



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Anatomía y Biología Celular

**Importancia de la metilación y sumoilación de la coilina
y del factor de supervivencia de las motoneuronas
en el ensamblaje del cuerpo nuclear de Cajal**

**Tesis doctoral presentada por Olga Tapia Martínez
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Julio 2009**

3. Material y Métodos

3.1 CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron las líneas celulares MCF7, procedente de un adenocarcinoma humano de mama; UR61, derivadas de la línea celular PC12 de feocromocitoma de rata; HCT-116 de carcinoma colorrectal humano; HeLa de carcinoma humano de cérvix; HEK293T de riñón embrionario humano; A172 de glioblastoma humano y N2A de neuroblastoma de ratón. Las células MCF7, HeLa, HEK293T, UR61 y N2A se cultivaron en el medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Invitrogen). Las células HCT-116 se cultivaron en el medio de cultivo RPMI suplementado con 8% de FBS y 80µg/ml de gentamicina. Las células A172 se cultivaron en el medio DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS), 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina (Invitrogen) y 2mM de L-glutamina. Todos los cultivos se mantienen en atmósfera húmeda a 37°C y con un contenido de CO₂ del 5%.

3.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

La experimentación animal se realizó en ratas de la cepa Sprague-Dawley. Los animales fueron mantenidos en estabulario, bajo condiciones idóneas y trasladados al laboratorio unas horas antes a su manipulación para conseguir su habituación y disminuir, en la medida de lo posible, cualquier situación de estrés que pudiera interferir con ulteriores resultados derivados de los tratamientos experimentales. El cuidado y manipulación de los animales se llevaron a cabo siguiendo las normas de experimentación con animales dictadas por las directivas de la Comunidad Europea (86/609/EEC) y de acuerdo con la legislación española vigente (Real Decreto 223; 1988). Para llevar a cabo el presente trabajo de tesis doctoral se han sacrificado 30 ratas que han sido utilizadas para los siguientes propósitos:

Para el estudio *in vivo* de los efectos farmacológicos de la inhibición de la metilación se han utilizado 12 animales adultos. De los cuales 3 fueron utilizados como control, el resto recibió tratamiento con adenosin-2'-3'-dialdehído (AdOx). El estudio se ha realizado en neuronas sensitivas del ganglio trigémino (GT). Se ha elegido este centro nervioso, dado que, al carecer de barrera hematoencefálica, las drogas pueden acceder con facilidad.

Para el estudio del modelo experimental de estrés osmótico agudo se han utilizado 18 animales según el proceder de Ceccattelli y cols (1989). Consiste en administrar una inyección intraperitoneal única de una solución hipertónica de NaCl 1,5M (1,8ml/100gr peso). Los animales macho de 3 meses de edad se sacrificaron a

los 30 minutos, a las 2 horas, a las 6 horas, a las 12 horas y a las 24 horas tras la inyección de la solución hipertónica. Un grupo de la misma edad y sexo sirvió de control. El estudio se ha realizado en las neuronas del núcleo supraóptico (SON) que desde un punto de vista fisiológico, son fundamentales para mantener las condiciones homeostáticas del medio interno mediante un riguroso control de la osmolaridad de los fluidos extracelulares.

3.2.1 Técnica de perfusión

Los animales fueron anestesiados utilizando 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich) administrada intraperitonealmente a una dosis de 25mg/Kg de peso corporal. Comprobada la ausencia de movimientos reflejos, se procedió a la fijación de los tejidos mediante perfusión transcardiaca según el proceder de Palay y Chan-Palay (1974). Se introdujo un catéter de teflón Abbocath-T® al través del vértice del ventrículo izquierdo hasta el origen del cayado aórtico, para canalizar la entrada de la solución fijadora, a continuación se practicó una incisión en la aurícula derecha para crear una circulación abierta y permitir así la salida de dicha solución. Para introducir la solución fijadora se utilizó una bomba de perfusión Masterflex® a un flujo aproximado de 25ml/min. Se bombeó aproximadamente el mismo volumen (en mililitros) de solución de fijación que gramos pesa el animal. Una vez finalizada la perfusión, el animal fue decapitado y se extrajeron los ganglios de trigémino y el núcleo supraóptico y posteriormente se lavaron en tampón fosfato salino (PBS: ClNa 120mM, ClK 2,7mM y buffer fosfato 10mM y pH 7,4).

