



Paper del canal de clorur CIC-2 en les patologies de la mielina

Tanit Arnedo Llena

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Paper del canal de clorur CIC-2 en les patologies de la mielina.

Tesi doctoral: Tanit Arnedo Llana
Departament de Ciències Fisiològiques II,
Unitat de Fisiologia
Universitat de Barcelona 2015

Director: Raúl Estévez Povedano
Departament de Ciències Fisiològiques II, UB

MATERIALS I MÈTODES

En la present Tesi s'ha treballat amb diferents tipus de models cel·lulars i s'ha utilitzat una gran varietat de tècniques. En aquest part del treball s'explica la metodologia de totes les tècniques que s'han portat a terme.

1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR.

1.1. **OBTENCIÓ DE BACTERIS ELECTROCOMPETENTS I TRANSFORMACIÓ DEL DNA.**

Per obtenir una quantitat suficient de DNA per a du a terme diferents experiments necessitem poder-lo amplificar. Per això, partim d'un DNA plasmídic purificat que conté l'insert d'interès i un gen de resistència a un antibiòtic. Aquest DNA purificat té capacitat autoreplicativa en cèl·lules bacterianes. Aquest procés s'anomena *transformació*. Normalment s'utilitzen soques bacterianes d'*Escherichia coli*. Quan s'han transformat els bacteris, es fan créixer en plaques amb LB-agar que contenen l'antibiòtic al que només presenten resistència els bacteris que han incorporat el DNA plasmídic exogen. En aquesta tesis s'han utilitzat les soques DH5 α i DB3.1.

1.1.1. **Obtenció de bacteris electrocompetents d'alta eficiència.**

L'electroporació és un mètode en que les soques d'*E.coli* són transformades a unes eficiències de l'orde de 10^8 - 10^9 transformant/ μ g.

MATERIALS I REACTIUS

- Bacteris *E.coli* de la soca DH5 α
- Medi LB
- Glicerol al 10% (v/v) en aigua i autoclavat. Utilitzar a 4°C.
- Tubs de centrífuga de 500 ml auto clavats. Refredats a 4°C.

METODOLOGIA

Aquest protocol s'ha de realitzar en una campana de flux laminar o sota l'acció de la flama d'un *bunsen* per tal d'evitar contaminacions.

1. Es raspa el glicerol de bacteris DH5 α i s'inoculen en 5 ml de LB sense antibiòtic de selecció. S'incuba a 37°C en agitació durant tota la nit (12-16 hores).
2. Es dilueix el precultiu 1:100 (v/v) en 500 ml de LB fresc i s'incuba a 37°C en agitació fins arribar a una D.O.₆₀₀ de 0,5-0,7, moment en que els bacteris es

troben en fase logarítmica de creixement.

3. S'atura el creixement bacterià incubant el cultiu 20 minuts en gel. (A partir d'aquí, tots els passos s'han de realitzar a 4°C).
4. Es transfereixen els bacteris als tubs de centrífuga de 500 ml (previament refredats) i es centrifuguen a 4000 g durant 15 minuts a 4°C.
5. S'elimina el sobrenedant per decantació. És molt important eliminar tot el sobrenedant, encara que es perdi una petita part dels bacteris.
6. Es resuspèn el pellet en 500 ml de glicerol 10% (prèviament refredat) i es centrifuga l'homogenat a 4000 g durant 15 minuts a 4°C. Seguidament es decanta el sobrenedant.
7. Es repeteix el procés efectuat en els passos 5 i 6 dues vegades, però aquest cop es resuspèn el pellet en un volum de 250 ml de glicerol 10%.
8. Després de decantar el sobrenedant, es resuspèn el pellet en 2 ml de glicerol 10%.
9. Finalment, es fan alíquotes de 50 µl que són congelades en nitrogen líquid ràpidament i guardades a -80°C.

1.1.2. Transformació de bacteris.

1.1.2.1. Mètode per electroporació.

Aquest mètode de transformació de bacteris es basa en aplicar una descàrrega elèctrica per tal de permeabilitzar la paret bacteriana generant porus, els quals permetran l'entrada de DNA exogen. És necessari que el DNA a transformar estigui lliure de sals per aconseguir una bona eficiència.

MATERIALS I REACTIUS

- Bacteris *E.coli* de la soca DH5α.
- Medi LB.
- Cubeta d'electroporació de 0,1 cm (BioRad).
- Electroporador (BioRad Micropulser).
- Plaques de Petri preparades amb LB-agar i que continguin l'antibiòtic al que presenti resistència el plàsmid de DNA exogen.

METODOLOGIA

1. S'afegeixen 0,5-1µl del DNA a transformar en una alíquota de 50 µl dels bacteris electrocompetents atemperades. Cal mantenir-ho sempre en gel.
2. S'homogenitza la mostra i s'introdueix entre els dos electrodes d'una cubeta d'electroporació refredada previament.
3. La cubeta s'introdueix en l'electroporador i se li aplica una descàrrega elèctrica de 375 V mitjançant el programa per bacteris de l'electroporador "Ec1". L'aparell ens dona una valor en milisegons (*time constant*) que indica el temps en que la mostra ha estat sotmesa al xoc elèctric. Com més gran sigui el valor del temps empleat, major quantitat de porus oberts hi haurà a la paret cel·lular, fet que ajuda a millorar l'entrada de DNA exogen al bacteri. Per tant és un indicatiu de l'eficiència de transformació.
4. Es recupera la mostra afegint 250 µl de LB sense antibiòtic i es passa a un tub.
5. S'incuba la mostra a 37°C durant una 1h en agitació. D'aquesta manera deixem que el gen de resistència a l'antibiòtic, que incorpora el plàsmid, s'expressi.
6. Es sembren 150-200 µl de bacteris en una placa de Petri que conté LB-agar amb l'antibiòtic de selecció.
7. S'asseca la placa uns minuts a temperatura ambient i s'incuba, en posició invertida, a 37°C tota la nit (12-16 hores). Cal fer sempre un control negatiu de transformació, en el que es sembren bacteris sense transformar amb DNA exogen.
8. Al següent dia, es piquen diverses colònies de la placa on s'havia sembra el bacteris transformats amb el DNA exogen. Es fan pre-cultius amb uns 4 ml de LB juntament amb l'antibiòtic de selecció. En la placa del control negatiu no ha d'haver-hi crescut cap colònia.
9. Els pre-cultius s'incuben a 37°C i en agitació durant tota la nit (12-16 hores) per a poder realitzar l'extracció de DNA.

1.1.2.2. Mètode per xoc tèrmic.

El mètode per xoc tèrmic és una tècnica de transformació de bacteris on els porus que permeten l'entrada del DNA exògen són produïts per un canvi bruscat de temperatura. Les condicions generals del DNA a transformar són les mateixes que en el cas del mètode per electroporació.

MATERIALS I REACTIUS

- Bacteris *E.coli* de la soca Stb13.
- Medi LB o SOC.

METODOLOGIA

1. S'inocula entre 50 i 100 ng de plàsmid recombinant per cada 100 µL de cèl·lules competents. La barreja es realitza en tubs de 15 mL o en *ependorfs* estèrils, agitant manualment amb suavitat.
2. S'incuba la barreja en gel durant 30 minuts.
3. S'incuba la barreja 45 segons a 42°C, produïnt així el xoc tèrmic.
4. Es transfereix immediatament en gel una altra vegada i es manté durant 2 minuts.
5. S'afegeix 900 µL de medi LB o SOC sense antibiòtic i s'incuba a 37°C, en agitació, durant 1 hora.

El procés de plaquejat, recollida de plaques i processat de les colònies s'efectua de la mateixa manera que en el cas anterior.

1.2. OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DE DNA PLASMÍDIC.

L'objectiu principal d'aquests processos és l'extracció del DNA amplificat obtingut a partir del procés de transformació. Per tal d'aconseguir-ho, s'han utilitzat els equips comercials de *Qiagen* (*Qiagen Plasmid kit*). A partir d'aquests processos es poden obtenir petites quantitats de DNA plasmídic en el cas de les minipreparacions o grans quantitats de DNA en el cas de les maxipreparacions. En aquesta Tesi només s'han realitzat minipreparacions. Aquests processos es basen en el mateix principi d'aïllament: lisi alcalina del bacteris amb una posterior unió del DNA a una reïna d'intercanvi iònic. També cal eliminar les impureses com són RNA, DNA cromosòmic, proteïnes, etc. Això s'aconsegueix mitjançant una sèrie de rentats de la reïna amb una solució de salinitat mitja que conté etanol. Per acabar, s'elueix el DNA purificat amb aigua o amb un tampó de major salinitat.

1.2.1. Minipreparacions.

L'objectiu és extreure petites quantitats de DNA (0,3-0,6µg/µl) seguint les instruccions de l'equip comercial *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen).

MATERIALS I REACTIUS

- Pre-cultiu de 4 ml de medi LB (12-16 hores a 37°C i en agitació) que conté l'antibiòtic de selecció.
- Solució de resuspensió (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNAsa A).
- Solució de lisi (200 mM NaOH, SDS 1%).
- Solució de neutralització (2,55 M acetat de potassi, pH 4,8).
- Columnes d'intercanvi iònic (Qiagen).
- Solució de rentat (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA. (Aquesta solució es barreja 1:1 amb etanol absolut).
- Aigua Milli-Q o tampó d'elució (TE) de salinitat alta.

METODOLOGIA

1. Es centrifuguen els 3-5 ml de precultiu a 4000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient i es decanta el sobrenedant.
2. Es resuspèn el pellet amb 250 µl de tampó de resuspensió, que conté RNAsa i que es manté a 4°C.
3. A aquest homogenat, s'hi afegixen 250 µl de tampó de lisi i es barreja per inversió fins que la solució es torni de color blau.
4. S'afegixen 350 µl de tampó de neutralització i s'homogeneïtza per inversió fins que la solució adquireixi una consistència densa de color blanc.
5. Es centrifuga l'homogenat a 13000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient.
6. El sobrenedant es transfereix a un tub acoblat a una columna que conté una reïna d'intercanvi iònic, i es manté en contacte amb la reïna durant 1 minut per obtenir una major recuperació de DNA.
7. Es centrifuga la columna durant 1 minut a 13000 rpm, de forma que el sobrenedant queda dipositat per gravetat en el fons del tub i el DNA queda acoblat a la reïna. Es desmunta la columna del tub i es descarta el sobrenedant.
8. Després de tornar a acoblar la columna al tub, s'afegixen 750 µl de solució de rentat (amb etanol), i es repeteix el procés anterior. Posteriorment s'efectua una nova centrifugació sense afegir cap tampó, amb la finalitat d'eliminar restes d'etanol que degradin el DNA.
9. Finalment, s'acobla la columna a un tub eppendorf nou i s'elueix el DNA, afegint 50 µl d'un tampó d'elució de salinitat alta (TE) o aigua Milli-Q, i es deixa reposar

durant 1 minut.

10. Es torna a centrifugar durant 1 minut a 13000 rpm la columna, quedant dipositat el DNA en el fons del nou eppendorf. En la majoria de casos, l'elució s'ha realitzat amb aigua Milli-Q, que ofereix una gran eficiència d'elució i el DNA no queda en una solució amb sals que pot ser un inconvenient en futurs processos.
11. El DNA extret es quantifica apartat (1.2.3) i es guarda a 20°C.

1.2.2. Precipitació del DNA.

El procés de precipitació del DNA s'utilitza tant per purificar el DNA com per concentrar-lo. A la mostra de DNA s'hi afegeix 3 cops el seu volum, d'etanol al 95% o isopropanol (també s'hi pot afegir una concentració 1/10 d'acetat de sodi 3M). S'incuba durant 30 minuts a -80°C per afavorir la precipitació. Després es centrifuga a 13300 rpm 30 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenedant amb molta cura per no perdre el pellet i s'efectuen 2-3 rentats amb etanol al 70%. Posteriorment es centrifuguen 5 minuts a 13300 rpm a 4°C. Finalment es decanta el sobrenedant i es deixa assecar el pellet. El DNA es resuspèn amb aigua Milli-Q i és convenient deixar-lo a 4°C abans de quantificar-lo. Posteriorment es guarda a -20°C.

1.2.3. Quantificació del DNA.

Els àcids nucleics tenen un pic d'absorbància a una densitat òptica de 260 nm, fet que permet la seva quantificació i validació del grau de puresa. El DNA extret (o RNA) es quantifica mitjançant un espectrofotòmetre, a una densitat òptica de 260 nm, realitzant un perfil d'absorbància entre 220 i 320 nm. El DNA o RNA purificats presenten una corba típica, amb el seu màxim a 260 nm, punt que es mesura per extrapolat la concentració de la mostra. La mostra de DNA (1-2 µl) es passa per l'espectrofotòmetre (Nano-Drop), que dóna l'absorbància a 260 nm, la qual correspon a 50 µg/ml de DNA o 40 µg/ml de RNA i la concentració en µg/µl.

La fórmula a aplicar es la següent:

$$C = \text{ABS}_{260} \times 50 \text{ } \mu\text{g} / 1000 \text{ } \mu\text{l} \times \text{FD} \text{ (per DNA)}$$

$$C = \text{ABS}_{260} \times 40 \text{ } \mu\text{g} / 1000 \text{ } \mu\text{l} \times \text{FD} \text{ (per RNA)}$$

on C és la concentració, ABS l'absorbància i FD el factor de dilució.

És convenient utilitzar una mostra "blanc", que contingui únicament el tampó on hi ha la mostra, com a calibratge previ de la mesura.

1.2.4. Seqüenciació del DNA.

El darrer pas per verificar la construcció obtinguda és assegurar-se que la seqüència de nucleòtids és la correcta. Per això, es procedeix a seqüenciar la construcció. Existeixen diversos sistemes comercials basats en el mètode de Sanger (Sanger et al.,1977). El que s'ha utilitzat en aquesta Tesi és el sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* i l'analitzador ABI3730 de la casa comercial Applied Biosystems.

MATERIALS I REACTIUS

- Termociclador (Applied Biosystems).
- Seqüenciador ABI3730.
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.
- Tampó de seqüenciació. 5X (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit).
- Construcció de DNA que conté el gen d'interès.
- Oligonucleòtid o *primer* corresponent a 1 µM. Consisteix en una seqüència d'oligonucleòtids que es troba a certa distància a 5' o 3' del gen que es vol seqüenciar. És recomanable efectuar varies reaccions de seqüència per un mateix gen, de manera que s'obtinguin un mínim de dues seqüències per cada regió del gen.

METODOLOGIA

1. En un tub de PCR es barregen 0,5-1 µg de DNA, 1 µl de *BigDye*, 1 µl de tampó de seqüenciació, 3,2 µl de *primer* i aigua Milli-Q fins a un volum final de 10 µl. La *BigDye* és l'últim reactiu que s'afegeix.
2. La reacció de PCR s'efectua en el termociclador amb les condicions següents:

Desnaturació a 96°C: 10 segons	}	25 cicles
Hibridació a 50°C: 5 segons		
Elongació a 60°C: 4 minuts		
3. Finalitzada la reacció de PCR, s'afegeixen 10 µl d'aigua Milli-Q i s'envia a seqüenciar als Serveis Científico-Tècnics del Parc Científic de Barcelona.

1.3. CLONATGE DE DNA PLASMÍDIC.

Les diferents tècniques de biologia molecular actuals permeten la manipulació i la modificació de fragments de DNA amb relativa facilitat. Avui en dia, és relativament

fàcil i ràpid dissenyar i construir vectors específics per a una aplicació o un assaig experimental concret. Es poden construir o comprar una ampla gamma de vectors d'aplicació diversa: vectors d'expressió proteica de bacteris o mamífers, vectors vírics (lentivirus, adenovirus, retrovirus), vectors per assajos d'interacció proteica (doble híbrid o d'assaig de complementació fluorescent), etc. En aquesta tesi s'ha utilitzat la tècnica de clonació clàssica mitjançant l'ús d'enzims de restricció, la clonació per recombinació mitjançant el sistema *Gateway* (Invitrogen) i la clonació de mutants mitjançant la reacció de PCR recombinant.

1.3.1. Reacció de PCR.

La reacció en cadena de la polimerasa o de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és un sistema *in vitro* que permet l'amplificació selectiva de fragments de DNA de doble cadena de manera exponencial, utilitzant una polimerasa termostable i oligonucleòtids encebadors (*primers*) específics per al fragment de DNA a amplificar (Saiki et al., 1988). Consisteix en cicles successius de desnaturalització de la doble cadena del DNA, hibridació de la cadena senzilla amb els *primers* que posseeixen una seqüència complementaria a la que es pretén amplificar i extensió de les cadenes d'oligonucleòtids mitjançant una polimerasa termostable.

A cada cicle, idealment, es dobla el nombre de còpies del fragment de DNA, per tant, s'obté una amplificació exponencial a partir d'un nombre inicial baix de còpies. Cada fragment de DNA a amplificar presenta unes característiques diferents, igual que els *primers* i la polimerasa. Per aquest motiu, és convenient optimitzar les condicions per cada fragment en particular.

El correcte disseny dels oligonucleòtids encebadors és un punt clau per obtenir una correcta PCR. Per tant, existeixen una sèrie de criteris que s'han de tenir en compte a l'hora de dissenyar-los:

- 1) El nombre de A+T, ha de ser similar al nombre de C+G.
- 2) L'extrem 5' ha de presentar una energia lliure de Gibbs molt negativa (per assegurar una unió forta) i l'extrem 3', menys negativa (per assegurar una unió específica ja que la desestabilització provocada per un nucleòtid no emparellat podria provocar la no unió del *primer*).
- 3) Sempre que sigui possible, ha d'haver-hi una C o una G a l'extrem 3', ja que la unió C-G és molt estable i ajudarà a la polimerasa a iniciar el seu procés.

4) És convenient evitar *primers* que puguin formar estructures internes estables a la temperatura a la que s'hagin d'utilitzar (habitualment al voltant de 55°C), o que presentin seqüències complementaries que permetin la formació de dímers, especialment si aquests presenten una estructura tal que deixin extrems 5' protuberants. A continuació es mostra la PCR optimitzada en el laboratori utilitzant la *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen):

Tampó Polimerasa (10X)	5 µl
dNTPs (2 mM cadascun)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl
<i>Primer F</i> (forward) (10 µM)	1.5 µl
<i>Primer R</i> (reverse) (10 µM)	1.5 µl
DNA motlle (100 ng/µl)	2 µl
DNA Polimerasa (KOD polimerasa 1 U/µl)	1 µl
<u>Aigua Milli-Q</u>	<u>31 µl</u>
Volum final:	50 µl

La reacció de PCR es fa en tubs de 0,2 o 0,5 ml i s'incuba en un termociclador amb un programa predeterminat. Quan es realitza una primera PCR cal optimitzar el procés, variant els diferents paràmetres de la reacció.

Les condicions òptimes d'utilització de la *KOD Hot Start DNA polymerase* en el laboratori són les següents:

Inici: 2 minuts a 95°C	} 25 cicles
Desnaturalització: 30 segons a 95°C	
Hibridació: 30 segons a 45°C	
Elongació: 1 minut i 30 segons a 70°C	
Elongació final: 10 segons a 70°C	
Finalment es deixa a 4-16°C	

Els temps d'elongació depenen de la longitud del fragment a amplificar (generalment 1 min per 1 kb) i la temperatura d'hibridació depèn de la seqüència de l'encebador, i es calcula en °C, mitjançant la següent fórmula:

$$T_m = [4 (G + C) + 2 (A + T)] - 4$$

En el cas que l'oligonucleòtid no sigui totalment complementari al DNA, la temperatura d'hibridació es redueix, amb la finalitat de facilitar una unió no totalment específica.

1.3.2. Reacció de PCR recombinant o mètode SOE (*splicing by overlap extension*).

Aquest tipus de PCR ens permet introduir mutacions puntuals al DNA, insercions i delecions relativament llargues.

La tècnica consisteix en generar 2 fragments de PCR que contenen la mutació. Aquests dos fragments contenen una regió de solapament que és igual i que conté la mutació d'interès, això permet fer-los servir com a motlle per la següent PCR de recombinació, fent servir els *primers* dels extrems 5' i 3'. La mutació que es vol generar s'introdueix a l'oligonucleòtid, fet que fa que la seqüència no sigui totalment complementaria a la seqüència del DNA motlle. És per això que s'ha d'ajustar les condicions de la PCR. En aquest cas s'ha reduït el número de cicles a 25 per disminuir la probabilitat de generar mutacions i s'ha partit d'una gran quantitat de DNA com a motlle. En algunes ocasions també s'ha fixat la temperatura d'hibridació a 55°C o s'ha afegit el 10% de DMSO per millorar les condicions d'hibridació.

En dos tubs de PCR es duen a terme les dues PCRs parcials (PCR1 i PCR2) tal i com s'explica a l'apartat , posteriorment es valida la mida del fragment en un gel d'agarosa i es purifica (apartats 1.3.3.2. i 1.3.3.3.). Les dues PCRs s'utilitzen com a motlle per la PCR recombinant.

La PCR recombinant optimitzada en el laboratori amb la *KOD Hot Start DNA polymerase* és la següent:

Tampó Polimerasa (10X)	10 µl
dNTPs (2 mM cadascun)	10 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
<i>Primer F</i> (forward) (10 µM)	3 µl
<i>Primer R</i> (reverse) (10 µM)	3 µl
PCR1	5 µl
PCR2	5 µl
DNA Polimerasa (KOD polimerasa 1 U/µl)	2 µl
<u>Aigua Milli-Q</u>	<u>66 µl</u>
Volum final	100 µl

El producte de la PCR recombinant es torna a verificar en un gel d'agarosa i es purifica la banda correcta, obtenint el fragment de DNA amb la mutació.

Finalment es procedeix a clonar el fragment en el vector d'interès ja sigui per el mètode clàssic o per el sistema *Gateway* (Sigma).

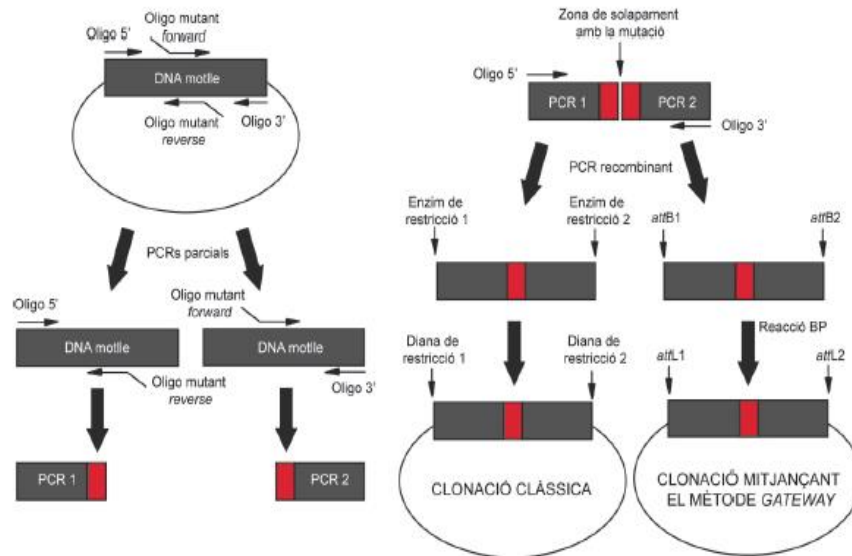


Figura 18. Esquema del mètode de mutagènesi per PCR recombinant. Es realitzen 2 PCRs parcials (PCR1 i 2) utilitzant els *primers* que contenen la mutació obtenint així 2 fragments amb una zona de solapament (en vermell) que és igual i conté la mutació. A continuació, els 2 fragments s'amplifiquen en una PCR recombinant amb els *primers* dels extrems 5' i 3' obtenint el DNA amb la mutació d'interès, que és clonat per mètode clàssic o bé per mètode *Gateway* (també es pot fer per digestió-ligació).

1.3.3. Clonació clàssica.

El mètode clàssic de clonació permet introduir un gen d'interès (insert) en un vector d'expressió determinat. Això s'aconsegueix mitjançant la digestió tant del vector com de l'insert de manera que els seus extrems siguin compatibles i posteriorment es puguin lligar o fusionar.

1.3.3.1. Digestió amb enzims de restricció.

El clonatge amb enzims de restricció es basa en la característica que tenen aquestes endonucleases de tallar el DNA en dianes específiques, generant extrems (cohesius o roms) que poden ser relligats en el vector d'interès mitjançant un enzim de lligació. La digestió del DNA amb enzims de restricció s'ha efectuat seguint les instruccions de la casa comercial utilitzada (New England Biolabs). Pel que fa als enzims, s'han utilitzat de 1 a 10 U/ μ g de DNA, i mai sense superar el 10% del volum final de la reacció. Normalment les digestions s'han efectuat a 37°C (a excepció d'alguns enzims que requerien temperatures concretes), durant 2-16 hores, depenent de l'eficiència de la reacció de digestió i de la quantitat de DNA. Es poden efectuar digestions dobles en el cas que la compatibilitat dels dos enzims ho permeti.

Si no es així, cal efectuar primer una digestió, córrer la mostra en un gel d'agarosa, tallar la banda i purificar-la per realitzar la segona digestió posteriorment.

1.3.3.2. Electroforesis de DNA en gel d'agarosa.

Per validar la integritat d'un DNA, la qualitat d'una digestió i els fragments generats, així com per a la purificació de fragments d'interès, es realitza l'electroforesi en gels d'agarosa no desnaturalitzants de manera que els fragments separats siguin de DNA de doble cadena. La migració d'aquests fragments és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. Juntament amb el DNA d'estudi es carreguen marcadors de pes molecular conegut per tal d'identificar els diferents fragments de DNA.

MATERIALS I REACTIUS

- Cubeta d'electroforesis.
- Font de corrent elèctrica.
- TAE 50X (Tampó Tris-acetat) (2M Tris-base, 1M àcid acètic, 50 mM EDTA). Es guarda a temperatura ambient i s'utilitza a 1X per a córrer el gel.
- Tampó de càrrega 5x (40 mM EDTA, 0,1% SDS, 30% Ficol 400, 0,2% blau de bromofenol). Es guarda a -20°C i s'utilitza a 1X.
- Gel d'agarosa: La concentració d'agarosa varia segons la mida de les bandes de DNA a visualitzar, normalment es prepara l'agarosa a l'1-2% en tampó TAE 1X. Al gel s'hi afegeix bromur d'etidi a una concentració aproximada de 1 µg/ml.
- Marcadors de pes molecular.

METODOLOGIA

1. Les mostres de DNA es preparen amb el tampó de càrrega a una concentració final 1X. Si es vol testar la correcta digestió d'un fragment de DNA, es prepara entre 1-2 µg de mostra carregada i s'intenta que el volum final (DNA, tampó de càrrega i aigua estèril) sigui de 10-12 µl.
2. Es prepara el gel amb agarosa a l'1-2% amb TAE 1X i es fa bullir al microones fins que l'agarosa es dissolgui completament. Es deixa temperar i s'afegeix el bromur d'etidi. Es barreja i es posa a la cubeta on prèviament s'ha posat una pinta.
3. Quan ja ha polimeritzat el gel, es col·loca en la cubeta d'electroforesis, es

cobréis completament de tampó d'electroforesis (TAE 1X), s'extreu la pinta i es carreguen les mostres juntament amb el marcador de pes molecular. La migració es produirà des del pol negatiu al positiu ja que el DNA té càrrega negativa degut a la presència de grups fosfat. Es sotmet el gel a un voltatge que varia entre 60 i 110 V, controlant el front de migració.

4. Finalitzada la migració, les bandes es visualitzen en un trans-il·luminador de llum ultraviolada i se'n fa una fotografia.

1.3.3.3. Purificació del DNA.

Sovint es necessita purificar fragments de DNA digerits de plàsmids o PCRs per tal d'efectuar un clonatge. Per això, primer cal realitzar una electroforesis en gel d'agarosa, i a continuació aïllar la banda d'interès per després purificar-la. Per aconseguir una bona purificació s'ha de carregar una gran quantitat de DNA en el gel (normalment tota la digestió o tota la PCR), ja que una gran part del DNA es perd durant el procés de purificació.

La mostra es deixa migrar suficientment de manera que la banda d'interès estigui prou separada de la resta. Després es talla la banda amb un bisturí, sota la llum ultraviolada, a baixa potència, de manera que es visualitzin els fragments de DNA, i es diposita en un tub eppendorf per a ser purificada.

La purificació del DNA es fa utilitzant el *kit* comercial *High pure PCR product purification kit* (Roche), que es basa en l'acció d'un agent caotrópic que desnaturalitza proteïnes, dissol l'agarosa i promou la unió del DNA de doble cadena (en un rang 100 pb i 48 Kb) a una matriu. El DNA unit a la matriu es renta, eliminant possibles contaminants, i s'elueix amb el tampó que interressi.

MATERIALS I REACTIUS

- Columnes acoblades a tubs de 2 ml.
- Tampó de captura (3M guanidina-tiocianat, 10mM Tris-HCl, 5%etanol (v/v), pH 6,6)
- Tampó de rentat (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5). Cal afegir-hi etanol.
- Aigua Milli-Q o tampó TE.

METODOLOGIA

1. S'afegeixen entre 400-500 µl de tampó de captura (en funció de la mida d'agarosa tallada) i s'incuba a 60°C fins que es dissolgui completament

l'agarosa (10-15 minuts).

2. Es transfereix la mostra a una columna acoblada a un tub de 2 ml i s'incuba durant 1 minut a temperatura ambient.
3. Es centrifuga a 13000 rpm durant 1 minut a temperatura ambient i es retira el sobrenedant.
4. S'afegeixen 500 µl de tampó de rentat i es centrifuga novament a 13000 rpm durant 1 minut.
5. S'efectua un altre rentat de la columna amb 250 µl del mateix tampó i es torna a centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut.
6. S'elimina el sobrenedant i es transfereix la columna a un tub eppendorf de 1,5 ml. S'elueix el DNA purificat amb 50 µl de tampó d'elució o aigua Milli-Q.

1.3.3.4. Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina elimina els grups 5'-fosfat del vector de DNA digerit. D'aquesta manera el vector no es pot religar augmentant l'eficiència de lligació amb l'insert, que té els seus propis grups 5'-fosfat lliures. S'ha utilitzat la fosfatasa alcalina de la casa comercial Roche. S'afegeixen 2 µl de fosfatasa alcalina a un volum total de 50 µl de vector digerit (barreja de vector digerit, enzims de restricció i tampó de digestió) i s'incuba la mostra durant 30 minuts a 37°C. Seguidament es du a terme una electroforesis i una purificació del vector digerit i de l'insert de la mateixa manera que s'explica als apartats anteriors.

1.3.3.5. Lligació.

El procés de lligació és el procés pel qual el vector (digerit, purificat i defosforilat) i l'insert s'uneixen. La reacció de lligació està catalitzada per l'enzim T4-DNA lligasa que catalitza la formació d'un enllaç fosfodiéster entre l'extrem 5' fosfat i el 3' hidroxil en un DNA de doble cadena. Aquesta reacció finalment es transforma en bacteris competents i s'han d'efectuar els següents controls:

Control negatiu de lligació: Transformació del vector digerit sense insert.

Control positiu de transformació: Transformació d'una construcció de DNA coneguda que funciona bé.

Control negatiu de transformació: Es plaquegen bacteris no transformats. Una lligació ha funcionat bé quan creixen moltes més colònies en la lligació problema que en el control negatiu de lligació, i cap en el control negatiu de transformació. L'èxit

d'una lligació depèn de diversos factors que s'han de tenir en compte, com ara la qualitat i la quantitat del DNA utilitzat, la forma dels extrems que han generat els enzims de restricció (millor extrems cohesius que roms), la relació molar entre el vector i l'insert, el grau de fosforilació del vector i el mètode de transformació.

Normalment, el procés de lligació s'efectua en un volum final de 10 µl. La relació insert:vector que s'utilitza és una relació molar i pot variar en funció de la llarga d'ambdós seguint la fórmula:

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times \text{mida insert (kb)}}{\text{mida vector (kb)}} \times \frac{6}{1} = \text{ng insert}$$

Habitualment s'ha utilitzat les següents proporcions: 6 µL d'insert, 2 µL de vector, 1 µL de T4DNA-ligasa (New England Biolabs), i 1 µL de tampó de lligasa 10x.

La reacció es deixa incubar a 4-16°C durant 16 hores i posteriorment es transforma en bacteries electrocompetents, s'extrau el DNA i es comprova per digestió i seqüenciació.

1.3.4. Clonació mitjançant el sistema *Gateway* (Invitrogen).

El sistema *Gateway* d'Invitrogen és un mètode de clonatge basat amb el sistema de recombinació de lloc específic del *fag lambda*. Aquest sistema proporciona una manera més ràpida i eficient de transferir una seqüència de DNA a diferents vectors comparada amb el sistema clàssic de clonatge mitjançant enzims de restricció, degut a que evita els passos de digestió, purificació i lligació optimitzant el temps de clonatge. El sistema permet la transferència d'un insert d'un vector a un altre mitjançant la utilització d'un vector d'entrada, anomenat *Entry Clone*, capaç de recombinar amb tota una gamma de vectors destí, ja siguin d'expressió bacteriana, de mamífer, lentivirals, adenovirals, etc., com es representa de forma esquemàtica en la Figura 19.

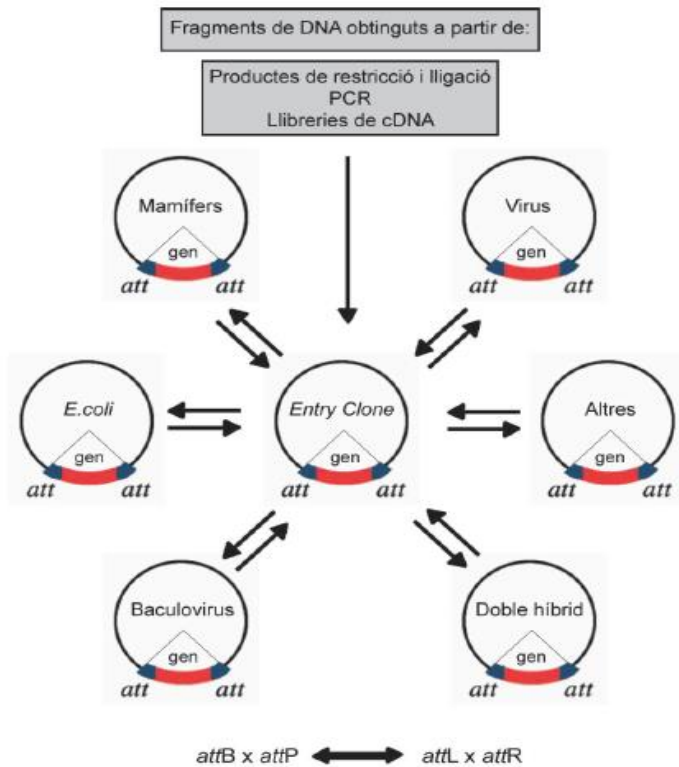


Figura 19. Sistema de recombinació Gateway. Aquest és un sistema de clonació ràpid i senzill amb el que un insert d'interès pot ser clonat per recombinació a qualsevol vector d'expressió a partir d'una construcció intermediària (*entry clone*).

1.3.4.1. Clonatge mitjançant el sistema Gateway simple.

El sistema Gateway està basat en el cicle biològic del *fag lambda* (Landy, 1989) i en el seu sistema de recombinació en *E.coli*. En el *fag lambda* la seqüència de recombinació és *attP* (243 pb), mentre que en *E.coli* és *attB* (25 pb). La reacció d'integració consisteix en la recombinació *attB* x *attP*, mitjançant proteïnes integrasa (Int) del *fag* i el factor d'integració de l'hoste (*Host Integration Factor*, HIF). El resultat d'aquesta reacció són dues noves seqüències de recombinació, *attL* i *attR*, flanquejant el profag recombinat, sense la pèrdua de seqüència de DNA. La reacció pot donar-se de forma inversa durant el procés d'escissió. Quan *attL* i *attR* recombinen (reacció efectuada pel HIF i la proteïna fàgica Escisionasa (Xis)), el λ -DNA s'escindeix del genoma de *E.coli*, regenerant les seqüències *attB* (en *E.coli*) i *attP* (en el *fag*).

Aquesta reacció és específica i bidireccional: $attB \times attP \leftrightarrow attL \times attR$

Seguint el protocol del proveïdor (Invitrogen), el primer pas és dissenyar els *primers* que permetin introduir les seqüències *attB1* i *attB2* als extrems del fragment de DNA d'interès mitjançant una reacció de PCR. Una vegada s'aconsegueix flanquejar el fragment amb les seqüències *atts*, s'efectua la reacció de recombinació entre el

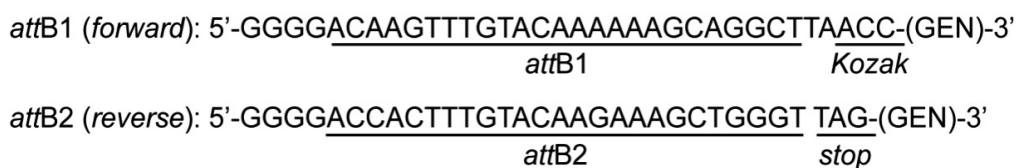
fragment de PCR i un vector donador. Aquest vector donador (en el nostre cas **pDONR221**) conté les seqüències *attP1* i *attP2* i s'utilitza per clonar el producte de PCR que conté el gen d'interès, flanquejat per *attB*, i generar els clons d'entrada o *Entry Clones*. El pDONR conté el gen de resistència a kanamicina i el gen de selecció negativa *ccdB*, el qual interfereix amb la DNA girasa de *E.coli* inhibint el creixement de la majoria de soques de *E.coli* (Bernard and Couturier, 1992).

Un *Entry Clone* (**pENTR**-gen d'interès), generat pel procés de recombinació entre el fragment de PCR i el vector donador (*attB* x *attP*), és un vector resistent a kanamicina, on el gen d'interès (flanquejat per seqüències *attL1* i *attL2*) ha eliminat el gen *ccdB*. Un cop obtingut el clon d'entrada, podem clonar el nostre insert a qualsevol vector destí (pDEST), que presenta resistència a ampicil·lina, conté el gen *ccdB* i presenta les seqüències de recombinació *attR1* i *attR2*.

La recombinació entre el pENTR i el pDEST (*attL* x *attR*) té com a resultat el vector d'expressió desitjat, que conté el nostre gen d'interès flanquejat per unes seqüències de recombinació *attB1* i *attB2* i presenta resistència a ampicil·lina.

1.3.4.2. Reacció *attB* x *attP*. Construcció de clons d'entrada (*Entry Clones*).

El primer pas per la construcció d'un *Entry Clone* consisteix en elaborar les seqüències *attB* que flanquejaran el gen d'interès. Les seqüències dels *primers* utilitzats han sigut les següents:



Les quatre guanines (G) afegides a l'extrem 5' de cada oligonucleòtid augmenten l'eficiència de la recombinasa. S'introdueix la seqüència *attB1* i abans d'introduir el gen d'interès, s'afegeix la seqüència *Kozak* (ACC) abans del codó d'inici del gen (ATG) facilitant el reconeixement de la seqüència d'iniciació (AUG) durant el procés de traducció. Seguidament s'afegeixen entre 18 i 25 pb del gen d'interès. A la seqüència *attB2* s'afegeix un codó d'aturada de la traducció del gen d'interès (*stop*). La reacció de recombinació entre el gen d'interès flanquejat per *attBs* i el pDONR (flanquejat per *attPs*) es du a terme mitjançant l'enzim recombinasa **BP clonasa II**,

obtenint l'*Entry Clone* (*attL1* i *attL2*). En un tub eppendorf de 1,5 ml, es preparen els següents reactius (reacció optimitzada):

Producte de PCR - <i>attB</i> (20-50 fmols)	3µl
pDONR (150ng/µl)	1µl
BP clonase II	1µl

La reacció s'incuba a 25°C entre 2-12 hores i s'atura afegint 0,5 µl de solució de proteïnasa K a 37°C durant 10 minuts. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bacteris DH5α per electroporació i es plaquegen els transformants en plaques de LB-agar que contenen 50 µg/ml de kanamicina. Un cop extret el DNA, aquest es comprova per digestió i seqüenciació.

1.3.4.3. Reacció *attL* x *attR*. Construcció de vectors d'expressió.

La recombinació entre un *Entry Clone*, que conté les seqüències *attL*, i el vector destí, amb seqüències *attR*, es fa mitjançant la **LR clonasa II**. En un tub eppendorf de 1,5 ml es preparen els següents reactius:

Vector Destí	150 ng
Entry clone	150 ng
Aigua Milli-Q	fins a 5 µl de volum final
LR clonasa II	1 µl

La reacció s'incuba a 25°C entre 2-16 hores i s'atura afegint 0,5 µl de proteïnasa K durant 10 minuts a 37°C. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bacteris DH5α per electroporació d'igual forma que amb els *Entry Clones*. Es plaquegen els transformants en plaques de LB-agar que contenen ampil·lina a 100 µg/ml. Els vectors resultants són comprovats per digestió i seqüenciació.

1.3.4.4. Clonatge mitjançant el sistema *Gateway Multisite* de dos fragments.

El sistema Gateway permet construir vectors d'expressió de manera ràpida i eficient a partir de 2, 3 o 4 fragments de DNA gràcies al sistema *Multisite*. Aquesta tecnologia utilitza la recombinació específica de lloc per clonar simultàniament varis fragments de DNA en l'ordre i orientació correctes. S'utilitza l'equip comercial *MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination* (Invitrogen). La diferència entre el sistema *Multisite* i el simple es troba en les seqüències *atts*. Si es vol clonar dos fragments, en un dels fragments de DNA s'introdueix, per PCR, les

seqüències *attB1* i *attB5r* i en l'altre fragment les seqüències *attB5* i *attB2*. Aquests dos fragments de DNA es clonen en els seus vectors donadors pDONR221 P1-P5r i pDONR221 P5-P2 respectivament, per generar dos *Entry Clones* els quals es podran recombinar amb el vector destí d'interès (mitjançant l'enzim **LR clonasa II plus**) generant el vector d'expressió desitjat (**Figura 20**).

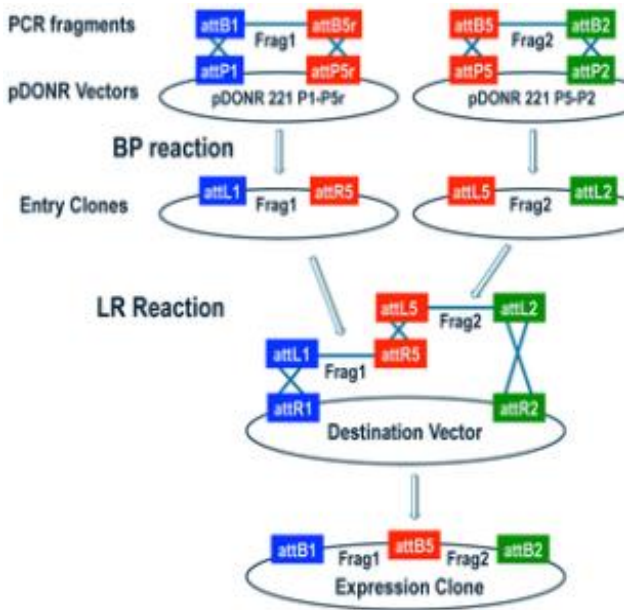


Figura 20. Esquema del sistema de clonació Gateway Multisite. Es pretén clonar el fragment 1 (F1) i el fragment 2 (F2). Mitjançant PCRs es flanquegen els fragments amb els diferents *attBs*, que poden ser recombinats amb els vectors donadors (pDONR) corresponents, per la reacció de la BP clonasa II i així obtenir els respectius Entry Clones. Aquests, es poden recombinar entre ells i amb el vector destí (pDEST) mitjançant la reacció de la LR clonasa II plus. Així s'obté un vector d'expressió amb els dos fragments d'interès en l'ordre i la direcció correctes.

Els primers utilitzats en aquest sistema són:

attB1 (forward): 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACC-(GEN)-3'
attB1 *Kozak*

attB5R (reverse): 5'-GGGGACAAC TTTTGTATACAAAAGTTGT-(GEN)-3'
attB5R

attB5 (forward): 5'-GGGGACAAC TTTTGTATACAAAAGTTGNN-(GEN)-3'
attB5

attB2 (reverse): 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TAG-(GEN)-3'
attB2 *stop*

S'ha de tenir en compte que si es volen clonar 2 fragments de DNA, i aquests són 2 proteïnes, cal treure el codó stop en el primer fragment que s'introdueixen les seqüències *attBs* per PCR, ja que si no és així, l'expressió es quedaria aturada i només s'expressaria una de les dues proteïnes.

La reacció de LR s'ha optimitzat per les següents relacions:

Vector Destí	20 fmols
Entry clone 1	10 fmols
Entry clone 2	10 fmols
TE o aigua MilliQ	5 µl (volum final)
LR clonasa plus	1 µl

On els fmols de DNA es converteixen en ng utilitzant la fórmula:

$$\text{ng} = (\text{x fmols}) (\text{N}) (660 \text{ fg} / \text{fmols}) (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

on x és el número de fmols i N la mida del DNA en parells de bases (pb). La reacció s'incuba a 25°C tota la nit i s'atura afegint 0,5 µl de proteïnasa K, a 37°C durant 10 minuts. Finalment, es transforma 0,5-1 µl de la reacció en bacteris DH5α com en el sistema simple.

1.3.4.5. Utilització del software *Vector NTI* per la construcció virtual de clons.

S'ha utilitzat el programa Vector NTI Advance, proporcionat per Invitrogen, pel disseny virtual de clons mitjançant el sistema Gateway. Aquest programa ofereix la possibilitat d'efectuar disseny de mapes, d'oligonucleòtids que contenen les seqüències *att*, integrar virtualment fins a 4 inserts en un vector, guardar en una base de dades tots els mapes elaborats, predir restriccions, etc.

1.3.5. Generació de miRNAs.

Els microRNAs (miRNA) són unes molècules petites de 20-25 nucleòtids que, igual que el RNA missatger (mRNAs), estan transcrits per gens, però la diferència és que no codifiquen per proteïnes.

La seva funció és la de regular l'expressió gènica, ja sigui prevenint la traducció del mRNA a proteïna o induïnt la degradació del mateix mRNA. S'ha identificat aproximadament 700 miRNAs en el genoma humà i la seva desregulació en l'expressió està implicada en varies malalties.

Els miRNAs es transcriuen a partir d'un gen, d'un intró o d'una regió promotora, mitjançant la RNA polimerasa II, obtenint un miRNA primari (pri-miRNA) de doble cadena i amb una estructura en forma de pinça (*hairpin*). El pri-miRNA és processat al nucli per l'endonucleasa Drosha/Rnasa III que talla les dues cadenes de RNA alliberant un miRNA d'entre 60-70 nucleòtids anomenat pre-miRNA. Aquest pre-

miRNA és transportat al citoplasma on és processat per l'enzim Dicer (RNAsa III, endonucleasa) que talla el RNA de doble cadena generant el miRNA madur. Aquest miRNA madur s'incorpora al complex RISC (Silenciament induït per RNA) on es dirigeix la repressió de l'expressió dels gens per dues vies:

- 1) Si la complementació entre el miRNA i el mRNA és perfecte, el complex RISC talla el mRNA i aquest és degradat.
- 2) Si la complementació no és perfecta, el complex RISC reprimeix la traducció del mRNA. El tall del mRNA no causa cap modificació en el miRNA i això permet que aquest pugui reconduir el complex RISC per reprimir l'expressió d'altres missatgers (Bartel,2004).

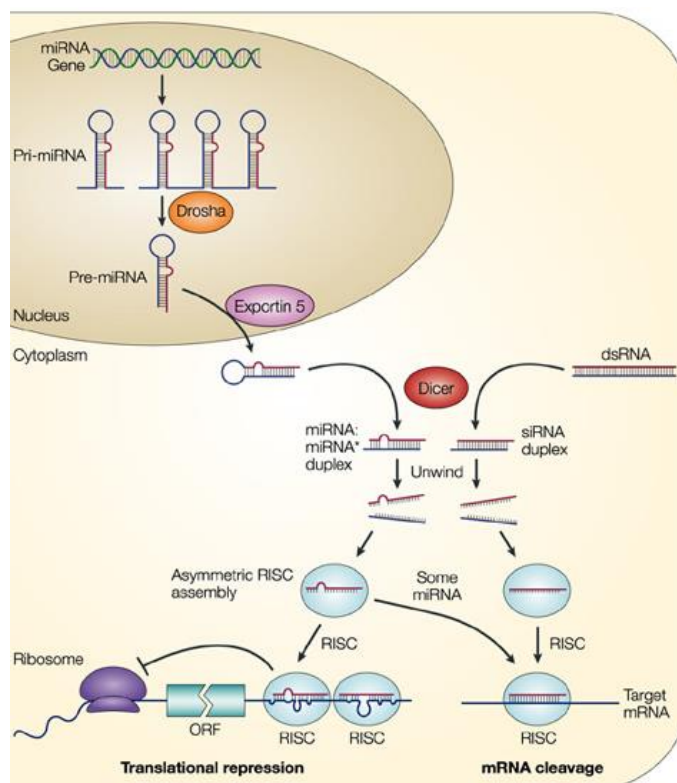


Figura 21. Via de la biogènesi dels miRNA en cèl·lules eucariotes.

Gràcies al seu descobriment i a la importància de la seva funció, s'han generat varies tècniques moleculars per a emprar els microRNAs en la investigació. En aquest treball s'ha utilitzat adenovirus que codifiquen per miRNAs, per a obtenir així models cel·lulars *knock-down* dels gens d'interès.

1.3.5.1. Disseny i construcció d'adenovirus que codifiquen per miRNAs.

En aquesta Tesi s'ha utilitzat el mètode de generació d'adenovirus *Vira-power adenoviral expression system* (Invitrogen) que codifiquen miRNAs obtinguts mitjançant el kit de *Block-it miRNA RNA* (Invitrogen). Els miRNAs es dissenyen *on-line* a la pàgina de *Block-it miR RNA designer* (Invitrogen), on s'introdueix la seqüència del cDNA d'interès i el programa genera 10 possibles miRNAs al llarg de tota la seqüència.

porta la EmGFP (*Emeral Green Fluorescent Protein*) per poder identificar en tot moment les cèl·lules que han incorporat el vector:



METODOLOGIA

1. Es resuspenen els miRNAs amb aigua Mili-Q a una concentració final de 200 μ M i es procedeix a l'anellament dels dos oligonucleòtids per tal d'obtenir el miRNA de doble cadena (ds miRNA) a 50 μ M.

En un tub *ependorf* de 1.5 mL es produeix la reacció d'anellament amb els següents reactius:

Oligonucleòtid <i>top</i> (200 μ M)	5 μ L
Oligonucleòtid <i>bottom</i> (200 μ M)	5 μ L
Tampó d'anellament 10X	2 μ L
<u>Aigua <i>DNase/RNase-free</i></u>	<u>8 μL</u>
Volum total	20 μL

2. S'incuba durant 4 min a 95 °C. Es deixa a temperatura ambient 10 minuts, es barreja i es fa un *spin*. Es fan unes dilucions seriades per tal d'obtenir el miRNA a 10 nM. Per això, en primer lloc es dilueix 1:100 amb aigua *DNase/RNase free* (obtenint una concentració de 500 nM) i seguidament, es dilueix 1:50 amb tampó d'anellament 1X.
3. Es digereix el pENTR-boicot (pDONOR221 modificat on s'ha introduït la EmGFP i una diana *Bsa I* de restricció on es clona els ds miRNA) amb l'enzim *Bsa I* a 50°C durant 1 hora.
4. Es purifica el DNA digerit amb el kit de purificació (Roche).
5. Es quantifica el DNA purificat i es dilueix amb aigua *DNase/RNase free* fins a una concentració de 5ng/5ng/ μ L.
6. Es fa la reacció de lligació entre els ds miRNAs i el vector digerit amb la següent relació:

pENTR-boicot digerit i purificat (5ng/ μ L).	2 μ L
ds miRNA (10mM)	4 μ L
Tampó lligació 5X	4 μ L
Aigua <i>DNase/RNase-free</i>	9 μ L
<u>T4 lligasa (1 U/μL)</u>	<u>1 μL</u>
Volum final	20 μL

S'incuba durant 5 minuts a temperatura ambient i es para la reacció en contacte amb gel.

7. Es transforma 2 μL de la lligació als bacteris DH5 α per electroporació i es plaquegen els transformants en plaques LB-agar que contenen 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina.
8. S'extreu el DNA (*Entry Clone*) de les colònies i es comprova per digestió i seqüenciació.
9. Es procedeix a la recombinació de l'*Entry Clone* amb el vector destí pAdv-CMV/V5-DEST mitjançant l'enzim LR clonasa II.

1.4. OBTENCIÓ DE RNA MISSATGER.

1.4.1. Normes generals en la manipulació del RNA.

Per la correcta manipulació del RNA és necessari recórrer a tractaments especials, ja que és una molècula fàcilment degradable. Tant la manipulació com les solucions que s'utilitzen han d'estar lliures de la presència de RNAses. Per això, és cal seguir algunes mesures quan s'hi treballa:

1. La manipulació ha d'efectuar-se amb guants, ja que les mans són una font molt important de RNAses.
2. El material de vidre ha d'estar tractat a 200°C durant un temps mínim de 4 hores.
3. El material de plàstic utilitzat ha d'autoclavar-se durant 20 minuts a 1 atmosfera de pressió i ha de ser manipulat sempre amb guants.
4. Els stocks dels reactius utilitzats han de ser lliures de RNAses.
5. Cal pesar els reactius directament sobre recipients lliures de RNAses. En cas que el reactiu sigui susceptible a ser autoclavat, ha de ser diluït en aigua Milli-Q i posteriorment autoclavat, el qual farà eliminar les RNAses. En cas que la mostra no es pugui autoclavar, s'ha de tractar amb aigua DEPC.
6. Les electroforesis s'han d'efectuar en cubetes prèviament tractades amb etanol i reservades exclusivament per experiments amb RNA.

1.4.2. Construcció de RNA missatger transcrit *in vitro*.

Per poder realitzar estudis amb oòcits de *Xenopus*, s'ha hagut de preparar RNA missatger a partir del DNA dels gens d'interès. Per això s'ha construït els diferents gens d'interès en vectors d'expressió adequats per poder generar el cRNA. El vector

utilitzat majoritàriament ha sigut el vector d'expressió pCSDEST, que pot ser linealitzat amb un enzim de restricció deixant lliure el promotor SP6 a 5' del gen que s'ha clonat. Llavors, utilitzant la polimerasa SP6 i l'equip de transcripció *mMESSAGE mMACHINE* (Ambion), es pot generar aquest RNA missatger que serà injectat als oòcits de *Xenopus* per expressar les proteïnes d'interès.

MATERIALS I MÈTODES

- Reactius de transcripció i polimerasa SP6 del *kit mMESSAGE mMACHINE* (Ambion).
- Aigua DEPC.
- Etanol al 70% i al 95% en aigua DEPC.

METODOLOGIA

1. Digerir 10µg de les construccions generades amb el vector pCSDEST amb l'enzim de restricció Not I per linealitzar-les.
2. Córrer les construccions linealitzades en un gel d'agarosa mitjançant una electroforesis i posteriorment purificar-les.
3. Transcripció *in vitro*: En un tub *ependorf* estèril lliure de RNAses es munta la reacció de transcripció amb els elements del *kit* i el DND purificat, seguint el següent ordre:

2X NTP/CAP	5 µL
DNA purificat	3 µL
Tampó 10X	1 µL
<i>Enzime mix</i> (SP6 polimerasa)	1 µL

La reacció s'incuba 2 hores a 37°C.

4. S'addiciona 0.5 µL de Turbo DNAsa i s'incuba durant 15 minuts a 37°C.
5. S'addiciona 40 µL d'aigua DEPC i 30 µL de la solució de precipitació de LiCl i s'incuba durant tota la nit (12-16 hores) a -80°C. A partir d'aquest punt les mostres de RNA sempre hauran d'estar en gel.
6. Es descongelen les mostres en gel i es centrifuguen a 13000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
7. S'elimina el sobrenedant amb molt de compte de no emportar-se el *pellet* de RNA (es sol utilitzar una agulla d'insulina per aspirar el sobrenedant).
8. Es renta el *pellet* amb 1 mL d'etanol al 70% en aigua DEPC i es centrifuga 20

minuts a 13000 rpm a 4°C.

9. Es descarta el sobrenedant i s'asseca el *pellet*, mantenint l'*ependorff* obert a temperatura ambient durant 10-15 minuts.
10. S'addiciona 12 µL d'aigua DEPC i es resuspén el *pellet* amb una pipeta.
11. Finalment s'utilitza 0.5-1 µL de la mostra per quantificar el rRNA i 0.5-1 µL per córrer un gel d'agarosa per verificar la integritat del DNA.

La quantificació de la mostra s'efectua mitjançant el *Nano-Drop*, com es descriu en l'apartat 1.2.3., tenint en compte que 1 unitat d'absorbància correspon a 40 µg/mL de RNA. S'utilitza aigua dEPC com a mostra "blanc" i per calibrar l'aparell.

La verificació de la integritat del RNA es du a terme mitjançant un gel d'agarosa al 1% on es corren exclusivament mostres de RNA. La qualitat és major quan més nítides i discretes s'observin les bandes en el gel. Un RNA degradat es visualitza com una taca continua al llarg de tot el carril (*smear*).

2. TÈCNiques DE BIOLOGIA DE PROTEÏNES.

2.1. OBTENCIÓ DE LA PROTEÏNA TOTAL.

2.1.1 Obtenció de la proteïna total a partir de cèl·lules.

Per tal de poder realitzar un correcte anàlisi, de les proteïnes d'interés, en alguns dels experiments d'aquesta tesi s'han hagut d'obtenir proteïna i posteriorment quantificar-la degudament.

MATERIALS I REACTIUS

- PBS 1x
- Tampó de lisi : PBS 1x, 1% Tritó X-100, inhibidors de proteases (Aprotinina i PMSF a 1mM, Leupeptina i Pepstatina a 2µM) i NaCl 150mM.

METODOLOGIA

La solubilització de proteïnes pot fer-se en condicions desnaturalitzants, amb detergents iònics, com per exemple el SDS, que trenquen unions covalents, o bé poden fer-se en condicions no desnaturalitzants, amb detergents no iònics com el Tritó X-100, Tween-20, digitonina, etc., que són capaços de mantenir diferents

unions no covalents.

La **solubilització d'extractes cel·lulars** es fa en fred per evitar la desnaturalització de les proteïnes. Es pot fer directament a la placa de cultiu o en un pellet cel·lular.

Solubilització en placa de cultiu

1. Es renten les cèl·lules 2 cops amb PBS 1x per eliminar l'excés del medi de cultiu i s'hi afegeixi a sobre el tampó de lisi (a 4°C, en gel). El volum de tampó de lisi utilitzat varia en funció del número de cèl·lules que hi ha, el qual depèn de la superfície o del diàmetre de la placa de cultiu on han sigut cultivades. Així, les cèl·lules procedents d'una placa de 100 mm de diàmetre són lisades amb 0,8-1 ml de tampó de lisi. En canvi, cèl·lules cultivades en un pou d'una placa multipou de 6 pous són lisades amb 100-124 µl de tampó. Es raspa les cèl·lules mitjançant un raspador. Es resuspenen bé amb l'ajut d'una pipeta i es transfereixen a un tub eppendorf.
2. S'incuba la mostra durant 1 hora a 4°C en agitació orbital.
3. Es centrifuga el lisat a 13000 rpm durant 10 minuts a 4°C i es recull el sobrenedant, el qual correspon a la fracció de proteïna soluble.
4. Es valora la concentració de proteïna (apartat 2.1.2.).

Solubilització en *pellet* cel·lular

1. Es retira el medi de cultiu de les cèl·lules de cada placa de cultiu i es renten amb PBS 1X. El volum de PBS 1X depenent del tipus de placa utilitzada.
2. Amb un raspador estèril, es desenganxen les cèl·lules immerses en el PBS 1X i es passen a un tub falcon de 15 ml.
3. Es centrifuga el tub a 2500 rpm durant 5 minuts a 4°C i s'aspira el sobrenedant per quedar-se amb un pellet cel·lular. Aquest pellet pot ser congelat i guardat a -20°C per ser processat en un altre moment o bé, pot lisar-se amb tampó de lisi per procedir amb la solubilització de la mateixa manera que s'ha explicat anteriorment.

2.1.2. Determinació de la concentració proteica. Mètode de BCA.

Després de l'extracció o la purificació de proteïnes, és necessari conèixer la seva concentració, no només per avaluar el rendiment de l'extracció, sinó també per establir un correcte anàlisi dels experiments efectuats amb aquestes proteïnes. El mètode de valoració de la concentració de proteïnes utilitzat ens aquest treball ha estat el mètode de BCA.

És convenient valorar les mostres solubilitzades amb detergent pel mètode de BCA. El mètode de l'àcid bicinconínic (BCA) (*Protein Assay Reagent*, 23225) s'ha realitzat seguint les especificacions del fabricant (Pierce). Aquest mètode es basa en la propietat que tenen els enllaços peptídics en solució alcalina de reduir el Cu^{2+} . Els ions Cu^+ produïts s'uneixen a dues molècules de BCA produint un canvi en l'estructura electrònica de la molècula, fet que provoca que absorbeixi llum a 562 nm formant un compost de color porpra. En les condicions de la reacció, l'absorció del compost és proporcional a la concentració de proteïna present. No són compatibles amb aquest mètode mostres que continguin més de 100 mM de EDTA, 1 mM DTT o 20% de NH_3SO_4 .

MATERIALS I REACTIUS

- Placa ELISA de 96 pous
- Lector ELISA (Biotek)
- Solució comercial (Pierce): Reactiu A (BCA, en condicions alcalines) i Reactiu B (4% de sulfat de coure). La barreja s'efectua a una ràtio de 50 ml de reactiu A per cada ml de reactiu B.
- Solució *stock* d'albumina bovina (BSA) a 2 mg/ml en tampó fosfat (Na_2HPO_4 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM) pH 7,4, conservada a temperatura ambient.

METODOLOGIA

1. En els primers pous de la placa ELISA, es preparen els punts necessaris per fer la recta patró per duplicat (0, 0.5, 1, 2 i 5 mg de proteïna BSA) en un volum final de 10 μl amb aigua Milli-Q.
2. En els següents pous, es preparen dues repliques d'entre 1 i 5 μL de cada mostra en un volum final de 10 μL amb aigua Mili-Q.
3. S'afegeixen 200 μl per pou del reactiu de BCA comercial (Pierce). En aquest cas, s'ha de deixar reaccionar el reactiu amb les mostres durant 15-20 min a 37°C. Finalment, es procedeix a la lectura mitjançant el lector d'ELISA a 595 nm.

2.2. TÈCNiques D'ELECTROFORESI DE PROTEÏNES.

2.2.1. Assaig de Western Blot (WB).

El Western-Blot és una tècnica àmpliament utilitzada en biologia molecular, ja que

permet detectar de manera específica proteïnes a partir de mostres biològiques. Aquesta tècnica aporta informació sobre la mida de les proteïnes, així com de moltes característiques bioquímiques (oligomerització, fosforilació, glicosilació i altres característiques que influeixen en la migració electroforètica).

El procés es porta a terme seguint diferents etapes:

1. Electroforesi SDS-PAGE.
2. Transferència.
3. Immunodetecció.

1) Electroforesi SDS-PAGE

L'electroforesi en gels desnaturalitzadors d'acrilamida-SDS és un sistema clàssic que s'utilitza per separar proteïnes en funció del seu pes molecular. El mètode es basa en què les proteïnes contingudes en una solució de SDS (detergent aniònic) són capaces de migrar sota un camp elèctric. L'SDS dona a les proteïnes càrrega negativa, mantenint la relació càrrega/massa, que permet la seva separació en migrar sobre una malla de polímer (acrilamida/ bisacrilamida) en aplicar un camp elèctric.

El gel de poliacrilamida consta de dues parts: un gel concentrador (*stacking*) que permet alinear les proteïnes prèviament a la separació electroforètica, i un gel separador (*running*). La concentració de acrilamida/bisacrilamida del gel separador varia segons el pes de la proteïna a detectar, Així, la separació de proteïnes amb un pes molecular menor serà més eficient en gels més concentrats i viceversa.

Juntament amb la mostra problema, es fan migrar estàndards de pes molecular conegut i pretenyits com a marcadors per conèixer la mida de la proteïna problema.

MATERIALS I REACTIUS

- Extractes de proteïna total o de membrana a partir de cèl·lules o teixit en un tampó de càrrega.
- Sistema de Western-Blot *Mini-Protean* (BioRad).
- Font de corrent elèctrica.
- Tampó d'electroforesi 10X (Tris base 250 mM; glicina 1,92 M; SDS 1%). S'utilitza a 1X.
- Tampó de càrrega de les mostres LSB 4X (Per 40 ml: 8 ml Tris-HCl 2 M, pH 6,8; 32 ml glicerol; 3,2 g SDS; 160 µl de blau de bromofenol). S'utilitza a 1X.

- Solució gel separador (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS).
- Solució gel concentrador (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS).
- Acrilamida/Bisacrilamida 40% (37,5:1) (BioRad).
- APS (Persulfat d'amoni 10% en aigua).
- TEMED.
- Estàndards de pes molecular pretenyits (BioRad o Fermentas).

METODOLOGIA

1. Preparació de les mostres. En un tub eppendorf es prepara la quantitat de proteïna desitjada (entre 1 i 100 µg per mostra), a la que s'afegeix el tampó de càrrega LSB perquè quedi una concentració final de 1X. Les mostres s'escalfen en un termoagitador i la temperatura dependrà del tipus de proteïna a immunodetectar. Per proteïnes de membrana, les mostres es processen a 60°C durant 2-5 minuts per evitar que es formin agregats. En canvi, per proteïnes citosòliques, les mostres es processen a 95°C durant 5 minuts. Es fa un spin a les mostres i ja es poden carregar en el sistema d'electroforesi.
2. Polimerització del gel. Prèviament al muntatge del sistema d'electroforesi, es neteja amb etanol totes les peces que estan en contacte amb les proteïnes. El sistema es munta segons les indicacions del fabricant (BioRad). L'APS i el TEMED són els últims reactius que s'afegeixen a la solució dels gels. En la següent taula es mostren les relacions dels diferents reactius pels diferents percentatges dels gels d'acrilamida.

SEPARADOR (2 gels 1,5 mm, 20 ml)	7,5%	10%	12%	15%	CONCENTRADOR (2 gels 1,5 mm, 20 ml)	4%
Acrilamida 40%	3,8 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml	Acrilamida 40%	1 ml
Sol. separació	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	Sol. concentració	2,5 ml
Aigua	11 ml	9,8 ml	8,8 ml	7,3 ml	Aigua	6,5 ml
APS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	APS	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	TEMED	20 µl

La solució es barreja lleugerament per inversió i es diposita lentament entre els vidres del sistema, vigilant que no es formin bombolles. El gel separador ha d'ocupar les tres quarts parts inferiors del sistema. Abans de la polimerització, s'afegeix una capa d'isopropanol a la part superior del gel perquè el límit superior sigui recte. Un cop polimeritzat el gel separador, es decanta l'isopropanol, es renta amb aigua i es diposita el gel concentrador. Ràpidament es col·loca la pinta, abans que es produeixi la polimerització del gel

concentrador. A continuació es munta el sistema de vidres amb els gels polimeritzats a la cubeta d'electroforesi, que s'omple de solució d'electroforesi 1X, de manera que hi hagi continuïtat elèctrica.

3. Migració del gel. S'extreu la pinta i es carreguen les mostres. Es tanca el circuit amb la tapa de la cubeta i es connecta a una font d'alimentació a un voltatge constant de 100-140 V, fins que el marcador de pes molecular s'hagi separat suficientment per poder detectar la proteïna d'interès.

2) Transferència.

Un cop finalitzada la separació electroforètica, les proteïnes són electrotransferides a una membrana porosa de fluorur de polivinilidè (PVDF) de manera que quedin immobilitzades, permetent la posterior immunodetecció.

MATERIALS I REACTIUS

- Cubeta de transferència, amb els cassets de transferència i esponges corresponents (Sistema de Western-Blot *MiniProtean* de BioRad).
- Paper Whatmann 3mm (dos rectangles per cada gel, de la mateixa mida que el gel separador).
- Membrana Immobilon-P (Millipore) (un rectangle de membrana de transferència per cada gel, de la mateixa mida que el gel separador).
- Tampó de transferència 10X (250 mM Tris base; 1,92 M glicina, pH 8,3) S'utilitza 1X + 20% metanol (v/v). El mateix tampó s'utilitza pel muntatge dels cassets.
- Aigua destil·lada.
- Metanol.

METODOLOGIA

1. Primer, cal hidratar la membrana de manera que sigui receptiva a immobilitzar proteïnes. Primer s'ha de submergir la membrana en una cubeta amb metanol absolut durant 5 minuts. A continuació, canviem a aigua destil·lada i ho deixem durant 5 minuts més i finalment es deixa equilibrar amb tampó de transferència.
2. Mentre s'esta hidratant la membrana preparem els cassets de transferència, les esponges i els papers Whatmann. Es submergeixen en tampó de transferència durant uns minuts. Es col·loca el casset obert amb la cara fosca al fons. A continuació, sobre la cara fosca es col·loca per aquest ordre, una de les esponges, un paper Whatmann i el gel separador (al que se li ha tret el gel

concentrador prèviament). Posteriorment es col·loca la membrana de manera que no es formin bombolles entre el gel i la membrana, ja que impedeixen la transferència proteica. Sobre la membrana es col·loca l'altre paper Whatmann i una altra esponja i es procedeix a tancar el sandwich. Aquesta disposició permet un flux del tampó seguint el camp elèctric, des del gel cap a la membrana, transferint-hi les proteïnes immobilitzades en el gel.

3. Es col·loca el casset en la cubeta de transferència de manera que el costat fosc coincideixi amb el pol negatiu dels elèctrodes ja que les proteïnes es transferiran en aquella direcció. Finalment s'omple la cubeta amb tampó de transferència. També s'hi diposita una placa de gel per evitar el sobreescalfament del sistema. El temps de transferència depèn de la mida de la proteïna; així, quant més gran és el pes molecular de la proteïna, més temps de transferència s'ha d'aplicar. Generalment s'ha transferit a 250 mA durant 100 minuts o més, o tota la nit a 35 V a 4°C.

3) Immunodetecció.

Quan ha passat el temps de la transferència es procedeix a la detecció de la proteïna d'estudi immobilitzada sobre la membrana, mitjançant anticossos específics. Durant aquest treball s'han realitzat WBs contra diferents proteïnes utilitzant anticossos policlonals i monoclonals que es descriuràn en cada apartat dels resultats.

MATERIALS I REACTIUS

- Solució de Ponceau (Àcid acètic 5% en aigua (v/v); ponceau 0,1%).
- Solució de bloqueig (5% de llet desnatada en pols en TTBS 1X, o 5% BSA en TTBS1X).
- Anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig.
- Anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave (HRP)
- Solució de rentat TTBS 1X (TBS 1X; 0,1% Tritó X-100).
- Reactiu ECL pel revelat (veure annex de solucions).
- *Hyperfilms* (Amersham) i casset de revelat.

METODOLOGIA

1. Les membranes de la transferència són dipositades en una cubeta amb solució

de Ponceau que tenyirà les proteïnes. Així es pot comprovar que la transferència ha funcionat bé i s'observa si han quedat bombolles. La membrana es destenyeix amb la mateixa solució de transferència.

