

Impacte Metabòlic de l'Activació de la Glicogen Sintasa Hepàtica

Susana Ros Domínguez

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.tesisenxarxa.net) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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.tesisenred.net) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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.tesisenxarxa.net) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

Impacte metabòlic de l'activació de la glicogen sintasa hepàtica

SUSANA ROS DOMÍNGUEZ
Barcelona, Juny del 2009

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

1.1. Reacció en cadena de la polimerasa

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al* 1988) es va usar en diverses estratègies:

1.1.1 Amplificació de gens a partir de plasmidis

Per tal d'amplificar un gen a partir de plasmidis que contenen un cDNA d'interès es va fer servir la polimerasa de *Pyrococcus furiosus* o Pfu (*PFU DNA polimerase*, Promega). Aquesta polimerasa es caracteritza per incorporar mutacions a un ritme de $1,3 \times 10^{-6}$ mutacions / parell de bases, per tant presenta una alta fidelitat.

La barreja de reacció sempre tenia un volum final de 50µl, i es composava de 0,5µg del ADN plasmídic d'interès, 2µl d'encebadors sentit a una concentració de 10µM, 2µl d'encebadors antisentit a 10µM, 1µl d'una barreja dels 4 deoxiribonucleòtids (dNTP's) a 10mM, 5µl de tampó 10x i 3 unitats de Pfu.

El resultat de la reacció es resolvia en un gel d'agarosa, i es visualitzava mitjançant un aparell de llum d'ultraviolat. Si es necessitava recuperar l'ADN, es tallava amb l'ajuda d'un bisturí, i s'extreia de l'agarosa mitjançant l'ús de columnes de purificació d'ADN en matriu d'agarosa (*Illustra GFX PCR DNA and Gel band Purification, GE Healthcare*).

1.1.2 Mutagènesi dirigida

Aquesta estratègia s'utilitzà per tal de reemplaçar aminoàcids concrets d'un gen d'interès. Degut a que els encebadors eren totalment complementaris entre ells (*Taula*

I), la reacció era sempre aritmètica, i no pas exponencial. Els encebadors contenien la mutació que volíem introduir aproximadament a la meitat de la seqüència.

La reacció tenia un volum final de 50µl, i es composava de 100ng del ADN plasmídic d'interès, 2µl d'encebadors sentit a una concentració de 10µM, 2µl d'encebadors antisentit a 10µM, 1µl de dNTP's a 10mM, 5µl de tampó 10x i 3 unitats de Pfu.

El resultat de la reacció es va digerir amb 1µl de l'enzim de restricció Dnpi (*Promega*), que talla ADN metilat, en aquest cas els plasmidis metilats motlle que es van amplificar en bacteris i que per tan estaven metilats. La digestió es va incubar durant una hora a 37°C. Uns 5µl del producte de la digestió es van transformar en 50µl bacteris competents.

Un cop obtinguts els nous plasmidis, mitjançant extracció de plasmidis de bacteris (**Punt 1.7**), es va comprovar mitjançant seqüenciació (**Punt 1.8**) que havien incorporat la mutació.

MUTACIÓ	ENCEBADORS
Ser 7 Ala	Sentit: CTCAGGGGCGCCTCCTTGGCTGTGAC
o lloc 2	Antisentit : GTCACAGCCAAGGAGCGGCCCTGAG
Ser 10 Ala	Sentit: CTGTGACGCGCCCTTGGTGGG
o lloc 2A	Antisentit : CCCACCAAGGGCCGTCACAG
Ser 640 Ala	Sentit: CTTTAAGTATCCCAGGCCCTCCGCAGTACCA
o lloc 3A	Antisentit : TGGTACTGCGGAGGGCCTGGGATACTTAAAG
Ser 644 Ala	Sentit: CAGTACCACCTGCCCATCAGG
o lloc 3B	Antisentit : CCTGATGGGGCAGGTGGTACTG
Ser 648 Ala	Sentit: CCCCATCAGGAGCCCAGACTTC
o lloc 3C	Antisentit : GAAGTCTGGGCTCCTGATGGGG
Ser 652 Ala	Sentit: CCATCAGGATCCCAGACTTCAGCTCCTCAGAGC
o lloc 4	Antisentit : GCTCTGAGGAGCTGAAGTCTGGGATCCTGATGG
Ser 656 Ala	Sentit: CTCAGAGCGCCGATGTGGAAAACGAAG
o lloc 5	Antisentit : CTTCGTTTTCCACATCGGCGCTCTGA
Glu 509 Ala	Sentit: CCATCATACTATGCGCCCTGGGGTTACACG
	Antisentit : CGTGTAACCCAGGGCGCATAGTATGATGG

Taula 1. Llistat d'encebadors usats en la mutagènesis de la LGS.

1.1.3 Detecció d'ADN

Per determinar la presència o absència d'un fragment d'ADN concret es va fer servir aquesta estratègia. Per a tal propòsit, s'amplificà l'ADN d'interès amb la polimerasa de *Thermophilus Aquaticus* o Taq (*Taq DNA polymerase Master Mix, Promega*). Aquest tipus de polimerasa es caracteritza per incorporar mutacions a un ritme de $8,0 \times 10^{-6}$ mutacions / pb, per tant presenta una menor fidelitat que la Pfu polimerasa, però la velocitat d'incorporació és major.

La reacció tenia un volum final de 25µl, i es composava de 100ng del ADN d'interès, 2µl d'encebadors sentit a una concentració de 10µM, 2µl d'encebadors antisentit a 10µM, 12,5µl del mix de tampó amb dNTP's i Pfu polimerasa ja preparats.

1.2 Electroforesi d'ADN

Permet separar les diferents molècules d'ADN en funció de la mida (Sambrook 1989). Es dipositen les molècules d'ADN en un gel d'agarosa submergit en la fase mòbil, el tampó d'electroforesi, i sotmès a un camp elèctric continu. L'acceleració és en funció del quocient càrrega/massa. La càrrega ve donada per els fosfats de l'enllaç fosfoèster entre nucleòtids, així doncs com més llarga sigui una molècula més càrrega presenta, i per tant el quocient és constant. La diferent mida de les molècules fa que pateixin més o menys fregament amb la matriu del gel d'agarosa.

El gel d'agarosa generalment es van preparar a l'1% (p/v), i contenien bromur d'etidi, el que permetia veure l'ADN d'interès, doncs s'intercala entre les bases de l'ADN i emet fluorescència taronja quan s'excita amb llum ultraviolada.

L'ADN es barrejava amb tampó de càrrega, que servia per a donar densitat i color a la mostra, en una relació 1:5 (v/v). La barreja es carregava en els pous del gel d'agarosa, que es trobava situat en una cubeta plena de tampó d'electroforesi. Com a marcadors dels fragments d'ADN, es va fer servir una digestió del fag λ , amb els enzims de restricció *EcoRI* i *HindIII* (λ *EcoRI-HindIII, Promega*). Aquest marcador de ADN presenta mides entre 21000 i 125 pb. L'electroforesi es feia a 100 V i a temperatura

ambient. Després de separar els fragments el ADN, el resultat va ser visualitzat sota la llum d'ultraviolat, gràcies a la presència de bromur d'etidi en el gel.

Material:

Tampó d'electroforesi: El tampó d'electroforesi en aquest cas era TBE, Tris base 89mM, Àcid Bòric 89mM a pH 8,3 i Na₂EDTA 2mM.

Gel d'agarosa a l'1%: Es pesaven 0,5 g d'agarosa d'alta puresa que es dissolien en 50 ml de tampó d'electroforesi TBE mitjançant l'ús de microones. Es deixava refredar una mica, s'afegien 10µl de bromur d'etidi (0,2 µg/ml) i es dipositava en un motlle que contenia pintes per a crear els pous del gel.

Tampó de càrrega : El tampó de càrrega es tractava d'una barreja de glicerol 50% (v/v), EDTA 1mM pH 8,0, i blau de bromofenol 0,25% (v/v).

1.3 Quantificació ADN

Per quantificar l'ADN, es tenia en compte que una unitat d'absorbància a 260 nm, mesurada en cubeta de quars de 1000µl, equival a una concentració de 50 µg/ml aproximadament. Així doncs es seguia la següent fórmula:

$$DNA [\mu g / \mu l] = OD_{260} \times \frac{Volum\ final}{Volum\ DNA\ problema} \times \frac{50\ \mu g / ml}{1\ UA_{260}} \times \frac{1\ ml}{1000\ \mu l}$$

La qualitat de l'ADN es va mesurar com la relació entre l'absorbància a 260 nm, pròpia de l'ADN, entre l'absorbància a 280 nm, pròpia de les proteïnes. S'acceptava una qualitat suficient de l'ADN quan la relació era igual o major a 1,8.

1.4 Generació de cèl·lules competents

Per a generar bacteris competents s'agafaven 50µl de bacteris *Escherichia coli* soca *DH5a* i els dipositàvem a un erlenmeyer de 250mL que contenia 30 ml de medi LB autoclavat. Deixàvem créixer els bacteris a 18°C durant 48 hores amb agitació vigorosa. Quan s'obtenia una densitat òptica de 0,1 mitjançant la lectura de l'absorbància a 550 nm fent servir com a blanc medi LB, es transferia el cultiu a un erlenmeyer d'un litre de

capacitat que contenia 70 ml de medi LB autoclavat. Deixàvem créixer a 37°C amb agitació vigorosa. Quan tornàvem a observar un valor proper a 0,1, transferíem el cultiu a un erlenmeyer d'un litre de capacitat que contenia 100 ml de medi LB autoclavat. Deixàvem créixer a 37°C amb agitació vigorosa un altre cop. Quan s'arribava a una OD₅₅₀ de 0,4 a 0,5, es retirava el cultiu, i es refredava ràpidament en un bany de gel i sal comuna. A partir d'aquest moment es treballava sempre a 4°C. Repartíem els 200 ml de cultiu en 4 tubs estèrils de 50 ml de capacitat a -20°C. Centrifugàvem els tubs a 1.125 g durant 5 minuts a 4°C. Els sobrenedants es descartaven, i els pellets es solubilitzaven amb 15 ml de solució TFB-I, mantenint sempre una temperatura de 4°C. Centrifugàvem a 1.125 g durant 5 minuts a 4°C. Els sobrenedants es descartaven, i a cada pellet s'afegien 2 ml de solució TFB-II. Es feien alíquotes de 50µl en tubs autoclavats de 1,5 ml refrigerats a -20°C, que es congelaven ràpidament en nitrogen líquid.