3.2.2 Disociados neuronales

Los disociados de neuronas se han utilizado para el estudio de microscopia confocal láser según el protocolo descrito por Lafarga y cols. (1998) y Pena y cols. (2001). El material previamente fijado en paraformaldehído al 3,7% en PBS fue almacenado en PBS hasta su procesamiento.

La técnica de disociados neuronales consiste en depositar sobre un portaobjetos (SuperFrost®Plus) un pequeño fragmento de tejido obtenido por microdissección de la región periférica del ganglio enriquecida en cuerpos neuronales. La muestra se cubre con un volumen de 10µl de PBS y sobre ella se sitúa un cubreobjetos de 18x18mm. Seguidamente con una aguja histológica se van disociando las neuronas por percusión. El grado de disociación y preservación citológica de las neuronas se controla bajo observación microscópica de la muestra. Con el fin de poder

retirar el cubreobjetos dejando el sembrado de las neuronas adheridas al portaobjetos, las muestras se congelan con nieve carbónica durante aproximadamente 5 minutos. De este modo el cubreobjetos congelado se retira con facilidad con un bisturí. Posteriormente las muestras histológicas fueron inmediatamente hidratadas a 4°C en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes y recogidas finalmente en PBS donde se almacenaron a 4°C hasta su posterior inmunomarcaje. Los disociados neuronales obtenidos por este procedimiento permiten disponer de centenares de cuerpos neuronales enteros y perfectamente preservados.

3.3 DROGAS Y TRATAMIENTOS

3.3.1 5'-Deoxi-5'-metil-thioadenosina (MTA)

La MTA inhibe de forma indirecta las metiltransferasas tipo I y II (PRMTs) (Avila y cols., 2003). La droga fue administrada a dosis 750µM durante 24 horas a cultivos de las líneas celulares MCF7 *MTAP*^{-/-}, HeLa, HTC116, 293T, A172 y UR61. Como control, en cada experimento se utilizó el volumen equivalente de DMSO (vehículo).

3.3.2 Adenosina-2',3'-dialdehído (AdOx)

El AdOx actúa sobre la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH) que provoca la inhibición de las PRMTs (Bartel y Borchardt, 1984). En cultivos de células MCF7 *MTAP*^{-/-}, la droga fue administrada a dosis 100µM durante 24 horas. En animales de experimentación, la droga fue administrada en una dosis única (100µM/Kg), inyectada en la vena yugular. Los animales fueron sacrificados a los 30 minutos y a las 4 y 24 horas post-tratamiento.

3.3.3 Estrés osmótico agudo

En animales de experimentación se indujo estrés osmótico mediante la administración de una solución hipertónica de NaCl 1,5M (1,8ml/100gr peso). Los animales se sacrificaron a los 30 minutos, a las 2 horas, a las 6 horas, a las 12 horas y a las 24 horas post-tratamiento.

3.3.4 Cultivo celular sin metionina extracelular

Para el estudio de la respuesta celular a la inhibición de la metilación, las líneas celulares fueron cultivadas durante 72 horas con el medio DMEM carente de los aminoácidos L-metionina y L-cisteína (Gibco) suplementado con 10% de FBS, 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Invitrogen).

3.3.5 Diferenciación de células UR61 a neurona-like

Las células UR61 contienen un plásmido recombinante (MMTV-LTR) que contiene el gen N-ras de ratón controlado por un promotor inducible por dexametasona (Dex) (Guerrero y cols., 1988). La activación del gen N-ras, por medio de Dex, induce la diferenciación neuronal en UR61 mediada por la sobreexpresión de la proteína N-ras (Lacal y cols., 1990). Se aplicaron tratamientos con Dex a 0.2 μ M para inducir la diferenciación en los periodos de 0 y 24 horas post-tratamiento.