2. Bloqueig de la membrana. És necessari bloquejar la membrana per evitar interaccions inespecífiques dels anticossos a les proteïnes electrotransferides. La membrana es preincuba durant 60 minuts i en agitació amb una solució rica en proteïnes (llet, en aquest cas), que s'unirà als llocs d'interacció inespecífica.
3. Incubació amb anticòs primari. L'anticòs primari s'ha de diluir en solució de bloqueig per tal d'establir certa competència entre les proteïnes de la llet (unions inespecífiques) i l'anticòs (unions específiques), de manera que l'anticòs no tingui cap altra possibilitat que la d'unir-se a la proteïna a la que està dirigit. La incubació es realitza en una bossa de plàstic Glad segellada que conté la membrana bloquejada i la solució d'incubació amb l'anticòs primari (1 ml). Es manté en agitació orbital suau durant 60 minuts a temperatura ambient o durant 16 hores a 4°C.
4. Rentat. Per tal de retirar d'eliminar les unions inespecífiques, s'efectuen tres rentats de 10 minuts amb la solució de rentat en agitació suau, a temperatura ambient.
5. Incubació amb anticòs secundari. Per detectar les unions específiques de l'anticòs primari amb la proteïna d'estudi, la membrana s'incuba amb anticossos específics per als dominis Fc de les immunoglobulines G, conjugats a l'enzim peroxidasa. Això permet detectar la interacció mitjançant una reacció hidrolítica que genera llum. L'anticòs secundari es dilueix també en solució de bloqueig (1:10000) i s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient en agitació i tapat de la llum. Posteriorment, es tornen a efectuar tres rentats de 10 minuts en agitació amb la solució de rentat.
6. Revelat. El revelat es fa incubant la membrana amb una solució que conté luminol, compost que en ser hidrolitzat per la peroxidasa genera llum. Aquesta llum es detecta mitjançant l'exposició de la membrana sobre un film fotogràfic. S'incuba la membrana amb la solució de ECL durant 1 minut i es retira l'excés. El revelat es fa en una cambra fosca amb l'ajuda d'un casset de revelat, efectuant exposicions a diferents temps sobre el paper fotogràfic *hyperfilm* d'alta sensibilitat. Els films es revelen en un aparell de revelat fotogràfic (Fujifilm).
7. En els casos que es requereixi una quantificació de les bandes obtingudes,

s'escaneja el paper fotogràfic i s'utilitzen els softwares informàtics *ImageJ* i *MultiGauge* (Fujifilm) per obtenir els valors d'intensitat de les bandes.

2.2.2. Tinció amb blau de Coomassie.

És una tècnica emprada per a detectar les proteïnes separades pels gels de poliacrilamida. Aquest mètode permet detectar fins a uns 0.5 µg de proteïna i és quantitatiu fins a uns 15 µg. Es tenyeix el gel durant 1 hora amb una solució de tinció (45% metanol, 10% àcid acètic glacial, 45% aigua bidestil·lada i 0.1% p/v Brilliant blue R, Sigma). Seguidament es destenyeix amb solució de destinció (7.5% àcid acètic glacial, 7.5% isopropanol en aigua bidestil·lada), canviant la solució unes quantes vegades fins que el fons del gel és transparent.

2.3 OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS

Al llarg d'aquesta tesi s'han anat generant diferents eines necessàries per a la recerca de la fisiopatologia MLC. Una de les més importants és la generació d'anticossos contra les proteïnes d'interès. En aquesta tesi s'ha generat i posteriorment purificat l'anticòs contra CIC-2.

A través dels serveis de l'empresa *EUROGENTEC*, es van immunitzar dos conills per a l'obtenció d'un anticòs contra la proteïna CIC-2 de rata. Primer es va dissenyar un pèptid sintètic corresponent a la regió C-terminal de la proteïna, i per predicció informàtica es va seleccionar una regió amb un nivell alt d'antigenicitat i que no mostrava homologia amb altres proteïnes. El pèptid que es va seleccionar és el següent: H₂N-CHGLPREGTPSDSDDKSQ-COOH i correspon al aminoàcid 890 de la proteïna. Es van realitzar 3 injeccions a cada animal i posteriorment es van obtenir els sangrats de cada un dels conills. Aquests es van testar per WB en extractes cel·lulars on s'hi havia transfectat el plàsmid CIC-2 flag. Com a control negatiu es van utilitzar els sèrum pre-immunes. Finalment, es va escollir el sèrum on es detectava millor la proteïna i es van purificar les immunoglobulines G (IgG) per afinitat utilitzant el corresponent pèptid.

2.3.1. Purificació de IgGs mitjançant afinitat per el pèptid.

Les IgGs amb major senyal es van seleccionar i es van purificar per afinitat amb el pèptid. El pèptid amb el que va ser immunitzat l'animal del qual es va obtenir el sèrum tenia una cisteïna reduïda. El seu grup sulfidril era capaç d'acoplar-se

covalentment a una resina *SulfoLink* (Pierce), la qual permetia la purificació de l'anticòs a partir a través d'aquesta columna d'afinitat. Mitjançant una activació iode-acetil, el pèptid tindrà la capacitat d'unir-se covalentment i de manera estable a la resina. Després de bloquejar els llocs d'unió inespecífics, es va incubar la columna amb el sèrum. D'aquesta manera, només els anticossos capaços de reconeixer el pèptid específicament s'unirien a la resina de la columna amb el pèptid acoblat. Finalment, aquests anticossos purificats s'elueixen de la columna amb una solució de pH àcid (2,5).

MATERIALS I REACTIUS

- Columna de cromatografia *Bio-Rad* de polipropilè de 10 ml de capacitat.
- Reïna d'acoplament *Sulfolink* (Pierce).
- Tampó d'acoplament 5X (Tris-HCl 250mM, EDTA 25mM, pH 8,5).
- Solució de bloqueig (Cisteïna 50mM en tampó d'acoplament 1x).
- Solució de rentat (NaCl 1M).
- Solució de manteniment (PBS, NaN_3 1mM).
- TBS 1X
- PBS 1X
- Tris 1m pH 9
- Tampó de neutralització (Tris 1M, NaCl 2M, pH 8,5).
- Tampó d'elució (Glicinia 100mM, pH 2,5).
- Sèrum amb IgGs

METODOLOGIA

A) Acoplament del pèptid a la columna.

1. Es prepara 1mg de pèptid (proporcionat per la casa comercial) en 200 μl d'aigua Milli-Q i 50 μl de tampó d'acoplament 5X. Cal barrejar-los fins aconseguir una completa homogenització. Es guarda una mostra de 10 μl i es rotula com a "pèptid abans de l'acoblament".
2. S'addicionen 2 ml de reïna *Sulfolink* en la columna *Bio-Rad* i s'equilibra amb 12 ml de tampó d'acoblament 1X (és important que la columna no es quedi seca).
3. Després d'equilibrar la columna, s'aplica la barreja del pèptid (250 μl) i 2 ml de tampó d'acoblament 1X. Es tapa la columna i s'homogenitza bé la barreja. S'incuba durant 2 hores en un orbital a temperatura ambient.

4. Es deixa caure la barreja per gravetat i es recull una altra petita mostra que es rotula com "pèptid després de l'acoblament". Es mesura la concentració de les dos mostres a 280 nm. La comparació ens donarà una idea de la quantitat de pèptid que ha quedat unit a la columna. Si s'observa que el percentatge d'acoblament és baix es deixa més temps la incubació.
5. S'aplica a la columna 2 ml de solució de bloqueig i s'incuba durant 15 minuts en agitació en l'orbital a temperatura ambient i després 30 minuts més però sense agitació aquest cop.
6. Es deixa caure la solució de bloqueig i seguidament es fan dos rentats de la columna amb NaCl 1 M. A partir d'aquest pas, el pèptid es troba acoblat a la columna cromatogràfica. Aquesta columna es podrà reutilitzar en el futur per a purificar més anticòs.
7. Cal guardar la columna amb NaN_3 NaCl 1M, ben tapada i a 4°C.

B) Purificació del sèrum per afinitat

1. Es prepara una dilució del sèrum en TBS 1X a una relació 1:1 (4 ml de sèrum en 4 ml de TBS 1X). Si es vol augmentar l'eficiència de purificació es pot canviar la relació. El pH ha d'estar ajustat a pH 8,5 amb Tris 1M pH 9.
2. La columna activada amb el pèptid es neteja dues vegades amb TBS 1X i s'incuba amb la barreja de sèrum i TBS 1X durant 3-4 hores en un orbital a temperatura ambient.
3. Passat el temps d'incubació, s'elueix la barreja per gravetat i es neteja la columna dues vegades amb PBS 1X i un tercer cop amb PBS 0,1X.
4. Per a l'elució de la columna de s'addiciona glicina 100 mM pH 2,5. Es recull l'eluit en 16 fraccions de 200 μl en eppendorfs on prèviament s'hi ha afegit 20 μl de solució Tris 1M, NaCl 2M, pH 8,5 (10X), amb la finalitat de neutralitzar el pH àcid de la mostra. Per tant, s'afegeixen 200 μl de glicina i es recullen les fraccions de manera continuada.
5. Quan es tinguin recollides totes la fraccions, la columna es neteja amb solució de rentat i finalment amb la solució de NaN_3 NaCl 1M. Es guarda amb uns 4 ml d'aquesta mateixa solució a 4°C.

Les fraccions van ser diluïdes 1/100 en llet al 5% en PBS 1X i provades per WB. Es va utilitzar com a control positiu l'anticòs Flag a dilució 1/500. Finalment es van barrejar les fraccions amb major intensitat de senyal.

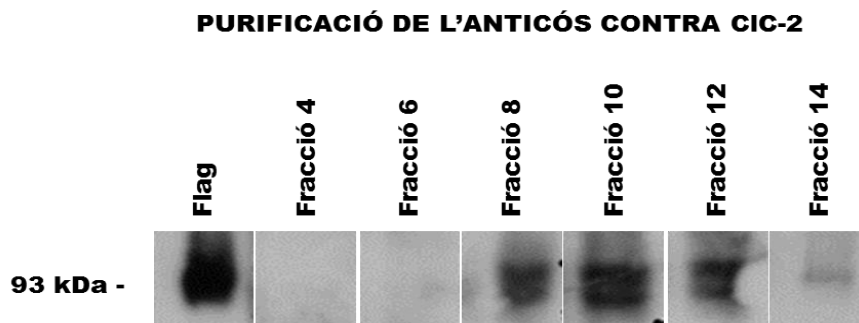


Figura 22. Purificació de l'anticós contra la regió C-terminal de la proteïna CIC-2 de rata. Anàlisi per Western blot dalgunes fraccions purificades prèviament a partir del mètode d'afinitat pel pèptid. S'utilitza com a control cèl·lules HEK 293 no transfectades o transfectades amb el plàsmid CIC2-Flag (50µg de proteïna). A partir de la fracció 8 es detecta la banda corresponent a la proteïna (93 kDa) amb major intensitat.

2.4. IMMUNOCITOQUÍMICA.

Durant aquesta Tesi s'han realitzat estudis immunocitoquímics en cèl·lules HeLa i en cultius primaris d'astròcits. S'ha estudiat la localització de les proteïnes MLC1, GlialCAM i CIC-2 ens els diferents tipus de cultius, així com proteïnes marcadores d'unions en astròcits i de transport d'ions en el model *knock-down* de CIC-2.

MATERIALS I REACTIUS

- Cultiu cel·lular en cobreobjectes.
- Placa de cultiu de 24 pous.
- Pinceres de cirurgia de precisió.
- Portaobjectes.
- PBS 1X estèril.
- Paraformaldehid (PFA) 3% en PBS 1X.
- Solucions d'autofluorescència (NH₄Cl 50 mM en PBS 1X; i Glicina 20 mM en PBS1X).
- Solució de permeabilització (PBS 1X; 0,1% Tritó X-100).
- Solució de bloqueig (PBS 1X; 10% FBS).
- Solució de bloqueig + permeabilització (PBS 1X; 10% FBS; 0,1% Tritó X-100).
- Anticossos primaris i secundaris.
- Medi de muntatge *Vectashield* (Vector).
- DAPI (150 ng/ml)

METODOLOGIA

1. Es retira el medi de les plaques de cultiu i es fan tres rentats amb PBS 1X.
2. Es fixen les cèl·lules amb PFA 3% en PBS durant 15-20 minuts a temperatura ambient.
3. Es fan tres rentats ràpids amb PBS 1X per tal d'eliminar l'excés de PFA. Si no es realitza la immunocitoquímica al moment, es poden guardar els cobreobjectes fixats a 4°C en PBS 1X + 0,05% NaN₃, per tal d'evitar possibles contaminacions.
4. Es depositen els cobreobjectes en una placa de 24 pous amb la cara que conté les cèl·lules cap amunt i s'hi afegeix PBS 1X. És important no deixar els cobreobjectes secs.
5. Per tal d'eliminar l'autofluorescència de les cèl·lules, s'incuben en una solució NH₄Cl 50 mM durant 10 minuts, i seguidament en una solució de glicina 20 mM, 10 minuts més.
6. A continuació, es permeabilitza la mostra amb la solució de permeabilització durant 10 minuts a temperatura ambient. (*)
(*) Si la immunocitoquímica que es vol dur a terme no requereix permeabilització, les cèl·lules s'incuben directament en la solució de bloqueig (sense detergent). Tanmateix, si les cèl·lules han de permeabilitzar-se, es pot dur a terme la permeabilització i el bloqueig conjuntament amb la solució de bloqueig + permeabilització. En algunes ocasions, en funció de l'anticòs s'ha procedit a bloquejar amb BSA enlloc de FBS.
7. S'efectua el bloqueig amb la solució de bloqueig durant 1-2 hores a temperatura ambient.
8. Es preparen els anticossos primaris a la dilució corresponent en la solució de bloqueig + permeabilització. És recomanable centrifugar l'anticòs per evitar l'agregació de les immunoglobulines. S'incuben els cobreobjectes amb la solució que conté l'anticòs primari dipositant 50 µl de la mateixa sobre un fragment de parafilm fixat sobre una superfície plana.
Amb l'ajuda d'unes pinces de precisió, es col·loquen els cobreobjectes sobre les gotes, posant en contacte les cèl·lules amb la solució d'anticòs. La incubació es pot fer durant 1 hora a temperatura ambient o durant 12 hores a 4°C col·locant els cobreobjectes dins d'una cambra humida per evitar que la gota pugui evaporar-se.
9. Després de la incubació amb l'anticòs primari s'han d'efectuar rentats. Per això,

es tornen a passar els cobreobjectes a la placa de 24 pous amb les cèl·lules cara amunt. Si la incubació amb l'anticòs primari ha sigut durant 12 hores a 4°C, els cobreobjectes s'han de temperar durant 15 minuts a temperatura ambient abans de procedir amb els rentats. S'efectuen 3 rentats de 10 minuts amb solució de bloqueig + permeabilització, per eliminar l'excés d'anticòs primari.

10. Es prepara l'anticòs secundari marcat amb un fluorocrom en la solució de bloqueig + permeabilització a una dilució 1/500. A partir d'aquest moment, es mantenen les mostres sempre protegides de la llum. Es realitza una incubació de 2 hores a temperatura ambient.
11. Es realitzen 1 rentat amb solució de permeabilització i després 3 rentats amb PBS1X de 10 minuts cada un a temperatura ambient.
12. Es procedeix a muntar els cobreobjectes sobre un portaobjectes de vidre, on s'hi afegeix una gota del medi de muntatge *Vectashield*, generalment amb DAPI (1,5 µg/ml), el qual emet en la longitud d'ona de la llum ultraviolada. Les cèl·lules han de quedar en contacte amb el medi. El portaobjectes es deixa assecar durant 5 minuts tapat de la llum i s'asseca l'excés de medi. Finalment, es fixa el cobreobjectes al portaobjectes. Els portaobjectes es guarden a la nevera a 4°C protegits de la llum.
13. Les mostres són observades amb el microscopi invertit de fluorescència *Olympus DSU amb spinning disk*.

2.4.1. Tractament de les dades obtingudes per immunocitoquímica.

Un cop realitzada la tècnica d'immunocitoquímica, s'ha utilitzat un microscopi confocal amb *spinning disk* DSU (Olympus) per adquirir imatges dels resultats obtinguts. Aquestes imatges s'han tractat posteriorment amb el programa informàtic *image J*, amb el qual s'ha incorporat color i s'ha eliminat la senyal generada per l'autofluorescència de les pròpies cèl·lules.

En aquesta Tesi, s'ha realitzat l'estudi de les diferents variants de GlialCAM i la seva implicació en el tràfic de MLC1. Per a determinar la localització en unions cel·lulars d'una proteïna concreta, s'ha realitzat l'assaig d'immunocitoquímica i s'ha determinat si la proteïna es presentava concentrada en unions, realitzant el perfil d'intensitat de fluorescència mitjançant el programa *Image J* i obtenint el valor R ($R = \frac{\text{Intensitat de fluorescència a la unió cel·lular}}{\text{Intensitat de fluorescència membrana cèl·lula 1} + \text{Intensitat membrana cèl·lula 2}}$). Únicament quan R és superior a 2 s'ha considerat

que una proteïna està concentrada en unions, ja que una R al voltant de 1 significa que la intensitat de la fluorescència observada en la unió intracel·lular és la suma de la fluorescència provinent de la membrana de cada cèl·lula (**Figura 23**).

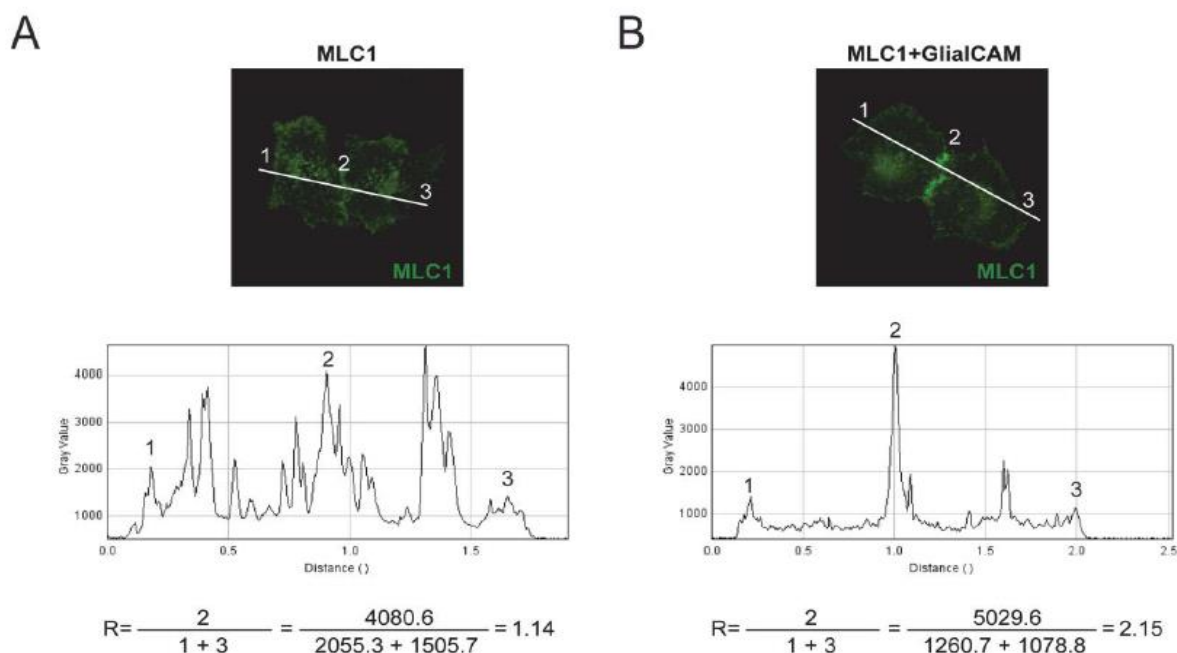


Figura 23. Càlcul del valor R per identificar la localització en unions intracel·lulars. Cèl·lules HeLa transfectades amb MLC1 (**A**) o cotransfectades amb MLC1 i glialCAM (**B**). Es mostra la imatge obtinguda per immunocitoquímica on s'ha afegit la línia que marca el perfil d'intensitat de fluorescència i els punts que es tenen en compte a l'hora de calcular el valor R. A sota es mostren els perfils d'intensitats de fluorescència obtinguts amb el programa *Image J*, on també hi ha marcats els punts de referència. Finalment es mostra el càlcul del valor R utilitzant els valors obtinguts. (Punt 1= intensitat de membrana de cèl·lula 1; Punt 2= intensitat d'unió intracel·lular; Punt 3= Intensitat de membrana cèl·lula 2).

2.5. MESURA DE L'EXPRESSIÓ EN SUPERFÍCIE PER CITOMETRIA DE FLUX.

Una estratègia que s'utilitza per detectar els nivells d'expressió a la membrana d'una proteïna és la immunodetecció d'aquesta a través de tècniques de citometria de flux. En aquesta Tesi s'ha utilitzat aquesta tècnica com a possible alternativa per probar la interacció en *Trans* entre dues proteïnes (Romero et al., 2005; Sintès et al., 2007). Si s'expressa GlialCAM en cèl·lules i s'utilitza una proteïna quimèrica que conté el domini extracel·lular de GlialCAM fusionat a la Fc de ratolí com a anticòs primari de la immunodetecció, una detecció positiva de l'expressió de GlialCAM en membrana mitjançant citometria de flux indicaria que GlialCAM és capaç d'interaccionar en *trans*.

MATERIALS I REACTIUS

- Cèl·lules HEK control o transfectades amb GlialCAM.

- Tripsina.
- Solució de bloqueig (0.2% en PBS 1X).
- Anticòs primari (*anti* GlialCAM monoclonal (R&D Systems).
- Anticòs secundari (*anti-mouse Alexa 488* (Molecular Probes).
- Citòmetre de flux.

METODOLOGIA

1. Es tripsinitzen (apartat 3.1.2) les cèl·lules HEK control i les que expressen GlialCAM.
2. Es separa els homogenats en 6 grups i es centrifuguen durant 1 minut a 5100 rpm.
3. S'elimina els sobrenedants i cada *pellet* es resuspèn amb les següents solucions en funció del grup experimental.
 - a. Control negatiu: 100 µL de solució de bloqueig.
 - b. Control positiu: 100 µL de solució de bloqueig amb una dilució 1/20 de l'anticòs primari *anti* GlialCAM.
4. Control d'anticòs secundari: 100 µL de solució de bloqueig.
5. Condició experimental 1: 100 µL de solució de bloqueig amb una dilució 1/100 de GlialCAM ext Fc mouse.
6. Condició experimental 2: 100 µL de solució de bloqueig amb una dilució 1/500 de GlialCAM ext Fc mouse.
7. Condició experimental 3: 100 µL de solució de bloqueig amb una dilució 1/1000 de GlialCAM ext Fc mouse.
8. S'incuben les cèl·lules durant 30 minuts a 4°C (en gel), colpejant amb el dit cada 10 minuts per evitar que les cèl·lules precipitin.
9. Es centrifuguen les mostres a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C i es descarta el sobrenedant.
10. Es resuspenen els *pellets* en 1 mL de solució de bloqueig i es centrifuguen novament a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C.
11. Es resuspenen els *pellets* amb 100 µL de solució de bloqueig amb una dilució 1/20 d'anticòs secundari unit a un fluorocrom excepte el grup control negatiu que es resuspèn amb 100 µL de solució de bloqueig. Les msotres s'incuben durant 30 minuts a 4°C (en gel), colpejant amb el dit cada 10 minuts per evitar que les cèl·lules precipitin.

12. Es centrifuguen les mostres a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C i es descarta el sobrenedant.
13. Es resuspenen els *pellets* en 1 mL de solució de bloqueig i es centrifuguen novament a 13000 rpm durant 30 segons a 4°C.
14. Es resuspenen les cèl·lules amb 1 mL de solució de bloqueig i ja poden ser analitzades per citometria de flux. (FACS).

2.6. ELISA.

En aquesta Tesi s'han realitzat experiments utilitzant aquesta tècnica per a la purificació d'anticossos policlonals. De la mateixa manera que per WB, es van provar les diferents fraccions purificades per ELISA i es van poder comparar pels dos mètodes.

MATERIALS I REACTIUS

- Placa de 96 pous EIA/RIA (*Costar*)
- Lector d'ELISA (*BioTec*)
- Pèptid/proteïna/anticòs de captura
- PBS 1X estèril
- Solució de bloqueig (PBS 1X, 2%BSA)
- Solució de rentat (PBS 1X, 1% Tween20)
- Anticossos primaris i secundaris
- Reactiu de revelat OPD (Sigma). Es prepara amb 20 ml d'aigua Milli-Q estèril i s'hi dissol una pastilla gran i una de petita de les que venen en el *kit* comercial. Cal protegir-ho de la llum.

METODOLOGIA

1. Es prepara la placa de 96 pous amb el pèptid de captura, on s'hi afegeix 100 µl per pou a una concentració de 3 µg/ml en PBS 1X estèril. La placa s'incuba durant tota la nit a 4°C en una atmòsfera humida per tal que el pèptid no pugui assecar-se.
2. Es descarta la solució que contenia el pèptid i es fan 2 rentats amb 200 µl/pou amb PBS 1X.
3. Es bloqueja la placa amb 200 µl/pou de PBS 1X + 2% BSA. La placa s'incuba a 37°C durant 1 hora.

4. Durant aquest temps es poden anar preparant les dilucions de l'anticòs que es vagin a utilitzar, prenguent en compte que el volum final per pou ha de ser de 100 µl. L'anticòs es dilueix amb solució de bloqueig.
5. Es descarta la solució de bloqueig i es neteja la placa amb PBS-Tween (200 µl/pou)
6. S'afegeixen 100 µl d'anticòs primari i es deixa en incubació durant 1 hora i tapat de la llum a temperatura ambient. És important afegir un control negatiu (100 µl de solució de bloqueig sol) i un control positiu (un anticòs previament purificat i que funcioni).
7. Es realitzen 4 rentats amb PBS-Tween.(200 µl/pou)
8. S'afegeixen 100 µl/pou de l'anticòs secundari, diluït 1/3000 en solució de bloqueig. S'incuba 30 minuts a temperatura ambient i tapat de la llum.
9. Es descarta l'anticòs secundari i es fan 3 rentats amb PBS-Tween seguit de 2 rentats més amb PBS 1X (200 µl/pou).
10. S'afegeix 100 µl/pou de la solució de revelat (OPD). S'incuba entre 15-20 minuts a temperatura ambient i tapat de la llum.
11. Es llegeix la placa en el lector d'ELISA a 450 nm.

2.7. MÈTODE DE COMPLEMENTACIÓ DE L'ACTIVITAT TEV PROTEASA (*Split-TEV*).

El mètode de complementació de l'activitat TEV proteasa o Split-TEV és un mètode de complementació proteica que s'utilitza per detectar interaccions entre proteïnes. Aquest mètode es basa en que la proteasa TEV és dividida per la meitat i cada fragment és fusionat a les proteïnes candidates a interaccionar (**Figura 24**). Així, trobem una proteïna (A, en blanc) que conté fusionat el fragment TEV-N, el lloc de reconeixement de la TEV proteasa i un factor de transcripció GV, sota el control d'un promotor d'alta expressió com el CMV. L'altra proteïna d'interès (B, en groc) està fusionada al fragment TEV-C i la seva expressió està controlada per un promotor de baixa expressió com el TK. Si hi ha interacció entre les dues proteïnes, es reconstitueix l'activitat TEV proteasa, la qual talla pel lloc de reconeixement i allibera el factor de transcripció GV que és capaç d'entrar al nucli i activar l'expressió d'algun gen reporter (que en el nostre cas és la *Gaussia luciferase* secretada) després d'unir-se a 5 elements de resposta Gal4 (5xUAS). La luciferasa és alliberada al medi de cultiu i la seva activitat es pot monitoritzar després de la reacció amb la

colenterazina en un luminòmetre.

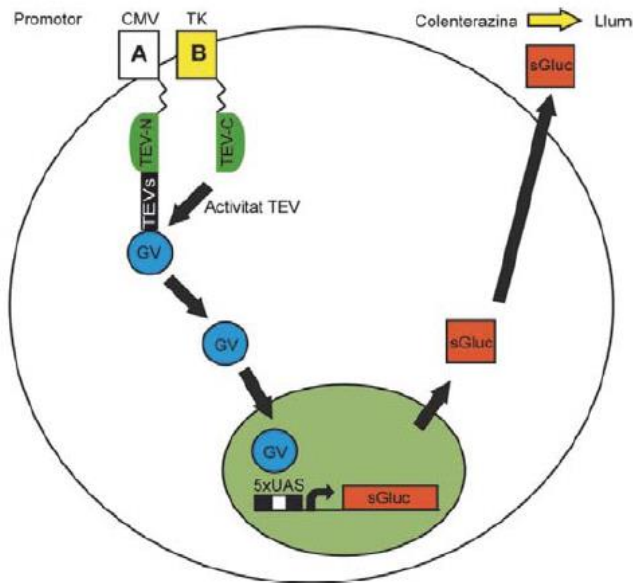


Figura 24. Esquema representatiu del mètode *Split-TEV*.

MATERIALS I REACTIUS

- Plaques de 6 pous.
- Medi DMEM (Biological Industries) complementat amb 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina i 1% Glutamina.
- Medi de transfecció Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
- PBS 1X estèril.
- Transfectina (BioRad).
- Cèl·lules HeLa.
- Colenterazina nativa (Nanolight Technology).
- Solució de solubilització (PBS 1X; 1% Tritó X-100; 1 mM PMSF; 1mg/L pepstatina; 1 mg/L leupeptina i 2 mg/L aprotinina).
- *Kit comercial β -Galactosidase Detection Kit II* (Clontech).
- Luminòmetre TD-20/20 (Turner BioSystems).

METODOLOGIA

1. Es sembren al voltant de 275.000 cèl·lules HeLa en plaques de 6 pous i es deixen a l'incubador durant 12-16 hores a 37°C.
2. Si les cèl·lules es troben a una confluència entre el 60-70%, es transfecten les corresponents construccions mitjançant transfectina (apartat 3.2.1). Es transfecta 2 μ g de DNA total amb el següent *ratio* de construccions: 0,75 μ g de cada

plàsmid que codifica per les proteïnes que contenen els fragments TEV-N i TEV-C; 0,3 µg del gen reporter pNEBr-X1Gluc; i 0,2 µg del vector pCMV-βGal, com a control de l'eficiència de transfecció.

3. Després de 48 hores, s'agafen 20 µL del sobrenedant de les cèl·lules i s'analitzen en el luminòmetre després de l'addició de Colenterazina nativa a 20 µM (en PBS 1X estèril).
4. Per normalitzar les dades respecte l'eficiència de transfecció, es solubilitzen les cèl·lules de cada grup experimental, s'agafen 30 µL de cada lisat cel·lular i es posen en un nou tub *ependorf*.
5. Paral·lelament, es prepara la barreja de reacció del *kit β-Galactosidase Detection Kit II* (Clontech), amb 196 µL de *Reaction Buffer* i 4 µL de *Reaction Substrate* per cada mostra.
6. Es munta la reacció de mesura de l'activitat β-Galactosidasa, barrejant els 30 µL de cada lisat cel·lular amb els 200 µL de la barreja de reacció. S'incuba 1 hora a temperatura ambient.
7. Es registra l'emissió de llum en el luminòmetre, mostra a mostra, des del primer tub fins a l'últim i quan s'hagi processat l'última mostra, es detecta dues vegades seguides i es torna a registrar l'emissió de llum des de l'últim tub fins el primer. Aquest doble registre és necessari perquè l'activitat de la β-Galactosidasa durant 1 hora després de la incubació no s'atura, i d'aquesta manera es pot fer una mitja dels 2 valors obtinguts i tenir un valor més acurat.
8. Un cop obtingudes totes les dades, es divideix el valor de la luminiscència entre el valor de l'activitat β-Galactosidasa de cada mostra per corregir les diferències en l'eficiència de transfecció. S'ha de tenir en compte que sempre s'ha de transfectar sola, la construcció que conté la proteïna fusionada al fragment TEV-N+lloc de reconeixement de la TEV+factor de transcripció GV, de manera que es pugui tenir un valor del *background* d'aquesta proteïna, ja que pot presentar autoproteòlisi del factor de transcripció GV i per tant, activitat basal. El valor de luminiscència dividit pel valor d'activitat de β-Galactosidasa obtingut per aquesta construcció és el que s'utilitza com a referència per calcular les vegades d'inducció de la senyal obtinguda en els grups experimentals respecte aquest grup que es considera la senyal basal (*fold* d'inducció).

2.8. PRODUCCIÓ DE GlialCAM EN *Escherichia Coli*.

Hi ha molts hostes diferents emprats per a la producció de proteïnes recombinants, però l'elecció principal és l'*Escherichia Coli* ja que és fàcil de créixer, té un cicle de vida molt curt i és fàcil de manipular genèticament gràcies a la seva coneguda genètica. Estudis estructurals, funcional i bioquímics requereixen una gran quantitat de proteïna d'alta qualitat. I tot i els beneficis de treballar amb *E.coli* ens trobem amb dos problemes, la difícil o poca expressió d'un gen forani i la solubilitat de la proteïna recombinant per a sobreexpressions.

Avui en dia, moltes companyies biotecnològiques proporcionen diferents tipus de soques *E.coli* alterades genèticament per a que s'adaptin millor a la expressió de gens foranis. De les diferents soques, vam escollir les següents variants (**Taula 4**) per a trobar la soca més eficient; es van fer servir dues temperatures de creixement i tres temps d'inducció diferents per a cada soca.

Soca <i>E.coli</i>	S'empra perquè presenta	Característiques a nivell genètic
BL21	Menor degradació de la proteïna recombinant per proteases.	Proteasa deficiënt per <i>Lom</i> i <i>OmpT</i> .
BL21 Star	Augment en l'estabilitat del mRNA.	Gen <i>rne31</i> mutat.
Rossetta	Gens rics en AT i GC.	Conté tots els gens codificants tRNA rars.

Taula 4. Característiques de les soques d'*E.Coli* emprades en la expressió de proteïnes recombinants.

2.8.1. Expressió pilot.

Per tal d'optimitzar diferents paràmetres de l'expressió de les nostres proteïnes hem fet expressions pilot que consisteixen en el creixement (37°C, 250 rpm aproximadament) en 125 mL de medi LB amb ampicil·lina d'un inòcul de 500 µL provinent d'un cultiu líquid de 2 mL O/N a la temperatura desitjada de les cèl·lules d'interès. Quan aquest cultiu arriba a la OD₆₀₀ requerida s'indueix mitjançant l'addició d'IPTG a la concentració desitjada. En les hores posteriors s'agafen alíquotes d'1 mL del cultiu, es mesura l'OD₆₀₀ i es centrifuga a 13000 rpm durant 3 minuts. El pel·let de cèl·lules es guarda a -20 °C per tal de ser analitzat posteriorment. Quan s'han agafat totes les alíquotes requerides els pel·lets són descongelats, resuspendos en tampó fosfat 20 mM pH7 i lisats per congelació/descongelació durant quatre cicles (mitjançant nitrogen líquid i un bany a 42 °C). Aquesta solució es centrifuga durant 30 minuts a 13000 rpm a 4 °C i es guarden els sobrenedants (proteïna soluble) i els

precipitats (proteïna no soluble i cossos d'inclusió) per a la seva posterior anàlisi per Western Blot i tinció de proteïnes de Coomassie.

A partir dels resultats de les expressions pilot, s'estableixen les millors condicions d'expressió per a cada proteïna i es preparen els cultius d'*E.coli* amb més quantitat per tal d'obtenir proteïna en quantitat abundant.

METODOLOGIA

1. Construir el cDNA d'interés.
2. Digerir el cDNA amb BamHI i EcoRI.
3. Digerir el vector pTrcHisA (Invitrogen) amb BamHI i EcoRI.
4. Clonar l'insert digerit en el vector, mitjançant lligació.
5. Transformar el plàsmid resultant en la soca d'*E.coli* escollida i el deixem créixer a 37 °C O/N en 20 mL de LB ampicil·lina d'*starter* per a 4 litres de cultiu.
6. Inoculem l'*starter* en el volum total de cultiu i esperar que la OD sigui igual a 0.6. Abans d'induir, separar una alíquota (uns 25 mL) per fer cultiu no induït (T0).
7. Induïm el cultiu amb 1mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) i ho deixem diferents temps (3h, 5h, 16h).
8. Recollir una alíquota de 100 μ L de cèl·lules de cultiu no induït (de l'alíquota que hem separat) i de cultiu induït per carregar en un gel de SDS.
9. Centrifugar el cultiu a 6000 xg a 4 °C durant 15-30 minuts i descartar el medi.
10. Resuspendre els pèl·lets a 2/1 (volum/pes) (per ex., 4 litres \pm 25 mg de pèl·let = 50 mL de *buffer*). (*Buffer* lisi: 0.02M NaHPO₄, 0.5M NaCl, pH 7.4).
11. Congelar els pèl·lets amb *buffer* de lisi en falcons a -80 °C (si es vol guardar).

2.8.2. Tècniques de purificació.

Un cop el precipitat de cèl·lules es resuspèn en tampó de lisi (50 mL per cada pèl·let provinent de 4 L de cultiu)(tampó de càrrega de la columna de purificació següent amb inhibidors de proteases, lisozim 1 mg/mL i DNAsa 5 μ g/mL) es deixa 30 minuts en gel. Després es passa per una cel·la de *French press* a 25000 psi 2 vegades (en aquest cas no cal afegir lisozim al tampó de lisi) o es sònica en gel (4 cicles de 30 segons ON/OFF) fins que canvia de color. Es centrifuga la solució de lisat a 4 °C durant 45 minuts a 16000 xg i el sobrenedant d'aquest pas es torna a centrifugar a 4 °C durant 45 minuts a 16000 xg. El sobrenedant d'aquestes centrifugacions correspon a la fracció de la proteïna soluble.

2.8.2.1. Cromatografia d'afinitat amb Ni²⁺ i purificació en *Batch* sota condicions natives.

Aquesta tècnica permet la separació de proteïnes en base a la interacció reversible entre un lligand específic unit covalentment a una matriu i una proteïna. En el nostre estudi, s'ha utilitzat la cua de 6 histidines en l'extrem N-terminal per a interaccionar amb l'ió Ni²⁺ unit a la reïna.

Es barreja el lisat amb una resina d'agarosa amb Ni²⁺ unit (Ni-NTA Qiagen) en una proporció 4:1 i s'agita en un agitador orbital a 4°C durant 1-2 hores. S'empaqueta la resina en una columna deixant sortir l'*Slurry* o proteïna no unida a la resina. Es fan diversos rentats amb tampons (Fosfat 50 mM pH7, NaCl 1M) que tenen una concentració d'imidazol creixent (de 5 mM a 50 mM) amb un total d'uns 8 CV (volums de columna) i finalment s'elueix amb un tampó 250 mM d'imidazol (Fosfat 50 mM pH7, NaCl 1M) amb un volum de 3 CV. Es recullen diverses fraccions de cada pas per la seva posterior anàlisi per *Western Blot* i tinció de proteïnes de Coomassie.

3. CULTIUS CEL·LULARS

La manipulació de cèl·lules en cultiu implica treballar en condicions de màxima esterilitat i higiene, per tal d'evitar que qualsevol contaminació comprometi els resultats de l'experiment que es durà a terme. S'ha de treballar sempre sota una campana de flux vertical i tot el material fungible que s'utilitzi ha de ser estèril i s'ha d'obrir sota la campana. Els medis de cultiu i solucions que estaràn en contacte amb les cèl·lules han de ser estèrils (autoclavats, filtrats, irradiats, etc.) i és convenient temperar-los a 37°C en un bany, així com ruixar-los amb etanol al 70% abans de ser utilitzats.

3.1. LÍNIES CEL·LULARS.

En aquest treball s'han utilitzat dos tipus de línies cel·lulars: cèl·lules HeLa i cèl·lules HEK 293. La línia cel·lular HeLa procedeix d'adenocarcinoma de cèrvix humà, caracteritzada per presentar un fenotip epitelial i per tenir incorporades seqüències del papilomavirus humà (HPV-18). La línia HEK deriva de cèl·lules epitelials de ronyó humà, i està transformada amb el gen E1A d'adenovirus (Graham et al., 1977). La línia 293T, concretament, consisteix en un derivat de la línia 293, que a

més a més, expressa l'antigen T del virus SV40, que permet la replicació episomal de plàsmids que continguin un origen i una regió promotora primerenca de SV40

3.1.1. Condicions generals de cultiu per cèl·lules HeLa i HEK 293.

Les condicions de cultiu per cèl·lules HeLa o HEK293 són a 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂. El medi de cultiu per cèl·lules adherents és el Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biological Industries) sense suplementar que es guarda a la nevera a 4°C. La suplementació consisteix en afegir substàncies com glutamina, antibiòtics o sèrum fetal boví (FBS) que es mantenen a -20°C. Els antibiòtics utilitzats rutinàriament han sigut la penicil·lina que inhibeix la síntesi de peptidoglicans de la paret bacteriana, i l'estreptomicina que inhibeix la síntesi del ribosoma 70S bacterià. El FBS s'ha sotmès a un tractament previ d'inactivació del complement i anticossos a 56°C durant 30 minuts. Regularment es realitzen proves per comprovar l'absència de contaminació per micoplasma. El medi es canvia cada tres dies i es fa un seguiment del creixement del cultiu de manera que quan està proper a la màxima confluència es tripsinitza i es torna a sembrar el cultiu més diluït.

3.1.2. Tripsinització.

Quan el cultiu cel·lular arriba aproximadament al 100% de confluència, cal tripsinitzar-lo per evitar que les cèl·lules morin. Primerament s'elimina el medi i s'efectuen 2-3 rentats amb PBS 1x estèril, en cas contrari, els factors presents en l'FBS del medi inhibeixen l'acció de la tripsina. A continuació s'afegeix al cultiu tripsina-EDTA 1x (Biological Industries). Es deixa incubar de 5 a 15 min a l'incubador de 37°C. Quan s'observa al microscopi que les cèl·lules s'han desenganxat i disgregat, s'hi afegeix medi de cultiu per parar la reacció i es resuspenen. A continuació, les cèl·lules es poden comptar i sembrar o fer un cultiu de manteniment.

3.1.3. Congelació de cèl·lules.

Les cèl·lules eucariotes són capaces de suportar processos de congelació quan aquests es donen de forma gradual i amb la presència d'un agent crioprotector que evita la formació de cristalls d'aigua que puguin trencar la cèl·lula. Una vegada s'han tripsinitzat, les cèl·lules poden ser congelades. Es passen les cèl·lules a un tub i es centrifuguen 5 minuts a 1000 rpm. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet de cèl·lules amb DMEM complet que conté un 10% de DMSO (1 ml per cada 2 x 10⁶

cèl·lules). Es fan al·lquotes (d'aproximadament 1 ml) en criotubs. El criotubs es dipositen al congelador de -80°C entre 10 i 16 hores i es dipositen en nitrogen líquid a -190°C.

3.1.4. Descongelació de cèl·lules.

La descongelació s'efectua de manera ràpida, al contrari de la congelació, amb l'objectiu d'eliminar ràpidament el DMSO, tòxic per a les cèl·lules. El criotub es posa en un bany a 37°C. Una vegada descongelat es resuspèn en un volum 10 vegades superior del medi pre-atemperat. Seguidament, es centrifuga a 5 min a 1000 rpm i s'elimina el sobrenedant. El *pellet* de cèl·lules es resuspèn en 10 ml de medi, es plaqueja i es deixa créixer a l'incubador.

3.2. TRANSFECCIÓ CEL·LULAR.

En aquesta Tesi s'ha realitzat transfecció de diferents DNAs en els diferents tipus de línies cel·lulars. Així, la metodologia utilitzada per als diferents experiments de transfecció ha estat la transfectina (BioRad).

3.2.1. Transfecció transitòria amb transfectina (BioRad) en cèl·lules HeLa i HEK 293.

MATERIALS I REACTIUS

- Medi DMEM complet (10% FBS inactivat; 1% penicilina/estreptomicina; 1% glutamina).
- Medi Opti-MEM amb Glutamax (Gibco).
- Cultius cel·lulars HeLa o HEK293 (a un 70-80% de confluència).
- PBS 1X estèril
- Agent lipídic: transfectina (BioRad)
- Aigua Milli-Q estèril.
- Preparació de DNA plasmídic d'interès.

METODOLOGIA

El procediment a seguir així com els volums que s'han d'utilitzar en cada tipus de placa, venen descrits en els manuals dels productes. El protocol descrit a continuació és per plaques de 6 pous.

1. Es sembren les cèl·lules un dia abans. la confluència ha de ser del 70-80% en el moment de la transfecció, ja que per la transfecció amb agents lipídics es requereix una confluència alta perquè és un mètode bastant tòxic.
2. Es prepara una barreja amb el DNA i el medi Opti-MEM, utilitzant 2 µg de DNA en un volum final de 250 µl.
3. En un altre tub es prepara una barreja de l'agent lipídic en Opti-MEM. Així, també es prepara una barreja en un volum final de 250 µl i generalment s'utilitza una relació 1:1 de l'agent lipídic i el DNA. Per tant, si es transfecten 2 µg de DNA, s'utilitzarà 2 µl d'agent lipídic.
4. S'ajunten les dues barreges (la del DNA i Opti-MEM amb la de l'agent lipídic i Opti-MEM) i s'incuben durant 20 minuts a temperatura ambient.
5. Mentre hi ha aquesta incubació, es retira el medi de cultiu de les plaques i es fa un rentat amb PBS 1X estèril amb l'objectiu d'eliminar traces d'antibiòtic. Després, s'afegeix 1,5 ml de medi Opti-MEM a cada pou i es deixa equilibrar a 37°C a l'incubador.
6. Un cop finalitzat el temps d'incubació, s'afegeix la barreja gota a gota a cada pou mentre es mou la placa en forma de creu de manera que quedi ben repartida.
7. S'incuba 4 hores a 37°C i després es retira el medi. Es renten les cèl·lules amb PBS 1X estèril, de manera que s'eliminin les restes d'agent lipídic i s'afegeixen 2 ml de medi DMEM complet. S'incuben les cèl·lules de 24 a 48 hores a 37°C perquè s'expressin les proteïnes.

3.3 CULTIUS PRIMARIS

En aquesta Tesi s'ha realitzat cultius primaris d'astròcits ja que és l'únic sistema cel·lular on MLC1 s'expressa de manera endògena. Per a l'obtenció d'astròcits primaris purs, s'han utilitzat rates d'estadi post natal entre P0 i P3, i s'ha seguit el protocol de Així mateix, aquests protocols estan aprovats pel comitè ètic de la Universitat de Barcelona i l'Estabulari del Campus de Bellvitge.

3.3.1. Obtenció de cultius primaris d'astròcits de rata.

MATERIALS I REACTIUS

- Rates de la soca Sprague-Dawley (Charles River), en estadi P0-
- Material de cirurgia (tissores, pinces de microcirurgia i micropinces tallants).

- Plaques de Petri de 10 cm i de 35 mm de diàmetre.
- Pipetes Pasteur de plàstic estèrils.
- Pipetes Pasteur de vidre estèrils.
- Cobreobjectes estèrils .
- Tubs *falcon* estèrils de 15 ml i de 50 ml.
- Filtre de 100 µm Falcon.
- Flascons de 25 ml.
- Cambra de Neubauer.
- Lupa binocular (Nikon).
- Medi de dissecció (PBS 1X; 0,3% BSA; 0,6% glucosa) estèril, a 4°C.
- Medi DMEM (Biological Industries) complet
- Tripsina-EDTA 1X (Biological Industries) complet
- DNAsa I (1000 U/ml en 0,15 M NaCl).
- Ara C (Sigma) (4 mM).
- dBAMPc (Sigma) (250mM).

METODOLOGIA

A) Dissecció

1. Les cries són anestesiades en gel i posteriorment decapitades amb unes tisores. Es disposen els caps sobre una placa de Petri. L'extracció del cervell es realitza amb l'ajut d'unes pinces de microcirurgia i unes tisores. Per això, es subjecta el cap clavant unes pinces als ulls, i amb unes tisores, es secciona l'epidermis per separar la pell del cap. Es talla l'os del crani per la línia mitja, procurant no danyar el cervell. S'obren els ossos i es treu el cervell per sota amb l'ajuda d'unes pinces, i es col·loca en una nova placa de Petri amb medi de dissecció fred.
2. La placa amb el cervell es col·loca sota una lupa i es separen els dos hemisferis per la línia mitja. També s'extreuen els bulbs olfactoris.
3. Els còrtexs es col·loquen en posició ventral i amb les pinces s'extreu el tàlem i les meninges. Un cop extret el tàlem, per la part de sota els hemisferis, es poden observar els hipocamps amb una forma semicircular de mitja lluna.
4. Tant els còrtex com els hipocamps es disposen en medi de dissecció nou fresc en una placa de Petri (en gel).

B) Cultiu

1. Dins la campana de cultius primaris es transfereixen els hipocamps i els còrtex a una placa de Petri de 35 mm de diàmetre, que conté 2 ml de tripsina i DNAsa I (1/100) (prèviament preparada i equilibrada a l'incubador), i s'incuben a 37°C durant 10 minuts.
2. Es traspassen les mostres a un tub de 50 ml amb 5 ml de DMEM complet amb DNAsa I (1/100) i es procedeix a la disgregació mecànica utilitzant cada vegada una pipeta de porus més petit.
3. Es centrifuguen les mostres 5 minuts a 1000 rpm a temperatura ambient. Es retira el sobrenedant i el *pellet* es resuspèn generalment amb 10 ml de DMEM complet (el volum depèn de la mida del *pellet* de cèl·lules obtingut). L'homogenat obtingut es passa per un filtre de 100 µm per evitar agregats.
4. Es procedeix a la sembra de cèl·lules en flascons, amb la relació de 1 flascó per cada 3 cries de rata, afegint medi DMEM complet fins a 10 ml. S'incuben a 37°C.
5. Es canvia el medi el dia següent, i cada 2-3 dies.

C) Purificació del cultiu d'astròcits

1. Un cop sembrat el cultiu, el qual està format per cèl·lules gials (astròcits, oligodendròcits i microglia) es deixa créixer entre 7-10 dies fins que arriba a la màxima confluència.
2. Per eliminar els oligodendròcits i la microglia i aconseguir un cultiu pur d'astròcits, es procedeix a fer una agitació mecànica forta, ja que els astròcits són capaços d'enganxar-se molt bé a la superfície plàstica de la placa, mentre que la resta de cèl·lules no. Per aquest pas, es canvia el medi dels flascons unes hores abans de l'agitació i es deixen equilibrar a l'incubador per tal que agafin la concentració adequada de CO₂. En un incubador a 37°C s'ha d'instal·lar un agitador on s'han col·locat els flascons amb el tap ben tancat i segellats amb parafilm.
3. Es procedeix a una agitació durant tota la nit a 250 rpm a 37°C.
4. S'obté un cultiu primari d'astròcits de rata d'aproximadament un 95% de puresa. Es retira el sobrenedant, es fan 3 rentats amb PBS 1X estèril i es tripsinitzen els astròcits.
5. Finalment es fa un comptatge de cèl·lules i es sembren les plaques de cultiu a una densitat de 50.000-80.000 cèl·lules en plaques de 24 pous, 200.000 en plaques de 6 pous i 10⁶ en plaques de 100 mm de diàmetre.
6. El medi es canvia cada 3-4 dies.

D) Diferenciació del cultiu d'astròcits

Quan el cultiu pur arriba a una confluència del 80% es procedeix a realitzar el tractament de diferenciació. Durant aquesta tesi s'ha procedit a diferenciar els astròcits amb 2 compostos diferents: **Cytosine β -D-arabinofuranoside** (Ara C) i **dibutiril AMP cíclic** (dBAMPc).

L'Ara C és un compost que inhibeix la síntesi de DNA, i que provoca que els astròcits es parin en la fase G₀/G₁ del seu cicle cel·lular. Es cultiven d'aquesta forma durant 3 setmanes, i es procedeix a fer els experiments. Aquesta parada de cicle amb Ara C es realitza perquè experiments previs en el grup van demostrar que es necessita aquest tractament per observar una localització de MLC1 a les unions astrocitàries (Duarri et al., 2011). Per això, aquest és el model en que normalment s'ha treballat.

El tractament amb dBAMPc s'ha dut a terme quan s'han hagut de realitzar registres electrofisiològics d'astròcits de rata mitjançant la tècnica de *Patch-Clamp*. Aquests registres els ha realitzat el Dr. Xavier Gasull, professor titular de la Universitat de Barcelona. Per implementar aquesta tècnica, els astròcits s'han de tractar amb dBAMPc perquè els astròcits que creixen en cultiu són cèl·lules epitelioides poligonals una mica aplanades, i per tant, és molt difícil poder-les registrar electrofisiològicament. Amb el tractament amb dBAMPc es poden registrar de manera òptima a les 2 setmanes de tractament. Es cultiven en flascons o en plaques de cultiu i 3 dies abans de l'experiment de *Patch-Clamp*, els astròcits són tripsinitzats i plantats sobre cobreobjectes en plaques de 24 pous a una confluència al voltant de 15-20.000 cèl·lules per pou.

3.3.2. Tractaments aplicats als cultius primaris d'astròcits.

En estudis previs del grup, fets per la Dra. Tania López, s'havia determinat que en certes condicions la proteïna GlialCAM tenia un efecte específic i es podia concentrar més en les unions astrocitàries. Per aquesta raó, s'han continuat aquests estudis i s'han determinat uns tractaments concrets per a poder estudiar la relació funcional entre MLC1, GlialCAM i CIC-2.

MATERIALS I REACTIUS

- Astròcits i oligodendròcits de rata i ratolí diferenciats
- Solució fisiològica : 122 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 0,4 mM MgSO₂, 1,3 mM CaCl₂, 1,2

mM KH_2PO_4 , 25 mM Hepes, 10 mM glucosa, pH 7.2, 300 mOsm/kg d'aigua.

- Solució d'alt contingut de potassi: 60 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,4 mM MgSO_2 , 1,3 mM CaCl_2 , 1,2 mM KH_2PO_4 , 25 mM Hepes, 10 mM glucosa, pH 7.2, 300 mOsm/kg d'aigua.

METODOLOGIA

Els astròcits plantats en plaques de 6 i 24 pous es tracten amb les solucions fisiològica i d'alt contingut de potassi durant 6 hores. Després, les cèl·lules són processades per a fer WB i immunoflorescència.

3.4. PRODUCCIÓ D'ADENOVIRUS.

Degut a la dificultat de transfectar astròcits primaris de rata, en els darrers anys en el nostre laboratori s'han produït adenovirus que expressessin les proteïnes d'interès per cada estudi o els miRNAs per obtenir els models cel·lulars determinats. Els adenovirus (AdVs) són relativament fàcils d'obtenir així com de manipular. A més a més, l'eficiència d'infecció és molt alta, aconseguint un nivell d'expressió de les proteïnes molt alt i pràcticament a totes les cèl·lules.

3.4.1. Adenovirus.

Els adenovirus són virus nus, icosaèdrics, amb fibres en els seus vèrtexs. El seu genoma, d'aproximadament 36 Kb, està constituït per una doble cadena linear de DNA. El genoma dels adenovirus es divideix en gens primerencs (E1 a E4) i gens tardans (L1 a L5). Degut a que la capacitat del genoma adenoviral per dirigir la producció d'adenovirus resideix en les seqüències ubicades al gen E1, les estratègies per produir vectors adenovirals consisteixen en eliminar aquestes seqüències i incorporar en el seu lloc el gen d'interès, generant així un vector adenoviral sense capacitat de replicació. El posterior creixement i amplificació del vector es realitza utilitzant una línia cel·lular complementària, que conté la seqüència E1 en el seu genoma. Per últim, el vector adenoviral que conté el gen d'interès és linealitzat per un mecanisme mediat per un receptor, i una vegada a l'endosoma és lissat. El DNA viral contenint el gen d'interès és alliberat al citoplasma i accedeix al nucli on resideix com un DNA extracromosòmic (episoma), dirigint l'expressió del gen d'interès.

3.4.2. Producció d'adenovirus.

El sistema que s'ha utilitzat per a l'obtenció d'adenovirus és el *ViraPower Adenoviral Expression System* (Invitrogen). Aquest sistema permet crear adenovirus no replicatius ni integratius que són usats per a l'expressió temporal del gen d'interès, tant en cèl·lules eucariotes divisores com en les no divisores. S'obtenen uns stocks virals d'alt títol, els quals es poden amplificar i purificar. S'ha de tenir en compte que s'ha de treballar en condicions de Bioseguretat 2. El vector d'expressió que s'ha utilitzat és el pAdV/CMV/V5-DEST compatible amb el sistema *Gateway* (Invitrogen), el qual conté els ITRs 5' i 3' i la senyal d'encapsidació necessaris per empaquetar el gen d'interès en els virions. La proteïna necessària per a l'expressió dels gens E1 està integrada a la línia cel·lular HEK293 en *trans*, la qual s'utilitza per a la seva producció.

METODOLOGIA

1. Primerament es construeixen els vectors d'expressió amb les seqüències d'interès en el vector pAdV/CMV/V5-DEST per el sistema *Gateway*, els quals són seqüenciats per confirmar que són correctes.
2. Amb la finalitat d'exposar els ITRs virals, es digereixen entre 5 i 10 µg del plàsmid que conté el gen d'interès amb l'enzim de restricció Pac I, a 37°C durant 12-16 hores. Es corre una petita alíquota en un gel d'agarosa per comprovar que la digestió ha funcionat i es purifica el plàsmid digerit. Es precipita amb l'objectiu de concentrar i purificar el DNA digerit obtingut i finalment es quantifica.
3. El dia abans de començar la producció, es sembren cèl·lules HEK293 (de passatge baix) en plaques de 6 pous, aproximadament a una densitat de 7×10^5 cèl·lules per pou, amb medi DMEM complet que conté aminoàcids no essencials (NE-AA) i s'incuben a 37°C en l'incubador durant 12-16 hores.
4. Es transfecta 1µg de DNA digerit amb Pac I a les HEK293 amb lipofectamina 2000 utilitzant una relació de DNA lipofectamina 1:3, utilitzant opti-MEM amb un 10% de FBS, ja que es deixa la transfecció durant tota la nit a l'incubador a 37°C.
5. El dia següent, es canvia el medi per DMEM complet amb NE-AA i es deixa incubar 24 hores més a l'incubador.
6. A les 48 hores post-transfecció, les cèl·lules es tripsinitzen i es transfereixen a una placa de 100 mm. Es deixen incubar durant 10-13 dies fins que s'obtingui un

80% d'efecte citopàtic. Durant els dies previs, es canvia el medi si és necessari i es va observant la producció de calves en el cultiu cel·lular.

7. Quan l'efecte citopàtic és del 80%, es recull el medi i les cèl·lules (cru viral), la barreja es transfereix a un tub de 15 mL ben resuspès.
8. Es fan 3 cicles de congelació (30 min a -80°C) i descongelació (15 min a 37°C), i es centrifuga el lisat cel·lular durant 15 minuts a 3000 rpm per tal d'eliminar les restes cel·lulars.
9. Es fan alíquotes amb el sobrenedant en criotubs que es guarden a -80°C . Encara que els *stocks* virals són bastant estables als processos de congelació/descongelació, és recomanable no usar *stocks* que hagin estat descongelats més de 10 vegades, atès que el seu títol haurà disminuït.

Els *stocks* virals es poden amplificar, i fins i tot purificar, amb l'objectiu d'obtenir un *stock* concentrat i més net, afavorint el seu ús en els casos on es necessita una multiplicitat d'infecció (MOI) molt alta, ja que els *stocks* virals estan compostos per les partícules virals però, a més a més, per medi i per restes cel·lulars que poden interferir en determinats experiments.

3.4.3. Titulació d'adenovirus.

La titulació de les partícules virals es pot fer per 2 mètodes, depenent de si l'adenovirus que s'ha construït expressa una proteïna fluorescent o no.

METODOLOGIA PER ADENOVIRUS QUE EXPRESSEN UNA PROTEÏNA FLUORESCENT

1. Es sembren 30.000 cèl·lules HEK 293 en una placa de 96 pous. Cada pou ha de tenir un volum final de 100 μl .
2. La placa s'incuba a 37°C durant 6-8 hores.
3. Infectar les cèl·lules amb molt de compte ja que les HEK tenen una baixa adherència. En el primer pou s'hi addiciona 10 μl de virus i es fan dilucions successives a partir del primer pou. Cal canviar la punta a cada pou per tal d'evitar errors de pipeteig.
4. Al matí següent s'ha de canviar el medi.
5. Per a poder titular el que es fa és el següent: fer una foto de cada dilució amb el filtre GFP del microscopi *Olympus DSU amb spinning disk*. Imprimir les fotos i

contar el nombre de cèl·lules verdes (infectades) que hi ha per foto. El títol es calcula amb la següent fórmula i es dona en Transduction Units/ml (TU/ml):

$$\text{TU/ml} = \text{dilució} \times \% \text{ cèl·lules fluorescents} \times 1000$$

METODOLOGIA PER ADENOVIRUS QUE NO EXPRESSEN UNA PROTEÏNA FLUORESCENT

En aquest cas cal seguir els mateixos passos però per a poder titular cal fer una immunocitoquímica ja que no podem veure els virus directament.

1. Retirar el medi i decaixar assecar durant 2-5 minuts a temperatura ambient.
2. Afegir 100 µl de metanol fred i incubar a -20°C durant 10 minuts.
3. Aspirar el metanol i rentar les cèl·lules dues vegades amb 100µl de PBS 1X.
4. Incubar durant 1-2 hores amb anticòs primari (1/100) en un volum final de 50 µl/pou de PBS1X + 1%BSA. Cal que estigui tapat de la llum.
5. Rentar 3 cops amb PBS1X+1%BSA.
6. Incubar durant 1-2 hores amb anticòs secundari (1/300) en un volum final de 50 µl/pou de PBS1X + 1%BSA. Cal que estigui tapat de la llum.
7. Rentar 3 cops amb PBS1X
8. Fer fotos en el microscopi *Olympus DSU amb spinning disk* i fer el comptatge de la mateixa manera que abans.

ADENOVIRUS AMPLIFICATS	TÍTOL (TU/mL)	ADENOVIRUS PRODUÏTS	TÍTOL (TU/mL)
GlialCAM-3xFlag	1.8 x 10 ⁸	miRNA 77-EmGFP CIC-2	2.75 x 10 ⁸
HA hMLC1 HA loop	5 x 10 ⁸	miRNA 223-EmGFP CIC-2	4.5 x 10 ⁸
CLC2-3xFlag	1 x 10 ⁹	miRNA 1407-EmGFP CIC-2	3.7 x 10 ⁸
miRNA SCR-EmGFP	5.5 x 10 ⁸	miRNA 1583-EmGFP CIC-2	1.73 x 10 ⁸
miRNA MLC1 905	1.13 x 10 ⁸	miRNA 1805-EmGFP CIC-2	5.76 x 10 ⁷
miRNA GlialCAM 1392	6.5 x 10 ⁷	GlialCAM K135Del-3xFlag	1.5 x 10 ⁸
		GlialCAM D211N-3xFlag	1 x 10 ⁸
		hCIC2-3xHA A500V	2 x 10 ⁷
		TRESK-EmGFP	1 x 10 ⁵

Taula 5. Adenovirus produïts. Taula on es mostren els adenovirus produïts, així com els amplificats i/o purificats. Es mostren els títols obtinguts en cada cas en TU/mL.

3.5. TRANSDUCCIÓ D'ASTRÒCITS AMB ADENOVIRUS.

Per infectar astròcits amb adenovirus, el procediment rutinari ha sigut el següent.

1. Abans que el cultiu compleixi les 3 setmanes s'efectua la infecció dels astròcits amb els adenovirus. Per això, s'elimina una mica de medi dels pous i s'afegeixen els adenovirus a la MOI d'infecció adequada. En cada tipus d'experiment, tant la MOI d'infecció com el dia en que s'ha infectat els astròcits ha sigut diferent. Habitualment per adenovirus que expressen les proteïnes d'interès (MLC1, GlialCAM, CIC-2, etc.), s'ha utilitzat una MOI de 2-3 i la infecció s'ha dut a terme 2 dies abans que el cultiu compleixi 3 setmanes. En canvi, quan s'han generat els models *knock-down* de malaltia en astròcits, mitjançant els adenovirus que expressen miRNA contra MLC1 o contra GlialCAM, s'ha hagut de conèixer la mínima MOI necessària per eliminar els nivells de les proteïnes d'interès i els dies que es requereixen perquè això es produeixi. En el cas dels miRNAs contra MLC1, la infecció s'ha fet a MOI 5, entre 5-6 dies abans de les 3 setmanes de cultiu. En canvi, els miRNAs contra GlialCAM necessiten d'una infecció a MOI 10, 7 dies abans de les 3 setmanes de cultiu. En el cas que s'hagi complementat el model *knock-down* amb l'expressió d'alguna proteïna, primer s'ha portat a terme la infecció amb l'adenovirus que expressa el miRNA i posteriorment la infecció amb l'adenovirus d'expressió de la proteïna corresponent, mantenint els temps i les MOI d'infecció determinats en cada cas.
2. El dia següent a la infecció, es retira el medi i es renten els astròcits amb PBS 1X estèril, amb la finalitat d'eliminar les restes virals que puguin quedar. Es torna a afegir medi DMEM complet + Ara C i s'incuben a l'incubador a 37°C fins que siguin processats.

ANNEX: SOLUCIONS D'ÚS GENERAL**AMPICIL·LINA**

Es dissol l'ampicil·lina en aigua Milli-Q a 100 mg/ml, es filtra a 0,22 µm i es guarda aliquidada a -20°C. Una vegada descongelada, es manté en gel. S'ha de tenir en compte que l'ampicil·lina s'inactiva a temperatures superiors a 55°C. Es treballa a 100 µg/ml.

KANAMICINA

Es dissol la kanamicina en aigua Milli-Q a 25 mg/ml i s'aliquota a -20°C. La concentració de treball és 25 µg/ml.

CLORAMFENICOL

Es dissol en metanol a 25 mg/ml i es guarda aliquidada a -20°C. La concentració de treball és de 25 µg/ml.

ESTREPTOMICINA

Es dissol en aigua Milli-Q a 30 mg/ml i s'aliquota a -20°C. Es treballa a 30 µg/ml.

MEDI LB, LB-AGAR

Es dissol en aigua Milli-Q, 1% triptona, 0,5% extracte de llevat, 1% NaCl. En el cas de preparar LB-Agar, s'afegeix l'agar (1,5% en pes) a l'ampolla que conté LB. S'autoclava, es deixa refredar fins a 50°C i s'hi afegeix l'antibiòtic (si és necessari). S'aboca a les plaques de Petri i es deixa solidificar a temperatura ambient. Les plaques es guarden a 4°C en posició invertida.

MEDI SOC

Es dissolen 20 g triptona, 5 g extracte de llevat, 0,5 g NaCl, 2,5 ml KCl 1M, 20 ml glucosa 1 M en 1 l d'aigua Milli-Q i s'autoclava.

TAE 50X

Es pesen 242 g de Tris Base, i s'afegeixen 57,1 ml d'àcid acètic i 100 ml de EDTA 0,5 M. S'ajusta amb aigua fins a un litre. PBS 10X. Es dissol en aigua Milli-Q, 1,36 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM K₂HPO₄ i s'ajusta el pH a 7,4 amb HCl. Si el PBS 1X és per cultius, s'autoclava.

PARAFORMALDEHID (PFA) 4% EN PBS

Cal manipular el PFA sempre sota la campana perquè és molt tòxic. Per 500 ml, es pesen 20 g de paraformaldehid en un vas de precipitats de vidre. En un altre vas s'escalfa 450 ml d'aigua Milli-Q fins que arriba a 60°C. Es va abocant l'aigua calenta al vas amb el PFA i es barreja amb un agitador. Quan està dissolt es tiren 2-3 gotes de NaOH 1 N fins que la solució quedi transparent. Es deixa refredar i s'afegeixen 50

ml de PBS 10X. Es fan alíquotes i es congelen a -20°C .

TAMPÓ DE CÀRREGA DE PROTEÏNES LSB 4X

En un volum de 40 ml, es preparen 8 ml de Tris HCl 2 M a pH 6,8, 32 ml de glicerol, 3,2 g de SDS i 160 μl de blau de bromofenol. Si és necessari es poden afegir agents reductors: 1-10% β -Mercaptoetanol o 100mM DTT.

TAMPÓ D'ELECTROFORESI 10X

(Tris base 250 mM, glicina 1,91 M, SDS 1%). Per un litre es pesen: 30,3 g de Tris, 144 g de glicina i 10 g de SDS. S'ajusta el pH a 8,3.

TAMPÓ DE TRANSFERÈNCIA 10X

(Tris base 250 mM, glicina 1,92 mM). Per un litre es pesen: 30,3 g de Tris i 144 g de glicina. S'ajusta a pH 8,3. Tampó de transferència 1X: 100 ml de tampó de transferència 10X, 200 ml de metanol i 700 ml d'aigua. Es pot reciclar un parell de vegades guardant-lo a 4°C .

TTBS 10X

Es dissol en aigua Milli-Q, 1,5 M NaCl, 100 mM Tris HCl, i s'ajusta a un pH de 7,4. Posteriorment se li afegeix 1% de Tween-20 o Tritó X-100 i s'agita suaument fins que el detergent queda ben dissolt.

ECL

Es preparen 2 solucions stock: una de 90 mM d'àcid coumàric i una altra de 250 mM de luminol, ambdues amb DMSO, protegides de la llum, i guardades a -20°C . Solució A: 5 ml Tris 1 M pH 8,5, 45 ml aigua, 110 μl d'àcid coumàric 90 mM, 250 μl de luminol 250 mM. Solució B: 100 μl H_2O_2 al 30% i 900 μl d'aigua. Les dues solucions es conserven a 4°C protegides de la llum. El reactiu ECL pel revelat es fa amb una relació 1 ml solució A + 15 μl solució B.

TRIS 1M

Es pesen 60,5 g de 2-Amino-2(hydroxymethyl)-1-3propanediol (Tris) en 500 ml d'aigua Milli-Q. S'ajusta al pH desitjat i es filtra.

EDTA 0,5M

Es dissol 90,3 g d'àcid etilen-diamino-tetra-acètic (EDTA) en aigua destil·lada i s'ajusta el pH a 8 amb NaOH (la solució passa de tèrbola a transparent).

HEPES 1M

Es pesen 119 g de 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid (Hepes) en 500 ml d'aigua Milli-Q. S'ajusta el pH a 7,4 i es filtra.

ANNEX: CONTRUCCIONS GENERADES PER BIOLOGIA MOLECULAR

S'inclouen totes les construccions generades i utilitzades tant en els projectes inclosos en els objectius de la tesi com els inclosos en altres projectes.

<u>ENTRY CLONES</u>	<u>EXPRESSION CLONES</u>
GlialCAM B1B5R	GlialCAM 3xFlag pCDNA3
GlialCAM K135Del B1B5R	GlialCAM K135Del 3xFlag pCDNA3
GlialCAM D211N B1B5R	GlialCAM K135Del 3xFlag TevSpB TK
GlialCAM Q56P B1B5R	GlialCAM K135Del 3xFlag pcsDEST
GlialCAM R73W B1B5R	GlialCAM K135Del 3xFlag pADV
HA hMLC1HA S27A B1B5R	GlialCAM D211N 3xFlag pCDNA3
HA hMLC1HA S27D B1B5R	GlialCAM D211N 3xFlag TevSpB TK
zCIC-1a B1B5R	GlialCAM D211N 3xFlag pcsDEST
zCIC-1a P480L B1B5R	GlialCAM D211N 3xFlag pADV
zCIC-1a I290M B1B5R	GlialCAM Q56P 3xFlag pCDNA3
zCIC-1b B1B5R	GlialCAM Q56P 3xFlag TevSpB TK
zCIC-1b P480L B1B5R	GlialCAM R73W 3xFlag pCDNA3
zCIC-1b I290M B1B5R	HA hMLC1HA S27A 3xFlag pCDNA3
zCIC-k B1B2	HA hMLC1HA S27D 3xFlag pCDNA3
zCIC-k B5B2	TRESK pcsDEST
zCIC-k V166E B5B2	TRESK-esmGFP pcsDEST
zBarttin B1B2	3xHA -TRESK pcsDEST
zBarttin B5B2	zCIC-1a 3xHA pcsDEST
TRESK B1B2	zCIC-1a P480L 3xFlag pcsDEST
TRESK B1B5R	zCIC-1b 3xFlag pcsDEST
TRESK B5B2	zCIC-1b P480L 3xFlag pcsDEST
zWolframin B1B2	zCIC-1b I290M 3xFlag pcsDEST
zWolframin B5B2	zCIC-k pcsDEST
hCIC-2 HA A500V	3xFlag zCIC-k pcsDEST
	zBarttin pcsDEST
	3xFlag zBarttin pcsDEST
	3xFlag zCIC-k pcsDEST
	3xFlag zCIC-k V166E pcsDEST

<u>ENTRY CLONES</u>	<u>EXPRESSION CLONES</u>
	hCIC-2 HA A500V pcDNA3.1 hCIC-2 HA A500V TevSpB TK hCIC-2 HA A500V pAdv hCIC2-HA Leu144_Ile145Del TevSpB TK