Material:

Medi LB: El medi *Luria Bertani* es preparava dissolent 10g de triptona, 5g d'extracte de llevat i 10g de clorur sòdic (NaCl) per litre d'aigua MilliQ. Un cop dissolt, es dipositava en erlenmeyer i s'autoclavava, per tal d'eliminar qualsevol microorganisme.

Solució TFB-I: Per a preparar 100ml barrejàvem 3ml d'acetat potàssic (KoAC) 1M, 5ml de clorur de manganès (MnCl₂) 1M, 10ml de clorur de rubidi (RbCl) 1M, 1ml de clorur de calci (CaCl₂) 1M, 15ml de glicerol i aigua MilliQ fins la resta de volum. Esterilitzàvem mitjançant filtració en porus de 0,22µm.

Solució TFB-II: Per a preparar 100ml barrejàvem 3 ml de salt sòdica d'àcid 3-(N-morfolino)propànsulfònic (NaMOPS) 1M a pH 7,0, 1ml de clorur de rubidi (RbCl) 1M, 7,5 ml de clorur de calci (Ca Cl₂) 1M, 15ml de glicerol i aigua MilliQ fins la resta de volum. Esterilitzàvem mitjançant filtració en porus de 0,22µm.

1.5 Transformació de bacteris

La transformació és una tècnica mitjançant la qual s'introdueix plasmidis d'interès en cèl·lules procariotes, basada en una alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana de les cèl·lules competents, el que facilita l'entrada de l'ADN (Sambrook 1989). En aquest projecte la transformació sempre s'ha dut a terme pel mètode del xoc tèrmic.

Es descongelava una alíquota de bacteris competents d'uns 50µl, sempre la soca *E.Coli DH5α* (*Life Technologies Invitrogene*), i es barrejava amb l'ADN plasmídic en una proporció no major a 10:1 (v/v). La barreja es mantenia durant 30 min en gel, i s'incubava a 42°C durant 1 minut. Passat aquest minut, es deixava refredar durant 5 minuts a 4°C i es procedia a dipositar 500µl de medi LB autoclavat. Es deixava creixent en agitació el cultiu a 37°C durant 1 hora, on els bacteris tenien temps de sintetitzar les proteïnes de resistència codificades pel plasmidi. Uns 100µl dels bacteris transformats es plaquejaven sobre una placa de LB més agar que incorporava l'antibiòtic corresponent. La placa es deixava creixent invertida durant 14 hores a 37°C, temps en el que si els bacteris havien incorporat els plasmidis formaven colònies.

Material:

Antibiòtics de selecció: Els d'ús en aquest projecte van ésser l'ampicil·lina, el cloramfenicol i la kanamicina

- a) *Ampicil·lina:* Es va preparar una solució mare a 50 mg/ml en aigua MilliQ, que es conservava a -20°C. La concentració d'ús era de 50 a 100 µg/ml.
- b) *Cloramfenicol:* Es va preparar una solució mare a 34 mg/ml en etanol, que es conservava a -20°C. La concentració d'ús era de 25 a 170 µg/ml.
- c) *Kanamicina:* Es va preparar una solució mare a 10 mg/ml en aigua MilliQ, que es conservava a -20°C. La concentració d'ús era de 10 a 50 µg/ml.

Plaques de LB-agar: Al medi LB s'afegia agar a l'1,5% (p/v). Una vegada autoclavat, es deixava refredar la solució fins a 50°C, i s'inclouïa la concentració adequada d'antibiòtic. Les plaques es preparaven en campana de flux laminar; quan la temperatura de la barreja havia disminuït a 50°C. Un cop solidificat l'agar les plaques es mantenien a 4°C fins el seu ús.

Glicerinat: Serveix per a fer un estoc de cultiu bacterià que es pot conservar a -80°C, i que permet créixer nous cultius a partir d'aquest sense necessitat de transformar nous bacteris. Aproximadament 1 ml de cultiu bacterià es barrejava amb 400µl de glicerol al 50% estèril en tubs per a congelació a -80°C.

1.6 Obtenció de l'ADN plasmídic

1.6.1 Miniprep

Protocol que permetia l'obtenció de plasmidis a baixa concentració, amb l'ajuda del sistema de columnes *QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN)*.

Una colònia bacteriana es picava mitjançant l'ús d'una punta autoclavada, i es deixava créixer en agitació un tub estèril que contenia 2ml de medi LB amb l'antibiòtic de selecció a una temperatura de 37°C, durant unes 12-14 hores aproximadament. Sobre 1ml d'aquest cultiu es passava a un tub d'1,5ml autoclavat, i es centrifugava a 3.300 g durant 1 minut a temperatura ambient, per tal de sedimentar els bacteris. El pellet bacterià, un cop descartat el sobrenedant, es dissolia en 250µl de tampó (50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA i 100 µg/ml d'ARNasa A). S'afegien 250µl de solució de lisi (200mM NaOH i 1% SDS) i s'invertia suaument 3 o 4 vegades, 5 min a temperatura ambient deixant per a que es produís la lisi bacteriana. Després, s'afegien 350µl de solució neutralitzadora (0,9M d'acetat potàssic i 4,2M Gu-HCl a pH 4,8), i es centrifugava a 15.700 g durant 10 minuts a temperatura ambient, per fer caure tots els ebris cel·lulars, el ADN cromosòmic i les proteïnes desnaturalitzades. El sobrenedant que contenia els plasmidis es feia passar per una columneta d'intercanvi iònic que reté només el ADN. Es centrifugava durant 1 minut a 15.700 g, i es netejava amb 750µl de solució de rentat (5M Gu-HCl i 30% etanol), finalment s'obtenien els plasmidis mitjançant incubació amb 50µl d'aigua MilliQ i centrifugació durant 2 minuts a una velocitat de 16.000 g.

1.6.2 Maxiprep

Protocol que permetia l'obtenció de grans quantitats de plasmidis, sobre 500µg, amb l'ajuda del sistema de columnes *NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel)*. El mètode també es basa en una lisi alcalina del cultiu cel·lular amb una posterior purificació de l'ADN per cromatografia d'intercanvi iònic en columna.

Es partia d'un cultiu propi per a fer miniprep, és a dir, una colònia bacteriana crescuda en agitació en 2ml de medi LB amb l'antibiòtic de selecció, durant 6 hores a 37°C, aproximadament. Aquest pre-cultiu es passava a un erlenmeyer que contenia 200 ml de medi LB i els antibiòtics apropiats, es deixava créixer en agitació a 37°C durant 12 hores. Es centrifugava a 3.300g durant 15 minuts a 4°C, per tal de sedimentar els bacteris. El pellet bacterià, un cop descartat el sobrenedant, es dissolia en 12ml de tampó (50mM Tris-Cl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100 µg/mL ARNasa A) i es passava a un tub estèril de 50ml de capacitat. S'afegien 12ml de solució de lisi (200mM NaOH i 1% SDS) i s'invertia suaument 3 o 4 vegades, deixant la lisi 5 minuts a temperatura ambient. Després, s'afegien 12ml de solució neutralitzadora (0,9M d'acetat potàssic i 4,2M Gu-HCl a pH 4,8). S'invertia el tub uns 3 cops, i s'aplicava a una columna equilibrada que contia un filtre. Un cop el lisat havia passat pel filtre, dipositàvem 15ml de solució d'equilibri al filtre de la columna (750mM NaCl, 50mM MOPS, pH7,0, 15% isopropanol, 0,15% Triton X-100). Quan aquest volum havia passat pel filtre, el descartàvem. Afegíem 25ml de solució de rentat (1,0M NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% isopropanol) a la columna sense el filtre. Els plasmidis s'obtenien amb 15ml de solució final (1,25M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8,5, 15% isopropanol). Es precipitava l'ADN amb 12,5ml d'isopropanol. Aquests 27,5ml totals els passàvem per una xeringa que contenia un filtre que retenia l'ADN. Un cop passat tot el volum, netejàvem amb 10ml d'etanol al 70%, es deixava assecar el filtre, passant aire per la xeringa, i s'obtenien els plasmidis amb 500µl de TE (10mM Tris-Cl, pH 8,0, 1mM EDTA).

1.7 Seqüenciació de l'ADN

El mètode emprat és el descrit per Sanger (Sanger and Coulson 1975) però modificat per Prober (Prober, Trainor et al. 1987) on es duu a terme una reacció de PCR amb l'ADN que es vol comprovar. La reacció es fa en presència de dideoxinucleòtids (ddNTP) marcats, cada un d'ells, amb un indicador fluorescent de longitud d'ona diferent. Aquests ddNTP acaben l'elongació de la cadena, doncs no tenen el grup 3'-OH necessari per a la formació de l'enllaç fosfodièster entre dos nucleòtids. Quan s'incorpora un ddNTP en la cadena naixent d'ADN, s'acaba la seva extensió, així doncs la reacció produeix diversos fragments de longitud variable. Posteriorment, aquestes

cadenaes són precipitades i analitzades per electroforesi en un sistema acoblat a fluorimetria.

La reacció de PCR tenia un volum final de 10µl, i es composava de 100ng del ADN plasmídic d'interès, 2µl d'encebadors sentit o antisentit a 2 µM, 3µl d'aigua MilliQ i 3µl de la barreja per seqüenciació, *Big Dye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*, que ja incorpora l'ADN polimerasa, els dNTPs i els ddNTPs marcats en tampó adequat.

Un cop finalitzada la reacció, l'ADN es precipitava i s'analitzava per electroforesi en un sistema acoblat a fluorimetria. Aquesta última part es duia a terme al servei de seqüenciació dels Serveis Científic-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona (UB), mitjançant el seqüenciador *ABI-PRISM 377 automatic DNA sequencer* (Perkin Elmer Applied Biosystems).

1.8 Obtenció d'ARN

Un dels usos de l'ARN en aquest projecte era la quantificació de l'expressió relativa d'un gen. El protocol consistia en una purificació de l'ARN total pel mètode de Trizol i posteriorment es feia una re-purificació d'aquest ARN mitjançant columna (*RNAeasy Total RNA Isolation kit, QIAGEN*). Si partíem de teixit realitzem les dues purificacions però si partíem de cèl·lules congelades tan sols fèiem la segona purificació.

1.8.1 Purificació amb Trizol

S'homogeneïtzaven 100mg de teixit per cada ml de Trizol (*Invitrogen*), gràcies a l'ajuda d'un polítró i mantenint sempre les mostres a 4°C. Es deixava reposar la mostra durant 5 minuts i es centrifugava a 11.000 g durant 10 minuts a 4°C, per tal d'eliminar el material insoluble. El sobrenedant el passàvem tubs autoclavats on dipositàvem 200µl de cloroform. Agitàvem els tubs i els deixàvem 5 minuts a temperatura ambient. Centrifugàvem les mostres a 4°C durant 15 minuts a 11.000 g. Es recuperava la part superior incolora, que es passava a tubs nous i es precipitava l'ARN amb 500µl d'isopropanol, deixant la barreja de 5 a 10 minuts a temperatura ambient. Centrifugàvem a 4°C durant 10 minuts a 11.000 g. Descartàvem el sobrenedant i el

pellet de color blanquinós es rentava amb 1ml d'etanol al 70%. Centrifugàvem a 4°C durant 10 minuts a 11.000 g. Deixàvem assecar el pellet, un cop descartat el sobrenedant, durant 5 minuts a temperatura ambient. Finalment es dissolia amb 100µl d'aigua lliure d'ARNases, i es desava a -80°C fins al seu ús.

1.8.2 Purificació mitjançant columna d'afinitat

Per la purificació mitjançant columna d'afinitat (*RNAeasy, Qiagen*).

Si partíem de l'ARN purificat de teixit als 100µl afegíem 350µl del tampó RLT. Si partíem de plaques de cèl·lules congelades, afegíem també el mateix volum de tampó, rascàvem amb espàtula tot el contingut de la placa, ho passàvem a un tub autoclavat i el contingut es passava cinc cops per xeringa d'un ml amb agulla de 25G. En tots els casos afegíem 350µl d'etanol al 70% per precipitar l'ARN. Passàvem tot el contingut a una columna i centrifugàvem a 11.000 g durant 1 minut a 4°C. Afegíem 700µl de tampó de rentat RW1 a la columna, i centrifugàvem a 11.000 g durant 1 minut a 4°C. Afegíem 500µl de la solució de rentat RPE i centrifugàvem a 11.000 g durant 1 minut a 4°C. Es tornava a centrifugar a 11.000 g durant 1 minut a 4°C, per tal d'eliminar les restes de solució. Finalment es recuperava l'ARN amb 50µl d'aigua lliure d'ARNases, deixàvem incubar durant 1 minut, centrifugàvem a 16.000 g durant 5 minuts a 4°C i desàvem l'ARN purificat a -80°C.

1.9 Quantificació de l'ARN

Per quantificar l'ARN, es va tenir en compte que una unitat d'absorbància a 260 nm, mesurada en cubeta de quars de 1000µl, equival a una concentració de 40 µg/ml aproximadament. Així doncs es seguia la següent fórmula:

$$RNA [\mu g / \mu l] = OD_{260} \times \frac{Volum\ final}{Volum\ RNA\ problema} \times \frac{40\ \mu g / ml}{1\ UA_{260}} \times \frac{1\ ml}{1000\ \mu l}$$

1.10 Retrotranscripció de l'ARN

La retrotranscripció la realitzàvem amb encebadors hexàmers degenerats per poder amplificar el 18S ribosomal, que no té cua poli-A amb el que no el podíem amplificar amb un polímer de deoxitimidines (poli-dT). Això ens permetia quantificar l'expressió d'un gen determinat normalitzant-la respecte als nivells de l'ARN 18S ribosomal. La reacció la realitzàvem usant el *Super Script III First-strand synthesis super mix (Invitrogen)* que conté la transcriptasa reversa del virus MML, que incorpora deoxinucleòtids a un encebador fent servir ARN com a motlle. A 5µg de ARN afegíem 1µl d'hexàmers degenerats (2,5 ng/ µl) i 1µl de tampó d'*annealing*, aquesta barreja l'incubàvem 5 minuts a 65°C i la deixàvem refredar a 4°C. Després afegíem 10µl de mix de reacció 2X RT que inclou MgCl₂ (10mM), i els dNTPs (10mM) i 2µl de l'enzim.

1.11 PCR quantitativa a temps real

Permet quantificar l'expressió d'un determinat gen relativa a un gen control. Per a tal fi, amplificàvem mitjançant una reacció de PCR l'ADN complementari (ADNc) procedent de l'ARN purificat de les mostres a analitzar amb sondes específiques per al gen que es vol mesurar. Les sondes es basen en la tecnologia *Taqman (Applied Biosystems)*, per a cada gen es dissenyen un parell d'encebadors i una sonda que hibrida en la regió que volíem amplificar. Aquesta sonda presenta un fluorocrom i un amortidor de fluorescència, un en cada extrem, així doncs només quan l'activitat 3'-5' exonucleasa de l'ADN polimerasa la degradi perquè està amplificant la regió on hibrida, es separen el fluorocrom i l'amortidor, i s'emet fluorescència. Aquesta serà proporcional a la quantitat d'ADN amplificat, que serà proporcional al nombre de còpies de ADNc inicial per a cada mostra. La fluorescència es determina en temps real, doncs si es fes en el final podria passar que la PCR es saturés. Així doncs s'acobra un detector de fibra òptica al termociclador que determina la fluorescència en el tub de cada mostra per a cada cicle. El perfil que s'obté és una corba sigmoïdal, en el que determinarem el cicle de la PCR en el qual es troba el punt d'inflexió i que només depèn de la quantitat de mostra inicial. Per tant obtindrem un número de cicle (C_T) on això succeeix.

El valor de C_T d'una determinada mostra per a un determinat gen se li resta el valor de C_T de l'ARN 18S ribosomal, l'expressió del qual no varia i obtenim d'aquesta manera el valor ΔC_T . Prenem com a referència una de les mostres, per exemple la mitjana del valor de les mostres control del nostre experiment, i aquest valor es resta de les demás mostres per aquell gen, obtenim així el valor de $\Delta\Delta C_T$. El resultat final que permet comparar quants cops s'expressa un determinat gen en una mostra en concret respecte a una altra mostra és funció de l'expressió $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Per a realitzar la PCR quantitativa en temps real (RT-Q-PCR) preparàvem 25 μ l de solució de *Taqman PCR Universal Master Mix* que incorpora també, nucleòtids i l'ADN polimerasa, 2,5 μ l de la sonda del gen d'interès i 5 μ l de cDNA (uns 33,5ng) de la mostra a analitzar que es trobava a una concentració de 6,7 ng/ μ l. A aquesta barreja la hi posàvem 10 μ l a tres pouets d'una placa de 384 pous de RT-PCR. Aquesta operació es repetia per a cada mostra i per a cada gen a analitzar, entre les sondes usades posàvem la del control intern l'ARN ribosomal 18S. Un cop la placa està finalitzada, la col·locàvem al termociclador *ABI Prism HT-7900 (Applied Biosystems)*, ubicat a la Unitat de Genòmica dels SCT de la UB.

Els resultats s'analitzen amb l'ajuda del programa SDS per al càlcul de les C_T , comparant al mateix temps i paràmetres totes les mostres i gens a determinar.

2. GENERACIÓ D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

L'estratègia de generació d'adenovirus recombinants està basada en la descrita prèviament per Becker i col·laboradors (Becker, Noel et al. 1994).

Per aquest procediment són necessaris dos vectors, el pACCMV.pla i el pJM17.

El vector pACCMV.pla (Gluzman and Ahrens 1982), que conté el promotor constituït de citomegalovirus (CMV), una seqüència de poliadenilació del plasmidi pUC19 i un fragment del genoma de SV40 que conté l'intró de l'antigen T, i una senyal de poliadenilació. Flankejant aquest casset d'expressió trobem dos fragments del genoma

de l'adenovirus 5, en la regió 5' hi ha un fragment que conté des de 0 fins a 1.3 unitats de mapa (mu) de l'adenovirus, i en la regió 3' trobem el fragment que conté des de 9.1 fins a 17 mu. La seqüència que compren les unitats de mapa de 1.3 fins a 17 conté la regió E1, que es troba inserit establement en la línia cel·lular 293. La regió E1A és particularment important per què expressa proteïnes requerides per l'expressió d'altres regions primerenques (E1B, E2, E3 i E4) (**Introducció general**).

El vector pJM17 (McGrory, Bautista et al. 1988), de 40 kb, conté el genoma complet de l'adenovirus 5, però en la posició 1.3 mu té inserit el plasmidi bacterià pBRX. Aquest vector doncs excedeix el límit d'empaquetament d'un adenovirus que és de 38kb, tot i que conté la regió E1 necessària per a expressar totes les proteïnes de la càpside, i per tant no és capaç de generar partícules víriques infectives.

La co-transfecció del vector pACCMV.pla que conté el cDNA d'interès i el vector pJM17 en cèl·lules 293 que tenen transfectat establement el gen E1A permet l'obtenció d'adenovirus només replicadors en les cèl·lules 293.

2.1 Co-transfecció de cèl·lules 293 per l'obtenció d'adenovirus

Disposàvem del cDNA de la LGS de rata subclonat en el vector pACCMV.pla, el vector final pAC-RnLGS (Gomis, Ferrer et al. 2000). La mutagènesi dirigida, serina per alanina, sobre aquest vector va permetre l'obtenció de tots els vectors necessaris per a generar els diferents adenovirus, que sobreexpressaven els mutants en els llocs de fosforilació de la LGS en cada una de les set serines homòlogues en seqüència a les de MGS. També es van generar dobles mutants, és a dir, vectors que tenen la LGS mutada en la serina 8, o lloc 2, en combinació amb una mutació en l'extrem C-terminal o bé una mutació en l'altra serina de l'extrem N-terminal.

Per a la generació de partícules víriques es va co-transfectar cèl·lules 293 crescudes en placa de 6 pous amb el vector pACCMV.pla que conté el gen d'interès i el vector pJM17 (1:2 ràtio molar pJM17:pACCMV.pla) mitjançant l'ús d'una solució endosomes (*Superfect*, *QIAGEN*), seguint les instruccions del fabricant, i fent servir diverses condicions en cada pou. Aproximadament 20 dies després de la co-transfecció, es

formaven plaques de lisi cel·lular en alguns dels pous. El contingut del pou es rascava, mitjançant l'ús d'una rascleta, i tot el contingut es dipositava en un tub de 15 ml de capacitat que es congelava a -20°C. Aquest contingut es feia servir per a generar una població d'adenovirus homogènia mitjançant l'assaig en placa.

2.2 Clons d'adenovirus. Assaig en placa

Sempre es va purificar un clon de l'extracte víric de la primera recombinació per a tenir una població homogènia d'adenovirus.

Infectàvem una placa confluent de cèl·lules 293 de 60 mm de diàmetre a un 80-90% de confluència amb una dilució $1/10^6$ de la solució d'adenovirus dissolta en 1ml de medi d'infecció durant 1 hora a 37°C. S'aspirava aquesta solució i s'afegien suaument 6 ml de la solució MEM/agarosa. La placa es deixava a temperatura ambient durant mitja hora, i quan l'agarosa estava solidificada es dipositava a dins d'un incubador. Passats uns set dies es veien les primeres plaques de lisi. Aquestes s'extreien mitjançant l'ajuda d'una punta de pipeta autoclavada, i es dipositava aquest tros d'agarosa en un tub amb 2 ml de medi d'infecció, el qual es congelava a -20°C. Això ho fèiem servir per a fer amplifacions d'una població homogènia dels adenovirus d'interès, després de la corresponent seqüenciació de l'ADN viral per comprovar que contenia el gen d'interès

Material:

Medi d'infecció: Medi DMEM amb 25mM glucosa, a l'1% sèrum fetal boví inactivat (FBS), i amb els antibiòtics penicil·lina 0.1mg/ml i estreptomicina 100U/ml (S/P).

Medi MEM/agarosa: Es pesava 0.325g d'agarosa de baix punt de fusió (*Low Melting Point agarose, Sigma*) i s'afegien 25ml d'aigua MilliQ. Tot el contingut es dissolia mitjançant l'ús de microones, i es mantenia a una temperatura de 42°C fins al seu ús. El medi MEM usat es preparava afegint 100ml de medi 2X MEM (*Gibco*), 11.2ml de FBS i 1,1ml de la barreja d'antibiòtics S/P, i es filtrava en porus de 0,22µm. Finalment es barrejava el mateix volum del medi MEM preparat i d'agarosa dissolta.

2.3 Extracció de l'ADN viral. Mètode de Hirt

El mètode de Hirt (Hirt 1967) és un mètode que permet enriquir la mostra en ADN de petita mida, i desfer-se de l'ADN genòmic. Per tant, permet extreure l'ADN viral d'una barreja d'ADN provinent de cèl·lules infectades amb adenovirus.

S'infectava una placa de 60mm de diàmetre de cèl·lules 293, amb una barreja solució de 500 µl dels adenovirus obtinguts després de l'assaig en placa dissolts i 500µl de medi d'infecció, i es deixava en un incubador a 37°C durant 1 hora. Passat el temps d'incubació, canviàvem el medi per 3ml de medi d'infecció. Després de 24 o 36 hores, depenent de la concentració vírica, les cèl·lules presentaven un aspecte rodó. En aquest punt aspiràvem el medi i afegíem 800 µl de solució de lisi. Deixàvem que es produís la lisi cel·lular durant 2 hores a 37°C. Passat aquest període afegíem 200µl de clorur de sodi 5M, i ho deixàvem incubant durant 12-14 hores a 4°C. Passat aquest temps, es rascava el contingut de la placa amb l'ajuda d'una rascleta estèril i passàvem el contingut a un tub d'1,5ml autoclavat. Centrifugàvem el tubs a 4°C i una velocitat de 11.000 g durant 30 minuts. El sobrenedant es recuperava i es dipositaven 500µl en un nou tub. S'afegia el mateix volum de fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1) ultrapur (USB), barrejàvem i centrifugàvem a 11.000 g durant 2 minuts a 4°C. Recuperàvem la fase superior, la dipositàvem en un tub i afegíem 500 µl d'isopropanol. S'agitaven els tubs i es deixaven durant una hora a -20°C. Passat aquest temps, obteníem un pellet d'ADN precipitat mitjançant centrifugació dels tubs a 16.000 g a 4°C durant 30 minuts. Aquest pellet es rentava amb 200µl d'etanol al 70%. Centrifugàvem a 16.000 g durant 15 minuts a 4°C. Descartàvem el sobrenedant, deixàvem assecar el pellet i el dissolíem amb 50 µl de tampó TE.

Material:

Solució de lisi: Afegíem 1ml de Tris 0.1M, 1ml EDTA 0.1M, 8 ml d'aigua MilliQ i 60µl de SDS al 20%, es barrejaven i finalment s'inclouïen 14.8µl de proteïnasa K (20 mg/ml en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, Roche)

Tampó TE (10mM Tris-HCl pH 7.5 i 1mM EDTA): Per a 10ml es barrejaven 100µl de Tris-HCl a pH 7.5, 100µl d'EDTA 0.1M i 9.8ml d'aigua MilliQ.

2.4 Amplificació d'adenovirus

Es van amplificar els adenovirus per tal de tenir un estoc que ens permetis realitzar els experiments desitjats. El mètode utilitzat és el descrit per Becker *et al* (1994).

Es preparava una placa confluent de cèl·lules 293 de 60 mm de diàmetre, i s'infectava amb una barreja de 500µl de solució d'adenovirus provinent de l'assaig en placa, i 500µl de medi d'infecció. Passada una hora a 37°C, es canviava el medi per 3ml de medi d'infecció. A les 24 – 36 hores post-infecció, les cèl·lules presentaven un aspecte rodó. En aquest punt, rascàvem el contingut de la placa amb l'ajuda d'una rascleta i congelàvem tot el contingut en un tub de 15 ml de capacitat a -20°C.

Es preparaven 5 plaques de 100 mm de diàmetre de cèl·lules 293 per a cada virus desitjat. Aquestes plaques s'infectaven amb el sobrenedant obtingut en el pas previ uns 2 ml, amb 48 ml de medi d'infecció, i dipositàvem 5 ml a cada placa de 100 mm de diàmetre. Es deixava incubar durant 2 hores a 37°C, i passat aquest període es canviava el medi per 10 ml de medi d'infecció nou per a cada placa. Passades unes 24 hores les cèl·lules presentaven un aspecte rodó, llavors es recollia el medi amb restes cel·lulars mitjançant l'ajuda d'una rascleta estèril i es desava el contingut en tubs que es congelaven a -20°C. Per tal de deixar lliures les partícules víriques es seguien 3 cicles de congelació i descongelació. Acabat el procés es centrifugava l'extracte a 1500 rpm durant 5 minuts, per eliminar les restes cel·lulars, i el sobrenedant es repartia en diverses alíquotes que es congelaven a -20°C.

Cicles de congelació-descongelació: es realitzaven tres cicles de congelació i descongelació, és a dir, la solució d'adenovirus congelada a -20°C es passava a uns 25°C, mitjançant un vas de precipitats amb aigua, tres cops.

2.5 Concentració d'adenovirus per gradient de clorur de cesi

El procediment constava de tres passos. El primer era la obtenció de grans quantitats d'adenovirus mitjançant infecció de cèl·lules 293. El segon, l'obtenció d'una solució

d'adenovirus descartant les restes cel·lulars. Finalment l'últim pas era la concentració d'adenovirus i obtenció d'alíquotes preparades per a procediments *in vivo*.

Pel primer pas infectàvem una placa de 100mm de diàmetre on teníem cèl·lules confluents creixent amb una barreja de solució d'adenovirus amplificat, però d'estocs primerencs, i de medi d'infecció en un volum d'1ml, i ho deixàvem durant 2 hores a 37°C, passat aquest temps es canviava el medi per 10ml de medi d'infecció nou. A les 24 hores les cèl·lules presentaven un aspecte rodó, en aquest punt les rascàvem amb l'ajuda d'una rasqueta autoclavada, les recuperàvem juntament amb el medi, i ho dipositàvem tot en un tub de 15ml que posteriorment desàvem a una temperatura de -20°C. Es descongelava el tub i es centrifugava a 1500 rpm durant 5 minuts, el sobrenedant el fèiem servir per a infectar 15 plaques de 150mm de diàmetre de cèl·lules 293. Les cèl·lules es deixaven durant 2 hores a 37°C, i passat aquest temps es reemplaçava el medi que contenia els virus per 15ml de medi d'infecció nou. De 24 a 36 hores aproximadament, les cèl·lules presentaven un aspecte arrodonit, les rascàvem, les recuperàvem juntament amb el medi i ho dipositàvem tot en 4 tubs que congelàvem a -20°C.

Pel segon pas descongelàvem els tubs i hi afegíem 200µl del detergent no iònic *IGEPAL CA630 (Sigma)* per cada 50ml, i dipositàvem els tubs en un orbital a temperatura ambient durant 15 minuts. Centrifugàvem a 20000 g durant 30 minuts a 4°C. En tubs nous posàvem 30ml d'aquest sobrenedant i 15ml d'una solució de polietilè glicol al 20%. Aquesta solució la deixàvem actuar durant 12 hores en agitació orbital a 4°C. Centrifugàvem el contingut de dos tubs a 20000 g durant 30 minuts a 4°C, descartàvem el sobrenedant i hi dipositàvem el contingut de dos tubs més provinents de la incubació durant 12 hores, i repetíem l'operació per tal de concentrar el pellet que contenia els adenovirus. Un cop ho havíem centrifugat tot, dissolíem cada pellet amb 4ml de PBS estèril i ho dipositàvem en un nou tub.

Finalment, centrifugàvem el tub amb la solució d'adenovirus durant 5 minuts a 4000 g a temperatura ambient. Recuperàvem el sobrenedant. En tubs de policarbonat de 11 x 34 mm pel rotor MLA-130 d'ultracentrifuga, dipositàvem 1ml de sobrenedant i clorur de cessi fins que els tubs pesaven d' 1,32 a 1,34 grams. Es centrifugàvem a 361000 g

(90000 rpm), amb acceleració tipus 9 i desacceleració tipus 2, a una temperatura de 25°C durant 3 hores, per a formar un gradient d'adenovirus. Al finalitzar, es visualitzava una banda blanca d'adenovirus a la meitat dels tubs aproximadament. S'extreia amb cura la fase superior, es recuperava aquesta banda blanca i es dipositava en un tub estèril. Afegíem PBS estèril fins arribar a un volum final de 2,5 a 3ml. Aquest volum el passàvem per a una columna (*PD-10 Sephadex, Pharmacia*) equilibrada prèviament amb PBS estèril. Quan la solució d'adenovirus havia passat totalment per la columna, dipositàvem 4ml de PBS estèril. Recollíem fraccions de 500µl en uns 8 tubs autoclavats, aproximadament. Finalment determinàvem la concentració d'adenovirus mesurant l'absorbància a 260 nm de dilucions 1/50 de les fraccions recollides, prenent com a blanc 100µl de PBS. Calculàvem el títol fent servir la següent fórmula:

$$\text{partícules víriques} = OD_{260} \times \frac{50}{1} \times \frac{10^{12} \text{ vp adenovirus/ml}}{1 UA_{260}} \times 500 \mu\text{l}$$

Preparàvem fraccions d'adenovirus de 500µl a una concentració de 1×10^{12} partícules víriques que es guarden a -80°C per al seu ús *in vivo*.

Material:

Polietilè glicol al 20% o Solució de PEG8000/NaCl: Es pesaven 200g de PEG8000 (Sigma), 146 g de clorur de sodi i s'afegia d'aigua MilliQ fins un litre.

2.6 Infecció de cèl·lules en cultiu

El procés d'infecció de cèl·lules amb adenovirus començava amb un rentat de les mateixes amb PBS. Seguidament, es tractaven les cèl·lules durant 2h amb 1 ml (plaques de 60 mm de diàmetre de solució amb virus amplificada diluïda en medi d'infecció (**Punt 2.4**)). Passat el temps d'incubació es retirava el medi s'hi afegia nou medi amb diferents característiques en funció de l'experiment. Abans de qualsevol experiment es van deixar transcórrer entre 14 i 16 hores per a l'expressió de la proteïna recombinant en hepatòcits i unes 36 hores en el cas de línies cel·lulars estables per aconseguir una major expressió.

3. CULTIU CEL·LULAR DE LÍNIES ESTABLES

3.1 Cèl·lules 293

Línia cel·lular que procedeixen de ronyó d'embrió humà (*ATCC CRL 1573*). Aquesta línia cel·lular és emprada per a la generació i amplificació d'adenovirus no replicatius, doncs presenten de manera estable el gen AdE1A de l'adenovirus tipus 5 (Graham, Smiley et al. 1977). Aquest gen, que per estratègia manca en els diferents adenovirus generats, és necessari per a la replicació vírica. El medi de manteniment d'aquesta línia és DMEM amb 25mM Glucosa, 10% de FBS i S/P.

3.2 Cèl·lules FTO2B

Hepatoma de rata (Zvibel, Fiorino et al. 1998). El medi de manteniment d'aquesta línia és DMEM amb 25mM Glucosa, 10% de FBS i S/P.

3.3 Manteniment de cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars es mantenen en incubadors en un ambient a 37°C, al 5% de CO₂ i 95% d'humitat. Quan s'arribava a un 80-90% de confluència, es tripsinitzaven i plaquejaven per tal d'assegurar la seva viabilitat. La tripsinització consisteix en la disgregació de les cèl·lules mitjançant un tractament amb tripsina al 0.25% i EDTA 1mM, prèviament les cèl·lules són rentades amb tampó PBS, per tal d'eliminar qualsevol resta de sèrum del medi de cultiu que pot interferir amb la digestió. Un cop disgregades, les cèl·lules es recollien i centrifugaven a 405 g durant 5 minuts, s'eliminava el medi amb tripsina i el pellet cel·lular es disgregava amb medi de manteniment nou. Les cèl·lules es plaquejaven en noves plaques de cultiu, de 150, 100 o 60 mm de diàmetre segons les necessitats, a una densitat de 60.000 cèl·lules/cm² aproximadament.

La congelació de les cèl·lules es realitzava després de la tripsinització, però el pellet cel·lular es disgregava amb 1ml de FBS amb un 10% de DMSO com agent

crioprotector. Aquesta suspensió cel·lular es dipositava en criotubs i es realitzava una congelació progressiva en un contenidor de cèl·lules a -80°C. Finalment els criotubs es desaven en tancs de nitrogen líquid. Quan les cèl·lules havien d'ésser descongelades per al seu us, es procedia a escalfar-les en un bany a 37°C i dipositar-les en un tub amb medi de manteniment, el qual es centrifugat durant 5 minuts a 1000 rpm. El pellet cel·lular es disgregava amb medi de cultiu propi de cada línia cel·lular, es plaquejava en plaques de 100mm de diàmetre i es mantenien en un incubador en ambient a 37°C, al 5% de CO₂ i 95% d'humitat

4. PROCEDIMENTS AMB ANIMALS

4.1 Tipus d'animals usats

4.1.1 Animals sans

Rates mascles Wistar (*Harlan o Charles River*) de 180 a 200 g de pes, alimentats amb aigua i menjar *ad libitum* (*Harlan Tekland Laboratory diet 7001, 65% carbohidrats 25% proteïnes i 4% grasses*). Les rates eren estabulades a una temperatura de 22°C i amb cicle de llum-fosc de 12 hores (8 del matí a 8 del vespre).

4.1.2 Animals diabètics tipus I per injecció de STZ

El procediment consistia en injectar en el peritoneu una solució d'estreptozotocina (STZ) a rates mascles Wistar, que havien estat dejunades durant 18 hores, a una dosi de 45 mg / kg. La STZ es preparava fresca en tampó citrat sòdic 100mM pH 4,5, NaCl 0.9% (w/v). Entre 5 i 7 dies després de la injecció de la STZ es mesurava la glicèmia per extracció de sang mitjançant un tall en la cua dels animals i l'ús d'un monitor *Glucometer Elite (Bayer)*.

4.2 Cultiu primari d'hepatòcits

Per a obtenir cultiu primari d'hepatòcits de rata en cultiu es van usar rates mascles Wistar que 12 hores abans de l'operació les rates eren dejunades.

La tècnica emprada per aïllar els hepatòcits del teixit va ésser descrita per Berry i Friend (Berry and Friend 1969) i posteriorment modificada per altres autors (Seglen 1972; Seglen 1973; Seglen 1973). La tècnica es basa en la perfusió recirculant del fetge amb una solució de col·lagenasa A (*Boehringer Mannheim, Sigma*).

Els animals s'anestesiaven per injecció de tiopental sòdic a 200 mg/kg via peritoneu (*Tiobarbital Braun 0.5g, Braun Medical*). Un cop obert l'abdomen i visualitzada la vena porta, a la que se li aplicava un tub semirígid de plàstic de 12 mm de diàmetre, després d'haver-hi realitzat un tall longitudinal d'uns 5 mm. Per la cànula s'introduïa, a un flux mínim, una solució bicarbonatada de Krebs-Ringer, que contenia NaCl 118,5 mM, KCl 4,8 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EGTA 0,5 mM i glucosa 5 mM, inicialment a 37°C i es gaseja amb carbogen (O₂/CO₂ 19:1) saturat d'aigua de manera que el pH s'ajustà a 7,4. Després d'introduir la cànula a la vena porta, es va seccionar la vena cava inferior per la part baixa de la cavitat abdominal i es va col·locar el fetge sobre una malla de niló. Per la cànula es va fer passar una solució que contenia col·lagenasa 50 mU/ml i CaCl₂ 60mM, de 12 a 16 minuts. El fetge es va submergir en una solució de Krebs-Ringer sense glucosa en presència de CaCl₂ 2,5 mM i albúmina de sèrum boví 15 mg/ml. Llavors es va procedir a extreure la membrana fibrosa que envoltava el fetge amb l'ajut d'unes pinces, per després agitar-lo suaument, i així s'alliberaven les cèl·lules. La suspensió cel·lular es filtrava i es feien dos cicles de rentat amb l'anterior tampó. A les cèl·lules s'afegia medi DMEM complementat amb 10mM glucosa, 10% FBS, , insulina 100nM, dexametasona 100 nM, i S/P.

Un cop obtinguda la suspensió d'hepatòcits, es va procedir al comptat cel·lular en una càmera de *Newbauer*. També es calculà la viabilitat segons el mètode d'exclusió de blau tripà (Howard and Pesch 1968), i que oscil·lava entre el 80-90%.

Els hepatòcits eren sembrats en plaques revestides de col·lagen a una densitat final de 6×10^6 cèl·lules / cm^2 , partint de la solució mare de 0.58×10^6 cèl·lules / ml. Les plaques es van mantenir a un incubador a 37°C de temperatura, 90% d'humitat i 5% de CO_2 durant un període de 3 hores. A continuació es rentava la monocapa cel·lular per tal d'eliminar les cèl·lules mortes no adherides, i es procedia a fer l'experiment.

4.3 Injecció intravenosa d'adenovirus purificats

Les rates Wistar mascle s'anestesiaven mitjançant inhalació d'una solució d'isofluorà al 2%, i es procedia a injectar una dosi d'adenovirus purificats de 2×10^{12} pfu / ml per 200g de pes corporal.

Un cop finalitzada l'administració, els animals s'estabulaven en gàbies individuals per a un control diari de la ingesta i beguda, que s'administrava *ad libitum*. Cada dia es procedia a mesurar la glicèmia en sang perifèrica, en aquest cas de la cua de l'animal. Per evitar la realització d'un número excessiu de talls a la cua dels animals, es va portar a terme un primer tall i després s'extreia sang a través del trencament del coàgul d'aquesta primera ferida. El volum de sang extret mai era superior a $3\mu\text{l}$ per a la seva monitorització amb un Glucometer Elite.

Al finalitzar l'experiment, al dia 5 o 6 post-infecció, es va practicar l'eutanàsia dels animals per anestesia amb tiopental sòdic a 200 mg/kg, i extracció de sang cardíaca. Els diferents teixits es van recol·lectar i congelar en nitrogen líquid per a posteriorment realitzar els diferents estudis metabòlics.

4.4 Test de tolerància a la glucosa

El test de tolerància es realitzà al cinquè dia post-injecció d'adenovirus en animals que havien estat prèviament dejunats durant 18 hores. Es va injectar 2g de glucosa / kg de pes corporal via peritoneu als animals. Es va mesurar la glicèmia mitjançant l'ús d'un monitor *Glucometer Elite* als 0 (abans de la injecció de glucosa), 15, 30, 90, 120, 150 i 180 minuts post-injecció.

5. DETERMINACIÓ I SEPARACIÓ DE PROTEÏNES

5.1 Concentració proteica

La valoració de proteïnes es va realitzar mitjançant el Mètode de Bradford (Bradford 1976). El mètode està basat en el canvi del blau brillant de Comassie en resposta a diferents concentracions de proteïna. En una solució àcida, el blau brillant de Comassie, quan es lliga a proteïnes, canvia el màxim d'absorbància de 465 nm a 595 nm.

Les mostres a analitzar es van diluir en aigua MilliQ fins a un volum final de 50µl. Com a patrons es van utilitzar diferents dilucions d'albumina de sèrum boví (BSA) a unes concentracions finals de 1, 2, 5, 10, 15 i 20 µg/µl. En tots els casos es va afegir 1ml de reactiu de Comassie (dilució 1:5 del colorant comercial *Bio-Rad protein assay*). Després de 5 minuts d'incubació, i mai excedint 60 minuts, es va mesurar l'absorbància de les mostres a 595nm, fent servir com a blanc d'assaig 50µl d'aigua MilliQ i 1ml de reactiu. Els resultats s'expressaven en µg de proteïna per µl.

5.2 Western blot

La separació de proteïnes d'un extracte es va dur a terme amb una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (Laemmli 1970) (SDS-PAGE, ref Laemmli 1970 i Tobwin 1992). L'extracte proteic es va tractar amb un tampó que contenia SDS i per tant conferia càrrega negativa a les proteïnes, mantenint constant la relació càrrega-massa. Les proteïnes es feien córrer en una malla del polímer acrilamida-bisacrilamida per acció d'un camp elèctric. La malla era de dos tipus, el primer gel, de porus grans, era concentrador i permetia l'acumulació de les proteïnes en una banda discreta abans de passar pel segon gel, que presentava porus més petits, i permetia la separació de les diferents proteïnes pel seu pes molecular.

L'extracte proteic dissolt en tampó de càrrega (glicerol 20% v/v, 2-mercaptoetanol 4% v/v, blau de bromofenol 60 µg/ml i Tris-HCl 125mM pH=7.8) s'escalfava a 100°C durant 5 minuts per a facilitar la seva aplicació en el gel. Es carregava la mateixa quantitat total de proteïna en cada pou. Els gels usats eren de 10x8cm, 0,75mm de gruix

i al 8 o 10% d'acrilamida, preparats usant l'aparell *miniprotean* (Bio-Rad). La diferència de potencial usada era de 150-200V i el tampó d'electroforesi estava compost per Tris-HCl 25mM, glicina 0.192M, SDS 0.2% a pH=8.3.

La tècnica de transferència usada es va descriure per Gershoni i Palade (Gershoni and Palade 1983). Implicava un muntatge en el qual la membrana de nitrocel·lulosa es dipositava sobre el gel, i el conjunt es comprimia. La transferència de les proteïnes des del gel a la membrana es va realitzava per electroforesi a un voltatge fix de 100V durant 30 minuts, amb presència de gel per tal de refredar. El tampó usat estava format per Tris/HCl 20mM, glicina 150mM i metanol al 20% (v/v) a pH 8,3. Un cop finalitzada la transferència, les membranes es tenyien amb una solució de vermell de *Ponceau* (0,5g vermell Ponceau, 2,5ml àcid acètic glacial i aigua MQ fins 250ml). Amb aquesta tinció de les proteïnes es comprovava que la transferència havia funcionat correctament. Les membranes es destenyien mitjançant un rentat amb PBS, Tween-20 0.05% (v/v, *Sigma*) a ph=7.4.

Per a la immunodetecció es realitzaven els passos:

- a) Bloqueig: Incubació de la membrana amb solució de al 3% (p/v) en PBS, Tween-20 0.05% durant 30 minuts.
- b) Incubació amb anticòs primari: A la solució de bloqueig nova s'aplica l'anticòs específic per a la proteïna d'interès a la dilució recomanada per la casa comercial. La membrana s'incuba per un període mínim d'1 hora a temperatura ambient a un període màxim de 12 hores a 4°C. Per tal d'extreure les restes d'anticòs no unit es procedeix a fer un mínim de tres rentats amb PBS, Tween-20 0.05% (v/v) de 10 minuts de duració.
- c) Incubació amb anticòs secundari: A la solució de bloqueig nova s'aplica l'anticòs secundari conjugat a la peroxidasa de rave (*Horseradish peroxidase, HRP*) i que reconeix específicament l'espècie de l'anticòs primari. La membrana s'incuba per un període mínim de 30 minuts a un període màxim d'1 hora a temperatura ambient. Per extreure les restes d'anticòs secundari no unit a l'anticòs primari es procedeix a fer un mínim de tres rentats amb PBS, Tween-20 0.05% (v/v) de 10 minuts de duració.

- d) Detecció: La detecció de les bandes corresponents a la proteïna d'interès s'aconseguia mitjançant un mètode fotomètric. El revelat de les membranes es va dur a terme amb una incubació de 5 minuts amb una solució de luminol (ECL Plus, Amersham), doncs la reacció de detecció es basava en la seva oxidació. Així doncs la peroxidasa de rave catalitzava l'oxidació del luminol en presència de peròxid d'hidrogen, i això desencadenava una reacció quimioluminiscent que amb l'ús de films de radiografia ens permetia visualitzar la presència de les diferents bandes corresponents a les proteïnes d'interès.

Els anticossos primaris que es van fer servir van ésser: anticòs policlonal de conill que reconeix la LGS de rata (Garcia-Rocha, Roca et al. 2001), anticòs policlonal de conill que reconeix la GS (muscular i hepàtica) fosforilada en el residu 3a o Ser-640 (PGS Ser640 Cell Signaling), anticòs policlonal de conill que reconeix la GK de rata (de la Iglesia, Veiga-da-Cunha et al. 1999), anticòs policlonal d'ovella que reconeix la PEPCCK de rata (donació de Dr. Daryl Granner, Vanderbilt University) (Leverence, Beale et al. 1988), anticòs policlonal de conill que reconeix la GP hepàtica de rata (Gomis, Ferrer et al. 2000; Gomis, Favre et al. 2003), anticòs policlonal de pollastre que reconeix la GP de rata fosforilada en la Ser-14 (Gomis, Favre et al. 2003), anticòs monoclonal de ratolí que reconeix la GAPDH (Ambion), anticòs monoclonal de ratolí que reconeix la gamma tubulina (Sigma), anticòs policlonal que reconeix l'AMPK fosforilada en la Thr 172 (Cell Signaling), anticòs monoclonal que reconeix la quinasa p44/42 MAPK (ERK1/2) fosforilada en els residus Thr-202/Tyr-204 (Cell Signaling), anticòs policlonal de conill que reconeix la p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Upstate Biotechnology, Waltham), anticòs policlonal de conill que reconeix la quinasa PKB/Akt fosforilada en el residu Thr-308 (Cell Signaling), anticòs policlonal de conill que reconeix la quinasa PKB/Akt fosforilada en el residu Ser-473 (Cell Signaling). També es va generar un anticòs policlonal de conill que reconeix la LGS fosforilada en el residu 2 o Ser-7, l'anticòs va ésser fabricat contra el pèptid LRGRSLpSVTSLGGL, dels residus de l'1 al 14 de la LGS de rata (PGS Ser7, Davids Biotechnologie).

Els anticossos secundaris conjugat a la peroxidasa de rave usats varen ésser: anticòs que reconeix anticossos primaris de conill (Amersham), de ratolí (DakoCytomation), de pollastre (Chemicon) i d'ovella (DakoCytomation).

La densitometria de les diferents bandes corresponents a les proteïnes d'interès van ésser quantificades amb l'ús del software *Image J Software (NIH)*.

6. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

6.1 Determinació de l'activitat GS

L'activitat enzimàtica fou determinada mesurant la incorporació d'UDP-[¹⁴C]-glucosa a glicogen (Thomas, Schlender et al. 1968).

Si es mesurava aquesta activitat a partir de plaques de cèl·lules congelades a -80°C, aquestes cèl·lules, mantingudes a 4°C gràcies a l'ús de gel, es recollien mitjançant 100µl de tampó d'homogeneïtzació (10 mM Tris-HCl de pH 7,0, 150 mM KF, 15 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoetanol, 0,6 M sacarosa, 10 µg/ml leupeptina, 1 mM benzamidina i 1 mM PMSF) i l'ús d'una rasqueta. Si es mesurava aquesta activitat a partir de teixits polvoritzats mantinguts al -80°C, es posava un ml del tampó d'homogeneïtzació per cada 100 mg de teixit. L'homogeneïtzació es duia a terme mitjançant l'ús d'un politró, en gel. La presència del ió fluorur en el tampó d'homogeneïtzació inhibeix l'activitat proteïna fosfatasa que pogués tenir l'extracte cel·lular. L'EDTA s'afegeix com a segrestador dels ions magnesi, necessaris per l'activitat proteïna quinasa responsable de la fosforilació de l'enzim. Així s'eviten canvis en l'estat de fosforilació de l'enzim durant la manipulació de les mostres. Els extractes cel·lulars es passaven 5 cops per xeringa de 25G, i es feien servir per a la mesura de l'activitat.

