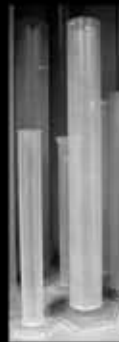


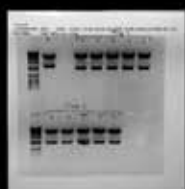
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona

# ESTUDI FUNCIONAL DEL GEN DOR

Jordi Duran i Castells  
Tesi Doctoral - Barcelona, 2007



Jordi



# **Estudi funcional del gen DOR**

Jordi Duran i Castells  
TESI DOCTORAL  
Barcelona, 2007

**Programa de Doctorat de Biomedicina, Bienni 2002-2004**  
**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**  
**Facultat de Biologia**  
**Universitat de Barcelona**

**Memòria per a optar al grau de**  
**Doctor per la Universitat de Barcelona**

**Presentada per:**


**JORDI DURAN I CASTELLS**

Vist i plau del director:

L'interessat,

Dr. Antonio Zorzano Olarte  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona

Jordi Duran i Castells

A dense pile of clear plastic pipette tips, likely 200 µl tips, filling the bottom third of the page. The tips are scattered and overlapping, creating a textured, monochromatic background.

***materials  
i mètodes***



## I. EINES INFORMÀTIQUES.

### I.1 Bases de dades.

#### I.1.1 Bases de dades del NCBI (*National center of biotechnology Information*).

<http://www.ncbi.nih.gov>

Es tracta d'un recurs que comprèn des de bases de dades de literatura científica a bases de dades de seqüències de projectes de seqüenciació de tot el món, així com eines per l'anàlisi de seqüències i la gestió de dades.

#### I.1.2 Human Protein Reference Database.

<http://www.hprd.org/>

Aquesta base de dades conté informació relativa a seqüència, modificacions post-traduccionals, arquitectura de dominis, interaccions amb altres proteïnes i associació amb malalties per a cada proteïna del proteoma humà (Peri et al., 2003).

#### I.1.3 Uniprot.

<http://www.expasy.org/sprot/>

És una base de dades de seqüències de proteïnes que proporciona molta informació relativa a funció, estructura de dominis, modificacions post-traduccionals, variants, etc. D'altra banda també dóna accés a diverses eines d'anàlisi de seqüències.

#### I.1.4 STRING.

<http://string.embl.de/>

STRING és una base de dades d'interaccions conegudes entre proteïnes, tant interaccions físiques com funcionals. A més prediu possibles interaccions basant-se en el context genòmic, informació d'experiments de gran escala i informació present a la literatura (von Mering et al., 2007).

#### I.1.5 Bases de dades de receptors nuclears i coreguladors.

A la xarxa podem trobar també diverses bases de dades que contenen informació relativa als receptors nuclears i als coactivadors o corepressors. Entre aquestes podem trobar:

**-Nuclear Receptor Database**

(<http://www.ens-lyon.fr/LBMC/laudet/nurebase/nurebase.html>)

**-Nuclear Receptor Signaling Atlas** (<http://www.nursa.org>)

**-Nuclear Receptor Resource** (<http://nrr.georgetown.edu/NRR/nrrhome.htm>)

## **Materials i mètodes**

### **I.1.6 International Chemical Safety Cards** (base de dades del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales).

<http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspnsyn.htm>

Les International Chemical Safety Cards recopilen de forma clara la informació essencial d'higiene i seguretat de substàncies químiques i estan destinades a totes aquelles persones que hagin de treballar amb aquestes substàncies.

### **I.1.7 Restriction Endonucleases (New England Biolabs).**

Aquesta base de dades de l'empresa New England Biolabs conté una gran quantitat d'informació sobre un gran nombre d'enzims de restricció, com per exemple especificitat de tall, propietats de l'enzim, emmagatzemament...

<http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp>

## **I.2 Anàlisi de seqüències.**

### **I.2.1 Comparació i alineament.**

#### **I.2.1.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).**

Permet la cerca de seqüències homòlogues en les bases de dades de seqüències de DNA o proteïna. El programa compara la seqüència problema amb totes les seqüències de la base de dades mostrant com a resultat aquelles seqüències amb un cert grau d'homologia. També es pot usar per comparar dues seqüències entre elles ("Pairwise Blast").

<http://www.ncbi.nih.gov/blast> o <http://www.ensembl.org/Multi/blastview>

#### **TCoffee.**

Es tracta d'una col·lecció d'eines per generar, evaluar i manipular alineaments múltiples de DNA, seqüències i estructures (Notredame et al., 2000).

[http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee\\_cgi/index.cgi](http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi)

#### **I.2.1.2 ClustalW.**

L'algoritme 'clustalw' permet obtenir el millor alineament entre múltiples seqüències de DNA o proteïna. Per tal de fer aquest anàlisi existeixen diferents llocs d'internet i programes. En aquesta tesi s'ha usat el programa 'MegAlign' del paquet de programes Lasergene, així com la següent web:

<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw-simple.html>

### **I.2.1.3 Alineament de seqüències de DNA amb el programa ‘Seqman’.**

Aquest programa permet introduir les seqüències en diferents formats, entre ells el cromatograma que s’obté del seqüenciador. Això permet que es pugui veure el cromatograma quan hi ha algun conflicte en la seqüència. A més el programa permet filtrar les seqüències segons diversos paràmetres.

### **I.2.2 Predicció i cerca de patrons.**

#### **ScanProsite, MotifScan.**

Aquestes eines permeten cercar en una seqüència proteica patrons o motius, com ara llocs de fosforilació, llocs catalítics o llocs d’unió de proteïnes (Hulo et al., 2006).

<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>  
[http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)

#### **ELM.**

ELM (en anglès Ekaryotic Linear Motif resource) és una eina per predir a proteïnes eucariotes llocs funcionals, és a dir, petits motius lineals que es poden associar a una funció molecular (Puntervoll et al., 2003).

<http://elm.eu.org/#>

#### **NetPhos 2.0, NetPhosK 1.0 i PhosphoMotif Finder.**

Aquestes eines serveixen per predir possibles llocs de fosforilació a la proteïna problema (Blom et al., 1999; Blom et al., 2004).

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>  
[http://www.hprd.org/PhosphoMotif\\_finder](http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder)

#### **SignalP 3.0 i TargetP 1.1.**

Aquestes eines serveixen per predir en la seqüència de la proteïna la presència de pèptids senyal que dirigeixin la seva localització cel·lular (Emmanuelson et al., 2007).

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

#### **PredictNLS i NucPred.**

Analitzen la seqüència de la proteïna en busca d’una senyal de localització nuclear (NLS, de l’anglès “Nuclear Localization Signal”) (Cokol et al., 2000; Brameier et al., 2007).



## Materials i mètodes

<http://sbcweb.pdc.kth.se/cgi-bin/maccallr/nucpred/single.pl>  
<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>

### **pSLIP, ESLpred, pTARGET, PA-SUB 2.5, CELLO, BaCello, LOctree, PSort II, WoLF PSORT i MultiLoc.**

Totes aquestes eines utilitzen la seqüència d'aminoàcids de la proteïna per predir la seva localització sub-cel·lular. Es basen en paràmetres com ara les propietats físico-químiques de la proteïna i la seva composició d'aminoàcids, així com la presència de patrons de dominis funcionals i la homologia amb altres proteïnes. Alguns prediuen a més altres característiques, com ara la possible capacitat d'unir-se al DNA en el cas de BaCello (Lu et al., 2004; Sarda et al., 2005; Guda et al., 2005; Yu et al., 2004; Pierloni et al., 2006; Nakai et al., 1999; Horton et al., 2006; Hoeglund et al., 2006).

<http://pslip.bii.a-star.edu.sg/>  
<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/submit.html>  
<http://bioinformatics.albany.edu/~ptarget/>  
<http://pasub.cs.ualberta.ca:8080/pa/Subcellular>  
<http://cello.life.nctu.edu.tw/>  
<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/index.htm>  
<http://cubic.bioc.columbia.edu/services/loctree/>  
<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>  
<http://wolfpsort.org>  
<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/>

### **NetNES 1.1.**

Analitza la presència a la proteïna de senyals de sortida del nucli (NES de l'anglès “Nuclear Exit Signal”) (la Cour et al., 2004).

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>

### **TMHMM Server v. 2.0.**

Cerca la presència a la proteïna de possibles hèlixs transmembrana.

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

### **YinOYang 1.2.**

Prediu la possible unió a la proteïna de la modificació post-traduccional O- $\beta$ -GlcNAc, és a dir, la unió de N-acetilglucosamina a residus de serina o treonina. També utilitza el programa NetPhos per determinar si el residu també pot ser fosforilat, generant així un lloc “Ying Yang”, és a dir, que pot ser tant fosforilat com gluconoacetilat (Gupta et al, 2002).

<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>

### **SAPS.**

SAPS (“Statistical Analysis of Protein Sequences) avalua estadísticament el contingut i la distribució dels diferents aminoàcids a la seqüència de la proteïna. D’aquesta manera es poden trobar regions de la proteïna amb una composició particular que poden suggerir una determinada funció o característica (Brendel et al., 1992).

[http://www.isrec.isb-sib.ch/software/SAPS\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch/software/SAPS_form.html)

### **GlobPlot 2 i DisEMBL.**

GlobPlot i DisEMBL mesuren la tendència de la proteïna analitzada generar una estructura ordenada (globular) o desordenada. Això pot ser útil a l’hora d’identificar dominis (linding et al., 2003).

<http://globplot.embl.de/>

<http://dis.embl.de/>

### **COILS.**

COILS és un programa que calcula la probabilitat de que la seqüència problema adopti una estructura coiled-coil (Lupas et al., 1991).

[http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)

### **NMT.**

Predicció de miristoilació a glicines N-terminals. El programa també utilitza en la predicció les glicines internes de la proteïna ja que és possible que es donin fenòmens de proteòlisi que generin noves glicines N-terminals (Eisenhaber et al., 2003).

<http://mendel.imp.ac.at/sat/myristate/SUPLpredictor.htm>

### **big-PI.**

Prediu la unió de GPI (glicosilfosfatidilinositol) a l’extrem C-terminal de la proteïna, que pot succeir a un trencament proteolític d’aquesta (Eisenhaber et al., 1999).

[http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html)

### **PeroxiP.**

Prediu la possible localització a peroxisomes de la proteïna problema (Emmanuelson et al., 2003).

<http://www.bioinfo.se/PeroxiP/>

## **Materials i mètodes**

### **RNABindR.**

Prediu la probabilitat de que la proteïna problema s'uneixi a l'RNA (Terriblini et al., 2006).

<http://bindr.gdcb.iastate.edu/RNABindR/main.aspx?target=new>

### **PFP.**

PFP (Protein Function Prediction) prediu quina pot ser la funció de la proteïna a partir de la seva seqüència (Hawkins et al., 2006).

<http://dragon.bio.purdue.edu/pfp/>

### **ProtFun 2.2.**

Aquest mètode utilitza diversos servidors de predicció de diferents característiques de la proteïna per obtenir informació sobre modificacions post-traduccionals, localització, etc, que són integrats en la predicció de la possible funció de la proteïna problema (Jensens et al., 2006).

<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun-2.2/>

## **I.3 Disseny d'encebadors.**

**Primer select:** aquest programa del paquet de programes 'Lasergene' (DNASStar) genera i proposa primers sobre la seqüència proporcionada per l'usuari. Permet seleccionar diferents paràmetres per als encebadors (longitud, temperatura d'hibridació...) així com per la PCR (longitud del producte de la PCR, regió d'hibridació dels primers...). També emparella els primers forward i reverse generats per donar els parells de primers més compatibles.

<http://www.dnastar.com>

## **I.4 Gestió de vectors.**

**pDRAW32:** aquest és programa gratuït molt útil per gestionar els vectors i altres seqüències de DNA que es van generant durant la tesi, així com per facilitar el disseny d'estratègies de clonació a l'hora de generar nous vectors. De forma resumida es poden generar vectors de dues formes:

- entrant la seqüència completa del vector
- per clonació “in silico”: a partir de la seqüència d’altres vectors o d’altres seqüències (com ara d’amplificacions per PCR) s’indica la forma com es farà la clonació (enzims de restricció, fragment seleccionat) i el programa genera el vector que en resultarà.

El programa analitza la seqüència i mostra pautes obertes de lectura, llocs de tall per enzims de restricció, llocs d’hibridació de primers de la base de dades...

<http://www.acaclone.com/>

## **II. TÈCNiques GENERALS DE MANIPULACIÓ DEL DNA.**

### **II.1 Consideracions generals.**

La manipulació de DNA implica que s'ha de treballar en condicions en què s'eviti la contaminació per DNAses, que podrien degradar els vectors i sobretot els DNAs lineals utilitzats. Per aquest motiu s'ha de treballar amb material esterilitzat: s'autoclava durant 20 minuts de manera que s'inactiven les possibles DNAses. A més s'ha de treballar amb guants, ja que les mans són una font de contaminació amb DNAses. Els reactius usats han de ser de qualitat per a biologia molecular; l'aigua utilitzada en les solucions ha de ser de qualitat ultrapura (sistema miliQ de Millipore). Les solucions de DNA s'emmagatzemen a  $-20^{\circ}$  C quan no estan sent utilitzades, i es conserven en gel mentre s'utilitzen per minimitzar-ne la degradació.

### **II.2 Bactèries competents.**

Per poder mantenir i amplificar els plasmidis utilitzats aquests han estat transformats en bactèries competents. S'han utilitzat les soques de *E. coli* DH5 $\alpha$  i XLBlue d'Stratagene. La manipulació de les bactèries s'ha de fer en un entorn estèril per evitar contaminacions amb altres bactèries. Així s'ha treballat amb material estèril i sempre a les proximitats d'un cremador Bunsen que proporciona una àrea estèril de treball.

En la preparació de les bactèries competents es tracten les cèl·lules amb una solució de CaCl<sub>2</sub>, que altera la paret bacteriana facilitant l'entrada de DNA exogen. Les bactèries competents utilitzades en aquesta tesi han estat generades per l'equip tècnic del laboratori.

#### **II.2.1 Transformació.**

La tècnica de transformació usada en aquesta tesi ha estat principalment la del "Heat-shock". El protocol és el següent:

1. En un tub eppendorf es barregen 100  $\mu$ l de bactèries competents amb el DNA que es vol transformar. Per transformar plasmidis s'utilitza una quantitat no

superior a 50 ng de DNA; en el cas de productes de lligació depèn dels casos, però normalment s'afegeix bona part de la reacció de lligació (fins a 20 µl).

2. Es manté el tub en gel 30 minuts. D'aquesta manera el DNA entra en contacte amb la paret bacteriana.

3. S'incuba a 42° C durant 90 segons. Aquest és el pas efectiu de la transformació.

4. S'afegeix 1 ml de medi LB i s'incuba a 37° C durant 1 hora amb agitació suau. Aquest pas permet que les bactèries es recuperin del heat-shock.

**Composició del medi LB:**

- Tryptona a l'1%
- Extracte de llevat al 0,5%
- NaCl al 0,5%

S'ajusta el pH a 7,5 i s'esterilitza amb autoclau.

5. Es centrifuga el tub a 4000 rcf durant 3 minuts. D'aquesta manera les bactèries es concentren a l'extrem del tub.

6. Treiem el sobrenedant per decantació i resuspenem el precipitat bacterià en el volum de medi LB que resta de la decantació (uns 100 µl).

7. Es sembra el cultiu en una placa amb medi LB i l'antibiòtic que permetrà la selecció de les bactèries transformades, ja que tan sols aquestes seran resistents a l'antibiòtic, característica que els dóna el vector transformat.

Els principals antibiòtics usats en aquesta tesi han estat Ampicil·lina i Kanamicina, a una concentració de 100 µg/ml.

8. S'incuba la placa en posició invertida a 37° C durant 12-18 hores, fins que apareguin les colònies.

Un cop apareixen colònies aïllades aquestes es poden picar amb una nansa de sembra i posar a créixer en medi LB amb l'antibiòtic adequat a 37° C i amb agitació suau. La quantitat de medi LB utilitzada dependrà de la quantitat de DNA que es vol obtenir.

## **Materials i mètodes**

### **II.2.2 Generació de glicerols.**

Per mantenir el cultiu de bactèries transformades durant un llarg període de temps es poden generar glicerols. S'afegeix un 10% de glicerol al cultiu de bactèries i es congela ràpidament (amb nitrogen líquid o neu carbònic). El manteniment d'aquests glicerols es fa a  $-80^{\circ}\text{C}$  o en nitrogen líquid. Per recuperar cultiu del glicerol s'obre el tub i es rasca la superfície del glicerol congelat amb una punta estèril. S'ha d'evitar que el glicerol es descongeli i treballar en condicions d'esterilitat. La punta es posa en medi LB amb el corresponent antibiòtic i es fa créixer de la mateixa forma que quan es pica una colònia.

### **II.3 Recuperació del DNA.**

Per purificar els plasmidis a partir dels cultius bacterians s'han usat equips comercials diferents en funció de la quantitat de DNA que es volia obtenir. Per finalitats analítiques s'han usat *minipreps*, amb les que es pot obtenir entre 10 i 30  $\mu\text{g}$  de DNA; quan es volia obtenir quantitats majors de DNA s'han usat *maxipreps*, amb les que es pot obtenir entre 300 i 800  $\mu\text{g}$  de DNA.