3.4. MICROSCOPIA CONFOCAL LASER

3.4.1 Inmunofluorescencia

Las distintas líneas celulares crecieron adheridas sobre cubres estériles de 10 x 10 mm. La fijación se realizó con paraformaldehído 3,7% en tampón fosfato salino (PBS: ClNa 120mM, ClK 2,7mM y buffer fosfato 10mM y pH 7,4) durante 15 minutos. Los cristales con las células y las neuronas disociadas y adheridas al portaobjetos fueron lavadas con PBS y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% en PBS durante 15-30 minutos a temperatura ambiente.

Después de la permeabilización, las células se lavaron varias veces con PBS-Tween al 0,05% y se procedió al marcaje por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario diluido en PBS (8 μ l por cubreobjeto o por cristal) durante 60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de varios lavados en PBS-Tween, las preparaciones se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, fluoresceína (FITC), TexasRed (TxR) o Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, E.U.A.), durante 45 minutos, en cámara oscura y húmeda a temperatura ambiente. En experimentos de doble marcaje tanto los anticuerpos primarios como los secundarios fueron incubados secuencialmente durante 45 minutos cada uno. Algunos inmunomarcajes fueron contrastados con una solución de Ioduro de Propidio (IP). El IP tiñe específicamente los ácidos nucleicos y, en las UR61, marca muy bien el nucleolo y los grumos de Nissl. Después de lavar las muestras con PBS se montaron con el medio VectaShield (Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido). Posteriormente las muestras se examinaron con un microscopio confocal láser Zeiss LSM 510 META provisto de tres líneas de láser, argón (488nm), HeNe (543nm) y HeNe (633nm), para excitar FITC, TxR, y Cy5 respectivamente. Los anticuerpos específicos utilizados en este estudio aparecen enumerados en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
SMN	Ratón	1:50	Transduction Labs
*Coilina	Conejo	1:200	Bohman y cols., 1995
*SUMO1	Conejo	1:100	Santa Cruz
SUMO1	Ratón	1:50	Zymed
Sm	Humano	1:200	Lamond y Carmo-Fonseca, 1993
TMG-cap	Ratón	1:100	Oncogene
U2B´´	Ratón	1:150	Habets y cols.,(1989)
Fibrilarina	Ratón	1:10	Lamond/Carmo-Fonseca
Y12	Ratón	1:10	A.I. Lamond
BrdU	Ratón	1:100	Sigma
Flag	Ratón	1:100	Sigma

3.4.2 Ensayo de Transcripción "run on" mediante incorporación de 5´-fluorouridina (5´-FU)

La actividad transcripcional fue medida por la incorporación in situ de 5´-fluorouridina (5´-FU) en el interior del RNA recientemente sintetizado. Se utilizó como vía de administración de 5´-FU a células MCF7 *MTAP*^{-/-} el cultivo con medio DMEM (Sigma) suplementado con 10% FBS, 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomycin (Invitrogen) conteniendo 4mM de 5´-FU durante 30 minutos. Las células fueron fijadas con paraformaldelhidio 3.7% en buffer HEPES que contiene 0.5% de tritón-X durante 15 minutos. El nucleótido halogenado se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón (clone BU-33) anti-BrdU (Sigma, UK) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (Jackson Laboratorios, USA). Las preparaciones fueron montadas con Vectashield como se ha comentado previamente. El ensayo de transcripción con 5´-FU fue combinado con técnicas de inmunofluorescencia para detectar la proteína coilina

La validez del ensayo de transcripción in vivo fue confirmada experimentalmente mediante la administración de Actinomicina D (Act D), un potente inhibidor de la transcripción. La Act D se administró en el medio de cultivo en una concentración de 0.05µg/ml durante 1 a 3 horas. Con 1 hora de tratamiento se inhibe preferentemente la transcripción nucleolar (RNA polimerasa I), mientras que tratamientos más prolongados (3 horas) el bloqueo transcripcional afecta a todas las categorías de RNAs, afectando a todas las RNA polimerasas .

