 22 antisentit i es va seqüenciar el producte d'amplificació amb l'encebador #9 (**taula 9**).

ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA	%GC	PB
#8	5'- TGCCATCCACCGTACAGGGAGCAG -3'	62,5	24
#9	5'- TCACCAGCTTGGCAGAACAG -3'	55	20
22 antisentit	5'- GAACGATCTCTG AACTCCACT -3'	47,6	21

**Taula 9.-** Encebadors emprats detectar les mutacions Val1028 i la mutació d'splicing.

## 5.8.- CLONACIÓ DEL RI.VAL1028 EN EL VECTOR pRc.CMV

Un cop es va obtenir el RI amb la mutació Val1028 (RI.Val1028) en el vector pUC18, va ser necessari clonar aquest RI.Val1028 en el vector pRc.CMV per poder-lo expressar en cèl·lules de mamífer.

### 5.8.1.- DIGESTIÓ DEL pUC18.RI1028 I DEL pRc.CMV AMB HindIII

Es va digerir amb l'enzim Hind III, tant el pUC18.RI.Val1028 (per tal de treure l'insert del vector), com el pRc.CMV (per tal d'obrir el vector i poder inserir el RI.Val1028), creant així extrems Hind III tant en el vector receptor com en l'insert. Es va digerir 1µg tant de pRc.CMV com de pUC18.RI.Val1028 mitjançant la següent reacció:

---

ADN (pRc.CMV/ pUC18.RI1028)	10µL
Tampó 2 10X	2µL
Enzim Hind III (10U/µL)	1µL
H <sub>2</sub> O destil. Estèril	fins a volum 20µL

---

Aquestes reaccions es van incubar durant 90min. a 37°C.

### 5.8.2.- DEFOSFORILACIÓ DE pRc.CMV DIGERIT AMB Hind III

Per tal d'evitar la recircularització del vector pRc.CMV digerit amb HindIII i per permetre la unió del RI.Val1028 fosforilat, es va procedir a defosforilar el vector mitjançant una Fosfatasa Alcalina. La reacció es va incubar durant 30min. a 37°C.

### 5.8.3.- ELECTROFORÈSI DE COMPROVACIÓ EN GEL D'AGAROSA

Per tal de comprovar que la digestió amb Hind III havia funcionat, es va procedir a córrer els productes digerits en un gel d'agarosa al 0,8%. En el gel es van carregar:

- ▶ 20µL de pUC18.RI.Val1028 + 10µL d'H<sub>2</sub>O destil. + 10µL de tampó de càrrega 5X
- ▶ 3µL de pRc.CMV (defosforilat) + 2µL tampó de càrrega 2,5X
- ▶ 2µL de pRc.CMV no digerit ni defosforilat + 2µL tampó de càrrega 2,5X

El gel es va fer córrer a 75 volts durant 90min. i es va visualitzar en un transil·luminador de llum ultravioleta. El marcador de Pes Molecular va ser el 1KB Ladder.

#### 5.8.4.- PURIFICACIÓ DE EL RI.VAL1028 DEL GEL D'AGAROSA

Per recuperar i purificar la banda del RI1028 del gel d'agarosa es va utilitzar el kit GENE CLEAN (BIO 101, Vista, California, USA). Un cop visualitzada la banda RI.Val1028 en el gel d'agarosa, es va tallar del gel i es va pesar. Es van afegir 3 volums de solució Na I per cada volum d'agarosa (0,1g equival a 100µL aproximadament) i es va incubar a 55°C durant 2min. per tal de desfer l'agarosa. Per capturar l'ADN es van afegir 5µL de GLASSMILK (sílicagel) i es va incubar 5-10min. a temperatura ambient. Per últim es van fer tres rentats de 5seg de centrífuga a velocitat màxima, descartar sobrenedant, resuspendre i rentar amb 500µL de solució New wash. Es va resuspendre el pellet amb el mateix volum d'aigua destil·lada estèril, es va incubar durant 2min. a 55°C, es va fer un pic de centrífuga, es va transferir el sobrenedant a un tub de 0,5mL i s'hi van afegir 6µL d'H<sub>2</sub>O i després d'una incubació de 2min. a 55°C i un altre pic de centrífuga, es va transferir el sobrenedant a un nou tub i es va fer la comprovació de la recuperació i la quantificació en un gel d'agarosa al 0,8%. El marcador de Pes Molecular va ser el 1KB Ladder.