#### **II.3.1 Minipreps i maxipreps.**

En aquesta tesi s'ha utilitzat per a l'obtenció del DNA plasmídic equips comercials de la casa Qiagen (*Qiagen Plasmid Mini kit* i *Qiagen Plasmid Maxi kit*). L'obtenció s'ha fet seguints les instruccions del proveïdor; el protocol complet es pot trobar al web d'aquest ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) però de forma resumida el mètode té els següents passos:

1. El precipitat de bactèries es resuspèn en la quantitat adequada (en funció de si es tracta de miniprep o maxiprep) de tampó de resuspensió en un tub eppendorf.
2. S'afegeix tampó de lisi i es mescla suaument per inversió del tub 4-6 vegades. Aquest pas s'ha de fer ràpidament ja que el tampó de lisi té un pH molt bàsic i es pot degradar el DNA.
3. Es neutralitza la solució afegint el tampó de neutralització i invertint 4-6 vegades. Apareix un precipitat blanquinós.
4. Es centrifuga a màxima velocitat per separar el precipitat.

5. El sobrenedant és on ha quedat el DNA. Es passa aquest sobrenedant per una columna QIAprep adient, de manera que el DNA queda retingut a la columna.
6. Es renta la columna fent-hi passar tampó de neteja, que manté la interacció entre la resina de la columna i el DNA.
7. Es fa passar per la columna la quantitat d'aigua en la que es vol recuperar el DNA. De la quantitat d'aigua dependrà la concentració final de DNA de la solució (a més aigua, solució més diluïda) i la quantitat de DNA recuperada (a més aigua més recuperació) de manera que s'ha d'arribar a un compromís.

#### **II.4 Digestió del DNA amb enzims de restricció.**

La digestió del DNA, ja sigui per comprovar o per generar noves clonacions, s'ha portat a terme seguint les instruccions dels proveïdors i amb els reactius proporcionats per aquests amb els enzims. S'han tingut en compte les següents consideracions:

- la relació entre quantitat d'enzim i de DNA ha de ser com a mínim d'una unitat d'enzim per microgram de DNA. En general en aquesta tesi s'ha utilitzat relacions de 2-4 unitats d'enzim per microgram, per assegurar la digestió completa.
- el temps de digestió ha estat de com a mínim una hora a la temperatura òptima de l'enzim, indicada pel proveïdor.
- el volum total de reacció utilitzat ha estat sempre el menor possible, ja que en la majoria de casos la reacció s'ha de carregar després en un gel. En tot cas el volum ha de ser suficient com perquè la relació entre volum d'enzim i volum total no superi el 10%, ja que les solucions d'enzim tenen una alta concentració de glicerol per evitar que es congelin que podria interferir a la digestió.

Els enzims de restricció utilitzats en aquesta tesi han estat de les cases comercials Roche i New England Biolabs. La informació relativa a enzims de restricció d'aquests proveïdors es pot trobar als webs:

<http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp>

<https://www.roche-applied-science.com/sis/cloning/index.jsp>



## **Materials i mètodes**

### **II.5 Electroforesi en gels d'agarosa.**

Per separar els fragments de DNA obtinguts en una digestió o en una PCR es fa servir normalment l'electroforesi en gels d'agarosa (tot i que per a fragments de DNA molt petits, inferiors a 100 parells de bases, s'utilitzen gels d'acrilamida).

El DNA té una càrrega global negativa; en un camp elèctric la mobilitat dels fragments de DNA és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. D'aquesta manera es poden separar els fragments del DNA en funció de la seva mida.

En la separació dels fragments influeix també la mida de porus del gel, la qual cosa ve determinada per la concentració d'agarosa utilitzada. En general en aquesta tesi s'han utilitzat gels de l'1% d'agarosa, que permeten la separació tant de bandes de diverses kilobases com de bandes de pocs centenars de bases. Aquesta concentració s'ha variat en els casos en que calia separar bandes molt petites (concentració d'agarosa més alta, fins al 3%) o molt grans (concentració més petita, fins al 0,5%). Al gel s'afegeix una solució de bromur d'etidi, un agent intercalant que serveix per marcar els àcids nucleics, ja que emet llum visible quan s'exposa a llum UV.

Les solucions utilitzades tenen la següent composició:

- **TAE 50X**

- 2 M Trizma base (Sigma)

- 1 M àcid bòric

- 50 mM EDTA

Es conserva a T<sup>a</sup> ambient

- **solució de bromur d'etidi 400 µg/ml**

- **tampó de càrrega 5X**

- 40 mM EDTA

- 0,1% SDS

- 30% Ficoll-400

- 0,2% blau de bromofenol

Es conserva aliquidat a -20°C.

### **II.5.1 Preparació del gel.**

El volum del gel a preparar depèn de la cubeta en la que es farà l'electroforesi. En aquesta tesi s'han utilitzat majoritàriament gels de 50 ml, però en alguns casos gels més grans, de fins a 200 ml, per carregar un major nombre de mostres.

1. Es pesa la quantitat d'agarosa necessària per aconseguir el volum desitjat a la concentració d'agarosa desitjada. Es barreja amb el volum de tampó TAE 1X.
2. S'escalfa en un microones d'ús exclusiu fins a la dissolució total de l'agarosa.
3. Es deixa refredar fins que el recipient es pot tocar sense que cremi (40°-50°) i s'hi afegeix el bromur d'etidi.
4. Es prepara el suport i s'hi posa la pinta que farà els pous desitjats. S'aboca la solució al suport i es deixa refredar.
5. Quan el gel és sòlid es retira la pinta i es col·loca a la cubeta d'electroforesi. Es cobreix el gel totalment amb tampó TAE 1X.

### **II.5.2 Preparació de les mostres.**

Per poder-les carregar al gel les mostres de DNA s'han de barrejar amb tampó de càrrega 5X (fins a una concentració final 1X). Aquest tampó té dues finalitats: d'una banda fa que la mostra "pesi" i entri al pou quan carreguem el gel, en lloc de dissoldre's amb el tampó d'electroforesi. De l'altra té un marcador de color que es comporta electroforèticament com un DNA de baix pes molecular, de manera que es pot veure com avança l'electroforesi. Els volums finals que es poden carregar depenen de la mida dels pous, oscil·lant entre 25 i 80 µl.

### **II.5.3 Electroforesi.**

Es carrega cada mostra en un pou del gel, es connecten els elèctrodes a la font d'electroforesi i es corre el gel a un voltatge constant entre 70 i 100 volts, depenent de la mida del gel. El DNA, amb càrrega negativa, migrarà cap al pol positiu. En un dels pous es carrega el marcador de pesos de DNA, que conté diverses bandes mida coneguda i serveix de guia per determinar la mida de les bandes de l'electroforesi. El marcador que s'ha utilitzat en aquesta tesi ha estat el *1 Kb plus DNA ladder*, d'Invitrogen. (<http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10787018.pdf>). El resultat es pot

## **Materials i mètodes**

comprovar en un transiluminador de raigs UV, gràcies al bromur d'etidi. Si es vol recuperar el DNA del gel s'ha d'evitar exposar prolongadament el gel als raigs UV, ja que es danya el DNA. En els casos en que es vol guardar el resultat s'utilitza un equip que té un transiluminador i una càmera per obtenir fotografies dels gels.

### **II.6 Recuperació de fragments de DNA.**

Els fragments de DNA que s'han separat en una electroforesi es poden recuperar per utilitzar-los en passos posteriors. En el transiluminador, i protegint-nos dels raigs UV, es talla amb un bisturí un tros del gel d'agarosa on hi ha el fragment de DNA que ens interessa. Per obtenir el DNA s'ha usat en aquesta tesi un equip comercial anomenat "GFX PCR DNA and gel band purification kit", de la casa Amersham, seguint les instruccions del fabricant. Bàsicament els passos a seguir són:

1. Escalfar el tros de gel en un tampó fins a la dissolució de l'agarosa.
2. Passar-ho per una columna que reté el DNA.
3. Rentar la columna amb el tampó de rentat.
4. Eluir el DNA amb la quantitat d'aigua desitjada.

Les instruccions completes es poden trobar al web <http://www6.gelifesciences.com>

### **II.7 Lligació.**

Les tècniques de DNA recombinant permeten obtenir nous constructes a partir de fragments de constructes previs i per lligació d'aquests. En general la lligació de fragments roms és menys eficient que la d'extrems cohesius; per aquest motiu en aquesta tesi s'ha intentat evitar, quan ha estat possible, l'ús d'enzims de restricció que generin extrems roms. Tot i això els extrems roms tenen l'avantatge que es poden lligar amb altres extrems roms, independentment de l'enzim amb què han estat generats. El procediment per lligar fragments de DNA és el següent:

1. Es barregen els fragments que es vol lligar; és bo que en les lligacions insert/vector es mantingui una proporció major d'insert que de vector, cosa que afavorirà la lligació.

2. S'afegeix el volum necessari de tampó de lligació (10X) i la lligasa (normalment 1 µl). En aquesta tesi s'ha usat principalment la T4 DNA lligasa de *New England Biolabs* (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0202.asp>).
3. La incubació òptima és a 16° durant 1 hora. També es pot fer a 4° durant 16-18 hores o 15 minuts a temperatura ambient.

El producte de lligació es transforma en bacteries competents i es piquen colònies. Es fan mini-preps de DNA i es comprova els plasmidis generats per restricció (quan és possible) i seqüenciació.

### **II.8 Desfosforilació.**

En alguns casos l'estratègia de clonació requereix que un dels DNAs que s'han de lligar sigui prèviament desfosforilat, és a dir, se li elimini el fosfat terminal, per evitar que es pugui relligar amb sí mateix. Això no impedirà la lligació amb altres fragments de DNA que sí tinguin aquest fosfat terminal. És el cas de clonar un insert a un determinat vector per una única diana de restricció.

La desfosforilació es realitza amb Fosfatasa Alcalina (en aquesta tesi s'ha usat la de la casa Roche, seguint les instruccions del proveïdor). Bàsicament consisteix en posar el DNA en contacte amb la fosfatasa alcalina (2-3 unitats per microgram de DNA) en el tampó adequat (que es subministra amb l'enzim) i deixar-ho una hora a 37° C.

### **II.9 PCR.**

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR, de l'anglès "Polimerase Chain Reaction) és una tècnica molt utilitzada en biologia molecular per obtenir DNAs d'interès. Per aconseguir una amplificació eficient cal tenir en compte diferents factors, com ara la DNA polimerasa utilitzada, la concentració de magnesi, etc. El manual "PCR Applications Manual", de la casa Roche, és una bona ajuda a l'hora d'optimitzar les PCRs (accessible al web <http://www.roche-applied-science.com/>).

En aquesta tesi s'ha usat principalment la Taq Expand High Fidelity DNA polymerase, de Roche, que té activitat 3'→5' exonucleasa que proporciona una major fidelitat en la

## **Materials i mètodes**

còpia del DNA. Les condicions de la reacció, sobretot quantitat de DNA motllo, primers, temperatura d'anellament i nombre de cicles, s'ha de posar a punt per a cada parella de primers.

### **II.9.1 Disseny d'encebadors.**

Un dels factors claus en l'èxit d'una PCR és el disseny dels encebadors. Tot i que no sempre és possible, en general es recomana que els primers compleixin les següents característiques:

- longitud entre 18 i 30 nucleòtids.
- que no formi estructures secundàries internes ("hairpins").
- que no s'hibridi amb sí mateix o amb l'encebador de la cadena complementària
- que el tant per cent de G i C sigui entre el 40 i el 60%.
- que tingui una temperatura de melting que permeti la hibridació entre 55 i 65°
- que no contingui repeticions de nucleòtids
- que en l'extrem 3' acabi en una o diverses G o C.

Els programes de disseny d'encebadors tenen en compte tots aquests factors i per tant faciliten el disseny. El programa usat en aquesta tesi ha estat 'PrimerSelect', del paquet de programes 'Lasergene' (veure punt **I.3**).

Els primers a més han de ser específics. Quan es fa la PCR usant com a motllo un vector això no suposa un gran problema i es pot analitzar fàcilment. Per PCRs sobre DNA genòmic cal mirar l'especificitat dels primers generats mitjançant el BLAST.

### **II.9.2 Clonació de productes de PCR en un vector pGEM-T easy.**

Moltes de les PCRs realitzades en aquesta tesi han estat fetes amb l'objectiu de clonar el DNA resultant en un determinat vector. En aquest cas els encebadors utilitzats tenien, a més de una regió d'homologia amb el DNA motllo, una diana per a un determinat enzim de restricció. El producte de PCR resultant tenia per tant dianes d'enzims de restricció als dos extrems. En principi aquest producte de PCR ja podria ser digerit pels enzims de restricció, però aquesta digestió acostuma a ser molt ineficient, degut a que

les dianes estan massa properes a l'extrem de DNA. És per això que en molts casos calia un pas previ a la digestió, que és la clonació del fragment de PCR en un vector intermedi, el pGEM-T easy (Promega). Es tracta d'un vector obert pel lloc de clonació múltiple al qual s'ha afegit dues timidines als extrems 3'. Moltes DNA polimerases afegeixen una adenina als extrems 3' dels productes amplificats (activitat desoxiadenina terminal transferasa) de manera que es poden lligar al vector fàcilment a través de les timines protuberants. Després de clonar el fragment de PCR al vector pGEM-T i amplificar-lo, es procedeix a digerir-lo amb els enzims de restricció adequats.

### **II.9.3 Mutagènesi dirigida.**

En els casos en què es volia canviar un o més nucleòtids d'un vector (normalment per generar un canvi d'aminoàcid en una pauta oberta de lectura) s'ha utilitzat la tècnica de la mutagènesi dirigida, que permet l'obtenció ràpida de plasmidis mutants partint dels plasmidis originals per amplificació per PCR .

L'equip utilitzat ha estat QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, d'Stratagene. El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant, que es poden trobar al web <http://www.stratagene.com/manuals/200518.pdf> . Breument el DNA plasmídic s'amplifica per PCR amb la *Pfu* DNA polimerasa, a partir de dos encebadors complementaris que contenen la mutació que es vol introduir. Un cop finalitzada l'amplificació es tracta amb l'enzim de restricció Dpn I. Aquest enzim té la característica de que tan sols talla DNA metilat, de manera que el DNA produït en l'amplificació per PCR no serà digerit, mentre que el DNA original sí. D'aquesta manera s'aconsegueix tenir tan sols plasmidis que tenen la mutació desitjada. Es transformen aquests en bacteries competents i s'amplifiquen. L'anàlisi dels plasmidis es pot fer per digestió (si la mutació ha introduït o eliminat una diana de tall útil) i per PCR.

### **II.9.4 Seqüenciació.**

Tots els vectors generats en aquesta tesi han estat comprovats per seqüenciació. El motiu és que si bé en molts casos els vectors es poden comprovar per restricció, la seguretat total de que la clonació ha estat ben feta no es té fins que no es seqüencia el

## **Materials i mètodes**

vector. A més espontàniament es poden donar mutacions puntuals que poden tenir conseqüències importants.

En aquesta tesi s'ha usat per seqüenciar l'equip BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, d'Applied Biosystems, seguint les instruccions del proveïdor (<http://www.appliedbiosystems.com>) . El procediment consisteix en una PCR amb un sol encebador i amb dideoxinucleòtids fluorescents, que actuen com a acabadors de la polimerització i permeten la seva identificació. Totes les reaccions de seqüenciació han estat analitzades pels Serveis Científic-Tècnics del Parc Científic de Barcelona. Els resultats de la seqüenciació s'han comparat amb la seqüència teòrica amb un dels programes esmentats al punt 1.2.1.

### **II.9.4.1 Disseny de primers de seqüenciació per al vector pCDNA3.1.**

El vector més utilitzat en aquesta tesi per generar els clons necessaris ha estat pCDNA3.1 (Invitrogen). La majoria de vectors comercials tenen a prop del lloc múltiple de clonació regions on s'hibriden encebadors que són utilitzats àmpliament per seqüenciar. En el cas de pCDNA3.1 aquests encebadors són coneguts com T7 i SP6. Tot i això aquests encebadors tenen dos inconvenients a pCDNA3.1: primer la PCR no és eficient i segon els llocs d'hibridació dels primers estan massa propers al lloc de clonació múltiple del vector. Això fa que es perdi informació de la seqüenciació, ja que la regió propera a l'encebador no acostuma a quedar gaire ben definida a les seqüenciacions. Per aquest motiu vam generar nous primers específics per a seqüenciar pCDNA3.1, amb una eficiència major i que hibriden a més distància del lloc múltiple de clonació. La seva seqüència és la següent:

```
Fwd  AGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
Rev  GGGGGAGGGGCAAACAAC
```

### **II.10 PCR a temps real.**

La PCR a temps real és un mètode per quantificar RNA missatger. Breument consisteix en passar el mRNA a cDNA (retrotranscripció) i amplificar per PCR una seqüència específica. Durant la PCR es fa un seguiment de la reacció a temps real, ja que en la

mescla de reacció s'incorporen reactius que emeten fluorescència a l'unir-se específicament a la seqüència amplificada (sondes) o bé quan s'intercalen en DNA de doble cadena (*SYBR-Green*).

En aquesta tesi s'ha usat el sistema "SYBR-Green PCR Master Mix" d'Applied Biosystems, per fer quantificacions relatives a l'expressió d'un gen house-keeping (que no varia en les condicions experimentals), treballant en plaques de 96 pous en un aparell ABI7700, segons les instruccions del fabricant.