3.4.3 Análisis cuantitativo

Realizamos un estudio cuantitativo del porcentaje y del número medio de CBs en células MCF7 *MTAP*^{-/-} según el patrón de distribución nuclear de la coilina formando CBs libres, CBs intranucleolares o concentrándose en los nucleolos (NoEC). Para esta cuantificación se utilizaron células MCF7 control inmunomarcadas con anti-coilina. Se utilizaron, al menos, 300 células con cada patrón de distribución nuclear de la coilina. Asimismo, se llevó a cabo un estudio cuantitativo en células MCF7 *MTAP*^{-/-} control y cultivadas en presencia de MTA a una dosis de 750 μ M durante 24 horas para analizar el porcentaje de células que exhibían nucleolos enriquecidos con coilina y el número medio de CBs. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron, al menos 300 células MCF7 *MTAP*^{-/-} sin y con tratamiento de MTA inmunomarcadas con anti-coilina. En ambos casos el número de células y de CBs por célula fueron estimados por examen directo de los diferentes planos del núcleo celular, utilizando un objetivo de inmersión 63x y un ocular equipado de escala micrométrica.

Por otro lado realizamos un estudio cuantitativo para determinar la proporción de CBs que concentraban SUMO1. El estudio se llevó a cabo en tres modelos celulares: i) la diferenciación a neurona-like de células UR61, ii) la respuesta neuronal al estrés osmótico en las neuronas osmosensitivas del núcleo supraóptico de la rata (SON) y iii) la respuesta de las neuronas sensoriales primarias del ganglio trigémino (GT) al estrés metabólico inducido con el AdOx. Para la cuantificación se utilizaron células UR61 diferenciadas con Dex durante 12 y 24 horas, disociados de neuronas del SON activadas osmóticamente durante 0,5, 2, 6, 12 y 24 horas y disociados de neuronas del GT tratadas con AdOx durante 0,5, 4 y 24 horas. En los tres modelos biológicos se utilizaron, al menos, 300 células correspondientes a cada estadio. Tanto las células cultivadas como los disociados neuronales fueron doblemente inmunomarcados con anti-SUMO1 y anti-coilina. Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente mediante el programa Excel. Para el contraste de hipótesis se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y χ^2 con un nivel de confianza del 95%.

3.5 MICROSCOPIA ELECTRONICA

3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio de microscopía electrónica de transmisión hemos seguido, con algunas modificaciones, la técnica descrita por Palay y Chan-Palay (1974).

Brevemente, tras la inmersión de ganglios trigémino o del pellet de nucleolos aislados en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,12M y pH 7, 4 durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Tras varios lavados de 15 minutos en tampón fosfato 0,12M fragmentos de GT y el pellet de nucleolos se post-fijaron con tetróxido de osmio al 2% en solución tamponada durante 2 horas. Posteriormente se hicieron varios lavados en agitación con solución salina (NaCl 2,4%). El proceso de deshidratación, se realizó mediante pasos sucesivos por acetonas a distinta concentración, procediendo como sigue:

- Acetona 30% 15 minutos
- Acetona 50%, 15 minutos
- Acetona 70% + acetato de uranilo 1% 30 minutos
- Acetona 80%, 30 minutos
- Acetona 90%, 30 minutos
- Acetona anhidra, 30 minutos (dos pasos)
- Propilenóxido, 30 minutos (dos pasos)

Los bloques de tejido se incluyeron en araldita (Durcapan) siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante (ACM, Fluka AG, Suiza) y se introdujeron en una estufa a 65°C durante dos días para su polimerización. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Se practicaron cortes semifinos de 1 µm y ultrafinos de 50 nm de espesor. Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina al 1% para valorar la correcta preservación del material. Los cortes ultrafinos se montaron en rejillas recubiertas con película de Formvar (Sigma) y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación con un microscopio electrónico (Philips EM 208).