#### 5.8.5.- LLIGACIÓ DEL RI.VAL1028 EN EL pRc.CMV

Un cop comprovat que es tenia el RI.Val1028 purificat es va procedir a clonar-lo en el vector pRc.CMV mitjançant la T4 Lligasa. Es van fer quatre reaccions de lligació:

- ▶ pRc.CMV no defosforilat (c+)
- ▶ pRc.CMV defosforilat (c-)
- ▶ pRc.CMV + RI1028 (relació 1/3)
- ▶ pRc.CMV + RI1028 (relació 1/5)

Per calcular la quantitat d'insert necessari per a cada relació es va emprar la següent fórmula:

$$\frac{\text{Vector (ng)} \times \text{Insert (Kb)} \times \text{relació molar}}{\text{Vector (Kb)}} = \frac{\text{Insert (ng)}}{\text{Vector}}$$

En totes les relacions es va utilitzar 10ng de vector, 0,6µL d'enzim T4 Lligasa, 1µL de tampó de lligació i H<sub>2</sub>O destil. estèril fins un volum de 10µL per a cada reacció. Aquestes barreges de reacció es van incubar O/N a 14°C.

### 5.8.6.- TRANSFORMACIÓ EN LES CÈL·LULES COMPETENTS JM109

El producte obtingut de la lligació va ser transformat en les cèl·lules Competents JM109 tal i com s'ha explicat en l'apartat 5.7.3.6.

### 5.8.7.- ANÀLISI DE L'ORIENTACIÓ DE L'INSERT RI.VAL1028 EN EL pRc.CMV

El Control Positiu (c+) i el Control Negatiu (c-) es van analitzar de *visu* per la presència o absència de colònies respectivament. Les colònies de les plaques problema es va analitzar mitjançant una PCR utilitzant un encebador específic per l'insert (Fsp I Sense) i un altre encebador específic pel vector (pCMV 3') (**taula 10**).

ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA	%GC	pb
Fsp I	5'- CTCATGCGATGTGCTGGC -3'	61,1	18
pCMV 3'	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'	40	20

**Taula 10.-** Característiques dels encebadors emprats per analitzar l'orientació de l'insert Receptor d'Insulina humana en el vector pRc.CMV.

De manera que només s'obtenia amplificació quan l'insert tenia la mateixa orientació que el promotor CMV. D'aquesta manera l'insert pot ser expressat amb sentit.

El protocol d'amplificació va ser el següent:

1 cicle de desnaturalització inicial de	3min.	a 94°C	
35 cicles	desnaturalització durant	45seg.	a 95°C
		45seg.	a 56°C
	hibridació dels encebadors durant	45seg.	a 72°C.
	extensió durant	45seg.	a 72°C.

Es va afegir un últim cicle d'extensió final de 5min. a 72°C.

Els productes de PCR van ser analitzats en un gel d'agarosa al 1,6% i visualitzats mitjançant un transil·luminador de llum ultravioleta. El marcador de Pes Molecular va ser el 1KB Ladder.



### **5.8.8.- OBTENCIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC pRc.CMV.RI1028**

Les colònies que van donar positiu en l'anàlisi de l'orientació del RI.Val1028 en el vector pRc.CMV, en van posar en cultiu líquid (amb medi 2X Tyr amb ampicilina) O/N a 37°C. L'obtenció de l'ADN plasmídic es va fer tal com s'explica en l'apartat 5.7.3.5. La concentració i puresa d'aquest ADN van ser mesurats en un espectrofotòmetre GeneQuant (Pharmacia Biotech).

### **5.9.- CULTIUS CEL·LULARS**

Es va treballar amb dos tipus cel·lulars diferents, un per dur a terme la transfecció (cèl·lules d'ovari de hámster) i l'altre com a control positiu de l'eficiència de transfecció (cèl·lules CL6).

#### **5.9.1.- CÈL·LULES D'OVARI DE HÀMSTER XINÈS (CHO)**

Aquestes cèl·lules representen un bon sistema per l'estudi, mitjançant transfecció, del receptor d'insulina, ja que expressen uns nivells de receptor d'insulina endògens molt baixos.

Es van mantenir les cèl·lules en cultiu a 37°C amb un aport d'un 5% de CO<sub>2</sub>. L'aport nutricional va ser mitjançant el medi Nutrient Mixture HAM F-12 (SIGMA) (+ Sèrum + Penicil·lina + Streptavidina). Les cèl·lules van ser utilitzades per a la transfecció quan assolien una confluència del 40-70%.

#### **5.9.2.- CÈL·LULES CL6**

Aquestes són cèl·lules CHO que sobre-expressen el RI d'una manera estable (el vector porta un gen per a la resistència a la Neomicina com a marcador de selecció), pel que es van utilitzar com a control positiu per mesurar l'eficiència de transfecció del RI en les cèl·lules CHO.

Es van mantenir en cultiu a 37°C amb un aport del 5% de CO<sub>2</sub>. El medi nutricional emprat va ser el G418 (porta neomicina) (LIFE TECHNOLOGIES , GIBCO) per tal de seleccionar les cèl·lules que expressen el RI. Aquestes cèl·lules es van utilitzar quan assolien una confluència del 40-70% (paral·lelament a les cèl·lules CHO).

### 5.9.3.- CÈL·LULES MOCK

Les cèl·lules MOCK són cèl·lules CHO i pateixen el mateix procés de transfecció que les cèl·lules CHO, però en comptes de ser transfectades amb ADN, són “transfectades” amb H<sub>2</sub>O. Així doncs el nivell de RI que expressen és endogen.

### 5.10.- TRANSFECCIÓ EN CÈL·LULES D'OVARI DE HÀMSTER XINÈS CHO

Es va fer la transfecció mitjançant la formació de liposomes portadors de l'ADN gràcies al reactiu LIPOFECTAMINE Reagent (LIFE TECHNOLOGIES , GIBCO) que permet la transfecció d'ADN en cèl·lules eucariotes en cultiu. Aquest reactiu està compost pel lípid policatiònic 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) i pel lípid neutre dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) amb una relació 3:1 (w/w).

Per cada reacció de transfecció es va fer la següent barreja (totes les mesures estan fetes per cada 10cm<sup>2</sup> de cèl·lules a ser transfectades, els volums es van ajustar a la superfície cel·lular a ser transfectada):

OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO BRL )	200µL
ADN (pRc.CMV.RI.Mut, pRc.CMV.RI.WT, volum d'H <sub>2</sub> O equivalent en les cèl·lules MOCK)	0,5µg
LIPOFECTAMINE	8µL

Es va incubar a temperatura ambient 30min. per deixar que es formessin els complexos ADN-Liposomes. Un cop la barreja de transfecció va estar a punt, es va fer un rentat de les cèl·lules amb 1mL de medi OPTI-MEM i se n'hi van afegir 800µL.

La transfecció es va fer per duplicat per cada mostra. Es van afegir 190µl de la barreja de transfecció gota a gota i remenant suaument. Es va incubar a 37°C durant 60min. Passat aquest temps es van agitar suaument les plaques i es van incubar a 37°C durant 2 hores més. Es va aspirar el medi OPTI-MEM (la LIPOFECTAMINE es tòxica per les cèl·lules) i es va rentar amb medi HAM F-12 complet, es va afegir 1mL d'aquest medi i es va incubar mínim 1hora a 37°C. Les cèl·lules CL6 van ser tractades d'igual manera a partir d'aquest pas. El següent pas va ser el rentat de les cèl·lules amb medi HAM F-12 sense sèrum i la incubació O/N amb 1mL d'aquest medi (pas de deprivació).

### **5.11.- ESTIMULACIÓ I LISIS DE CÈL·LULES**

Després del pas de deprivació (cèl·lules en cultiu O/N amb medi sense sèrum), es van estimular les cèl·lules amb insulina freda (5µM). Es van afegir 40µl d'insulina als pous i es van incubar a 37°C durant 2min. Passat aquest temps es van treure les plaques de l'estufa i es van posar immediatament en gel. Es van rentar amb 1 mL de PBS fred i s'hi va afegir 100/200 µl de Tampó de Lisis. Les cèl·lules es van recuperar dels pous mitjançant escombrat de les plaques. Es van centrifugar 10min. a 12.000rpm a 4°C. Es van fer dues alíqüotes; pels assajos d'autofosforilació i expressió es va afegir Tampó de Carrega 5X i es va guardar a -80°C fins la seva utilització. Pels assajos del binding "*in vitro*", l'activitat Tirosina quinasa i la Biotinització es va congelar directament a -80°C fins la seva utilització.

### **5.12. TRACTAMENT AMB METFORMINA DE LES CÈL·LULES TRANSFECTADES CHO-RI.VAL1028, CHO-RI.WT/VAL1028 I CHO-RI.WT.**

Per tal d'estudiar l'efecte que exerceix la Metformina (Roche) en el receptor d'insulina es van incubar les cèl·lules transfectades CHO-RI.Val1028 (mutació en el domini tirosina quinasa), les cèl·lules CHO-RI.WT i les cèl·lules CHO-RI.WT/Val1028 amb Metformina (5µg/mL) (82) o sense, durant 30min. a 37°C, amb la posterior estimulació o no amb insulina (5µM). Es va procedir a fer els estudis funcionals tal i com s'explica en els següents apartats.

### 5.13.- ANÀLISI D'UNIÓ DE LA INSULINA AL RECEPTOR; BINDING

Es va estudiar la capacitat d'unió de la insulina als seus receptors tant *in situ* com *in vitro*.

#### 5.13.1.- LISAT DE CÈL·LULES. 'IN VITRO'

Es van cobrir els pous d'una placa de 96 pous amb l'anticòs 83-7 anti-receptor d'insulina (83-7 RI) diluït amb NaHCO<sub>3</sub> i es van incubar en agitació O/N a 4°C.

Es van afegir 50µl de la mostra (llisat de cèl·lules) i es va incubar a 4°C O/N en agitació. Un cop incubat, es va rentar dues vegades amb tampó de Roth i s'hi va afegir la insulina marcada (<sup>125</sup>I-Insulin). Després d'incubar-ho de 4-6 hores a 4°C en agitació es van rentar tres vegades amb PBS, s'hi va afegir SDS 0,03% durant 10min. i es va transferir la mostra als tubs pel comptador .

#### 5.13.2.- CÈL·LULES SENCERES. 'IN SITU'

Es van recuperar les cèl·lules de les plaques de Petri amb el Tampó PBS/Glucosa/EDTA, es van rentar dues vegades amb PBS i es van resuspendre els pellets amb Tampó de Roth. En els tubs de comptador es va posar 100µl de la insulina freda, 50µl de la <sup>125</sup>I-insulin (10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> i 10<sup>-10</sup> M) i 100µL de la mostra. Es va incubar en agitació a 15°C durant 2 hores i 30min. Després de tres rentats amb PBS + BSA 0,1% i la posterior centrifugació es va aspirar el sobrenedant i es va comptar durant 1min. en un comptador .

### 5.14.- WESTERN BLOT

Es van utilitzar minigels SDS-PAGE (37,5:1 30%). La part de càrrega (Stacking) va ser al 4% mentre que la part resolutive (Resolving) va ser al 8%. Es van carregar 15 µl de cada mostra prèviament escalfada a 100°C durant 3min. El marcador de pes molecular va ser el Prestained Protein Marker Broad Range (New England BioLabs). Es va fer córrer a 130 volts durant 1 hora.

Es va fer una transferència semi-seca a la membrana fent córrer durant 1 hora a 180mA de corrent constant. Un cop els gels es van transferir es va aturar la reacció amb tampó d'aturada i es va procedir al marcatge amb els anticossos.

#### 5.14.1.- AUTOFOSFORILACIÓ

Per detectar l'autofosforilació es va emprar com a primer anticòs antireceptor el Carl 10 (anticòs monoclonal de conill). Com a segon anticòs es va utilitzar el HRP Goat

-Rabbit (anticòs de cabra contra conill marcat amb peroxidasa). La detecció es va fer mitjançant l'addició d'un potenciador de la quimioluminiscència (ECL, Amersham Life Sciences, England). Es va fer un revelat automàtic del film.

#### **5.14.2.- EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR**

Per detectar l'expressió del receptor es va emprar com a primer anticòs el Mouse Phosphotyrosine (4G10, Upstate Biotechnology, New York, USA) (anticòs de ratolí). Com a segon anticòs es va emprar el HRP Goat Mouse (anticòs de cabra contra ratolí marcat amb peroxidasa). La detecció es va fer mitjançant l'addició d'un potenciador de la quimioluminiscència (ECL, Amersham Life Sciences, England). Es va fer un revelat automàtic del film.

#### **5.15.- EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR EN MEMBRANA; BIOTINITZACIÓ**

Es va utilitzar el Kit ECL Protein Biotinylation Module (Amersham Life Science, England) i es van seguir les instruccions del manual. La immunoprecipitació dels receptors es va fer utilitzant la ProteinA-agarosa (SIGMA, USA) i l'anticòs -IR rabbit Carl 10. Les mostres es van sotmetre a western blot, el marcatge va ser amb l'anticòs HRP Goat -rabbit i la detecció amb el potenciador de quimioluminiscència ECL (Amersham Life Sciences). El revelat del film va ser automàtic.

#### **5.16.- ANÀLISI DE L'ACTIVITAT TIROSINA QUINASA**

Es van capturar els receptors d'insulina en plaques de 96 pous recoberts de l'anticòs -RI 83-7, després d'una incubació O/N a 4°C en agitació. Es van rentar els pous amb el tampó WGBT, es va afegir el tampó d'assaig, on hi ha el  $^{32}\text{P}$ -ATP, i es va incubar 15min. La reacció es va aturar amb HCl i es va transferir a les columnes Pierce Phosphocellulose Units (Pierce, USA). Aquestes es van rentar tres vegades amb àcid fosfòric 75mM i es van transferir les membranes de les columnes als tubs de comptador amb líquid de centelleig. Es van comptar en un comptador .

### 5.17.- EXTRACCIÓ D'ARN A PARTIR DE FIBROBLASTS EN CULTIU

Es van llisar els fibroblasts amb TRIS (TRIS Reagent, SIGMA, USA), es va afegir cloroform i es va agitar bé. Després de 5min. d'incubació en gel, es van centrifugar 15min. a 4°C i es va traspasar la fase aquosa. Es va afegir un volum igual d'Isopropanol i es va incubar 30min. en gel. Es va centrifugar en iguals condicions i es va aspirar el sobrenedant. Es va rentar el pellet amb Etanol al 75% i es va deixar assecar. L'ARN es va resuspendre en aigua DEPC, ADNasa i Inhibidor d'ARNasa i es va incubar a 37°C durant 30min. Després de fer un gel d'agarosa de comprovació, es va guardar a -80°C.

### 5.18.- AMPLIFICACIÓ DE L'ARN MITJANÇANT LA RETRO-TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)

Es va incubar l'ARN total (0,6 µg) a 70°C durant 5min. per tal d'inactivar les ADNases de la mostra. Es van afegir els següents reactius per a la reacció:

M-MLV RT 5X buffer	4µl
Primer 22 antisentit	1µl
DNTPs (10mM)	2µl
RNase Inhibitor	0,75µl
M-MLV RT	1,5µl
H <sub>2</sub> O fins a	20µl

Es va incubar la reacció 1 hora a 42°C i 5min. a 95°C. Per fer la reacció de PCR es van emprar les Ready to Go PCR beads (Pharmacia/Biotech- Amersham Life Sciences, England). Es va fer amb 2µl de ADNc i els encebadors es van emprar els encebadors de la **Taula 11**.

---

5'- GAA CGA TCT CTG AAC TCC ACT -3' Encebador que s'uneix a la regió 3'-UTR del gen del receptor d'insulina humana.

ENCEBADADOR	SEQÜÈNCIA	%GC	PB
22 antisentit	5'- GAACGATCTCTG AACTCCACT -3'	47,6	21
1174 sense	5'- CTGCTCCCTGTACGGTGGATGGCACCG -3'	64,2	28

**Taula 11.-** Encebadors emprats per amplificar el producte obtingut de la reacció RT.

El protocol d'amplificació va ser el següent:

Pas	Temps	Temperatura (°C)
"Hot start"	3min. / 2min.	95
Desnaturalització	45 segons	95
Hibridació	45 segons	56 / 58 / 60 / 62
Extensió	45 segons / 1,5min.	72
Extensió final	5min.	72
Final	indefinit	4

Es van fer 35 cicles d'amplificació.

Els productes es van visualitzar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa.

### 5.19.- CLONACIÓ DELS PRODUCTES DE LA RT-PCR

Per aïllar les possibles diferents bandes que s'esperava obtenir i per augmentar la quantitat de producte de cada una d'elles, es va passar a la clonació dels productes mitjançant la TOPO TA Cloning (Invitrogen, Noruega) que permet inserir productes amplificats amb l'enzim Taq polimerasa dins del vector TOPO en només 5min.

La reacció de clonació va ser la següent:

Producte de PCR (10ng/μl)	0,5 a 2μl
Aigua estèril fins a	4μl
Vector pCR-TOPO	1μl
Volum final	5μl

Es va incubar la reacció 5min. a temperatura ambient i es va procedir a la transformació.

Es van afegir 2 $\mu$ L de la reacció de clonació a les cèl·lules amb  $\beta$ -Mercaptoetanol i es va incubar durant 30min. en gel. Es va fer un xoc tèrmic de 30 seg. a 42°C i immediatament es van posar els tubs en gel durant 2min.

Es van afegir 250mLde medi SOC i es va incubar en agitació durant 1 hora a 37°C. Es van sembrar les cèl·lules en plaques d'agar amb ampicilina, IPTG i X-Gal i es van incubar a 37°C O/N.

## **5.20.- PURIFICACIÓ I SEQÜENCIACIÓ DELS PRODUCTES CLONATS**

De les colònies blanques i les blau cel se'n van fer cultius líquids i se'n va extreure l'ADN mitjançant Minipreps. Les recuperacions de l'ADN es van comprovar en un gel d'agarosa al 0.8%. Es va fer una amplificació per PCR del fragment comprès entre els encebadors 1174 sense i Exó 22 3'. El programa emprat va ser el mateix que el de l'apartat 5.18. Els productes de la PCR van ser analitzats en un gel d'agarosa al 1,6% i posteriorment purificats segons l'apartat 5.4. La seqüenciació es va realitzar segons l'apartat 5.7.3.7.1.

## **5.21.- STOCKS DE GLICEROL**

Un cop es van tenir identificats els clons portadors de les mutacions, es van posar en cultiu en placa O/N. Es va aïllar una sola colònia d'aquesta placa i se'n va fer un cultiu líquid saturat O/N. Finalment es van posar 0,85 mLdel cultiu amb 0.15 mLde glicerol estèril en un criotub i es van conservar a -80°C.