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601292>

### **II.10.1 Disseny dels encebadors.**

El disseny dels encebadors per a PCR amb temps real és un element clau per a l'èxit de l'experiment, i té uns criteris diferenciats que són els següents:

- el producte amplificat ha de tenir entre 50 i 150 parells de bases. Quan no sigui possible es pot augmentar fins a 200 parells de bases o disminuir fins a la mida mínima per a que els encebadors no es solapin.
- la hibridació dels encebadors amb el cDNA ha de ser propera a l'extrem 3' del cDNA. Això és així perquè la reacció de retrotranscripció es fa usant oligodT, és a dir, a partir de la cua de poliA. Per tant, si hi ha trànscrips parcialment retrotranscrits (especialment important en trànscrips llargs) els pot mancar part de l'extrem 5', cosa que fa preferible que l'encebador hibridi per 3'.
- en cas que hi hagi possibles splicings alternatius s'ha de tenir en compte en el disseny dels encebadors.
- quan sigui possible la temperatura d'hibridació dels primers serà propera als 60°C, que és la temperatura d'extensió de la polimerasa del *SYBR Green*. D'aquesta manera ens estalviem d'introduir un pas d'anellament i a més es pot analitzar més d'un trànscrip per placa.
- és especialment important que els encebadors no formin dímers o hairpins, ja que el que es mesura és la formació de DNA de doble cadena.
- quan sigui possible les 5 bases de l'extrem 3' de l'encebador no han de tenir més de 2 C o G.



## **Materials i mètodes**

- és útil dissenyar els encebadors de manera que hibridin en exons diferents. D'aquesta manera en cDNA estaran a la distància correcta, però en DNA genòmic estaran massa lluny l'un de l'altre, perquè hi haurà l'intró pel mig. Així s'aconsegueix evitar la interferència d'una possible contaminació del cDNA amb DNA genòmic. Aquest, però, és un criteri secundari que es compleix tan sols quan és possible i no si cal renunciar a algun dels criteris anteriors, més importants. El millor és assegurar l'absència de DNA a la mostra, tractant si cal la mostra d'RNA amb DNAses prèviament a la retrotranscripció.

### **II.10.2 Optimització de les condicions d'amplificació.**

Un cop s'ha dissenyat uns encebadors cal valorar quines són les concentracions òptimes de treball i quin és el rendiment de l'amplificació. Es fa una amplificació de prova amb 10 ng d'equivalents de RNA (volum de solució de cDNA que correspondria a 10 ng de la solució inicial d'RNA) a diferents concentracions dels encebadors (en aquesta tesi s'ha usat 900, 600, 300 i 150 nM). Es valora per PCR a temps real l'amplificació i es selecciona la menor concentració a la que s'obté una menor Ct. També es comprova que els primers no fan dímers o 'hairpins' a través de les corbes de fusió. Amb la concentració òptima de primers es valora el rendiment de la reacció, amb un banc de dil·lucions seriades del cDNA (10, 5, 2'5, 1'25 i 0'625 ng d'equivalents de RNA) i es determina la pendent de la relació entre les Cts i el logaritme de la concentració. El rendiment respondrà a la fórmula:

$$\text{Rendiment (\%)} = 100 (10^{-1/m} - 1)$$

on "m" és la pendent. Una pendent de -3'322 representa un rendiment del 100%.

### **II.10.3 Encebadors de Real Time pel gen DOR.**

En aquesta tesi es van dissenyar i posar a punt encebadors per quantificar mRNAs del gen DOR en humà, ratolí i rata. Aquests primers han estat àmpliament usats al nostre grup per quantificar l'expressió del gen DOR amb diversos propòsits.

<b>Humà</b>	hRT-DORf	CTCCCCTTCTCCTCCAGTAAA
	hRT-DORr	AGCCCAAATTCAGTCTCACCA
<b>Ratolí</b>	mRT-DORf	AACCACAGCCTGCTTCTAATACCTT
	mRT-DORr	TCAGCCAGTCTCAACACAAAACAC
<b>Rata</b>	rRT-DORf	CACAGCCTGCTTCAAATACCTTCT
	rRT-DORr	TCAGCCAGTCTCAACACAAAACAC

La posició relativa d'aquests primers en els cDNAs és la següent:

Taula 1. Posició als cDNAs dels primers usats per RT-PCR					
	Mida cDNA (bp)	Posició ORF	Posició primers RT		Amplificació (bp)
			Forward	Reverse	
<b>hDOR</b>	4110	327 a 989	2315 a 2335	2406 a 2427	112
<b>mDOR</b>	3933	212 a 877	3649 a 3673	3730 a 3753	104
<b>rDOR</b>	3972	186 a 851	3683 a 3706	3761 a 3784	101

#### II.10.4 Quantificació de l'expressió de l'RNA de DOR per Real Time PCR.

En la quantificació per RT-PCR de l'expressió del gen DOR s'ha utilitzat com a gen constitutiú la ciclofilina A (CYPA). Les amplificacions s'han fet en un volum final de 16 µl. Tots els encebadors s'han utilitzat a una concentració de 300nM, la qual s'ha determinat experimentalment com l'òptima, i amb una quantitat de cDNA de 10 ng d'equivalents de RNA per tub. Els cicles s'han fet en les següents condicions:

$$\left. \begin{array}{l} 10' \text{ a } 95^{\circ}\text{C} \\ 15'' \text{ a } 95^{\circ}\text{C} \\ 1' \text{ a } 60^{\circ}\text{C} \end{array} \right\} \times 40$$

Un cop finalitzada l'amplificació s'han fet les corbes de melting de cada pou per a descartar amplificacions inespecífiques o formació de dímers d'encebadors.

## **Materials i mètodes**

### **II.11 Obtenció de RNA total.**

En la obtenció i manipulació de RNA s'ha de treballar encara més amb compte que amb el DNA, ja que el RNA és molt més sensible a la degradació. Cal treballar sempre amb reactius i en condicions en què s'evitin possibles contaminacions amb RNAses.

El mètode que principalment s'ha usat en aquesta tesi per a l'obtenció de RNA és el mètode del Trizol (Invitrogen), que permet l'aïllament de RNA total a partir de teixits o cultius cel·lulars. L'obtenció d'RNA s'ha fet seguint el procediment que indica el fabricant (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=469>). Bàsicament el Trizol és una solució que lisa les cèl·lules i en dissol els seus components mantenint la integritat de l'RNA. Un cop lisat, s'afegeix cloroform i es centrifuga, de manera que queden dues fases separades, una orgànica i una aquosa, on es troba l'RNA. La fase aquosa es separa i es precipita el RNA amb isopropanol.

Per a certes aplicacions cal tenir un RNA absolutament lliure de DNA. Per això es fa servir una DNAsa lliure de RNAses (DNAsa I, d'Ambion, procediment segons les instruccions del fabricant). (<http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?AM2222>).

### **II.12 Obtenció de cDNA.**

Per a determinades aplicacions (com ara per la PCR a temps real) cal passar el RNA a cDNA. Això s'aconsegueix per acció d'una retrotranscriptasa, enzim que sintetitza DNA usant RNA com a motlle. L'encebador usat pot ser específic d'un RNA concret o inespecífic. En aquesta tesi s'ha usat l'encebador inespecífic oligodT, que hibrida amb les seqüències poliA dels mRNAs.

L'equip comercial que s'ha usat en aquesta tesi és el d'Invitrogen, seguint les instruccions del fabricant

(<https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewCategories&pc=2719&npc=388&nc=395&>)

### **III CULTIU CEL·LULAR.**

#### **III.1 Consideracions generals.**

La manipulació de les línies cel·lulars s'ha fet seguint condicions estrictes d'esterilitat per minimitzar el risc de contaminació. El treball amb les cèl·lules s'ha realitzat en campanes de flux laminar. Aquestes es netegen abans i després del seu ús amb una solució d'etanol 70%; periòdicament es manté sota irradiació per UV (incorporat a la pròpia campana) per assegurar-ne l'esterilitat. L'ús del cremador Bunsen és opcional, però no es recomana perquè crea turbulències que trenquen el flux laminar. És important no passar les mans o objectes per sobre de cèl·lules o solucions estèrils, ja que és una forma usual de contaminació. El material de treball ha de ser estèril, o esterilitzar-lo abans del seu ús, per irradiació amb UV o amb etanol 70%. Les solucions de treball (medis de cultiu, antibiòtics, tripsina, reactius...) han de ser esterilitzats, bé per autoclau o passant-los per filtres de 0,22 µm de diàmetre (Schleicher & Schuell).

En general les cèl·lules es mantenen en incubadors en les condicions més favorables (temperatura: 37°C; pressió de CO<sub>2</sub>: 5%; humitat: 90%).

Un cop acabat l'experiment, i tractant-se de material biològic, cal tractar els materials utilitzats per eliminar les cèl·lules restants, bé amb lleixiu, per incineració o amb l'autoclau.

#### **III.2 Medis i reactius generals.**

Les solucions d'estoc que s'han utilitzat han estat les següents:

- Medi basal: medi DMEM amb glutamina 2mM i 4,5g/l de glucosa (Gibco).
- Sèrum: Sèrum Boví Fetal (FBS) o sèrum de cavall (HS) tots dos de Gibco. Abans del seu ús cal tractar-los a 56°C durant 30 minuts per inactivar les proteïnes del complement, que podrien danyar les cèl·lules.
- Antibiòtics: (per minimitzar el risc de contaminació) Solució de Penicilina/Streptomicina 10.000 U/ml: 10.000 µg/ml (Gibco).
- Tamponador: HEPES, solució 1,25 M, pH 7'4. Per mantenir les condicions de pH, juntament amb el CO<sub>2</sub> de l'incubador.

## **Materials i mètodes**

Per a més informació <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9371> (Gibco).

Amb aquestes solucions d'estoc es preparen els medis necessaris per al creixement de les cèl·lules. Típicament el medi usat és el conegut com a “medi complet”: sobre un volum de 500 ml de DMEM s'afegeixen els següents reactius fins a la concentració final indicada:

- HEPES 25 mM (dil·lució 1/50 de l'estoc)
- Penicil·lina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml (dil·lució 1/100 de l'estoc)
- FBS al 10% (medi de creixement) o HS al 2% (medi diferenciació).

El medi preparat es manté a 4°C i s'escalfa al bany maria fins a 37°C abans del seu ús en cèl·lules.

Altres solucions generals de treball són:

- PBS: preparat i esterilitzat per l'equip tècnic del laboratori. S'usa bàsicament per rentar les cèl·lules de restes de medi, per exemple abans de l'acció de la tripsina.
- Tripsina: 2,5 g/l. (Gibco). Allibera les cèl·lules de la superfície de creixement.

### **III.3 Manteniment dels cultius cel·lulars.**

Les cèl·lules es poden mantenir en suspensió en un medi o adherides a una superfície adequada. Per establir un cultiu de cèl·lules adherides es plaquegen les cèl·lules normalment a plaques de 10 cm de diàmetre o flascons de 75 cm<sup>2</sup>. Aquests són els suports més comuns per al manteniment de la línia cel·lular, però depenent dels usos per als que es vol destinar les cèl·lules pot interessar plaquejar-les en receptacles diferents, com ara plaques de 15 cm<sup>2</sup>, quan es necessita un gran nombre de cèl·lules, o plaques multi-pou, quan no necessitem tenir moltes cèl·lules i hi ha moltes condicions diferents d'experimentació. Per passar cèl·lules d'un tipus de suport a un altre es pot usar com a referència la superfície relativa dels dos receptacles (**taula N**). Així, per exemple, a una

placa de 15 cm de diàmetre (145 cm<sup>2</sup>) hi cabran gairebé 3 vegades més cèl·lules que en una placa de 10 cm de diàmetre (56 cm<sup>2</sup>).

**Taula 2.** Diferents suports utilitzats en aquesta tesi, superfície i nombre de cèl·lules HeLa que hi caben en confluència.

		<b>Superfície</b>	<b>HeLa</b>
<b>Placa</b>	15 cm Ø	145 cm <sup>2</sup>	2 x 10 <sup>7</sup>
	10 cm Ø	56 cm <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>6</sup>
	6 cm Ø	21 cm <sup>2</sup>	2,5 x 10 <sup>6</sup>
	3,5 cm Ø	8 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>
<b>Multi-pou</b>	6 pous	9,5 cm <sup>2</sup> /pou	1,2 x 10 <sup>6</sup>
	12 pous	4 cm <sup>2</sup> /pou	5 x 10 <sup>5</sup>
	24 pous	2 cm <sup>2</sup> /pou	2,5 x 10 <sup>5</sup>
	48 pous	1 cm <sup>2</sup> /pou	1,3 x 10 <sup>5</sup>
<b>Flascó</b>	250 ml	75 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>
	50 ml	25 cm <sup>2</sup>	3 x 10 <sup>6</sup>

Per poder mantenir una línia en bones condicions, les cèl·lules han d'estar en constant divisió i per tant s'ha d'evitar que arribin a la confluència màxima, és a dir, que arribin al punt en què ocupen tota la superfície del suport i ja no es poden dividir més. Això és especialment important en línies cel·lulars com els mioblasts C2C12, ja que quan arriben a confluència comencen a diferenciar. Per aquest motiu quan arriben a una confluència del 80-85% (quan les cèl·lules ocupen el 80-85% de la superfície del suport) s'han de passar a un nou suport. Per al manteniment de les línies les cèl·lules es passen a confluències baixes, sent 10% el percentatge mínim recomanat, ja que amb percentatges inferiors es compromet l'homogeneïtat del cultiu i fins i tot la supervivència cel·lular.

La majoria de línies cel·lulars dupliquen el nombre de cèl·lules en un temps lleugerament inferior a un dia. Això fa que si es plauegen al 10% calgui passar-les per manteniment de la línia en menys de 3 dies perquè no arribin a estar massa confluents.

## **Materials i mètodes**

El procediment per passar les cèl·lules de suport és el següent:

1. S'aspira el medi en el que estan creixent les cèl·lules.
2. Es renten amb tampó PBS. Quan s'aboquen tampons o medis a les cèl·lules és important no fer-ho directament sobre les cèl·lules, sinó en la mesura del possible fer-ho sobre la paret del receptacle per evitar desenganxar cèl·lules.
3. S'aspira el tampó PBS. És important aspirar bé perquè no quedin restes de tampó o medi, per al correcte funcionament de la tripsina al següent pas.
4. S'afegeix la solució de tripsina (1 ml per una placa de 10 cm) i es reparteix bé per tota la superfície de les cèl·lules. La tripsina és una proteasa que trencarà les unions entre cèl·lules i entre aquestes i el suport, de manera que quedaran les cèl·lules lliures. Convé exposar les cèl·lules a la tripsina el menor temps possible, per evitar que es malmetin.
5. Quan les cèl·lules s'han desenganxat (es pot veure a simple vista o al microscopi) s'afegeix medi de cultiu (9 ml en una placa de 10 cm), i es resuspenen les cèl·lules fins a aconseguir una suspensió homogènia.
6. Es centrifuga la suspensió a baixa velocitat (700 rcf, 3 minuts) per concentrar les cèl·lules. S'aspira en sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en medi de cultiu. D'aquesta manera s'elimina la tripsina del medi.
7. Es dilueixen les cèl·lules en el volum de medi necessari i es plaquegen al suport desitjat.

En els casos en què calgui tenir molt ben controlat el nombre de cèl·lules que es plaquejarà es pot comptar el nombre de cèl·lules per mil·lilitre que hi ha en una determinada suspensió de cèl·lules amb l'ús d'una cambra de Neubauer al microscopi.

### **III.4 Congelació i descongelació de cèl·lules.**

Els cultius cel·lulars es poden mantenir durant períodes llargs de temps congelats en nitrogen líquid. Les cèl·lules tendeixen a envellir i a perdre les seves característiques bioquímiques i morfològiques quan es van tractant amb tripsina i subdividint. En aquest sentit és interessant mantenir estocs congelats de cèl·lules que hagin estat passades poques vegades. Això també serà útil en cas que una contaminació de les cèl·lules amb

les que s'està treballant faci que les haguem de llençar. El procediment per obtenir alíquotes congelades de cèl·lules és el següent:

1. Es tripsinitzen les cèl·lules i es centrifuguen com hem vist al punt **III.3**.
2. Es resuspenen les cèl·lules en una solució de DMSO (dimetilsulfòxid) (*Sigma*) diluït al 10% en FBS. El DMSO és un crioprotector, és a dir, protegeix les cèl·lules dels efectes nocius que tindria la congelació, bàsicament la formació de cristalls. Tot i això és tòxic i per tant cal exposar les cèl·lules el menor temps possible al DMSO a temperatura ambient.
3. S'aliquota aquesta suspensió en criotubs (*Nunc*) prèviament rotulats. S'hi indica el tipus cel·lular, el nombre de processos de tripsinització, la quantitat de cèl·lules congelades, la data de congelació i el propietari.
4. Es col·loquen els criotubs en uns tancs de congelació d'isopropanol i es situa el tanc a  $-80^{\circ}\text{C}$  durant 24 hores. El tanc d'isopropanol serveix per fer que el refredament de les cèl·lules sigui lent, al voltant d'un grau per minut, fent així una congelació progressiva menys nociva per les cèl·lules.
5. Després de 24 hores el tanc ja haurà assolit els  $-80^{\circ}\text{C}$  i és aleshores quan es passen els criotubs a nitrogen líquid.

En el procés de descongelació de les alíquotes un cop més cal tenir les cèl·lules exposades el menor temps possible al DMSO a temperatura ambient. El protocol consisteix bàsicament en el següent:

1. El criotub es passa del nitrogen líquid al bany maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , perquè es descongeli ràpidament.
2. Es resuspèn el contingut del criotub en 10 ml de medi de cultiu.
3. Es centrifuguen les cèl·lules i s'aspira el sobrenedant. D'aquesta manera s'elimina el DMSO de les cèl·lules.
4. Es resuspenen les cèl·lules en medi i es tracten de manera anàloga a si s'acabessin de tripsinitzar (punt **III.3**).



### **III.5 Detecció de micoplasma.**

En general les contaminacions que poden afectar als cultius cel·lulars (bàsicament bacteries i fongs) es detecten fàcilment a simple vista perquè fan que el medi de cultiu s'enterboleixi i canviï de color, ja que s'acidifica i els medis tenen un indicador colorimètric de pH. La contaminació per micoplasma, en canvi, passa normalment desapercibuda, ja que és un paràsit intracel·lular que no provoca aquests canvis en el medi i per tant no detectable a simple vista. Les úniques pistes que poden portar a pensar que es pateix una contaminació per micoplasma són que les cèl·lules es divideixen més lentament, o que són menys efectives per a processos com diferenciacions o transfeccions transitòries.

L'anàlisi de la possible contaminació per micoplasma s'ha de fer periòdicament a través d'un equip de detecció específic. En aquesta tesi s'ha usat un equip anomenat EZ-PCR Mycoplasma Test (Biological Industries) que detecta la presència de micoplasma amb una PCR específica d'un marcador de la bactèria, seguint les instruccions del fabricant (<http://www.bioind.com/Htmls/product.aspx?C1010=12564&BSP=12562>).

### **III.6 Línies cel·lulars utilitzades.**

-**Cèl·lules HeLa** (ATCC CCL-2) procedeixen d'adenocarcinoma de cèrvix humà. Presenten una morfologia i un fenotip epitelial i tenen incorporades seqüències del papilomavirus humà 18 (HPV-18). Són cèl·lules adherents (s'uneixen a les superfícies de cultiu) i presenten inhibició per contacte, de manera que formen monocapes en cultiu. Aquestes cèl·lules són àmpliament utilitzades per l'estudi de diferents proteïnes expressades de manera transitòria, ja que es poden transfectar per diferents mecanismes i són resistent i amb un fàcil manteniment.

-**HEK 293T** (ATCC CRL-11268) és una línia que també es pot transfectar fàcilment. Deriva de la línia 293 (una línia originària de ronyó humà), per inserció de l'antigen T del virus SV40. S'utilitzen també per a la propagació i titulació d'adenovirus recombinants. Com en el cas de les HeLa tenen fenotip epitelial, i presenten adherència a les superfícies i inhibició per contacte.

-**C2C12** (ATCC CRL-1772) és una línia de mioblast procedent de ratolí. La seva principal característica és que en les condicions adequades diferencia rapidament, formant miotubs contràctils i produint proteïnes característiques del múscul. El tractament amb BMP-2 (bone morphogenic factor 2), però, fa que es diferenciïn a osteoblast.

Per a més informació sobre aquestes línies: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

### **IV TRANSFECCIÓ CEL·LULAR TRANSITÒRIA.**

En molts casos l'estudi funcional d'una proteïna requereix la seva expressió en una línia cel·lular. Tot i ha altres mètodes, com la infecció amb virus, per a aconseguir aquesta finalitat en aquesta tesi s'han usat bàsicament mètodes de transfecció cel·lular transitòria. Dels diferents mètodes disponibles s'ha usat com veurem un o altre en funció del propòsit per al qual es feia la transfecció.

#### **IV. 1 Transfecció pel mètode del fosfat de calci.**

Aquest mètode es basa en la formació d'un precipitat de fosfat de calci que engloba el DNA que es vol transfectar. El precipitat s'adhereix a la superfície de la cèl·lula i posteriorment és endocitat. El precipitat es forma en mesclar dues solucions, una que conté clorur de calci i l'altra tamponada que conté el fosfat.

El paràmetre més important en la formació correcta del precipitat és el pH de les solucions: petites variacions en el pH donen lloc a la formació de precipitats de mida diferent. Cal trobar el pH òptim al qual es forma un precipitat prou gran per sedimentar i adherir-se a les cèl·lules i prou petit per permetre la seva endocitosis. Per determinar el pH òptim s'usa una solució de clorur de calci a pH 6'95 i una bateria de tampons fosfat a diferents pHs (6,5 a 7,5), i es mesura quin és el que produeix una màxima transfecció (pel procediment que veurem al punt **IV.3**). Un altre paràmetre que influeix en la formació dels precipitats és la temperatura. En aquest sentit és important evitar l'ús de la flama quan es transfecta amb clorur de calci.

El DNA transfectat també influeix en l'eficiència de la transfecció. D'una banda la quantitat de DNA ha de ser proporcional al nombre de cèl·lules. Així, per exemple, per una placa de 10 cm s'han utilitzat en aquesta tesi normalment 20 µg de DNA, i per un pou d'una placa de 6 pous, 4µg. Aquestes quantitats són generals i en alguns casos cal ajustar-les al tipus d'experiment. La qualitat del DNA transfectat també influeix en l'eficiència de la transfecció. La majoria de DNAs que es transfecten són vectors que s'han obtingut per amplificació en bacteries. En aquest sentit és recomanable usar per a transfectar plasmidis provinents de maxi-preps i no de mini-preps, ja que les primeres donen una concentració i una puresa més elevada dels DNAs.

Les solucions usades en la transfecció per fosfat de calci són les següents:

- Tampons fosfat:    -0,28 M NaCl  
                          -50 mM BES  
                          -0,75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                          -0,75 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Es generen diferents alíquotes del tampó en què els pHs s'ajusten un rang entre 6,5 i 7,5. Es filtren amb un filtre de 0,22 µm per esterilitzar-los.

- solució de CaCl<sub>2</sub>:   -2 M CaCl<sub>2</sub>  
                          -0,1 M Tris-base  
                          S'ajusta el pH a 6'95 i es filtra.

- solucions dels plasmidis a transfectar
- aigua miliQ estèril

El procediment seguit per a la transfecció de plaques de 10 és el següent:

1. el dia abans de la transfecció es sembren les plaques de manera que en el moment de la transfecció estiguin a la confluència desitjada (al voltant del 25%).
2. es prepara la mescla de DNAs que es vol transfectar en tubs estèrils. Es porta fins a 250 µl amb aigua miliQ estèril i es barreja.
3. s'afegeix 250 µl de la solució de CaCl<sub>2</sub> i es barreja.
4. s'afegeix 500 µl del tampó fosfat i es barreja.
5. S'espera 15' per a que es formin els precipitats. Passat aquest temps es barreja la solució per resuspendre els precipitats i s'aboca, gota a gota, per tota la superfície de les cèl·lules.
6. Es deixa les cèl·lules en contacte amb els precipitats durant 16-18 hores. Exposicions més prolongades als precipitats poden tenir efectes tòxics.
7. Es renten les cèl·lules amb PBS per eliminar les restes de precipitats i s'afegeix nou medi de cultiu.

## **Materials i mètodes**

Aquest procediment descrit per a plaques de 10 cm es pot escalar per adaptar-lo a plaques de mida diferent. Així per exemple en el cas de transfeccions de multi-pous de 24 pous en què es volien fer experiments per quadruplicat (3 pous per l'experiment i un per a mesurar l'eficiència de la transfecció) s'ha preparat la mescla per als quatre pous conjuntament:

1. Es barregen els DNAs
2. Es porten a 100 µl amb aigua miliQ estèril
3. S'afegeixen 100 µl de solució de CaCl<sub>2</sub>
4. S'afegeixen 200 µl de tampó fosfat
5. S'espera 15' i s'aboquen 100 µl a cada un dels 4 pous

Aquest mètode de transfecció no funciona per a qualsevol tipus cel·lular. Tot i això, en determinats tipus cel·lulars com ara les cèl·lules HeLa aconseguix unes eficiències de transfecció molt altes. El principal problema d'aquest sistema de transfecció és la variabilitat: en un mateix experiment en què es transfectin diferents condicions es poden tenir eficiències de transfecció molt diferents. Això fa que aquest sistema de transfecció no sigui el més adequat per experiments on es requereix una eficiència de transfecció similar entre les diferents condicions experimentals, com ara els estudis amb vectors reporters. L'alta eficiència de transfecció que s'aconsegueix pot ser també (i paradoxalment) un problema, un altre cop en estudis com els de vectors reporters.

Per tots aquests motius en aquesta tesi s'ha usat aquest mètode per transfectar cèl·lules HeLa en els casos en que calia una alta eficiència de transfecció però no era necessària una elevada homogeneïtat en les eficiències de transfecció, com ara transfeccions per obtenir proteïna per Western Blot o per analitzar localització de proteïnes per microscòpia confocal.

### **IV.2 Transfecció amb *Lipofectamine*.**

Un mètode alternatiu a la transfecció amb fosfat de calci és la transfecció amb diferents mètodes comercials basats en la formació de liposomes que engloben en DNA i són fagocitats per la cèl·lula. En aquesta tesi s'ha utilitzat principalment l'equip *Lipofectamine 2000 (Invitrogen)*. Els avantatges d'aquest sistema de transfecció respecte al fosfat de calci són principalment dos: el primer que permet la transfecció de determinats tipus cel·lulars que no es poden transfectar pel mètode del fosfat de calci;

segon l'eficiència de la transfecció és molt més constant, de manera que en un experiment la variabilitat en l'eficiència de transfecció de les diferents condicions disminueix, cosa necessària per determinats experiments com ara estudis amb vectors reporters. Els inconvenients són també dos: l'eficiència de transfecció sol ser menor que amb el fosfat de calci (50-70%); d'altra banda el seu preu és molt més elevat.

Les transfeccions amb *Lipofectamine 2000* s'han portat a terme en plaques multi-pou de 12, 24 o 48 pous, seguint les instruccions del fabricant (<https://catalog.invitrogen.com/>).

Breument el procediment seguit per transfectar multi-pous de 24 pous és el següent:

1. El dia abans de la transfecció es plaquegen les cèl·lules de manera que en el moment de la transfecció estiguin a la confluència desitjada. En aquest cas la confluència ha de ser més alta que amb el fosfat de calci (45-65%), per minimitzar la toxicitat del producte.
2. Abans de la transfecció es retira el medi de les cèl·lules i es canvia per medi sense antibiòtic. Això és degut a que l'antibiòtic augmenta la toxicitat de la lipofectamine.
3. Es barregen els DNAs i es porten a un volum de 200 µl amb DMEM.
4. Es barreja la quantitat necessària de lipofectamine per totes les condicions a transfectar amb el volum adequat de DMEM. S'espera cinc minuts.  
La quantitat de lipofectamine dependrà de la quantitat de DNA que es vol transfectar, i el ràtio µg de DNA:lipofectamine pot variar entre 1:0,5 i 1:5. Aquest ràtio s'ha d'optimitzar per a cada tipus cel·lular per aconseguir una eficiència major amb una baixa toxicitat.
3. Es barregen els 200 µl del punt 3 amb 200 µl de la solució del punt 4. S'espera 20 minuts.
4. Es barreja bé i s'afegeixen 100 µl a cada un dels pous del quadruplicat, gota a gota i repartint per tota la superfície de les cèl·lules.
5. Després de 4-6 hores ja es pot canviar el medi de la placa sense perdre eficiència de transfecció.

Un cop més aquest és el procediment per a transfectar plaques multi-pou de 24 pous, però el procediment es pot escalar per adaptar-lo a altres tipus de plaques.

## **Materials i mètodes**

Aquest sistema de transfecció s'ha utilitzat en aquesta tesi en línies cel·lulars que no es transfecten bé amb fosfat de calci, com les cèl·lules C2C12, així com en els assajos amb vectors reporter, en els que es requereix la màxima uniformitat possible en l'eficiència de transfecció dels diferents grups analitzats.

### **IV.3 Mesura de l'eficiència de transfecció.**

La mesura de quina ha estat l'eficiència d'una determinada transfecció té principalment dos objectius. El primer és determinar sí la transfecció ha funcionat correctament; d'aquesta manera evitem fer llargs protocols amb una despesa innecessària de temps i diners amb unes mostres que no serviran perquè la transfecció no ha funcionat com caldria. D'altra banda en molts experiments es transfecten diferents condicions que s'han de comparar numèricament entre sí. La dada de l'eficiència de transfecció es pot usar com un valor numèric amb el qual corregir els valors experimentals de les diferents condicions, de manera que es reverteix la possible variabilitat creada per una transfecció diferent. Cal dir que aquesta correcció és creïble quan la correcció que s'ha de fer és de petita magnitud; dues condicions experimentals amb eficiències de transfecció molt diferents no es podran comparar encara que es corregeixin els valors per l'eficiència de transfecció.

#### **IV.3.1 Mesura de la GFP al citòmetre.**

Un dels mètodes utilitzats per a la mesura de l'eficiència de la transfecció en aquesta tesi ha estat la mesura de la proteïna Green Fluorescent Protein (GFP) utilitzant un citòmetre. La GFP és una proteïna que emet fluorescència quan és excitada amb una determinada longitud d'ona i per tant es pot mesurar per mètodes fluorimètrics. Un vector d'expressió per a la proteïna GFP es co-transfecta juntament amb els vectors de l'experiment (típicament el vector de GFP s'afegeix en un 10% de la quantitat total de DNA transfectada). L'expressió de la proteïna GFP es donarà tan sols en aquelles cèl·lules que hagin estat transfectades, i amb una intensitat proporcional al nombre de còpies de vector de GFP que hagin entrat. Donat que tots els vectors tenen la mateixa probabilitat d'entrar a la cèl·lula, la intensitat de la senyal de la GFP serà proporcional

no tan sols a l'entrada del vector de la GFP, sinó també a l'entrada de qualsevol dels vectors de la mescla de transfecció.

El citòmetre mesura el percentatge de cèl·lules que tenen senyal de GFP, i la intensitat d'aquesta senyal per a cada cèl·lula mesurada. Aquests valors s'usaran per a la correcció de l'experiment.

Per fer aquesta anàlisi no és necessari trencar ni matar les cèl·lules. Per aquest motiu amb aquest sistema i l'ús d'un FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) és pot aconseguir seleccionar aquelles cèl·lules que expressen GFP, i separar-les de les que no per poder-les seguir creixent.

#### **IV.3.2 Mesura de l'activitat renilla al luminòmetre.**

Un mètode alternatiu a la GFP, però basat en el mateix concepte, és el de co-transfectar amb els vectors de l'experiment un vector d'expressió per a l'enzim renilla (també en una relació del 10% del DNA total transfectat). Aquest enzim és capaç de produir llum a partir d'un substrat, i aquesta llum es pot mesurar al luminòmetre, com veurem al punt **V.3.2**. La mesura de la llum produïda és proporcional a la quantitat de renilla present i per tant a l'eficiència de la transfecció. Aquests valors per tant es poden usar també per corregir els valors de les diferents condicions experimentals. A diferència de la GFP amb aquest sistema sí cal lissar les cèl·lules i per tant no es pot utilitzar per seleccionar-les.



**V. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL.**

Una de les tècniques utilitzades per l'estudi de l'activitat transcripcional és la utilització de vectors reporters. Els vectors reporters codifiquen per l'expressió d'una proteïna que per les seves característiques és fàcilment mesurable; l'expressió d'aquesta proteïna està controlada per un promotor que conté elements de resposta als factors dels quals es vol analitzar l'activitat transcripcional. D'aquesta manera l'expressió del gen reporter serà una mesura de l'activitat transcripcional que es vol determinar. Els gens utilitzats com a reporters en aquesta tesi han estat dos, la cloramfenicol acetil transferasa (CAT) i la luciferasa.

**V.1 Disseny de l'experiment.**

Un experiment típic d'aquesta tesi és el següent: es vol analitzar la capacitat d'un possible coactivador d'incrementar l'activitat transcripcional d'un determinat receptor nuclear. Els elements necessaris per fer l'experiment són:

- cèl·lules en plaques multi-pou: generalment s'han usat cèl·lules HeLa, tot i que també s'han usat altres com 293 o C2C12.
- plàsmids:
  - vector reporter per al receptor nuclear
  - vector d'expressió del receptor nuclear
  - vector d'expressió del possible coactivador
  - vector buit per igualar la quantitat de DNA transfectat a les diferents condicions. El vector buit usat ha estat pCDNA3.1.
- hormona per al receptor nuclear

Les transfeccions s'han realitzat majoritàriament a plaques multi-pou de 24 pous. El mètode de transfecció d'elecció ha estat la transfecció amb Lipofectamine 2000; el principal motiu és que l'eficiència de transfecció és més constant entre les diferents condicions que amb altres mètodes com el fosfat de calci. L'eficiència de la transfecció és menor però suficient.

Les quantitats típiques de vectors transfectades per pou han estat:

Condició	ng de DNA					Hormona
	Reporter	Receptor Nuclear	co-activador	vector buit	Total DNA	
Basal	150	0	0	375	525	-
Receptor Nuclear	150	75	0	300	525	+
-	150	75	100	200	525	+
co-activador	150	75	200	100	525	+
+	150	75	300	0	525	+

Les diferents condicions es transfecten per quadruplicat: 3 rèpliques serveixen per mesurar l'expressió del gen reporter; la quarta serveix per mesurar l'eficiència de la transfecció i corregir pel seu valor. El procediment utilitzat ha estat el següent:

- Dia 0: es passen les cèl·lules a plaques de 24 pous de manera que en el moment de la transfecció estiguin a la confluència desitjada (40-60%)
- Dia 1: a la tarda (16:00-18:00 h) es realitza la transfecció, de la forma descrita al punt **IV.2**
- Dia 2: pel matí es canvia el medi i a la tarda (sobre les 18:00 h) s'afegeix l'hormona.
- Dia 3: pel matí, després de 16-18 h d'incubació amb l'hormona, es lisen les cèl·lules i es mesura l'expressió del reporter. Alternativament es pot afegir el tampó de lisi i congelar-les a -20°C fins al moment de fer l'experiment. La congelació ajuda de fet a que la lisi sigui completa. Es mesura també l'eficiència de la transfecció, analitzant la quarta rèplica al citòmetre de flux.

## V.2 Assaig de l'expressió de CAT.

La mesura clàssica de l'expressió de l'enzim CAT es basa en la seva activitat enzimàtica: es mesurava la capacitat del lisat cel·lular d'acetilar l'antibiòtic cloramfenicol. En aquesta tesi, però, s'ha usat un mètode comercial d'ELISA per a l'enzim CAT (*CAT ELISA assay kit*, de Roche). Aquest és més ràpid que el mètode tradicional, més precís, més sensible i evita treballar amb radioactivitat. El protocol complet està disponible al web del fabricant (<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1465074a.pdf>) però bàsicament consisteix en el següent:

## **Materials i mètodes**

1. Es renten les cèl·lules amb PBS, s'hi aboca tampó de lisi (100 µl per pou de multi-pou de 24) i es deixa en agitació 20-30 minuts a temperatura ambient.
2. Es centrifuga el lisat (5', 4°C, màxima velocitat) per eliminar restes cel·lulars. Amb el sobrenedant es realitza l'assaig.
4. Es prepara una recta patró de proteïna CAT dil·luida amb tampó de mostra. Això permetrà seguir la linealitat de la senyal en relació a la concentració de la proteïna.
5. Als pous de la placa ELISA s'afegeixen 200 µl de les solucions de la recta patró i 50 µl dels lisats cel·lulars més 150 µl de tampó de mostra.
6. Es cobreix la placa amb un plàstic adherent i s'incuba a l'estufa a 37°C 1h.
7. S'elimina la solució i es renta els pous 5 cops amb 200 µl de tampó de rentat.
8. S'incuba amb 200 µl de solució d'anticòs primari anti-CAT-DIG (37°C, 1h.)
9. Repetició del punt 7.
10. S'incuba amb 200 µl de sol. d'anticòs secundari anti-DIG-POD (37°C, 1h.)
11. Repetició del punt 7.
12. S'afegeixen 200 µl del substrat POD fins que aparegui el color. Es controla la reacció amb la recta patró. Es mesura en un lector de plaques l'absorbància a 450 nm.

### **V.3 Assaig de l'expressió de Luciferasa.**

En els casos en què ha estat possible (és a dir, quan s'ha tingut accés al vector reporter) s'ha preferit l'ús de la luciferasa com a gen reporter a l'ús de la CAT. Els principals avantatges de la luciferasa sobre la CAT són els següents:

- el protocol és més senzill, més ràpid i més barat
- es requereix menys quantitat de lisat cel·lular per fer l'experiment
- major sensibilitat de la mesura
- resultats més reproduïbles i amb menor error
- possibilitat de mesurar alhora l'eficiència de la transfecció (activitat dual luciferasa/renilla (punt V.3.2))

La Luciferasa és un enzim bioluminescent: la reacció que catalitza (transformació de la luciferina en oxiluciferina) emet fotons de llum visible. Això fa que la presència d'aquest enzim a extractes cel·lulars sigui detectable en un luminòmetre amb els

reactius adequats. En aquesta tesi s'ha mesurat la luciferasa amb dos equips comercials diferents, en funció de si es mesurava tan sols la luciferasa o si també es mesurava l'enzim renilla.

### **V.3.1 Mesura de la luciferasa.**

En alguns dels experiments es va mesurar l'activitat luciferasa i la correcció de l'eficiència de transfecció és feia per anàlisi de l'expressió de GFP al citòmetre de flux. L'equip comercial usat per mesurar la luciferasa ha estat *Luciferase Assay System*, de *Promega* (<http://www.promega.com/tbs/tb281/tb281.html>), seguint les instruccions del fabricant. De forma resumida el protocol és el següent:

1. Es renten les cèl·lules amb PBS, s'hi aboca el tampó de lisi (100 µl per pou de multi-pou de 24) i es deixa en agitació 20-30 minuts a temperatura ambient.
2. Es centrifuga el lisat (5', 4°C, màxima velocitat) per eliminar restes cel·lulars. Amb el sobrenedant es realitza l'assaig.
3. Es barregen entre 2 i 20 µl del lisat cel·lular amb 50 µl de substrat de luciferasa en tubs de polipropilè adequats pel luminòmetre. S'introdueix immediatament al luminòmetre; aquest té programat prèviament un temps d'espera (en el nostre cas 5 segons) i un temps de mesura (en el nostre cas 10 segons).
4. Quan acaba la mesura es descarta el tub i es passa a mesurar la següent mostra.

Si les dades obtingudes estan fora de rang es pot modificar la quantitat d'extracte afegida (de 2 a 20 µl), la sensibilitat del luminòmetre (de l'1 al 100%) o el temps de mesura (5 a 15 segons).

### **V.3.2 Mesura de l'activitat dual Luciferasa/Renilla.**

Quan la correcció de l'eficiència de transfecció es feia amb l'enzim renilla l'equip usat ha estat el *Dual-Luciferase Reporter Assay System*, de *Promega*, seguint les instruccions del fabricant (<http://www.promega.com/tbs/tm058/tm058.html>). La renilla també és un enzim bioluminescent, que en aquest cas transforma la coelenterazina a

## **Materials i mètodes**

coelenteramida produint llum. Breument, el protocol usat per mesurar alhora luciferasa i renilla ha estat el següent:

1. Es segueixen els passos descrits a l'apartat **V.3.1** fins al punt 3.
2. En lloc de descartar el tub, s'afegeix 50 µl del reactiu *Stop&Glo*. Aquest reactiu atura la reacció de la luciferasa i aporta els substrats per a la reacció de la renilla.
3. S'introdueix un cop més al luminòmetre, que un cop més esperarà un determinat temps (5 segons) i mesurarà la llum produïda (durant 10 segons).
4. Es descarta el tub.

Alguns luminòmetres permeten la injecció automàtica dels substrats de la Luciferasa i la Renilla al tub, que tan sols ha de contenir aleshores el lisat cel·lular. Tot i això l'experiència al laboratori ens diu que aquest sistemes d'injecció tenen problemes de fiabilitat i solen donar problemes; d'altra banda amb l'ús dels injectors es gasta més reactiu que si s'afegeix manualment. És per això que en aquesta tesi no s'han usat els injectors automàtics dels luminòmetres.

## **VI. TÈCNIQUES GENERALS DE MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES.**

### **VI.1 Obtenció d'extractes proteics totals.**

Hi ha molts mètodes descrits a la literatura per a l'obtenció de extractes proteics totals a partir de cèl·lules; es poden trobar molts d'aquests mètodes descrits àmpliament a llibres com ara "Current Protocols in Protein Science" (Coligan et al, 2001).

En aquesta tesi s'han usat mètodes d'obtenció de proteïnes basats en l'ús de detergents; l'objectiu és permeabilitzar les membranes cel·lulars (tant la citoplasmàtica com les dels orgànuls i nucli) per afavorir l'alliberament del contingut cel·lular. Podem trobar al mercat molts detergents amb una força molt diferent; de forma general els detergents es poden separar en no iònics (que es consideren més suaus) i iònics (que es consideren més forts). Els detergents s'han d'usar amb compte de no trencar o comprometre interaccions proteïques o característiques de la proteïna que puguin afectar a l'estudi en qüestió. El principal mètode usat en aquesta tesi utilitza una barreja de diferents detergents, la composició de la qual és la següent:

- 0,1% desoxicolat de sodi
- 0,2% SDS
- 1% Tritó X-100
- 0,1% BSA

Els dos primers són dos detergents iònics; el tercer és no iònic. Aquesta barreja es guarda a 4°C per preservar-ne l'estabilitat i evitar que es contamini amb bacteries o fongs. En el moment de l'ús es prepara una dilució al 30% en PBS fred (pH 7,4), i s'hi afegeixen els inhibidors de proteases. El més usat en aquesta tesi ha estat el còctel d'inhibidors *Complete*, de *Roche*. Aquest es subministra en forma de comprimits que s'afegeixen al tampó (1 comprimit per 10 ml de tampó) i contenen els inhibidors PMSF (1mM), Aprotinina (2 µg/ml), Pepstatina (1 µM) i leupeptina (10 µM).

(<https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1836153a.pdf>)

## **Materials i mètodes**

El procediment següent és el següent:

1. Es posen les plaques de cèl·lules sobre una placa metàl·lica que té a sota gel, de manera que manté una temperatura baixa que evita la degradació proteica.
2. S'aspira el medi de la placa i es renta 2 cops amb tampó PBS.
3. S'afegeix el tampó de lisi necessari (per exemple per una placa de 10 cm es poden posar 200-500 µl de tampó) i es desenganxen les cèl·lules amb un rascador. Es passen a un tub eppendorf en gel.
4. Es passa la mostra per una xeringa amb una agulla de 19 g 5-10 vegades.
5. S'acaba d'homogeneïtzar per rotació en un agitador orbital a 4°C durant 1 h.
6. Es centrifuga a màxima velocitat durant 10 minuts a 4°C
7. Es recupera el sobrenedant i s'aliquota en nous tubs en volums d'ús. D'aquesta manera s'evita congelar i descongelar la mostra.

### **VI.2 Quantificació de les proteïnes.**

El pas següent a l'obtenció de l'extracte proteic és sempre la valoració de la concentració de proteïnes. Això té un doble propòsit: d'una banda saber si s'ha obtingut prou proteïna per continuar amb l'experiment que es vol realitzar; de l'altra saber quants µl de cada mostra calen per aconseguir una mateixa quantitat de proteïna. El mètode usat principalment per valorar la proteïna en aquesta tesi és el mètode BCA. Aquest mètode es basa en la reacció de Biuret, en què les proteïnes reaccionen amb ions  $\text{Cu}^{2+}$  generant ions  $\text{Cu}^{1+}$ , que al seu temps reaccionen amb el reactiu BCA, generant un component violeta. La mesura espectrofotomètrica d'aquest color format serà proporcional a la concentració de proteïna de la mostra.

La reacció es porta a terme en plaques multi-pou de 96 pous. El reactiu usat és el *BCA Protein Assay Reagent*, de *Pierce* (<http://www.piercenet.com/files/1296dh4.pdf>). El procediment és el següent:

1. Es prepara una corba estàndard amb una solució de BSA 2 mg/ml. Típicament s'ha fet una corba amb 0, 2, 5, 10 i 20 µg de BSA. Es posa a la placa.
2. Es posen les mostres a la placa (1-10 µl). Tant les mostres com la corba estàndard es mesuren per duplicat i es fa la mitja dels valors.

3. Es dilueix el reactiu que conté el coure amb el tampó de dilució (1/50) just abans de la seva utilització.
4. S'afegeixen 200 µl del reactiu diluït a cada pou de la placa. Es mou lleugerament la placa per afavorir la mescla.
5. S'espera a que aparegui el color de la reacció. Es pot incubar a 37°C per afavorir la reacció.
6. Es mesura l'absorbància a 562 nm en un lector de plaques d'ELISA.

Gràcies a la corba estàndard obtindrem el valor en µg/µl de la concentració de proteïnes de les mostres. Tot i això és important valorar en una sola mesura la concentració de totes les mostres que s'usaran en un mateix experiment, ja que valoracions en dies diferents poden donar resultats lleugerament diferents. Així la quantificació de les proteïnes serveix sobretot per obtenir resultats de concentració relatius entre les diferents mostres que s'analitzen en una mesura.

### **VI.3 Detecció de proteïnes.**

Molts experiments requereixen la detecció d'una proteïna específica dins una determinada mostra; per a aquesta fi s'utilitza el mètode del Western Blot, en què les proteïnes es separen per electroforesi i es detecten amb un anticòs específic.

#### **VI.3.1 Electroforesi.**

L'electroforesi de mostres de proteïna en gels d'acrilamida és una eina molt útil que es pot usar per separar i comparar complexos proteics, avaluar la puresa de les proteïnes en processos de purificació o avaluar característiques físiques de les proteïnes (mida, càrrega, punt isoelèctric). Una revisió completa de diverses tècniques electroforètiques es pot trobar al llibre "Current Protocols in Protein Science" (Coligan et al., 2001). El sistema més usat per a la separació de les proteïnes en funció de la seva mida és el **SDS-PAGE** (**S**odium **D**odecyl **S**ulphate – **P**oli**A**cridamide **G**el **E**lectroforesis). En aquesta s'utilitza el detergent SDS, que desnatura les proteïnes i els dóna una forta càrrega negativa. La majoria de les proteïnes s'uneixen a una quantitat constant d'SDS per microgram de proteïna, la qual cosa els dóna una densitat de càrrega uniforme que depèn tan sols de la seva massa. Les proteïnes es separen aleshores en una matriu de



## **Materials i mètodes**

poliacrilamida-bisacrilamida aplicant un camp elèctric. Això permet separar les proteïnes únicament per la seva mida. Tot i això trobem algunes excepcions: proteïnes molt carregades, per exemple, poden tenir una mobilitat electroforètica que no correspongui amb la seva mida, ja que la càrrega global de la proteïna influeix en la seva mobilitat. És el cas per exemple de les histones, amb una gran càrrega positiva.

Prèviament a l'electroforesi les mostres de proteïna es barregen amb el tampó de càrrega, que conté l'SDS. La seva mobilitat en el gel d'acrilamida dependrà també de la mida de porus del gel, que al seu temps ve determinat per la concentració d'acrilamida. La matriu d'acrilamida té dues parts diferenciades: el gel separador (anomenat "running") i a sobre d'aquest el gel empaquetador ("stacking"). La diferència entre tots dos és la concentració d'acrilamida (i per tant la mida del porus): el gel empaquetador té un 3,3% d'acrilamida, el gel separador pot tenir entre el 7,5 i el 15%. El gel empaquetador permet una elevada migració de les proteïnes sense gaire diferència entre proteïnes de diferent massa. Això permet que totes les proteïnes entrin al gel separador alhora. En el gel separador és on es dona la diferència de mobilitat electroforètica segons la mida de la proteïna. La mida del porus (i per tant la concentració d'acrilamida) es tria en funció de la mida de la proteïna d'interès: per a proteïnes grans s'utilitzen gels amb baix percentatge d'acrilamida i per a proteïnes petites gels amb alt percentatge.

En paral·lel a les mostres analitzades es fa correr un marcador de pesos moleculars que consisteix en diverses proteïnes de mida coneguda pre-marcades, de manera que són visibles sense cap tractament. Això indicarà el grau de separació entre proteïnes i servirà per estimar la mida de les proteïnes de l'estudi. Aquest marcador també és útil per monitoritzar l'avanç de l'electroforesi i l'eficiència de la transferència a membranes.

Les solucions i reactius usats han estat els següents:

- Tampó de càrrega (4X) (LSB 4X, de Laemml i Sample Buffer 4X)
  - 4 ml Tris HCl 1,5 M (pH 6,8)
  - 16 ml Glicerol 100%
  - 1,6 g SDS
  - 1 mg blau de bromofenol

S'ajusta a 20 ml amb aigua miliQ. Per dilució amb aigua miliQ es poden preparar tampons de càrrega 3X, 2X i 1X.

- Gel d'empaquetament
  - Tris HCl 0,125 M (pH 6,8)
  - Acrilamida 3,3% / Bisacrilamida 0,088%
  - 6,6 mM TEMED
  - 0,1 % APS
  - 0,1 % SDS
  
- Gel separador
  - Tris HCl 0,375 M (pH 8,8)
  - Acrilamida 7,5-15% / Bisacrilamida 0,2-0,4%
  - 2,2 mM TEMED
  - 0,043 % APS
  - 0,1 % SDS
  
- Tampó d'electroforesi (10X)
  - TRIS Base base 250 mM
  - Glicina 1,91 M
  - SDS 1%
  
- Marcadors
  - Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BioRad)*
  - Fumarasa pre-tenyida (Sigma) 0,02% en LSB 1X
  
- Agents reductors
  - DTT 2 M
  - $\beta$ -Mercaptoetanol

## **Materials i mètodes**

Procediment per a la preparació del gel d'acrilamida:

1. Es prepara el sistema del gel seguint les instruccions del fabricant. El sistema d'electroforesi usat en aquesta tesi és el *Mini-PROTEAN (BioRad)*.  
([http://www.bio-rad.com/cm\\_upload/Literature/44432/4006157B.pdf](http://www.bio-rad.com/cm_upload/Literature/44432/4006157B.pdf))
2. Es prepara la solució del gel separador. L'APS i el TEMED s'han d'afegir els últims, perquè són els que fan polimeritzar el gel.
3. Immediatament s'afegeix amb una pipeta Pasteur entre els vidres del gel, omplint fins al 75% de l'alçada dels vidres.
4. Amb una altra pipeta Pasteur s'afegeix lentament aigua per cobrir la part superior del gel separador. Això impedeix el contacte amb l'oxigen, que inhibeix la polimerització, i ajuda a que la part superior del gel quedi plana.
5. Es deixa polimeritzar el gel a temperatura ambient. El sobrant de solució que no es carrega al gel serveix per monitoritzar la polimerització.
6. Es retira l'aigua de sobre del gel separador.
7. Es prepara la solució del gel d'empaquetament i s'afegeix sobre el gel separador amb una pipeta Pasteur, fins a omplir l'espai entre els vidres.
8. Immediatament s'afegeix una pinta de tefló de 1,5 mm de gruix amb el nombre de pous que es vol fer el gel, amb cura de no generar bombolles. Es deixa polimeritzar a temperatura ambient.

Procediment per a la preparació de les mostres:

1. S'afegeix el volum necessari de cada mostra per obtenir una determinada quantitat de proteïna (normalment 15-100 µg).
2. S'igualen els volums de les diferents mostres amb aigua destil·lada.
3. S'afegeix LSB 4X de forma que quedi 1X. Si les mostres s'han de separar en condicions reductores s'afegeix DTT o β-Mercaptoetanol.
4. Es bullen les mostres (95°C, 5').
5. Es centrifuga a màxima velocitat un minut

Procediment per a carregar el gel:

1. S'introdueix el gel a la cubeta corresponent. Es retira la pinta de tefló.
2. S'omple la cubeta amb tampó d'electroforesi fins a cobrir els pous del gel.
3. Amb una xeringa Hamilton o una micropipeta es carreguen als pous tant les mostres com el marcador de pesos moleculars. Si queden pous buits s'hi carrega LSB 1X per evitar que el gel corri distorsionat.
4. Es tapa la cubeta i es connecta a la font d'alimentació. Es corre aproximadament 1h a voltatge constant (125 V).
5. Ho aturem quan el front d'electroforesi (que ens ve indicat pel blau de bromofenol de les mostres) arriba al final del gel.
6. Es desmunta el sistema, es separa el gel i es procedeix a la detecció de les proteïnes.

### **VI.3.2 Tinció dels gels: Blau de Comassie.**

Després de la separació electroforètica les proteïnes es poden tenyir per mètodes com ara la tinció de **Blau de Comassie**. En aquests mètodes es fixen les proteïnes a la matriu del gel, de manera que quan s'han de separar del gel per a posteriors anàlisis no es pot usar aquesta tinció. Alternativament la tinció es pot realitzar un cop la transferència de proteïnes (punt **VI.3.3**) ja s'ha realitzat, per comprovar la qualitat de la transferència.

Els reactius usats en la tinció de Blau de Comassie són els següents:

- Solució de tinció:
  - 7,5% àcid acètic
  - 25% isopropanol
  - 0,05% Comassie Brilliant Blue
- Solució de destenyiment:
  - 7,5% àcid acètic
  - 7,5% isopropanol

## **Materials i mètodes**

El procediment per a la tinció és el següent:

1. S'incuba el gel amb la solució de tinció, a temperatura ambient amb agitació durant 1 hora.
2. Es destenyeix el gel en solució de destenyiment a temperatura ambient amb agitació durant diverses hores. És útil posar paper de filtre sucut a la solució de destenyiment, que anirà unint el blau de comassie que s'elueixi del gel i per tant mantindrà la solució de destenyiment neta.
3. Opcionalment el es pot assecar en un assecador.

### **VI.3.3 Transferència de les proteïnes.**

Per poder treballar amb les proteïnes que s'han separat en l'electroforesi és útil transferir-les a un suport inert que les retengui. Amb aquesta intenció es fa la transferència de les proteïnes des de la matriu d'acrilamida a una membrana adequada. Hi ha diverses membranes que retenen les proteïnes de forma efectiva; l'elecció de la membrana depèn de l'aplicació final per a la que es vol fer servir. Les membranes de PVDF *Inmobilon-P* (Millipore) ([www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/c3117](http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/c3117)) han estat les elegides en aquesta tesi perquè tenen una alta capacitat d'unió de proteïnes i permeten combinar múltiples mètodes de detecció com ara tinció de proteïnes i immunodetecció.

La transferència s'ha realitzat en sistemes *MiniProtean TransBlot Cell*, de Biorad ([www.bio-rad.com/cmc\\_upload/0/000/013/280/M1703930E.pdf](http://www.bio-rad.com/cmc_upload/0/000/013/280/M1703930E.pdf)). El procediment a seguir és el següent (continua des del punt 6 de l'apartat **VI.3.1**):

1. Es separa el gel d'empaquetament i es descarta
2. Es talla una membrana una mica més gran que el gel (6 x 9 cm, aprox.). S'incuba en metanol 1-2 minuts.
3. S'hidrata la membrana en aigua destil·lada 1-2 minuts.
4. Es tallen papers de filtre Whatmann (7 x 10 cm, aprox.)

5. Es submergeix el casset de la transferència en un recipient amb tampó de transferència. Amb el casset obert i sobre un dels costats es situen tots els components de la transferència en el següent ordre:

- esponja rectangular (subministrada amb el sistema)
- paper Whatmann
- gel (marcat de forma que en coneixem l'orientació)
- membrana (marcada de la mateixa forma)
- un segon paper Whatmann
- una segona esponja

Cal evitar que quedin bombolles d'aire entre els diferents components. En cas que es transfereixin alhora més d'un gel s'han de marcar de forma que es puguin diferenciar.

6. Es tanca el casset i es col·loca en la cubeta de transferència assegurant-nos que l'orientació sigui la correcta: les proteïnes migraran cap al pol positiu, per tant entre el gel i el pol positiu ha de quedar la membrana.

7. Es col·loca a la cubeta un suport amb gel, ja que en la transferència el sistema s'escalfa. Alternativament la transferència es pot realitzar a la cambra freda.

8. Omplim la cubeta amb tampó de transferència, tanquem la cubeta i connectem amb la font d'alimentació. Es corre a amperatge constant (250 mA, 75 minuts).

9. Quan desmuntem el sistema, les bandes del marcador donen una idea de l'eficiència de la transferència.

La membrana ara pot ser tenyida o usada per a mètodes de detecció.

#### **VI.3.4 Tinció de membranes: Ponceau.**

Per tenyir la membrana s'han d'usar mètodes reversibles, per permetre el posterior ús per a altres mètodes de detecció, com la immunodetecció.

Un d'aquests mètodes és la tinció de Ponceau. Es tracta d'un mètode amb baixa sensibilitat però que ofereix els avantatges de ser simple, ràpid i reversible.

## **Materials i mètodes**

La solució de tinció té la següent composició:

- 0,5% Ponceau S (*Sigma*)
- 1% Àcid acètic

El procediment a seguir per a la tinció és el següent:

1. Es renta la membrana amb aigua destil·lada 3 cops
2. Es submergeix en solució de Ponceau durant 1 minut
3. Es destenyeix rentant amb aigua fins que el fons és lleugerament rosat. Les bandes de proteïnes quedaran com a marques d'un rosat intens.
4. Es pot eliminar totalment la tinció rentant amb aigua durant 10 minuts.

### **VI.3.5 Immunodetecció (Western Blot).**

El Western Blot és una tècnica molt sensible que s'usa per detectar específicament i quantificar proteïnes que s'han separat prèviament per electroforesi. La detecció de certs antigens (epítops) de la proteïna d'interès s'aconsegueix mitjançant l'ús d'anticossos específics. Un cop les proteïnes han estat transferides a una membrana ja estan disponibles per a la detecció per anticossos. La membrana s'ha de bloquejar amb proteïnes no reactives per eliminar els llocs d'unió de la membrana amb proteïnes que han quedat després de la transferència, evitant així marcatge inespecífic per unió de l'anticòs. Després de bloquejar-les les membranes s'incuben amb l'anticòs primari (específic de la proteïna d'interès). En el següent pas, un anticòs secundari unit a una activitat enzimàtica reconeix l'anticòs primari que s'ha unit a la proteïna d'interès. L'últim pas és la detecció de la proteïna a través de l'activitat enzimàtica de l'anticòs secundari.

El **bloqueig** de les membranes es pot fer amb:

- solució de llet desnatada en pols (5% en PBS)
- solució de BSA (3% en PBS)

Es submergeix la membrana en una d'aquestes solucions durant una hora a 37°C amb agitació. Alternativament el bloqueig es pot fer a 4°C durant tota la nit.

Per a la incubació amb l'**anticòs primari** es dilueix aquest en la mateixa solució que s'ha usat pel bloqueig. La dilució depèn de l'anticòs, i s'ha d'optimitzar per aconseguir una bona senyal sense tenir massa unió inespecífica. Es posa en contacte la membrana amb la solució d'anticòs en una bossa termo-segellable i s'incuba amb agitació durant tota la nit a 4°C. Alternativament la incubació es pot fer a temperatura ambient durant dues hores o a 37°C durant una hora, però això disminueix la possibilitat de reutilitzar l'anticòs, ja que a altes temperatures es fa malbé.

Passada la incubació es retira la membrana de la bossa i es recupera la solució d'anticòs si es vol reutilitzar, que es guardarà congelada a -20°C. Es renta la membrana amb tampó de rentat durant 10' a temperatura ambient o a 37°C, depenent de l'anticòs. Es repeteix aquest rentat tres vegades. La solució de rentat consisteix normalment en PBS amb un detergent dissolt. En aquesta tesi s'ha usat principalment com a solució de rentat PBS amb Tritó-X-100 al 0,3% o SDS al 0,1%.

Després dels rentats s'incuba la membrana amb l'**anticòs secundari**, de manera anàloga a com s'ha fet amb l'anticòs primari, però la incubació en aquest cas es fa a 37°C durant 45 minuts, i la solució d'anticòs no es reutilitza. Els anticossos secundaris usats en aquesta tesi han estat *HRP-conjugated donkey antimouse/antirabbit (Jackson)* ([www.jireurope.com/catalog/wholeigg.asp](http://www.jireurope.com/catalog/wholeigg.asp)) que estan units a l'enzim Peroxidasa. Els rentats es fan de la mateixa forma que amb l'anticòs primari.

L'últim pas és la **detecció** gràcies a l'activitat peroxidasa de l'anticòs secundari. Es renta la membrana amb PBS per eliminar restes del tampó de rentat. Es prepara el reactiu de detecció; en aquesta tesi s'ha usat el *ECL Western Blotting detection reagents (Amersham)* ([www.amersham.com](http://www.amersham.com)). Consisteix en dos reactius que s'han de barrejar a parts iguals immediatament abans del seu ús. El procediment és el següent:

1. S'incuba la membrana amb el reactiu de detecció durant 1-2 minuts.



## **Materials i mètodes**

2. Es col·loca la membrana en una bossa de plàstic transparent i s'elimina fent pressió les restes de reactiu de detecció. Es col·loca en un casset especial per al revelat de films.
3. A la cambra fosca, es col·loca un film sobre la membrana, es tanca el casset i es deixa exposar el temps necessari. Aquest temps pot ser molt variable, de pocs segons a diverses hores, i dependrà de l'anticòs i la mostra de l'experiment. Normalment s'han de fer exposicions de diferents temps per aconseguir el resultat desitjat. Després de l'exposició es revelen els films exposats.

Un cop feta la detecció la membrana es pot guardar a 4°C. És interessant guardar-la perquè es podrà reutilitzar per detectar proteïnes amb un altre anticòs. Si l'anticòs primari amb el que es vol reutilitzar la membrana és produït en una espècie diferent de l'anticòs primari amb que s'ha incubat la membrana el primer cop, no caldrà fer cap tractament de la membrana previ a la reutilització, ja que l'anticòs secundari serà diferent. Si es vol fer servir un anticòs primari de la mateixa espècie caldrà fer un stripping de la membrana, per eliminar la presència d'anticòsos en aquesta.

### **VI.3.6 Stripping.**

El procés d'stripping permet, per tant, eliminar la presència d'anticòsos de la membrana pràcticament sense alterar les proteïnes que s'hi ha transferit.

Per al procés d'stripping s'utilitzen les mateixes solucions de bloqueig i rentat que ja hem vist, a més de la solució d'stripping, que té la següent composició:

- Tris HCl 62'5 mM
- 2% SDS
- β-Mercaptoetanol 100 mM

El procediment de l'stripping és el següent:

1. Es renta la membrana amb PBS.
2. Es submergeix en solució d'stripping i s'incuba en agitació durant 30 minuts a 50°C.
3. Es renta la membrana 3 cops amb buffer de rentat.

4. Es bloqueja la membrana amb solució de bloqueig com ja hem descrit.
5. Es procedeix a la incubació amb el nou anticòs primari de la mateixa forma que si fos una membrana nova.

## **VII. TÈCNiques DE MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA.**

Per analitzar la funció i el comportament d'una determinada proteïna molts cops és important saber quina és la seva distribució dins la cèl·lula i com es veu alterada aquesta distribució en diferents situacions. Per fer-ho s'utilitzen tècniques com la microscòpia de fluorescència, on la proteïna en estudi està marcada fluorescentment, de forma que es pot analitzar la seva distribució en un microscopi de fluorescència. Aquesta fluorescència que s'associa a la proteïna d'interès pot tenir diferents orígens. En determinats casos (tot i que és el menys usual) la molècula en estudi és per sí mateixa fluorescent. Una proteïna no fluorescent es pot fer fluorescent si se la uneix artificialment amb una altra proteïna que ho és. En aquest tipus d'estudi es genera un vector d'expressió per a una proteïna de fusió entre la proteïna d'interès i una proteïna fluorescent. Això servirà per estudiar la proteïna d'interès, però té l'inconvenient de que la fusió pot atorgar a la proteïna d'interès propietats que no tenia en origen, amb la qual cosa els resultats de l'estudi tenen un valor relatiu. Per contra té l'avantatge de que per veure'n els resultats no cal fer cap tractament a les cèl·lules, de manera que es poden fer determinats experiments que no es poden fer per altres tècniques, com ara time-lapses. Per últim també es pot atorgar fluorescència a la proteïna d'interès a través de l'ús d'anticossos específics marcats fluorescentment. Això es coneix com immunofluorescència.

Donat que podem les emissions fluorescentes difereixen en la longitud d'ona d'excitació i d'emissió, es poden usar diferents marcatges fluorescentes per a diferents proteïnes d'interès, de manera que es poden localitzar diverses estructures alhora. És important assegurar-se a cada pas (des del marcatge a la visualització) que la senyal obtinguda és específica. En aquest sentit cal usar controls, com ara cèl·lules no transfectades (quan es treballa amb cèl·lules transfectades) o controls de l'anticòs (fer condicions sense anticòs primari o amb un primari irrellevant). També és important tenir diverses rèpliques de cada condició experimental, per evitar artefactes.

Un pas previ a la detecció de la proteïna d'interès amb l'anticòs és fixar les cèl·lules, com veurem al següent punt. Com hem dit en els casos en què la proteïna és fluorescent (com ara quan tenim proteïnes de fusió amb GFP) es pot treballar amb les cèl·lules

sense fer cap tractament. Tot i això en molts casos és preferible fixar-les, ja que permet treballar més còmodament i mantenir la preparació durant un cert temps.

### **VII.1 Fixació de les cèl·lules.**

Les cèl·lules s'han de créixer en un suports que permetin la seva posterior manipulació, tant per poder fixar-les com pels posteriors tractaments de la immunolocalització si és el cas. Per aquest motiu les cèl·lules es sembren en uns cobreobjectes de vidre de 10 mm de diàmetre. Per fer-ho, aquests cobreobjectes s'esterilitzen (amb llum UV) i es col·loquen en una placa de cultiu. En aquesta tesi s'han usat normalment plaques multi-pou de 6 pous, amb 4 cobreobjectes per pou. Cada pou s'ha destinat a una condició diferent, de manera que s'obtenen 4 rèpliques (4 cobreobjectes) de cada condició. Les cèl·lules es sembren normalment a la placa, amb la precaució de que els cobreobjectes quedin al fons del pou i que no s'apilin els uns sobre els altres.

Les solucions usades en la fixació són:

- PBS
- Paraformaldehid 4% en PBS

El procediment per a la fixació és el següent:

1. Es retira el medi de la placa i es renta amb PBS. S'aspira bé el PBS.
2. Es cobreix la superfície amb el paraformaldehid 4%. S'incuba 10 minuts a temperatura ambient. És important no sobrepassar el temps de 10-15 minuts, ja que fixacions més prolongades podrien afectar greument a les proteïnes de la cèl·lula, afectant per exemple possibles epítops.
3. Es retira la solució de paraformaldehid. En aquest pas es pot procedir, segons el cas, a la immunodetecció, a muntar els cobreobjectes en portaobjectes o guardar els cobreobjectes en PBS amb azida a 4°C per al seu posterior ús. En el cas que es guardin els cobreobjectes és important no deixar-los períodes llargs de temps, ja que les cèl·lules es poden desenganxar.

## **Materials i mètodes**

### **VII.2 Immunofluorescència.**

Un cop els cobreobjectes estan fixats ja es pot procedir a la immunodetecció. Les solucions que necessitarem són les següents:

- PBS
- PBS NH<sub>4</sub>Cl 50 mM
- PBS Glicina 20 mM
- PBS Tritó-X-100 1%
- PBS FBS 10%
- Dilució d'anticòs primari
- Dilució d'anticòs secundari
- Solució de tinció de Hoescht (1/2000 en PBS)
- Medi d'inclusió

El procediment a seguir és el següent (seguint des del punt 3 de l'apartat **VII.1**) (tots els passos tenen lloc a temperatura ambient):

1. Els cobreobjectes es distribueixen en plaques multi-pou de 24 pous, que permeten treballar còmodament amb els cobreobjectes, fent que siguin fàcilment identificables i minimitzant el volum necessari de les solucions usades.
2. Es renten cobreobjectes tres cops amb PBS.
3. Es cobreixen amb la solució de NH<sub>4</sub>Cl en PBS i s'incuba 10 minuts. Aquest pas serveix per reduir l'autofluorescència de la cèl·lula, disminuint així el soroll de fons.
4. S'incuben 10 minuts amb la solució de glicina en PBS per equilibrar el pH.
5. S'incuben 10 minuts amb la solució de Tritó-X-100 en PBS. Aquest pas serveix per permeabilitzar les membranes i permetre així el pas dels anticòssos.
6. Es fan tres rentats amb PBS per eliminar el Tritó.
7. Es bloquegen els llocs inespecífics d'unió amb la solució d'FBS en PBS durant 30 minuts.

Tots aquest passos previs serveixen per preparar els cobreobjectes per a la immunolocalització pròpiament dita, que es fa seguint el següent procediment:

1. Es dilueix l'anticòs primari en solució de bloqueig. La dilució a realitzar depèn de l'anticòs, i ha de ser optimitzada per a cada anticòs per tenir una bona senyal amb poc soroll de fons. Es poden usar diversos anticossos primaris diferents alhora si són d'espècies diferents, cosa que permetrà després usar anticossos secundaris amb fluorescència diferent i obtenir senyals diferenciades.
2. Es centrifuga la dilució d'anticòs a màxima velocitat durant 10 minuts a 4°C. Aquest pas serveix per precipitar agregats d'anticòs que embrutarien la mostra.
3. En una superfície neta i llisa (com ara un tros de parafilm) es distribueixen gotes de 20 µl de la solució d'anticòs primari. S'han de col·locar rotulades de forma que quedi clar quin punt correspon a cada condició.
4. S'agafen els cobreobjectes i es col·loquen verticalment sobre un paper absorbent per treure'n la solució de bloqueig.
5. Es col·loquen els cobreobjectes sobre la gota corresponent de solució d'anticòs primari. Cal tenir cura de posar-los amb la cara on hi ha les cèl·lules en contacte amb la solució.
6. S'incuba durant 1 hora a temperatura ambient.
7. Es tornen a col·locar els cobreobjectes en plaques de 24 pous i es fan 3 rentats amb PBS per eliminar l'excés d'anticòs primari.
8. Es dilueix l'anticòs o anticossos secundaris en solució de bloqueig.
9. Es repeteixen els passos 2 a 5.
10. S'incuba 45 minuts a temperatura ambient. Donat que la fluorescència dels anticossos secundaris és sensible a la llum aquest pas es realitza protegint els cobreobjectes de la llum, i tots els passos posteriors s'han de realitzar amb la menor exposició a la llum possible.
11. Es fan tres rentats:
  - el primer amb PBS
  - opcionalment el segon es pot fer amb la solució de tinció de Hoescht en PBS (10 minuts). Així en aquest rentat es tenyeixen els nuclis.
  - el tercer un altre cop amb PBS

## **Materials i mètodes**

En aquest punt la immunolocalització ja està feta i tan sols queda muntar els cobreobjectes en els portaobjectes. El procediment és el següent:

1. S'agafa un cobreobjectes de la placa i es submergeix en aigua miliQ per fer un rentat ràpid.
2. S'asseca bé posant-lo verticalment sobre un paper absorbent.
3. Es deixa assecar totalment per evaporació.
4. Es col·loca una gota de Mowiol de 8-10 µl sobre el portaobjectes.
5. Es col·loca el cobreobjectes sobre la gota de Mowiol amb les cèl·lules en contacte amb el Mowiol. Es pressiona lleugerament i es deixa assecar tota la nit a temperatura ambient, protegit de la llum.

Els cobreobjectes ja estan preparats per ser visualitzats. Es poden conservar a 4°C protegits de la llum.

### **VII.3 Microscopia confocal.**

Les immunolocalitzacions es poden analitzar en un microscopi de fluorescència convencional o en un microscopi confocal. Aquest últim té una sensibilitat major i dona unes imatges amb una qualitat més alta. A més les imatges s'obtenen per talls, de manera que es pot apreciar millor la localització de la senyal, per exemple en casos on es vol veure si es troba dins o fora d'un determinat orgànu. La microscòpia d'immunofluorescència d'aquesta tesi ha estat realitzada en un microscopi *Leica TCS SP2* adaptat a un microscopi invertit *Leitz DM IRBE*. Les mostres han estat escanejades amb un objectiu Leitz 63x, amb oli d'immersió. En les mostres amb dobles i triples marcatges no s'ha observat creuament entre els diferents canals. Els fluorocroms usats (Hoescht, Oregon green o GFP, i Alexa 568) han estat excitats amb les línies de làser d'UV, 488 i 561 nm, respectivament. Per evitar creuaments en marcatges dobles o triples cada fluorocrom ha estat escanejat independentment. El format de la imatge ha estat de 512x512 o 1024x1024 píxels. S'han escanejat entre 7 i 15 seccions òptiques, depenent del tipus de cèl·lula analitzada. Les imatges obtingudes han estat en format TIFF.

ANNEX 1. Vectors usats per clonar i expressar

Nom	Selecció	Característica especial	Tag	Origen
pGEM-T easy	Ampicil·lina	Permet la clonació directa de productes de PCR		Promega
pCDNA3.1	Ampicil·lina			Invitrogen
pGBKT7	Kanamicina	Genera fusions amb el Gal4 DBD		Clontech
pCMV-His	Kanamicina	Genera fusions amb un tag d'histicidines	His	Clontech
pCMV-HA	Kanamicina	Genera fusions amb un tag hemaglutinina	HA	Clontech
pGL3	Ampicil·lina	Vector reporter (luciferasa)		Promega
pMDA-F2	Ampicil·lina	Té el promotor de la MLC-1		Fátima Bosch
pEGFP	Kanamicina	Genera fusions amb GFP		Clontech

ANNEX 2. Vectors reporter usats

Nom	Respon a	Reporter	Origen
TRE TK CAT	TR	CAT	Horacio Moreno
TRE luc	TR	luciferasa	Ana Aranda
pBLCAT2-GRE	GR	CAT	Carme Caelles
GRE luc	GR	luciferasa	Carme Caelles
PPARE pBL CAT 2	PPAR	CAT	Diego Haro
PPARE-TK-luc	PPAR	luciferasa	Diego Haro
ERE (3X)-TK-luc	ER	luciferasa	Maria Vivanco
VDRE (4X) luc	VDR	luciferasa	Ana Aranda
pG13 luc	p53	luciferasa	Manuela Sanchez
pG2L-M4-luc	C-myc	luciferasa	Javier Leon
pFR luc	Gal4	luciferasa	Stratagene
pG5 luc	Gal4	luciferasa	Promega



ANNEX 3. Construccions usades per sobreexpressió (cedides)				
Nom	Vector	Expressa...	Característica especial	origen
mDOR	pCDNA3	DOR de ratolí		Bernhard Baumgartner
mDOR Cmyc		DOR de ratolí	Tag Myc	Bernhard Baumgartner
mDOR curt	pCDNA3	DOR de ratolí (forma curta d'splicing)		Bernhard Baumgartner
GFP-DOR	pEGFP	DOR de ratolí unit a GFP per N-terminal	Fusió amb GFP	Bernhard Baumgartner
CBP	pRSV	CBP		Marian Martinez Balbàs
GFP	pEGFP	eGFP		Clontech
hGR	pSB	GR humà		Carme Caelles
rGR	pCDNA3	GR de rata		Carme Caelles
rGR C656G	pCDNA3	GR de rata	mutació C656G	Daryl K. Granner
rGR C656G E773A	pCDNA3	GR de rata	mutació C656G i E773A	Daryl K. Granner
PPARY	pSVSPORT 1	PPARY humà		Diego Haro
TRα	pMT2	TRα		Horacio Moreno
ERα	pCDNA3	ERα humà		Ana Aranda
VDR	pSG5	VDR humà		Ana Aranda
p300	pCMV	p300	HA	Marian Martinez Balbàs
Tip60	pRC/CMV	Tip60	HA	Marian Martinez Balbàs
pCAF	pGEX-4T2	pCAF	GST	Marian Martinez Balbàs
CBP	pRSV	CBP	HA	Marian Martinez Balbàs
GCN5	pRSet	GCN5		Marian Martinez Balbàs
Src-1	pCDNA3	Src-1		Francesc Vilarroya
C-myc	pCEFL	C-myc		Javier Leon
p53	pCMV	p53		Manuela Sanchez
pM53-VP16	pM53-VP16	Fusió p53-VP16		Clontech
VDUP1	pCDNA3	VDUP1		Meritxell Orpinell
Renilla	pRL-CMV	Luciferasa de renilla		Promega

## ANNEX 4. Construccions usades per sobreexpressió (generades en aquesta tesi)

Nom	Vector	Expressa...	Característica especial	Construcció	Encebadors
mDOR LXXAA	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació L99A i L100A	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: CCGGTGGAGGAGCGCCATTGAGCATGCCAGC Rev: GCTGGGATGCTCAATGGCGCGTCTCCAGCGG
mDOR AXXAA	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació de la caixa LXXLL a AXXXA	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR LXXAA	Fwd: CAGAGCAATCGGGGGGAGGACGCGCCATTG Rev: CAATGGCGGCTCTCCGGCGGATTCGTCTG
mDOR S7A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S7A	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: CCGCGCCTTCACCGCGCTTTTCTTCAACACCC Rev: GGGGTGTGAAGAAAAGGGCGTGAAGCGCTGG
mDOR S93A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S93A	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: CCGCGCCTTCACCGCGCTTTTCTTCAACACCC Rev: GGTCTCCAGGGGATTCGGCTGGAAGCGGCG
mDOR S27A, S65A, S136A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutacions S27A, S65A, S136A	Mutagènesi triple sobre mDOR	Fwd1: CCGGGGCGCTTTGCTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev1: CCACCTTCATCTCTCCAGCACAAAGCGCCCGCGG Fwd2: CCAACCCGCGCCCGCTTGTATGATGATGAG Rev2: CTCATCATCAAGCGCGCGCGCGGTGG Fwd3: CCTGATCAGGACCTCGCCGCGGATGAGAGCTGG Rev3: GCCAGCTCTCCATCGCGGAGGCTCTGATCAGG
mDOR K166R, K188R, K205R	pCDNA3	DOR de ratolí	mutacions K166R, K188R, K205R	Mutagènesi triple sobre mDOR	Fwd1: CCGCGCGCGGACCCAGCGGCGAGCTTC Rev1: GAAGCTGCCCTGGTGGCGCGCGCGG Fwd2: GCCACACATTGAGTGTAGAGTGTGCAACCGC Rev2: CCGGTGCAACAGCTAGCACTCAATGTGTGGC Fwd3: GTGCTGTGGAGAGGGGCTGCCCCAGGTGGC Rev3: CGCACCTGGCCAGCGCTCTCCAGGACGAC
mDOR 1-163	pCDNA3	DOR de ratolí (fragment 1 a 164)	mutació L165stop	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: CCGTCCAGCTGTGCTGTAGGAGAAGGCTGGCC Rev: GGCCAGCTTCTCTACAGACAGACTCGAGCG
mDOR L36A L40A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutacions L36A i L40A	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: GGATGGCTGGCCATCATCGACGGCACAGACAGC Rev: GCTGTCTGTGCTGCTGATGATGGCCAGCCATCC
mDOR NES1-A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutacions L36A, 137A, 138A i L40A	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR L36A L40A	Fwd: GGATGGCTGGCCAGCGCGCGCGCGG Rev: CCTGTGCTGGCGCGCCAGCGCTCC
hDOR	pCDNA3	DOR humà		Amplificació per PCR i clonació per dianes Hind III i Bam HI	Fwd: TATTAAGCTTATGTTCCAGCGCTCTCC Rev: GGGGAGGGGCAACAAC
hDOR L100A	pCDNA3	DOR humà	mutació L100A	Mutagènesi sobre pCDNA3-hDOR	Fwd: GTCCCTGGAGGAGCGCCCTCATCGAGACGCC Rev: GGGTGTGCTGATGAGGCGCTCTCCAGGGGAC
hDOR S185A	pCDNA3	DOR humà	mutació S185A	Mutagènesi sobre pCDNA3-hDOR	Fwd: GCGCACGCGCTGGCCGCCAAGCGGTGC Rev: GCACGCGCTGGCGCGCAGCGCGTGGCGC
hDOR S198A	pCDNA3	DOR humà	mutació S198A	Mutagènesi sobre pCDNA3-hDOR	Fwd: CCGAGCGCGGAGCGCGCTCCGCGCGGTCC Rev: GGAACGCGCGGCGCGCTCCGCGGCTCGG
GFP-DOR 1-111	pEGFP	DOR de ratolí (fragment 1-111) unit a GFP per N-terminal	Fusió amb GFP	Mutagènesi sobre GFP-DOR	Fwd: GTCCCTTTATGTCACCTGAGCACCATAGTGTGG Rev: CCAGCACTATGGTGTCTTCAAGGTGACATAAAGGAC
GFP-DOR 83-221	pEGFP	DOR de ratolí (fragment 83-221) unit a GFP per N-terminal	Fusió amb GFP	Subclonació des de pCDNA3-DOR per dianes Apa I i Xba I	
GFP-DOR RRAA	pEGFP	DOR de ratolí unit a GFP per N-terminal	Mutació de la possible NLS	Mutagènesi sobre GFP-DOR	Fwd: GGAGAGCGGTTCCGCGCGCCCGCCAGCACAG Rev: CTGGTGTGGCGCGCCCGAACGGCTCTCC
Gal4 DBD	pCDNA3	DBD de Gal4		Subclonació des de pGBKT7 per diana Hind III	
Gal4-DOR 1-220	pCDNA3	DOR humà unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 1-220 per diana Hind III	
Gal4-DOR 1-120	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 120) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 1-120 per diana Hind III	
Gal4-DOR 120-220	pCDNA3	DOR humà (fragment 120 a 220) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 120-220 per diana Hind III	
Gal4-DOR 1-76	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 76) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigitada sobre pCDNA3-Gal4-DOR 1-220 (A77Stop)	Fwd: GTTTGTTACCCCTCCCTAGTGTTTGGATCCGAG Rev: CTCGATCCAAAACACTAGGGAGGGGTAACAAC
Gal4-DOR 1-97	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 97) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigitada sobre pCDNA3-Gal4-DOR 1-220 (D98Stop)	Fwd: AGACAGTCCCTGGAGTAGCGGATCTCGA Rev: TCGAGTCCCTACTCCAGGGGACTGCTCT
Gal4-DOR 1-111	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 111) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigitada sobre pCDNA3-Gal4-DOR 1-220 (G112Stop)	Fwd: TGTCCGTTTACCTGACCTAGGATCCATAG Rev: CTATGGATCCCTAGTGTGACGTAAACGGACA
Gal4-DOR 17-76	pCDNA3	DOR humà (fragment 17 a 76) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 17-76 per diana Hind III	

ANNEX 4. Construccions usades per sobreexpressió (generades en aquesta tesi) (continuació)						
Nom	Vector	Expressa...	Característica especial	Construcció	Encebadors	
Gai4-DOR 31-76	pCDNA3	DOR humà (fragment 31 a 76) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 31-76 per diana Hind III		
Gai4-DOR 31-111	pCDNA3	DOR humà (fragment 31 a 111) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 31-111 per diana Hind III		
Gai4-DOR 1-43	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 43) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-DOR 1-220 (Y44Stop)	Fwd: CTGCCGACAGCTGAGGGGCTCCACCCAG Rev: CTGGTGGAGCGCTCAGCTGTCCGGCAG	
Gai4-DOR 1-61	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 61) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-DOR 1-220 (P62Stop)	Fwd: GGCGCCGCTCCCTGAGCCGCTCTTTGATG Rev: CATCAAGGAGGCGCTCACGAGGGGCGGCGCG	
Gai4-DOR 44-111	pCDNA3	DOR humà (fragment 44 a 111) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 44-111 per diana Hind III		
Gai4-DOR 62-111	pCDNA3	DOR humà (fragment 62 a 111) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-DOR 62-111 per diana Hind III		
Gai4-DOR 1-220 L100A	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 220) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD; mutació L100A	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-DOR 1-220 (L100A)	Fwd: GTCCCTGGAGAGCGCCCTCATCGAGCACCC Rev: GGGTGTCTGATGAGGGGGTCTCCAGGGGAG	
Gai4-DOR 1-120 L100A	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 120) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD; mutació L100A	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-DOR 1-120 (L100A)	Fwd: GTCCCTGGAGAGCGCCCTCATCGAGCACCC Rev: GGGTGTCTGATGAGGGGGTCTCCAGGGGAG	
Gai4-DOR 77-120 L100A	pCDNA3	DOR humà (fragment 77 a 120) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD; mutació L100A	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-DOR 77-120 (L100A)	Fwd: GTCCCTGGAGAGCGCCCTCATCGAGCACCC Rev: GGGTGTCTGATGAGGGGGTCTCCAGGGGAG	
Gai4-DOR 1-111 L100A	pCDNA3	DOR humà (fragment 1 a 111) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD; mutació L100A	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-DOR 1-111 (L100A)	Fwd: GTCCCTGGAGAGCGCCCTCATCGAGCACCC Rev: GGGTGTCTGATGAGGGGGTCTCCAGGGGAG	
Gai4-DOR 31-111 L100A	pCDNA3	DOR humà (fragment 31 a 111) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD; mutació L100A	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-DOR 31-111 (L100A)	Fwd: GTCCCTGGAGAGCGCCCTCATCGAGCACCC Rev: GGGTGTCTGATGAGGGGGTCTCCAGGGGAG	
Gai4-ciona	pCDNA3	DOR de ciona intestinalis (BW054874) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-ciona per dianes Hind III i Eco RI		
Gai4-ciona 1-98	pCDNA3	DOR de ciona intestinalis (fragment 1 a 98) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-ciona (E99SStop)	Fwd: GTTCGTGAAGCCAGCATAAACCGTCAAGAAGACC Rev: GGTTCCTTGACGGTTATGCTGGCTTACAGAAC	
Gai4-oncorthynchus	pCDNA3	DOR de oncorthynchus mykiss (CA354808) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-oncorthynchus per dianes Hind III i Eco RI		
Gai4-oncorthynchus 1-70	pCDNA3	DOR de oncorthynchus mykiss (fragment 1 a 70) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-oncorthynchus (R71Sstop)	Fwd: GTATGTAGACCAGATCTGACACCAGCTCAGGG Rev: CGCTAGCTGTGTCAAGATCTGGTCTACATACTAC	
Gai4-salmo	pCDNA3	DOR de salmo trutta (BG935547) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-salmo per dianes Hind III i Eco RI		
Gai4-salmo 1-70	pCDNA3	DOR de salmo trutta (fragment 1 a 70) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-salmo (R71Sstop)	Fwd: CTGTATTACAGATCTGACACCCAGCCAGCGATG Rev: CATCGGCTGTGGTGTCAAGATCTGGTATACAG	
Gai4-mDOR	pCDNA3	DOR de ratolí unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Amplificació per PCR i clonació per dianes Eco RI i Eco RV	Fwd: CCGCGGAATTCATGTTCCAGCGGTTTCCACCAG Rev: CTAGTAGTGTGAACCTGGCGTGGCAGC	
Gai4-mDOR 1-111	pCDNA3	DOR de ratolí (fragment 1-120) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-mDOR (G112Sstop)	Fwd: GTCCGTTTATGTCACCTGAGCAGCATATAGTCTGG Rev: CCAGACATATGGTGTCTCAGGTGACATTAACGGAC	
Gai4-mDOR L36A L40A	pCDNA3	DOR de ratolí unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD; mutacions L36A L40A	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-mDOR (L36A L40A)	Fwd: GGATGGCTGGCGCATCTCGACGACAGGACAGC Rev: GCTGTCTCTGTGCTCGATGATGGCCAGCCATCC	
Gai4-mDOR 1-111 L36A L40A	pCDNA3	DOR de ratolí (fragment 1-120) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD; mutacions L36A L40A	Mutagènesi dirigida sobre pCDNA3-Gai4-mDOR 1-111 (L36A L40A)	Fwd: GGATGGCTGGCGCATCTCGACGACAGGACAGC Rev: GCTGTCTCTGTGCTCGATGATGGCCAGCCATCC	
Gai4-xenopus	pCDNA3	DOR de xenopus laevis unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-xenopus per dianes Hind III i Eco RI		
Gai4-xenopus 1-126	pCDNA3	DOR de xenopus laevis (fragment 1 a 126) unit al DBD de Gai4	Fusió amb Gal4 DBD	Subclonació des de pGBKT7-xenopus 1-126 per dianes Hind III i Eco RI		
pMDF2-mDOR	pMDF2	DOR de ratolí	Promotor MLC1 (expressió en múscul esquelètic)	Digestió de pCDNA3-mDOR amb Eco RI i Nsi I i clonació a pMDF2 per Eco RI i Pst I (Nsi I i Pst I generen extrems compatibles)		

ANNEX 5. Construccions usades per sobreexpressió (generades en aquesta tesi, que no apareixen en aquesta memòria)

Nom	Vector	Expressa...	Característica especial	Construcció	Encabadors
mDOR LXXAA	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació L99A i L100A	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: CCGCTGGAGGAGGCGCCCATTTGAGCATCCGAGC Rev: GCTGGGATGCTCAATAGCGGCGTCTCCAGCGG
mDOR 1-203	pCDNA3	DOR de ratolí (fragment 1 a 204)	mutació P205stop	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: GCGGTTCGGCCGGTAGACACACACAGGGGAGC Rev: GCTGGCCCTGGTCTTCTACCGCGCGGAGAGGCG
mDOR RRAA	pCDNA3	DOR de ratolí	mutacions R202A R203A	Mutagènesi sobre pCDNA3-mDOR	Fwd: GGAGAGCGCTTGGCGCGGCGCCCAAGCACCAG Rev: CTGAGTGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
hDOR L100A	pCDNA3	DOR humà	mutació L100A	Mutagènesi sobre pCDNA3-hDOR	Fwd: GTCCCTGGAGAGCGCCCTCATCGAGCACCC Rev: GGTCTCGATGATGAGGCGCTCTCCAGGGGAC
hDOR S203A	pCDNA3	DOR humà	mutació S203A	Mutagènesi sobre pCDNA3-hDOR	Fwd: GTCCCTGGAGAGCGCCCTCATCGAGCACCC Rev: GGTCTCGATGATGAGGCGCTCTCCAGGGGAC
Gal4-DOR 17-76	pGBKT7	DOR humà (fragment 17 a 76) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR sobre Gal4-DOR 1-76 i clonació per dianes Nde I i Not I	Fwd: CTCCCATATGTAAGACCCCGCATTCGC Rev: GGTATGCCCGCCGATTTTGAAGC
Gal4-DOR 31-76	pGBKT7	DOR humà (fragment 31 a 76) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR sobre Gal4-DOR 1-76 i clonació per dianes Nde I i Not I	Fwd: GTTTCATATGCGAAGTGGCGCGCTGGCTC Rev: GCTAGGCGCCCTGGCAAGTGTGA
Gal4-DOR 31-111	pGBKT7	DOR humà (fragment 31 a 111) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR sobre Gal4-DOR 1-111 i clonació per dianes Nde I i Not I	Fwd: GTTTCATATGCGAAGTGGCGCGCTGGCTC Rev: GCTAGGCGCCCTGGCAAGTGTGA
Gal4-DOR 44-111	pGBKT7	DOR humà (fragment 44 a 111) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR sobre Gal4-DOR 1-111 i clonació per dianes Nde I i Not I	Fwd: CDTACATATGTCGGCGCCCTCCCTGAT Rev: GGATGCGCCCGATTTTGAAGC
Gal4-DOR 62-111	pGBKT7	DOR humà (fragment 62 a 111) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR sobre Gal4-DOR 1-111 i clonació per dianes Nde I i Not I	Fwd: ACATCATATGTAAGCGCGCTCCACCAG Rev: GCTAGGCGCCCTGGCAAGTGTGA
Gal4-ciona	pGBKT7	DOR de ciona intestinalis (BW054874) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR i clonació per dianes Nde I i Eco RI	Fwd: CAAACATATGCTTAACTACT Rev: GAAGAATCTTAAACCCCTCTTCCGGG
Gal4-oncorthynchus	pGBKT7	DOR de oncorthynchus mykiss (CA354808) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR i clonació per dianes Nde I i Eco RI	Fwd: TATACCATATGATGGAAAGATA Rev: GABAATCTGATGTACAGACGCTGGC
Gal4-salmo	pGBKT7	DOR de salmo reio (EG935547) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR i clonació per dianes Nde I i Eco RI	Fwd: TATACCATATGATGGAAAGATA Rev: ATGGGAATCTAGTAGACACTCAAG
Gal4-xenopus	pGBKT7	DOR de xenopus laevis unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR i clonació per dianes Nde I i Eco RI	Fwd: CTCCACATATGCTCCAGCG Rev: TTGSGAATCTCACTGCTGGTTC
Gal4-xenopus 1-126	pGBKT7	DOR de xenopus laevis (fragment 1 a 126) unit al DBD de Gal4	Fusió amb Gal4 DBD, per expressió a llevats	Amplificació per PCR i clonació per dianes Nde I i Eco RI	Fwd: CTCTCCACATATGTCACCGG Rev: ACCGAATCTCCCTTAGGTAATAG
pSFB-EGFP	pSFB-EGFP	DOR de ratolí	Vector per generar retrovirus	Amplificació per PCR i clonació per dianes Bam HI i Eco RI	Fwd: GCTTGAATCTGGGAGGTCGTGAGTAG Rev: GGGGGGAGGGGCAACCAAC
pIRES-EGFP	pIRES-EGFP	DOR de ratolí	Vector amb casset d'expressió bicistronic per DOR i GFP	Clonació per diana Eco RI	
GFP-DOR S93A	pCDNA3	DOR de ratolí fusionat a GFP	Fusió amb GFP; mutació S93A	Mutagènesi sobre GFP-DOR	Fwd: GCGCGCTCCAGGCGCAATCCGCTGGAGAAC Rev: GGTCTCCAGGCGAATGGCTGGAGGGGGG
GFP-DOR L36A L40A	pCDNA3	DOR de ratolí fusionat a GFP	Fusió amb GFP; mutacions L36A i L40A	Mutagènesi sobre GFP-DOR	Fwd: GATGGCTGGCCATCATCGACGACGACAGC Rev: GCTGCTGTGCTGGTGGATGGCCGACGCTCC
DOR S7A S93A	pCDNA3	DOR de ratolí	Mutació S93A i S7A	Mutagènesi sobre DOR S93A	Fwd: CCAAGCGCTCCAGCGGCTTTCACACCC Rev: GGGGTGTTGAAGAAAAGGGGTGAAGCGCTGG
mDOR S27A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S27A	Mutagènesi triple sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTTCGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
mDOR S65A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S65A	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCAGCGCGCGCGCTTGATGATGAG Rev: CTGATCATAGACCTGCCATGAGAGGTGG
mDOR S136A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S136A	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTGTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
mDOR S27A S65A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S27A S65A	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTGTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
mDOR S65A S136A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S65A S136A	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTGTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
mDOR S27A S136A	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació S27A S136A	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTGTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
mDOR K166R	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació K166R	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTGTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
mDOR K188R	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació K188R	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTGTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
mDOR K205R	pCDNA3	DOR de ratolí	mutació K205R	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: CCGGCGGCGCTTGTGCTGAGGAGGATGAAGTGG Rev: CCACCTTCATCTCCCTCAGCACAAAGGCCCGG
pCDNA4-HisMax-mDOR	pCDNA4-HisMax	DOR de ratolí	Tag His	Mutagènesi sobre mDOR	Fwd: GTGCTGTGGAGAGGGGCTGGCCAGGTGGC Rev: GGACCTGCGCAGCCCTCCAGCAGGAC
pCDNA4-HisMax-mDOR 3KR	pCDNA4-HisMax	DOR de ratolí	Tag His; mutacions K166R, K188R, K205R	Mutagènesi sobre pCDNA4-HisMax-mDOR	Fwd: GCGCGCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCTTC Rev: GAAAGTCCCGCTGGTGGCGGCGGCGG
K166R	pCDNA4-HisMax	DOR de ratolí	Tag His; mutació K166R	Mutagènesi sobre pCDNA4-HisMax-mDOR	Fwd: GCGCGCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCTTC Rev: GAAAGTCCCGCTGGTGGCGGCGGCGG
K188R	pCDNA4-HisMax	DOR de ratolí	Tag His; mutació K188R	Mutagènesi sobre pCDNA4-HisMax-mDOR	Fwd: GCGCGCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCTTC Rev: GAAAGTCCCGCTGGTGGCGGCGGCGG
K205R	pCDNA4-HisMax	DOR de ratolí	Tag His; mutació K205R	Mutagènesi sobre pCDNA4-HisMax-mDOR	Fwd: GCGCGCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCTTC Rev: GAAAGTCCCGCTGGTGGCGGCGGCGG

ANNEX 6. Encebadors usats per seqüenciació		
Norm	Seqüència	Ús
Fwd1	AGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTA	seqüenciar inserts donats a pCDNA3.1 (forward)
Fwd2	AATGGCGGTGGATAGCGGTTTGAC	seqüenciar inserts donats a pCDNA3.1 (forward)
DOR1_FOR1	GATGGATGAGAGCTGGTTTGT	primer intern per seqüenciar hDOR i mDOR (forward)
DOR1_FOR2	GCTGTGCTGCTGGAGAAGG	primer intern per seqüenciar hDOR i mDOR (forward)
DOR1_REV1	CGGTGACATAACCGGACAT	primer intern per seqüenciar hDOR i mDOR (reverse)
DOR1_REV2	GCGCTGGCACGGCTGGTAAAT	primer intern per seqüenciar hDOR i mDOR (reverse)
Retro2r	GGGGGAGGGGCAACAAC	seqüenciar inserts donats a pCDNA3.1 (reverse)
hDORf	TATTAAGCTTATGTTCCAGCGCCTCTCC	primer intern per seqüenciar hDOR (forward)
luc_rev	GGCGCAACTGCAACTCCGATAA	primer intern a ORF luciferasa, reverse, per seqüenciar promotors de vectors reporter amb luciferasa
T7	TAATACGACTCACATATAGGG	seqüenciar inserts clonats a pCDNA3.1 i altres vectors (forward)
SP6	TAGAAGGCACAGTCGAGG	seqüenciar inserts clonats a pCDNA3.1 i altres vectors (reverse)
trans1f	CTCTCCACCCGGCCCTCCTTGATG	genotipar els ratolins transgènics
trans1r	TGGCGCTGGCACGGCTGGTAAATA	genotipar els ratolins transgènics
trans2f	CTGTCCGGGGCCCTTGTCTCTGA	genotipar els ratolins transgènics
trans2r	GGCGTGGCACGGCTGGTAAATAA	genotipar els ratolins transgènics

## ANNEX 7. Anticossos

Anticossos primaris						
Reconeix	espècie	reactivitat	ús	dil·lució	origen	
DOR	conill	humà, ratolí, rata	Western Blot Immunofluorescència	1/500 1/150	Generat al nostre laboratori	
$\beta$ -actina	ratolí	humà, ratolí, rata	Western Blot	1/1000	Sigma	
PML	ratolí	humà	Immunofluorescència	1/100	Santa Cruz	
Tubulina	ratolí	humà, ratolí, rata	Immunofluorescència	1/1000	BD Biosciences	
BiP/GRP78	ratolí	humà, ratolí, rata	Immunofluorescència	1/50	BD Biosciences	
EEA1	ratolí	humà, ratolí, rata	Immunofluorescència	1/100	BD Biosciences	
Cox-1	ratolí	humà, ratolí, rata	Immunofluorescència	1/100	Molecular probes	
GM130	ratolí	humà, ratolí, rata	Immunofluorescència	1/50	BD Biosciences	
Lamp-1	rata	humà, ratolí	Immunofluorescència	1/100	BD Biosciences	
SERCA-1	ratolí	ratolí, rata	Immunofluorescència	1/50	Santa Cruz	
GW182	ratolí	humà, ratolí	Immunofluorescència	1/100	abcam	
Anticossos secundaris per Western Blot						
Anticòs	espècie	Reactivitat	detecció	dil·lució	origen	
Anti-Mouse	cabra	ratolí	ECL reagent (peroxidasa)	1/25000	Jackson	
Anti-Rabbit	cabra	conill	ECL reagent (peroxidasa)	1/25000	Jackson	
Anticossos secundaris fluorescents i tincions fluorescents						
Anticòs	Reactivitat	$\lambda$ absorció	$\lambda$ emissió	Làser òptim	dil·lució	origen
Alexa 568	conill	578	503	546	1/250	Molecular probes
Oregon Green	ratolí	496	524	488	1/250	Molecular probes
Hoescht	DNA	343	483	UV	1/2000	Molecular probes

ANNEX 8. Productes químics usats en tractaments cel·lulars

Nom	Ús	Dissolt en	Emmagatzemament	Concentració usada	Temps	Proveïdor
Staurosporina	Inhibidor proteïna cinases	DMSO	-20°C, protegit de la llum	1-10 µM	1h	MBL
Cicloheximida	Inhibidor traducció proteica	DMSO	4°C, protegit de la llum	100 µg/ml	3-9h	Calbiochem
MG-132	Inhibidor Proteasoma	Etanol	-20°C	20µM	1h	Calbiochem
Nicotinamida (NAM)	Inhibidor SIRT1	H <sub>2</sub> O	-20°C	10 mM	1h	SIGMA
T3	liligand TRα	NaOH 1N	-20°C, protegit de la llum	100 nM	16-18h	SIGMA
Dexametasona	liligand GRα	Etanol	-20°C, protegit de la llum	1 µM	16-18h	Calbiochem
Rosiglitazona	liligand PPARγ	H <sub>2</sub> O	-20°C	100 nM	16-18h	Smithkline Beecham
17-β-Estradiol	liligand ERα	Etanol	-20°C	10 nM	16-18h	SIGMA
1,25-dihidroxi-vitamina D <sub>3</sub>	liligand VDR	Etanol	-80°C	10 nM	16-18h	Calbiochem
BADG	Inhibidor O-β-gluconoacetilació	Etanol	-20°C	0,1 mM	16-18h	SIGMA