3.5.2 Inmunocitoquímica ultraestructural

Las células MCF7 *MTAP*^{-/-} y UR61 se fijaron con 5ml de paraformaldehído 3,7% en una placa de 10mm durante 15 minutos. Posteriormente se retiraron 4ml y se raspó la placa con una espátula de plástico para levantar las células. El fijador con las células se pasó a un eppendorf, donde se realizó primero una centrifugación a 7000 rpm, seguida de otra centrifugación a 12000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados de 15 minutos PBS 1X. El pellet de células se sometió a la siguiente pauta de deshidratación:

Metanol 30%, 10 minutos a 4°C
Metanol 50%, 10 minutos a 4°C
Metanol 70%, 10 minutos a 4°C
Metanol 90%, 30 minutos a -20°C
Metanol 90% : Lowicryl (1:1), 60 minutos a -20°C
Metanol 90% : Lowicryl (1:2), 60 minutos a -20°C
Lowicryl, 60 minutos a -20°C

La inclusión se realizó siguiendo las indicaciones especificadas por el proveedor de la resina (Lowicryl K4M). La polimerización se hizo por exposición a la luz ultravioleta, durante 5 días a -20°C, seguida de 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente los bloques se cortaron con un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de níquel cubiertas de formvar.

Las secciones ultrafinas fueron incubadas secuencialmente en gotas de PBS glicina 0,1M durante 15 minutos como paso previo a su posterior incubación con un anticuerpo primario (diluido en PBS que contenía un 1% de BSA) durante 60 minutos, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Después de varios lavados sobre gotas de PBS se procedió a su incubación con un anticuerpo secundario específico. Los anticuerpos secundarios, conjugados con partículas de oro coloidal de 10 o 15 nm de diámetro (BioCell, UK) se usaron a una concentración de 1:25 a 1:50 en PBS que contenía 1% de BSA. Después las rejillas se lavaron enérgicamente con agua bidestilada en un vaso de precipitado. Se dejaron secar al aire y se contrastaron con acetato de uranilo para su observación al microscopio electrónico (Philips EM 208). La relación de anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo aparecen señalados con un asterisco en la tabla 1.

3.6 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE PLASMIDOS

Las células MCF7 *MTAP*^{-/-} y UR61 se transfectaron con el reactivo Fugene 6 (Roche) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células se sembraron el día anterior a la transfección en una confluencia de 10⁴ células/cm² con el objetivo de conseguir una confluencia de aproximadamente el 80% al día siguiente. Para la transfección se prepararon una mezcla de medio DMEM sin FBS sobre el que se añadió el medio lipídico que se dejó reposar 5 minutos. Posteriormente se añadió la mezcla al DNA plasmídico y tras un nuevo reposo de 15 minutos se incorporó gota a gota en el

medio de cultivo celular. La expresión del plásmido se comprobó pasadas 24-48 horas. Las células fueron incubadas durante 24 ó 48 horas.

Los plásmidos utilizados fueron pGFP-SUMO1 que expresa la forma salvaje de la proteína SUMO1 activo (Gostissa y cols., 1999); pGFP-SMN que expresa la proteína SMN en su forma salvaje (Sleeman y cols., 2003) y pGFP-Coilina que expresa la proteína coilina. Los tres plásmidos están etiquetados con la green fluorescent protein (GFP). También se transfectaron el plásmido pDsRed1-Ubc9 que codifica la enzima específica de sumoilación Ubc9 etiquetada con la proteínas fluorescente roja DsRedN1 (R. Hay, Edimburgo). Por último, células MCF7 *MTAP*^{-/-} se transfectaron con el plásmido pSG5-Flag-MTAP que expresa la forma salvaje de la enzima MTAP junto al epítipo Flag (Gotoh y cols., 2007).