En tots els casos l'activitat GS es va mesurar en absència i presència de Glc6P. Per determinar l'activitat glicogen sintasa en absència de Glc6P s'utilitzava una solució formada per: UDP-[¹⁴C]-glucosa 2000 cpm/µl, UDP-glucosa 6,7 mM, glicogen 10 mg/ml, KF 25 mM, EDTA 20 mM, i Tris 50 mM ajustat a pH 7,8 amb HCl. Si es determinava en presència de Glc6P es preparava la mateixa solució però canviant la concentració d' UDP-[¹⁴C]-glucosa a 1000 cpm/µl i s'hi afegia Glc6P 10,8 mM.

Per a realitzar l'assaig, es dipositaven 40µl de la solució d'assaig en un bany a 30°C. Tot seguit, s'hi afegien 20µl de mostra i la barreja es deixava incubar 10 minuts a 30 °C. Una vegada passats aquests minuts, s'extreien 50µl de la barreja de reacció i es dipositaven en un tros de paper 31-ET (*Whatman*). El glicogen es precipitava en el paper per immersió d'aquest en etanol 66% a una temperatura de -20°C durant 10 minuts. És aquest canvi de temperatura el que provocava la precipitació i fixació al paper del glicogen present en la barreja. Després de dos rentats de 10 minuts amb d'etanol 66% a temperatura ambient, els papers es submergien en acetona per desplaçar l'etanol 66% i poder assecar-los completament. Els papers secs s'introduïen en vials que contenen líquid de centelleig *Ecolite (MP)*. La radioactivitat es comptava amb un comptador de centelleig *Rack BETA 1217 (LKB)*. L'activitat GS s'expressava com a mU per mg proteïna en el cas de l'activitat provinent de cèl·lules i mU per mg teixit en el cas de mesura de l'activitat GS en teixit.

6.2 Determinació de l'activitat GK i HK

L'activitat enzimàtica fou determinada mesurant la capacitat de la mostra de convertir la glucosa inicial en Glc6P (Kuwajima, Newgard et al. 1986). Degut a que la Glc6P no pot ésser quantificada directament, acoblàvem una reacció d'oxidació que generava NADH, mesurable per espectrofotometria a 340 nm.

Es va modular la quantitat de glucosa inicial en la barreja de reacció per tal de determinar la fracció d'activitat corresponent a la GK i a la resta d'hexoquinases, gràcies a les diferències d'afinitat per a la glucosa que presenten aquests enzims. Amb una concentració de glucosa de 0,5 mM només mesuràvem l'activitat de les HK I, II i III. En canvi, amb una concentració de 100 mM mesuràvem les activitats de totes les hexoquinases, inclosa la GK. A part, també es mesurava l'activitat sense glucosa, per tal d'establir la línia base, que es restà a les altres mesures. La resta de les mesures amb 100 mM o 0,5 mM glucosa ens proporcionava l'activitat de la GK.

Es mesurà aquesta activitat a partir de teixits polvoritzats mantinguts al -80°C, es van homogeneïtzar 100 mg de teixit en un ml del tampó (Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM,

EDTA 1 mM, 10% sacarosa (p/v), β -mercaptoetanol 0,1 mM a pH 7,4) mitjançant l'ús d'un politró, a 4°C. Les mostres es centrifugaven a 13.000 g durant 15 minuts. Les mesures es van realitzar dels sobrenedant amb l'ajuda de l'autoanalitzador Cobas Bio (*ABX Diagnostics*).

Amb les absorbàncies de cada mostra es van fer les línies de regressió de les quals es va extreure el pendent, que expressava l'activitat fosforiladora de glucosa $\Delta A_{340\text{nm}} / \text{min}$, que es transformà en mU per mg de proteïna.

6.3 Determinació de l'activitat GP

La determinació de l'activitat GP es va mesurar a partir de teixits polvoritzats mantinguts al -80°C, que foren preparats en el mateix tampó i en les mateixes condicions que s'indiquen a l'apartat 6.1 per a la determinació de l'activitat GS.

Aquesta activitat es va mesurar mitjançant un assaig radiomètric consistent en la mesura de la incorporació de [14-C]-glucosa-1-fosfat a glicogen, seguint la tècnica descrita per Gilboe i col (Gilboe, Larson et al. 1972), en absència o presència de diferents efectors. L'assaig es basa en la incubació de la GP en unes condicions en les quals es sintetitza glicogen en comptes de degradar-lo. Es una mesura de la quantitat de glicogen produït per la GP per unitat de temps i proteïna. La GP es pot trobar en estat fosforilat i actiu (forma a) i en estat defosforilat i inactiu (forma b).

Per determinar l'activitat GP s'emprà la barreja d'assaig formada per: [14-C]-glucosa-1-fosfat a la concentració de 75mM (0,005mCi/mmol), KF 125mM i glicogen al 0,6% a un pH de 6,3. Per determinar l'activitat de la forma a, s'addicionà cafeïna a la barreja d'assaig a una concentració final d'1mM, que és un inhibidor de la forma b.

L'assaig radiomètric d'activitat es realitzà de la mateixa manera que per a la GS, a 30°C durant 30 minuts emprant el mateix procediment i les mateixes condicions d'assaig. L'activitat s'expressà com activitat específica (mU/mg teixit).

7. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS

7.1 Determinació de la quantitat de glicogen

Es va determinar el glicogen tant d'extractes cel·lulars preparats a partir de plaques de cèl·lules congelades a -80°C , com de teixit polvoritzat procedent dels experiments *in vivo*. Per a determinar el glicogen d'extractes cel·lulars es van afegir $100\mu\text{l}$ d'una solució de KOH al 30% per placa de 60 mm de diàmetre mantinguda a 4°C , i amb l'ajut d'una rascleta es recuperava tot el contingut. Per a determinar el glicogen emmagatzemat de teixits s'homogeneïtzaven 100mg de teixit en $300\mu\text{l}$ de la solució de KOH al 30% amb l'ajuda d'un polítró. Els extractes alcalins es van incubar a 100°C durant 15 minuts, i la quantificació del glicogen es va fer fent servir l'assaig de l'amiloglucosidasa (Chan and Exton 1976). Els extractes es van aplicar sobre paper 31-ET (*Whatman*), i un cop assecats, els papers es van submergir en etanol al 66 % a -20°C durant 10 minuts, per tal de precipitar el glicogen. Es feien dos rentats de 10 minuts amb etanol al 66% a temperatura ambient, els papers es van passar per acetona per extreure l'aigua que hi podia quedar, i es van deixar assecar. Els papers es van dipositar en tubs on hi havia 1ml d'una solució amb amiloglucosidasa (25 U/l) preparada en tampó d'acetat de sodi 100 mM a pH 4,8, i es van incubar a 37°C durant 90 minuts en agitació. Aquest període d'incubació permetia que l'amiloglucosidasa hidrolitzés el glicogen donant lloc a molècules de glucosa. Aquestes molècules de glucosa són les que es mesuraven en els diferents tubs, mitjançant la tècnica de l'hexoquinasa-Glc6P deshidrogenasa (Bergmeyer 1974) disponible en forma d'assaig comercial (*Glucose HK CP, ABX Pentra*) i adaptat a l'autoanalitzador Cobas Bio (*ABX Diagnostics*). Els resultats s'expressaven com a μg de glicogen mg de proteïna en el cas de la determinació del glicogen acumulat en cèl·lules. Si es tractava de determinació de glicogen a partir de teixit els resultats s'expressaven com mg glicogen per g teixit.

7.2 Determinació de la ramificació del glicogen

Per tal de valorar la ramificació del glicogen es va usar el mètode de Schlamowitz (Schlamowitz 1951), aplicat per Krisman (Krisman 1962) que està basat en l'espectre d'absorció del iode. Els teixits es van homogeneïtzar amb una solució de KOH al 30%,

300µl per cada 100 mg de teixit, i es van bullir a 100 °C durant 20 min. Un cop refredades les mostres es van centrifugar a 1000 g durant 15 minuts. Es van barrejar 300µl dels sobrenedants amb 600 µl de etanol al 96%, i la barreja va ésser bullida i refredada ràpidament en gel. A continuació, es van centrifugar les mostres a 1000g durant 15 min. Un cop descartats els sobrenedants, els pellets van ésser rentats dos cops amb etanol al 66%, i es van dissoldre les mostres amb 200 µl d'una solució de NH₄Cl saturat. Les mostres es van escalfar a 100°C durant 5 minuts. Després d'afegir 250µl d'aigua MilliQ, les mostres es van desar a -20°C.

La solució control d' amilopectina (*Corn Amylopectin, Sigma*) es va preparar en escalfar 180 µg a 100°C durant 5 minuts en 2 ml d'una solució de NH₄Cl saturat, a la que afegíem 4 ml d'aigua MilliQ després de refredar. La concentració de glicogen de les mostres va ésser mesurada per l'assaig de l'amiloglucosidasa. Tant l'amilopectina com el glicogen (120 µg) van ésser afegits a 670 µl de la solució de Krisman (Krisman 1962). La barreja va ésser incubada durant 5 minuts a temperatura ambient i es va mesurar el pic màxim en l'espectre d'absorbància que va de 350 a 750 nm.

7.3 Determinació de paràmetres plasmàtics

Un cop els animals foren sacrificats, es recollí la sang en tubs que contenien EDTA dipotàssic (*Eurotubo*), i es van agitar amb cura per a no produir hemòlisi. Després d'unes dues hores, els tubs es van centrifugar a 1000 g durant 15 minuts. El plasma es va recollir i es va guardar a -80°C.

La mesura de lactat (*ABX Pentra Lactic Acid*), alanina aminotransferasa (*ABX Pentra ALT CP*), aspartat aminotransferasa (*ABX Pentra AST CP*), triglicèrids (*GPO-Trinder, Sigma*) i de cossos cetònics, concretament l'àcid β-hidroxibutirat (*β-HBA 310, Sigma*) en plasma es van realitzar mitjançant l'ús de reactius de diagnòstic per a la determinació espectrofotomètrica mitjançant un autoanalitzador COBAS Bio (*Roche*).

Les mesures d'insulina (*Rat insulin EIA Spi Bio*) i de leptina (*Mouse/Rat leptin EIA Spi Bio*) en plasma es varen realitzar per ELISA.

8. TÈCNiques D'IMMUNOFLOUORESCÈNCIA

8.1 Immunofluorescència. Cèl·lules crescudes sobre cobreobjectes

Els cobreobjectes de 10-12 centímetres de diàmetre que contenen les cèl·lules crescudes en monocapa a analitzar es tractaven amb una solució fixadora de paraformaldehid al 4% en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient. Passat el temps d'incubació, es procedia a fer dos rentats amb tampó PBS de 10 minuts, i els cobreobjectes es mantenien en PBS 1X amb azida 0.05% a 4°C fins al seu ús per evitar la possible contaminació per fongs. La manipulació d'aquests cobreobjectes sempre es duia a terme amb pinces invertides (*A. Dumont & Fils*).

El protocol usat sempre es realitza a temperatura ambient i consisteix en els següents passos:

- a) Reducció: incubació amb una solució de NaBH₄ en PBS (1mg/ml, *Merck*) durant 10 minuts per a reduir les restes de paraformaldehid.
- b) Permeabilització: incubació amb una solució de Tritó X-100 0.2% en PBS (v/v).
- c) Bloqueig: per tal de bloquejar les unions no específiques es tractaven amb una solució de BSA al 3% (p/v) en PBS, Tritó X-100 al 0.2% durant 10 minuts.
- d) Incubació amb anticòs primari : A una solució BSA al 3% (p/v) en PBS s'aplicava l'anticòs específic per a la proteïna d'interès a la dilució recomanada per la casa comercial. Els anticòs primaris usats eren l'anticòs policlonal contra la LGS de rata (L1, dilució 1/500) i l'anticòs monoclonal específic per a glicogen (cedit pel Dr. Otto Baba, dilució 1/60). Sempre es feien servir controls de l'especificitat de l'anticòs primari, que consistien en cobreobjectes amb cèl·lules fixades que no eren tractats amb l'anticòs primari. Els cobreobjectes s'incubaven per un període mínim de 45 minuts amb aquesta solució. Passat aquest període es procedia a fer un mínim de tres rentats amb PBS, de 10 minuts de duració.
- e) Incubació amb anticòs secundari : A una solució BSA al 3% (p/v) en PBS s'aplicava l'anticòs secundari específic conjugat algun fluoròfor o bé el TEXAS RED Donkey Anti-Rabbit IgG (*Jackson ImmunoResearch*, dilució 1/50) o bé el TRITC Goat Anti-Mouse (*Chemicon*, dilució 1/100), que reconeixen específicament l'espècie de

l'anticòs primari. A la solució amb anticòs secundari hi afegíem Hoechst 33342 (0,01 mg/ml), per tal de visualitzar els nuclis cel·lulars. La incubació amb anticòs secundari és de 30 minuts. Per extreure les restes d'anticòs secundari no unit a l'anticòs primari es procedia a fer un mínim de tres rentats amb PBS, de 10 minuts de duració.

- f) Assecat i Muntatge: Els cobreobjectes es rentaven amb aigua MilliQ primer, amb etanol al 96% i es deixaven eixugar a l'aire fins al seu muntatge sobre portaobjectes de vidre. Es col·locaven els diferents cobreobjectes sobre una gota de Mowiol (*Aldrich-Sigma*) en els portaobjectes, pressionàvem per eliminar les restes de resina de muntatge i desàvem els portaobjectes a 4°C fins a la seva visualització.

8.2 Immunofluorescència. Teixits

El teixit d'interès es trossejava en blocs d'un centímetre aproximadament i es submergien en el fixador, en aquest cas paraformalhid-PBS al 4%, preparat en el moment. Aquesta solució fixadora es canviava a les 4 hores, i es deixava durant 12 hores a 4°C. Un cop passat aquest temps, es feien dos rentats amb PBS i es passava a procedir a la crioprotecció dels teixits. El protocol de crioprotecció usat sempre es realitzava a 4°C i consistia en un gradient de sacarosa. Primer es tractava amb sacarosa al 10% durant 1 hora, tot seguit amb sacarosa al 20% durant una hora i mitja i finalment amb sacarosa al 30% durant 12 hores aproximadament. Un cop finalitzat el gradient de sacarosa, muntàvem els teixits amb OCT en nitrogen líquid. Podíem deixar les mostres al -80°C fins que es realitzaven els talls.

Els talls es realitzaven d'uns 10µm de gruix a una temperatura de -25°C mitjançant l'ús d'un criostat (*Criostat CM 1900, Leica*). Teníem el tall amb blau de metilè al 0.5% i l'observàvem al microscopi de contrast, per veure si el tall realitzat es trobava en una bona zona d'anàlisi. Fèiem diversos talls que dipositàvem en portaobjectes tractats amb col·lagen i mantinguts amb PBS a 4°C. Fem tres rentats de 10 minuts a 4°C amb PBS per eliminar qualsevol resta de sacarosa, i procedim a fer el marcatge:

- a) Permeabilització: els talls de teixit sobre els portaobjectes s'incubaven amb una solució de Tritó X-100 0.5% en PBS (v/v), a temperatura ambient però dins d'una

cambrà humida. Després fèiem una incubació durant una hora amb una solució de Tritó X-100 1% en PBS (v/v).

- b) Bloqueig: per tal de bloquejar les unions no específiques es tractaven amb una solució de BSA al 3% (p/v) en PBS, Tritó X-100 al 1% durant 1 hora. Fèiem tres rentats amb PBS de 10 minuts aproximadament.
- c) Incubació amb anticòs primari : A una solució BSA al 3% (p/v) en PBS s'aplicava l'anticòs específic per a la proteïna d'interès a la dilució recomanada per la casa comercial. Els anticòs primaris usats eren contra la LGS de rata (L1, dilució 1/500). Sempre es van fer servir controls de l'especificitat de l'anticòs primari que consistien en talls que no eren tractats amb l'anticòs primari. Els cobreobjectes s'incubaven per un període de 12 hores amb aquesta solució a 4°C. Passat aquest període es procedia a fer un mínim de tres rentats amb PBS, Tween-20 0.05% (v/v) de 10 minuts de duració.
- d) Incubació amb anticòs secundari : A una solució BSA al 3% (p/v) en PBS s'aplicava l'anticòs secundari específic conjugat algun fluoròfor, en aquest cas el TEXAS RED Donkey Anti-Rabbit IgG (*Jackson ImmunoResearch*, dilució 1/50), que reconeixien específicament l'espècie de l'anticòs primari. A la solució amb anticòs secundari hi afegíem Hoechst 33342 per tal de visualitzar els nuclis cel·lulars. La incubació amb anticòs secundari era de dues hores a temperatura ambient. Per extreure les restes d'anticòs secundari no unit a l'anticòs primari es procedia a fer un mínim de tres rentats amb PBS, de 10 minuts de duració.
- e) Assecat i Muntatge: Els portaobjectes es rentaven amb etanol al 96% i es deixaven eixugar a l'aire fins al seu muntatge, posant cobreobjectes quadrats a sobre. Es col·locaven gràcies a una gota de *Mowiol (Aldrich-Sigma)* en els portaobjectes, pressionàvem per eliminar les restes de resina de muntatge i desàvem els portaobjectes a 4°C fins a la seva visualització.

9. MICROSCOPIA CONFOCAL

Les imatges de microscòpia de fluorescència van ésser obtingudes en microscopi confocal invertit amb detecció espectral *Leica TCS SPII* (*Leica Microsystems*). L'objectiu usat és el *Plan-Apo 63x (NA 1.4 oil, Leitz)*. La fluorescència vermella, que provenia dels anticossos secundaris conjugats a *Texas Red* o del iodur de propidi, van ésser obtingudes amb el làser a 568 nm.

10. MICROSCOPIA ELECTRÒNICA

La preparació de teixit per a la seva visualització mitjançant l'ús d'un microscopi electrònic es va realitzar al Servei de Microscòpia Electrònica dels SCT de la UB.

- a) Fixació del teixit: Trossos d'1 mm² de teixits, en concret fetge, es van fixar amb gluteraldehid al 2.5%.
- b) Osmificació del teixit: Primer varem rentar els teixits amb tampó PB 0.1 M. Un cop rentat, es van incubar amb una solució de K₃Fe(CN)₆ al 0.8% durant una hora i mitja a 4°C i protegit de la llum.
- c) Deshidratació del teixit: Després de rentar els teixits, es va procedir a deshidratar els teixits amb acetona a concentracions creixents, de 50% a 100%, sempre en agitació i a 4°C
- e) Incrustació en resina: Un cop deshidratats els teixits es va dipositar la resina en concentracions creixents. Primer es van incubar les mostres amb resina sense catalitzador (23,5g Eponate 12, 12,5g DDSA i 14g NNA) diluïda en acetona i en concentracions creixents, fins acabar en una incubació amb resina sense catalitzador durant 12 hores a temperatura ambient. Després es van incubar els teixits amb resina amb catalitzador (23,5g Eponate 12, 12,5g DDSA, 14g NNA i 370µl de DPM-30) durant una hora i mitja aproximadament. Finalment es van incrustar els teixits en la mateixa resina i es van deixar polimeritzar durant 48 hores.

Mitjançant l'ultramicrotom *Leica Ultracut UCT* es van obtenir seccions ultrafines que van ésser muntades en reixetes de coure cobertes de *Formyar*. Les preparacions van

ésser tenyides amb acetat d'uracil al 2% en aigua. Les seccions van ésser observades amb el microscopi electrònic JEM-1010 (*Jeol*).

11. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els valors obtinguts s'expressen com la mitjana \pm S.E.M. (error estàndard de la mitjana). Els resultats es van analitzar per anàlisi de la variància i la distribució *t-Student*. Es van considerar diferències significatives les mesures que donaven una probabilitat inferior o igual a 0,05.