3.7 MUTAGENESIS PUNTUAL DIRIGIDA

Realizamos mutaciones puntuales con el sistema QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante en el vector pGFP-SMN, que contiene el cDNA que codifica la proteína SMN silvestre. Procedimos a sustituir los nucleótidos que codifican lisinas 55 y 119 de SMN (potenciales sitios de sumoilación) por alaninas con el oligonucleótido cebador 5' GCATGCTCTAGCGAATGGTG ACATTTGTGAAACTTCGGG3' para realizar la mutación puntual K55A y con el cebador 5' CCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTGCAGAGAAACC3' para realizar la mutación K119A. Estos pares de oligonucleótidos cebadores complementarios al cDNA (normalmente de una longitud de 40-45 bp) se diseñaron de modo que contenían las mutaciones puntuales deseadas en el medio de la secuencia del cebador, que tuvieran temperaturas de anillamiento mayores de 78°C, un contenido mínimo de 40% de CG y que terminaran en una o mas bases de C o G. Los cebadores fueron amplificados mediante PCR utilizando los reactivos que proveía el kit bajo las siguientes condiciones: un volumen total de 50µl con 10-50ng del DNA plasmídico que sirve de molde, bufer de reacción 1X, 250nM de cada cebador, 1µl de la mezcla dNTP y 2,5U de la DNA polimerasa PfuTurbo[™]. Se realizaron 16 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de anillamiento a 55°C y 6-8 minutos de síntesis de DNA a 72°C. Las reacciones de PCR se incubaron consecuentemente con 10U de la enzima de restricción DpnI durante 1 hora a 37°C para digerir el DNA inicial y se transformó directamente en 50ml de células supercompetentes E.coli XL1-Blue

(provistas por el kit) y se sembraron en placa de agar LB-kanamicina (50µg/ml). Las colonias resultantes se crecieron en LB broth-ampicilina (50µg/ml) para la obtención del plásmido (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen).

Con este procedimiento generamos, en primer lugar, los plásmidos con mutaciones simples pGFP-SMN K55A y pGFP-SMN K119A que fueron utilizados como moldes para obtener el plásmido con la doble mutación puntual pGFP-SMN K55-119A. Todos los plásmidos fueron secuenciados para verificar las mutaciones y fidelidad de toda la secuencia de cDNA.

3.8. ANALISIS DE PROTEINAS POR WESTERN BLOT

Para la obtención de la fracción citoplasmática y nuclear, las células se recogen en PBS-EDTA 5mM, se centrifugan 5 minutos a 1000 rpm y se incuban durante 10 minutos en hielo con un tampón hipotónico A (10mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos a 4°C. El sobrenadante se recogió consiguiéndose así la fracción citoplasmática. Para obtener la fracción nuclear, el pellet de la centrifugación se lavó con tampón A y se incubó durante 20 minutos en hielo con el buffer C (20mM HEPES pH 7.9, 0.45M NaCl, 1mM EDTA) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y se centrifugo a 14000 rpm durante 2 minutos a 4°C, recogiéndose el sobrenadante.

Para la obtención de extractos nucleolares se sigue el protocolo descrito por Vandelaer et al. (1996). Brevemente, se recogen las células MCF7 *MTAP*^{-/-} mediante raspado en 3ml de buffer Hanks seguido de centrifugación a 375g durante 5 minutos a 4°C. Se resuspende el pellet en 3ml de buffer de lisis nucleolar (Bnu) constituido por 142,7mM NaCl, 4,5mM KCl, 2mM Mops, 2,5mM MgSO₄ y suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas. Se centrifuga durante 5min a 375g y se realiza un segundo lavado en buffer nucleolar. Una vez resuspendido el pellet en 3ml se sonica durante 1 minuto a 80% de amplitud en hielo, se deposita sobre 3ml de sucrosa 0,88M en Bnu y se centrifuga a 3840g durante 10 minutos a 4°C. Se lava el pellet tres veces con 500µl de Bnu para eliminar el exceso de sucrosa y se congela a -83°C. Una fracción de 50µl se utilizará para realizar el inmunomarcaje de los nucleolos aislados con el anticuerpo anti-fibrilarina para comprobar la pureza del extracto nucleolar.

Tras la obtención de los extractos, se determinó la cantidad de proteína de las muestras por colorimetría según el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando

seroalbúmina bovina para establecer una recta patrón. Las muestras (40-50µg de proteína) se calentaron a 95°C durante 5 minutos en "SDS gel loading buffer 1x" (50mM Tris base pH 6,8, 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% de glicerol) y se fraccionaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS, de un porcentaje adecuado al tamaño de las proteínas a analizar. La electroforesis se realizó en un Mini-ProteanII (BioRad) en tampón de electroforesis (25mM Trizma, 192mM Glicina y 1% SDS). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa PROTAN® (SCHLEICHER&SCHUELL), durante 2,15 horas a 260mA/cm² en un Mini-ProteanII (BioRad) en tampón de transferencia (25mM Trizma base y 192mM Glicina). Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron en agitación en TBS-T (Tris buffer saline Tween20: 20mM Tris base, 137mM NaCl, 0,05% Tween) con un 5% de BSA para bloquear los sitios inespecíficos. Posteriormente los filtros se incubaron con anticuerpo primario diluido en TBS-T y 2% de BSA, durante toda la noche a 4°C y con agitación. Los anticuerpos específicos utilizados aparecen enumerados en la tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados para western blot

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
SMN	Ratón	1:500	Transduction Labs
SMN	Conejo	1:500	Santa Cruz BioTech
Coilina	Ratón	1:500	Abcam
Coilina	Conejo	1:10000	Bohman y cols., 1995
SUMO1	Ratón	1:500	Zymed
Fibrilarina	Ratón	1:500	Abcam
Y12	Ratón	1:500	A.I. Lamond
RhoGDI	Conejo	1:1000	Santa Cruz BioTech
GFP	Conejo	1:500	Invitrogen

Finalizada la incubación, los filtros fueron lavados con TBS-T durante 20 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a una concentración de 1:10000 en TBS-T y 2% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de varios lavados con TBS-T. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa y diluidos en solución de bloqueo: anti-IgG de ratón (1:10000, Promega) y anti-IgG de conejo (1:8000, Promega) cuya detección se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Pharmacia biotech). Alternativamente, se utilizaron los anticuerpos secundarios diluidos en solución de

bloqueo: IRDye™ 800 anti-IgG de ratón (1:10000, Rockland) y IRDye™ 680 anti-IgG de conejo (1:10000, Rockland) que fueron detectados utilizando el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor)

3.9 INMUNOPRECIPITACION DE PROTEINAS

Para los ensayos de inmunoprecipitación, células cultivadas en placas de 100mm se lisaron para obtener las fracciones nucleares (apartado 3.8). Posteriormente, los lisados nucleares (1000 µg) se llevaron hasta un volumen de 1ml y se pre-incubaron con 20 µl de proteína G-*Sepharose* (Amersham) durante 1 hora en un volumen final de 1ml. Después de un pulso, se recogió el sobrenadante y se incubaron toda la noche a 4°C con agitación rotatoria con el anticuerpo primario (2µg) descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados para inmunoprecipitación

Anticuerpo	Especie	Referencia
SMN	Ratón	Transduction Labs
Coilina	Ratón	Abcam
GFP	Conejo	Invitrogen

Posteriormente, se incubaron con 30µl de proteína A-*Sepharose* durante 1 h a 4°C. Los inmunocomplejos retenidos en las bolas de sefarosa se lavaron cinco veces con 1ml de tampón de lisis con 1% de NP-40. La fracción inmunoprecipitada se resuspendió en 30µl de tampón Laemmli 2X y las proteínas de interés se detectaron mediante Western blot (apartado 3.8) usando los anticuerpos correspondientes (apartado 3.8, tabla 2). Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes dirigidos contra las cadenas ligeras de las IgG acoplados a peroxidasa y detectados por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Pharmacia biotech). También, se utilizaron los anticuerpos secundarios correspondientes IRDye™ 800 y 680 que fueron detectados utilizando el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor)