

Tesi doctoral presentada per En/Na

**Marta PUIGMULÉ RAURICH**

amb el títol

**"Caracterització dels sistemes renals de ratolí i humà  
(PCT3 I HK-2). Mecanismes moleculars implicats en la  
nefrotoxicitat produïda per la CsA en el túbul proximal  
renal"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 29 de maig de 2008

Facultat de Biologia  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



## MÈTODES



# 1. PURIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

## 1.1. EXTRACCIÓ D'RNA TOTAL

### 1.1.1. Extracció d'RNA amb el *Kit RNeasy* de QIAGEN

Durant aquest treball experimental, l'extracció d'RNA s'ha portat a terme utilitzant el *Kit* d'extracció d'RNA de la casa comercial QIAGEN. Es basa en l'ús de columnes cromatogràfiques d'afinitat que eviten la manipulació de substàncies potencialment tòxiques, com el fenol i el cloroform. Aquest *Kit* suposa un estalvi important de temps i permet el processament d'un nombre més elevat de mostres mantenint la reproductibilitat. En l'extracció d'RNA de cèl·lules es parteix d'una placa de 6 cm de diàmetre en què al principi de l'experiment s'hi sembren  $6,6 \times 10^5$  cèl·lules i es segueixen les recomanacions subministrades pel fabricant. La qualitat i puresa d'aquest RNA són suficients per utilitzar-lo en aplicacions com *Northern-blot*, RT-PCR i qRT-PCR.

## 1.2. PURIFICACIÓ DE DNA PASMÍDIC

### 1.2.1. Purificació a petita escala de DNA plasmídic (*Miniprep*)

Per a la obtenció de DNA plasmídic a partir de cultiu bacterià d'*E. coli*, s'ha utilitzat el *Kit* comercial *Wizard® plus SV Minipreps Purification System* de PROMEGA. Aquest *Kit* es basa en el mètode de lisi alcalina i en l'adsorció del DNA en una resina especial. A partir de 5 ml de cultiu s'obté un rendiment de 15-20 µg de DNA de prou puresa i qualitat per ser utilitzat en digestions enzimàtiques i en reaccions de seqüenciació automàtica. S'han seguit els passos indicats pel fabricant. A continuació se'n detallen els més importants:

1. Recollida i resuspensió de cèl·lules bacterianes.
2. Lisi alcalina.
3. Neutralització i precipitació proteica i del DNA genòmic.
4. Unió del DNA plasmídic a la resina de la columna.
5. Rentats de la columna per centrifugació.
6. Elució.

### 1.2.2. Purificació a gran escala de DNA plasmídic (*Maxiprep*)

En ocasions on el requeriment de DNA plasmídic és elevat, com per exemple transfeccions, digestions preparatives entre d'altres, es procedeix a purificar el DNA recombinant de cultius d'*E. coli* de volums més elevats (400-500 ml). A tal efecte s'ha utilitzat el *Kit Nucleobond® AX-500* de MACHERY-NAGEL seguint el protocol recomanat per la casa comercial.

### 1.3. PURIFICACIÓ DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA

Els fragments de DNA resolts electroforèticament en un gel d'agarosa es poden recuperar i purificar a partir del gel per utilitzar-se en posteriors aplicacions. En primer lloc es separa electroforèticament el DNA d'interès en un gel d'agarosa-BrEt (vegeu els apartats 2.1.1 i 2.1.2 dels MÈTODES). En segon lloc es retalla la banda a recuperar amb una fulla de bisturí estèril, sota la llum U.V.. Per purificar el DNA de la banda d'agarosa retallada s'utilitza l' *Agarose gel DNA extraction kit* de ROCHE, basat en la utilització de pols de sílica que reté adsorvit el DNA en presència de sals caotrópiques. S'ha seguit el protocol recomanat pel fabricant.

### 1.4. PRECIPITACIÓ DEL DNA

La precipitació del DNA té com objectiu eliminar restes de reactius procedents per exemple de la purificació de DNA a partir de gels d'agarosa, de digestions enzimàtiques, etcètera, que poden interferir en etapes posteriors com per exemple en el procés de clonatge.

Es segueixen els següents passos:

1. Es parteix d'un volum de DNA de 50µl.  
Afegir 1/10 del volum del DNA de NaCl 4M.
2. Afegir 2.5-3 volums d'etanol absolut.
3. Afegir poliacrilamida soluble (el mateix volum que de NaCl).
4. Vortexar.
5. Deixar 10 minuts en gel.
6. Centrifugar durant 10 minuts a 14.000 rpm.
7. Eliminar el sobrenedant. Rentar el *pellet* amb etanol al 70%.
8. Vortexar suaument i centrifugar durant 5 minuts a 14.000 rpm.
9. Eliminar amb molta cura el sobrenedant i deixar assecar el *pellet*.
10. Resuspendre el *pellet* amb H<sub>2</sub>O *milli-Q*.
11. Guardar el DNA a -20°C fins a posteriors utilitzacions.

## 2. ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS

### 2.1. ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA

El material d'electroforesi utilitzat han estat principalment les cubetes tipus minigel i mitjà de les cases comercials BIO-RAD i ECOGEN i fonts d'electroforesi de les cases comercials HOFFER I BIO-RAD.

Les mostres a carregar es dilueixen 1/10 en tampó de càrrega 10×: 50% Glicerol, 0,21% de Blau de bromofenol, 0,21% de *xylene cyanol* FF i 0,2M EDTA pH 8,0.

#### 2.1.1. Electroforesi analítica

Per visualitzar el resultat de digestions de DNA plasmídic i/o altres mostres d'àcids nucleics amb caràcter diagnòstic, normalment s'han utilitzat gels petits d'agarosa (agarosa estàndard grado medio, ECOGEN) preparats en tampó TAE 1×. El percentatge d'agarosa dels gels pot oscil·lar entre 0,7 i 2,5% p/v segons la grandària dels fragments a utilitzar. El bromur d'etidi s'incorpora directa-

ment en el gel (per tal de poder-lo visualitzar en el transil·luminador) a la concentració de 0,5 µg/ml. L'electroforesi es resol a voltatges d'entre 70-115V.

### 2.1.2. Electroforesi preparativa

Quan el propòsit és purificar el DNA a partir de gel per posteriors utilitzacions s'utilitza agarosa de màxima puresa (*molecular biology grade agarose* de PROMEGA). Ens aquests casos es treballa amb dimensions i volums de càrrega més grans (50-100 µl per pou) i l'electroforesi es resol a voltatges més baixos (40-60V) i durant temps més llargs.

## 2.2. AMPLIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Permet obtenir una quantitat de DNA important a partir d'un àcid nucleic motlle (ja sigui DNA o RNA) alhora que fa possible la introducció de modificacions específiques com ara l'addició d'una diana de restricció o *tags* als extrems del DNA, mutagènesi dirigida, etcètera.

Les condicions d'amplificació depenen en gran mesura del fragment a amplificar, de les característiques dels *primers* i de l'enzim d'elecció.

### 2.2.1. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR s'ha convertit en un procediment bàsic en el laboratori de biologia molecular. Cada reacció d'amplificació s'ha d'optimitzar de manera individualitzada, així s'ha de tenir en compte, a part del disseny de cada *primer*, la temperatura d'anellament ( $T_a$ ), el número de cicles de la reacció i la concentració de  $Mg^{2+}$ .

L'elecció de la polimerasa dependrà de l'aplicació de la PCR. En la majoria de situacions s'utilitza la *EcoTaq* d'ECOGEN, mentre que aquells casos en què la fidelitat de l'amplificació ha estat important s'han escollit polimerases amb activitat correctora com la *FasStart* de ROCHE o la *Pfu turbo* de STRATAGENE.

A continuació es descriuen les condicions estàndard que s'utilitzaran com a punt de partida previ a la optimització de cada cas concret.

#### Reactius:

- Taq polimerasa amb el seu tampó corresponent
- $MgCl_2$  50 mM
- dNTP mix (dCTP, dGTP, dATP, dTTP; 10 mM)
- *primers forward* i *reverse* a 10 µM
- *eppendorfs* per PCR de paret fina
- $H_2O$  *milli-Q* estèril

**Procediment:**

1. Preparar en gel la següent reacció (V final 50 µl):

Component	Concentració final
H <sub>2</sub> O milli-Q estèril	fins al V final
DNA motlle*	X µl
10x taq buffer	1x
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,5 mM
dNTPs mix 10 mM	200 µM
<i>forward primer</i>	1 µM
<i>reverse primer</i>	1 µM
EcoTaq	1-2,5 U

\* les quantitats de DNA motlle varien en funció de si és DNA genòmic, DNA plasmídic o cDNA. En general parlem de 25-100 ng de DNA genòmic i 0,1-1 ng de DNA plasmídic.

2. Col·locar cada reacció en el termociclador i executar el programa de PCR. Condicions tipus:

1 cicle	94°C	5 min
30 cicles	94°C	30 s
	Ta <sup>#</sup>	30 s
	72°C	1min/Kb
1 cicle	72°C	5 min
1 cicle	4°C	∞

#Temperatura d'anellament sovint -5°C per sota de la T<sub>m</sub> dels primers

### 2.2.2. qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*)

La RT-PCR o transcripció inversa, permet amplificar un mRNA concret fins al cDNA de doble cadena corresponent. La tècnica consta de dues etapes, primer la transcripció inversa (RT) a partir de l'mRNA i en segon lloc l'amplificació per PCR de la cadena de cDNA sintetitzada en l'etapa anterior. El producte amplificat es detecta en un gel d'agarosa un cop acabada la reacció. És una anàlisi de punt final. La RT-PCR quantitativa o en temps real (qRT-PCR) en canvi, permet detectar i quantificar el producte generat a cada cicle d'amplificació. Aquesta quantitat de producte està directament relacionada amb la quantitat de cadenes de cDNA existents a l'inici del procés de la PCR. Per tal de detectar en temps real els productes de PCR, s'inclou a la reacció una molècula fluorescent de tal manera que un augment en la fluorescència ens indica un augment proporcional de la quantitat de DNA.

La PCR en temps real consta d'una fase exponencial on la quantitat del producte de PCR es duplica a cada cicle. No obstant, a mesura que avança la reacció es van consumint els diferents components de la reacció fins a arribar a ser limitants. A partir d'aquí, la reacció de PCR entra a la fase *plateau*. Inicialment, la fluorescència es manté a uns nivells no detectables tot i que existeix una acumulació del producte de PCR de forma exponencial. Finalment, l'acumulació de producte de la PCR produeix una senyal de fluorescència detectable. El cicle on té lloc aquest procés és el que s'anomena CT (*threshold cycle*). Aquest valor de CT depèn de la quantitat de cDNA present a l'inici de la reacció (FIGURA 2).

Durant aquest treball experimental, s'han utilitzat com a molècules fluorescentes les sondes *Taq-Man*<sup>®</sup> (APPLIEDBIOSYSTEMS). Aquestes sondes són oligonucleòtids que porten unides dos tipus de molècules: un fluorocrom a l'extrem 5' i un reductor de l'emissió o *quencher* a l'extrem 3'. Mentre la

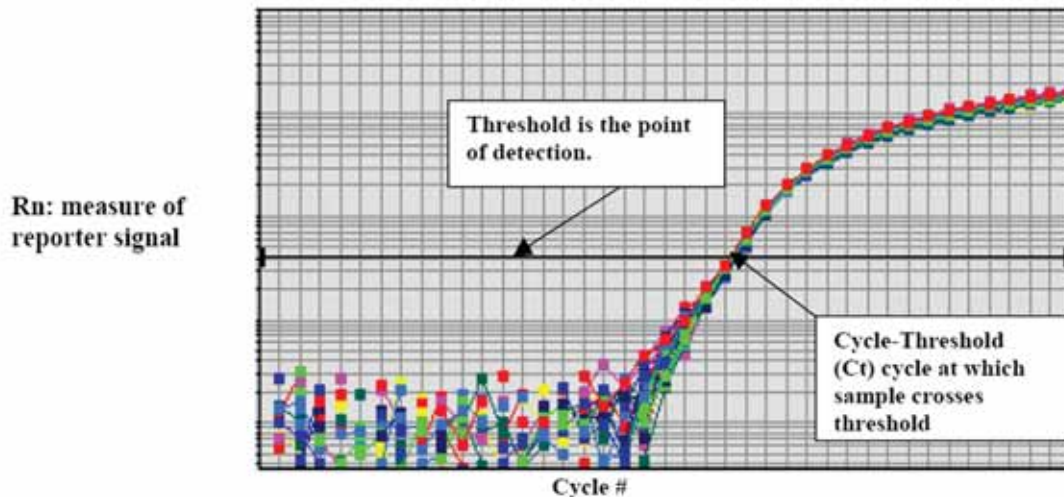


Figura 23. Model d'una corba d'amplificació de la qRT-PCR.

sonda es mostra intacte, la proximitat del *quencher* absorbeix la fluorescència emesa pel fluorocrom. Quan la Taq polimerasa arriba a l'extrem 5' allibera el fluorocrom gràcies a la seva activitat exonucleasa distanciant-lo del *quencher*, moment en el qual el fluorocrom emet fluorescència. D'aquesta manera el sistema esdevé altament específic ja que el fluorocrom només emet fluorescència quan s'amplifica la cadena d'interès.

La PCR en temps real permet tant una quantificació absoluta del nombre de còpies de cada mRNA com una quantificació relativa. En aquest treball s'ha utilitzat la quantificació relativa que es basa en el mètode de la comparació de CT. Aquesta tècnica utilitza un control endogen com a element normalitzador i es basa en el càlcul de la relació que hi ha entre el CT del gen problema i el CT del control endogen que serveix per a normalitzar la quantitat de cDNA afegit a la reacció. A més a més aquest valor es pot utilitzar per a la comparació relativa de les diferents quantitats entre les diferents mostres problemes. Per tal d'aconseguir-ho es tracta de designar una de les mostres com a calibrador. El calibrador no és res més que una mostra que serveix com a base per a comparar els resultats, és el que s'anomena valor 1 d'expressió.

La quantitat de la mostra problema normalitzada pel control endogen i relativa al calibrador, ve donada per:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

On  $\Delta CT = CT$  gen problema -  $CT$  control endogen

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$  mostra problema -  $\Delta CT$  calibrador

A continuació es descriuen el protocol seguit, en primer lloc per la transcripció inversa i en segon lloc per la PCR a temps real.



**Reactius de la transcripció inversa:**

- RNase OUT™ (INVITROGEN)
- *Random Primer* 3 µg/µl (INVITROGEN)
- dNTP Mix 10 mM
- DTT (0.1M)
- *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (INVITROGEN)
- *5x First Strand Buffer* (INVITROGEN)

**Procediment de la transcripció inversa:**

1. Preparar en gel la següent reacció (Vf=12µl):

Component	Concentració final
H <sub>2</sub> O <i>milli-Q</i> estèril	fins al V final
1 µg RNA	X µl
<i>Random Primer</i>	250 ng/µl
dNTPs mix 10 mM	50 µM

2. Escalfar 5 min a 65°C. Refredar en gel
3. Afegir a la reacció:  
4 µl *5x First Strand Buffer*

- 2 µl DTT 0.1M
- 1 µl RNase OUT

4. Barrejar bé i incubar 2 min a 25°C.
5. Afegir a la reacció 1 µl *SuperScript™ II Reverse Transcriptase*. Pipetejar.
6. 10 min a 25°C  
50 min 42°C  
15 min a 70°C
7. Congelar-ho a -20°C o procedir a la qPCR.

**Reactius de la qPCR:**

- *2x TaqMan® Universal PCR Master Mix* (APPLIED BIOSYSTEMS)
- *20x Assays on Demand™ Gene Expression Assay Mix* (APPLIED BIOSYSTEMS):  
Sonda *Taqman* Cyclophilin B (Mm00478295\_m1)  
Sonda *Taqman* β-2-microglobulina (Mm00437762\_m1)
- cDNA
- H<sub>2</sub>O *milli-Q* estèril
- Plaques de 96 pous (APPLIED BIOSYSTEMS)
- Taps per a plaques de 96 pous (APPLIED BIOSYSTEMS)

**Procediment de la transcripció inversa:**

1. Diluir el cDNA 1/10.
2. Preparar la següent reacció (Vf=20µl):

Component	Volum final (µl)
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x</i>	10
<i>Assay on Demand 20X</i> (Sonda)	1
cDNA	2
H <sub>2</sub> O <i>milli-Q</i> estèril	7

Aquests volums són per pou de placa de 96 pous

3. Centrifugar breument la placa.
4. Col·locar la placa a l'aparell de PCR quantitativa i executar la PCR:
 

1 cicle	50°C	2 min
1 cicles	95°C	10 min
50 cicles	95°C	15 s
50 cicles	60°C	1 min
1 cicle	4°C	∞

5. Anàlisis dels resultats

## 2.3. SEQÜENCIACIÓ DE DNA

Les seqüències s'han realitzat al Servei de Seqüenciació Automàtica de la Unitat Científico-Tècnica de Suport (UCTS) de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (IR- HUVH) mitjançant l'analitzador genètic ABI PRISM 310 d'APPLIED BIOSYSTEMS. Per a les reaccions de seqüència s'ha utilitzat *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* de PEKIN ELMER/ APPLIED BIOSYSTEMS. Les condicions de la reacció de seqüència s'han optimitzat pel PEKIN ELMER *GeneAmp PCR System 2400*.

### Reactius:

- H<sub>2</sub>O *milli-Q* estèril
- *BigDye* (APPLIED BIOSYSTEMS)
- TSR *polymer* (APPLIED BIOSYSTEMS)
- *Primer* específic a 5 µM
- Etanol

### Procediment:

1. Preparar la reacció de seqüència (Vf = 20 µl)

Component	Quantitat
H <sub>2</sub> O <i>milli-Q</i> estèril	fins a 20 µl
DNA motlle *	X µl
<i>Primer</i> 5 µM	1 µl
<i>BigDye</i>	5 µl

\* Producte de PCR 200 ng, plasmidi 1 µg

2. Programar i executar el següent programa en el termociclador.

1 cicle	96°C	2 min
25 cicles	96°C	10 s
	Ta <sup>#</sup>	5 s
	60°C	4 min
1 cicle	4°C	∞

<sup>#</sup> Temperatura d'anellament, sovint 5°C per sota la T<sub>m</sub> dels primers

3. Precipitació de les seqüències, afegint a la reacció:

16 µl d'H<sub>2</sub>O *milli-Q*

64 µl d'etanol al 95%

4. Vortexar i deixar precipitant 15 min a temperatura ambient.

5. Centrifugar 20 min a 14.000 rpm.

6. Rentar el *pellet* amb 250 µl d'etanol al 70%.

7. Assecar.

8. Resuspendre el *pellet* amb 15 µl de TSR.

9. Desnaturalitzar 3 min a 94°C.

10. Centrifugar breument i clavar en gel.

11. Guardar a 4°C i a les fosques fins el moment de punxar la mostra a l'analitzador.

### 3. DNA RECOMBINANT

#### 3.1. CLONATGE DE DNA

Per tal de que l'expressió dels shRNA es doni cal en primer lloc clonar al vector mU6pro els oligonucleòtids corresponents.

S'han seguit els següents passos:

- Digestió i purificació del vector de clonatge
- Preparació de l'insert a clonar: anellament dels oligonucleòtids
- Lligació de l'insert al vector
- Transformació en bacteris competents del producte de lligació
- Identificació de les colònies recombinants

##### 3.1.1. Digestió i purificació del vector de clonatge mU6pro

Per tal de poder clonar l'oligonucleòtid corresponent cal en primer lloc eliminar el cDNA corresponent a la proteïna verda GFP que conté el vector mU6 pro.

1. Preparar la següent reacció: Vf = 20µl

Component	Concentració final
H <sub>2</sub> O milli-Q	fins a 20µl
Vector mU6pro	1µg/µl
Enzim/s de restricció*	2U/ µg DNA
Tampó 10x	1x

\* La digestió té lloc en dues etapes ja que els tampó dels respectius enzims no són compatibles. En primer lloc digerim el vector amb l'enzim de restricció *BbsI* i a continuació amb l'enzim de restricció *XbaI*.  
Subministrat amb l'enzim de restricció.

2. Incubar la reacció 1h a 37°C.

3. Comprovar per electroforesi en gel d'agarosa que la digestió ha estat completa (vegeu l'apartat 2.1.2 dels MÈTODES), purificació de la banda i precipitació del DNA (vegeu els apartats 1.3 i 1.4 dels MÈTODES) abans de digerir amb l'altre enzim de restricció.

4. Digestió amb l'altre enzim de restricció. Repetició de les etapes 1, 2 i 3.

5. Guardar la digestió a -20°C fins a la seva utilització.

##### 3.1.2. Preparació de l'insert a clonar: anellament dels oligonucleòtids

Per a l'obtenció del shRNA s'han dissenyat dos oligonucleòtids complementaris que seran els responsables d'eliminar l'expressió gènica de la proteïna d'interès (vegeu l'apartat 4.1.1 dels MATERIALS). Per obtenir el fragment de DNA de doble cadena necessari per a la lligació amb el vector, s'ha procedit a anellar els dos oligonucleòtids seguint el protocol recomanat per Turner et al., 2002 que es descriu a continuació:

1. Preparar en un *ependorf*: 5 µl d'oligonucleòtid *upper* 100 µM  
5 µl d'oligonucleòtid *lower* 100 µM  
3 µl de tampó M 10x (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 50 mM, 1 mM DTE)  
17 µl H<sub>2</sub>O milli-Q

2. Incubar a 100°C durant 3 minuts.
3. Deixar refredar a temperatura ambient.
4. Guardar la reacció a -20°C o continuar amb la lligació.

### 3.1.3. Lligació de l'insert al vector

Per a la reacció de lligació es recomana que la relació de les quantitats molars de vector (V) i insert (I) siguin de 1(V):3(I). S'ha utilitzat el *Rapid DNA Ligation Kit* de ROCHE. El protocol seguit ha estat el següent:

1. Preparar en un eppendorf: 10 µl de DNA (vector més insert) en DNA dilution buffer \*1×  
10 µl T4 DNA ligation buffer \*2×  
1 µl T4 DNA ligase\*

\*Subministrat amb el kit

2. Incubar la reacció 5 minuts a temperatura ambient.
3. Aturar la reacció a -20°C o procedir amb la transformació.

## 3.2. TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS

Els bacteris competents poden incorporar DNA exogen en un procés anomenat transformació. En aquest treball experimental, s'ha utilitzat la transformació per xoc tèrmic. El sistema utilitzat ha estat el dels bacteris One-Shot®TOP10 d'*E. coli* de la casa comercial INVITROGEN, fets competents químicament i que ofereixen una eficiència de transformació de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> cfu/µg.

### 3.2.1. Transformació per xoc tèrmic

Per a la transformació de bacteris per xoc tèrmic s'han escollit els bacteris *One-Shot*® TOP10 d'*E. coli* de la casa comercial I INVITROGEN, fets competents químicament i que ofereixen una eficiència de transformació de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> cfu/µg.

#### Procediment:

1. Descongelar en gel una alíquota de bacteris competents.
2. Afegir a la suspensió de One-Shot® TOP10 5 µl de la lligació (vegeu l'apartat 3.1.3 dels MÈTODES).
3. Incubar en gel durant 20 min.
4. Realitzar el xoc tèrmic incubant la barreja a 42°C durant 30 s.
5. Transferir ràpidament la barreja al gel.
6. Afegir 250 µl de medi SOC prèviament temperat a 37°C.
7. Incubar a 37°C amb forta agitació (225 rpm) durant 1 h.
8. Sembrar 100 – 250 µl en una placa amb medi selectiu per identificar els bacteris transformats.
9. Incubar la placa o/n a 37°C.

## 4. RNA D'INTERFERÈNCIA (RNAi)

L'RNA d'interferència, és una tècnica que permet l'eliminació total o parcial de l'expressió gènica de manera específica i a nivell posttranscripcional, mitjançant la introducció a l'interior de la cèl·lula d'una molècula d'RNA de doble cadena (*small interference RNA* – siRNA) que conté homologia amb el gen que es vol silenciar. En cèl·lules de mamífer aquestes molècules de siRNA no poden ser superiors a 25 nucleòtids ja que es desencadenen respostes no específiques com pot ser la inducció de l'interferó (Elsbashir et al., 2001).

Quan aquests siRNA són introduïts a l'interior de la cèl·lula, s'uneixen a un complex ribonucleo-proteic (*RNA-induced silencing complex*, RISC), que dirigit per l'siRNA reconeixerà l'RNA missatger homòleg al siRNA produint un tall aproximadament al mig de la regió homòloga, la qual donarà lloc a l'eliminació total o parcial de l'expressió del gen (Bernstein et al., 2001). Aquesta tècnica permet estudiar la funció del gen en sistemes cel·lulars de mamífer.

Per tal d'aconseguir l'eliminació de l'expressió de les ciclofilines A i B, s'han realitzat diverses aproximacions. En primer lloc es transfecta de forma transitòria el vector mU6pro que permet l'expressió de shRNA (*small hairpin RNA*). Els shRNA són molècules formades per 19 nucleòtids complementaris units entre sí per un loop de 3 nucleòtids i cinc T consecutives a l'extrem 3' que permeten la finalització de la transcripció. En segon lloc es transfecten de manera transitòria diverses molècules siRNA sintetitzades químicament i marcades amb Cy3. Aquestes molècules estan formades per una doble cadena d'RNA de 21 nucleòtids de llargada. Dinou d'aquests nucleòtids són complementaris entre sí, els dos nucleòtids restants són dímers d'uridina no complementaris localitzats a l'extrem 3'. En últim lloc i per tal d'aconseguir eliminar l'expressió gènica durant mesos, s'introdueix a l'interior de la cèl·lula un vector d'expressió que conté un gen de resistència a antibiòtic que permet seleccionar les cèl·lules transfectades que expressen el DNA introduït. Aquest vector permet l'expressió d'un *hairpin* d'siRNA, molècula formada per 19 nucleòtids complementaris units entre sí per un *loop* de 9 nucleòtids. A l'extrem 3' també conté un dinucleòtid lliure que hibrida amb l'RNA del gen a silenciar.

A continuació es descriuen amb més detall les aproximacions realitzades.

### 4.1. ELIMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE FORMA TRANSITÒRIA

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, l'eliminació de l'expressió gènica de forma transitòria s'ha portat a terme en primer lloc utilitzant un vector d'expressió de shRNA i a continuació transfectant siRNA sintetitzats químicament i marcats amb Cy3™.

#### 4.1.1. Vector d'expressió mU6 pro

- |  |   |
|--|---|
| 1. Disseny dels oligonucleòtids que donaran lloc al <i>hairpin</i> de siRNA. | 5.2.1 dels MÈTODES)   |
| 2. Clonatge (vegeu els apartats 3.1 i 3.2 dels MÈTODES)                      | 4. Observació de les cèl·lules transfectades al microscopi.                   |
| 3. Transfecció transitòria (vegeu l'apartat                                  | 5. Comprovació de l'eliminació de l'expressió del gen per <i>Western blot</i> |

1. Disseny dels oligonucleòtids que donaran lloc al *hairpin* de siRNA.
2. Clonatge (vegeu els apartats 3.1 i 3.2 dels MÈTODES)
3. Transfecció transitòria (vegeu l'apartat 5.2.1 dels MÈTODES)
4. Separació de les cèl·lules transfectades
5. Comprovació de l'eliminació de l'expressió del gen per *Western blot*

#### 4.1.2. siRNA-Cy3

Aquest procés s'ha portat a terme seguint les instruccions dels diferents *kits* de la casa comercial AMBION. A continuació es descriuen els passos generals per a cada procediment.

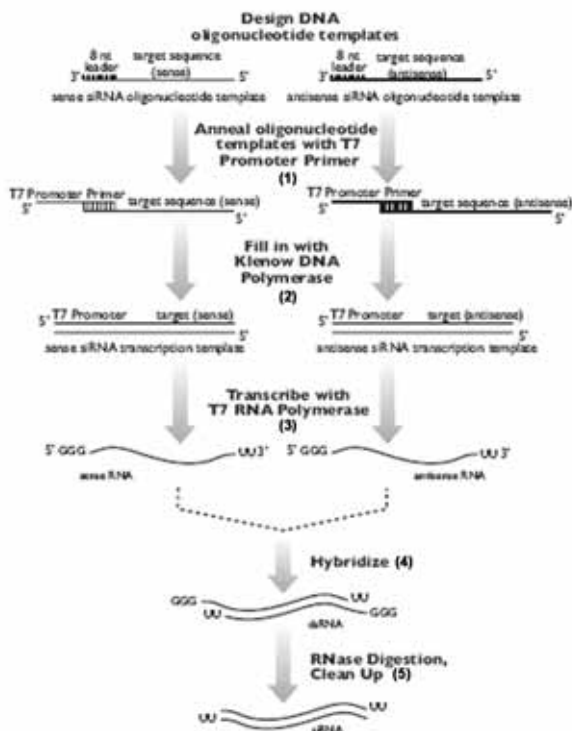
##### Reactius:

- *Silencer™ siRNA Construction Kit. Large Scale Synthesis and Purification of siRNAs* (AMBION)
- Oligonucleòtids de siRNA
- *Silencer™ siRNA Labeling Kit. For Cy™3 or FAM Labeling of siRNA* (AMBION).
- Etanol al 100%

##### Procediment:

1. Disseny dels siRNA. Per a cada gen que es vol silenciar es sintetitzen 3 siRNA (TAULA 4). Fer un BLAST per comprovar que no presenta homologia amb cap proteïna coneguda.
2. Resuspendre els oligonucleòtids de siRNA a una concentració de 100 µM amb H<sub>2</sub>O lliure de nucleases.
3. Síntesi de la doble cadena de RNA (FIGURA 24).
4. Purificació dels siRNA.
5. Quantificació dels siRNA.
6. Guardar els siRNA a -20°C fins a la seva utilització.
7. Reconstitució del reactiu de marcatge Cy™3\*.
8. Marcatge dels siRNA durant 1h a 37°C.
9. Precipitació amb etanol dels siRNA marcats.
10. Guardar els siRNA- Cy™3 a -20°C i protegits de la llum fins a la seva utilització.
11. Transfecció dels siRNA (*Silencer™ siRNA Transfection Kit. Transfection Agents and siRNA Controls*, AMBION) (vegeu l'apartat 5.2.1 dels MÈTODES).
12. Observació de les cèl·lules transfectades al microscopi.
13. Comprovació de l'eliminació de l'expressió del gen per *Western blot*.

\* Subministrat amb el Kit



**Figura 24. Esquema de la síntesi de la doble cadena de siRNA.** 1. Cada oligonucleòtid de DNA s'hibrida amb el primer del promotor de la T7. 2. Els extrems 3' dels oligonucleòtids hibridats s'allarguen amb la DNA polimerasa Klenow per formar la doble cadena de DNA que servirà de motlle per crear la doble cadena de siRNA. 3. A continuació té lloc la transcripció per acció de la T7 RNA polimerasa. 4. Tot seguit s'hibriden els RNAs per formar la doble cadena de RNA. 5. Eliminació de les seqüències leader situades a l'extrem 5 de la doble cadena d'RNA mitjançant l'acció d'una ribonucleasa específica de cadena simple i dels l'oligonucleòtids de DNA per acció d'una desoxiribonucleasa. Els dinucleòtids UU romandran al siRNA. El producte final és una doble cadena de siRNA de 21 nucleòtids amb un dímer d'uridina a l'extrem 3'.

## 4.2. ELIMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE FORMA ESTABLE

Per a l'eliminació de l'expressió gènica de forma estable s'ha utilitzat el Kit *pSilencer<sup>TM</sup> 4.1-CMV hygro. CMV- Driven siRNA Expression Vector with Hygromycin Resistance* (AMBION).

A continuació es descriuen els passos generals del procés.

### Reactius:

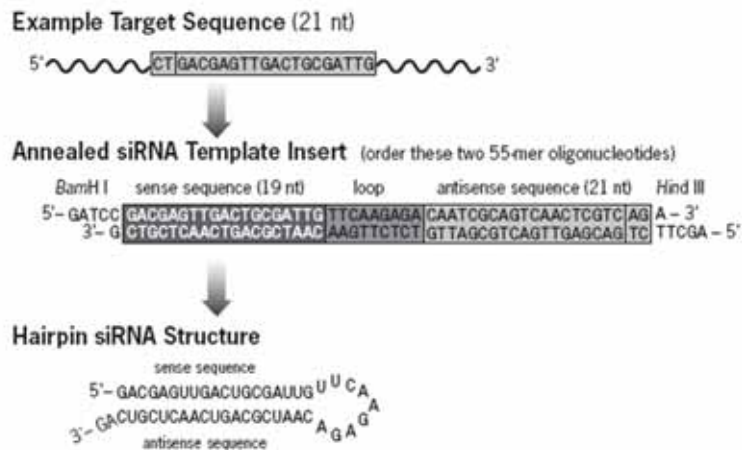
- *pSilencer<sup>TM</sup> 4.1- CMV hygro. CMV- Driven siRNA Expression Vector with Hygromycin Resistance*
- Oligonucleòtids de siRNA

### Procediment:

1. Disseny dels oligonucleòtids que donaran lloc al hairpin siRNA (TAULA 5 i FIGURA 25).
2. Resuspendre els oligonucleòtids a la concentració de 1 µg/µl.
3. Anellar els oligonucleòtids que donaran lloc al *hairpin* (vegeu l'apartat 3.1.2 dels MÈTODES\*).
4. Clonatge (vegeu l'apartat 3.1.3 dels MÈTODES\*).
5. Transformació del producte de lligació (vegeu l'apartat 3.2.1 dels MÈTODES)
6. Identificació dels clons que contenen l'insert.
7. Purificació del vector *pSilencer 4.1-CMV* per a la transfecció.
8. Transfecció (vegeu l'apartat 5.2.2 dels MÈTODES).
9. Selecció dels clons resistents a l'antibiòtic.
10. Comprovació de la reducció de l'expressió

del gen silenciats per a cada clon seleccionat per Western blot i qRT-PCR (vegeu els apartats 7.2 i 2.2.2 dels MÈTODES respectivament).

\*Durant aquest protocol s'utilitzen els tampons subministrats amb el Kit i els volums recomanats per la casa comercial.



**Figura 25.** Esquema del disseny de l'oligonucleòtid que donarà lloc al *hairpin* siRNA. A partir de l'mRNA del gen que es vol silenciar, triar seqüències de 21 nucleòtids putatives a ser dianes de l'siRNA. A continuació es dissenyen els oligonucleòtids de DNA que donaran lloc al *hairpin*. Als extrems 5' de cada oligonucleòtid s'afegeixen les dianes de restricció pels enzims *BamHI* i *HindIII* per facilitar el clonatge direccional.

## 5. CULTIUS CEL·LULARS I TRANSFECCIONS

### 5.1. CULTIUS CEL·LULARS

En aquest treball s'han utilitzat 3 línies cel·lulars renals (PCT3, PR10 i HK-2) i una línia cel·lular no renal (HeLa). Totes aquestes línies han estat mantingudes i expandides a una temperatura de 37° C en un incubador amb atmosfera humida al 5% de CO<sub>2</sub>, seguint les pràctiques estàndards i condicions d'esterilitat requerides pel treball amb cultius.

#### 5.1.1. Tripsinització

Pel manteniment de les línies cel·lulars, les cèl·lules es tripsinitzen cada 4-5 dies aproximadament depenent de la velocitat de creixement de cada línia cel·lular. És recomanable tripsinitzar quan el cultiu cel·lular assoleix una confluència entre 80-90%.

#### Reactius:

- Tripsina-EDTA (0.05% - 1/5000) (BIOLOGICAL INDUSTRIES)
- Medi de cultiu
- PBS 1× Estèril



### Procediment:

1. Temperar els reactius a 37° C.
2. Aspirar el medi de les cèl·lules amb una pipeta pasteur de vidre estèril.
3. Rentar les cèl·lules amb PBS 1x.
4. Aspirar el PBS 1x i afegir la tripsina (3ml/flascó T-25).
5. Retirar la tripsina i col·locar el flascó durant 5-10 minuts dins l'incubador fins que les cèl·lules s'hagin desenganxat.
6. Recollir les cèl·lules amb 3ml de medi de cultiu /flascó T-25 (si no es desenganxen, colpejar suament el flascó).
7. Centrifugar les cèl·lules 5 min. A 1500 rpm a 4° C.
8. Aspirar el sobrenedant i resuspendre el pellet de cèl·lules en 1 ml de medi de cultiu.
9. Sembrar les cèl·lules a un nova placa, a la dilució desitjada.

### 5.1.2. Recompte de cèl·lules

Per tal de poder sembrar la quantitat desitjada de cèl·lules, després de tripsinitzar es fa un recompte de les cèl·lules mitjançant la cambra de *Neubauer*.

### Reactius:

- Blau de Tripà (SIGMA)
- Cambra de *Neubauer*

### Procediment:

1. Preparar una dilució 1/10 les cèl·lules en blau tripà.
2. Amb 10 µl de la dilució omplir la cambra de *Neubauer* i realitzar el comptatge. Comptarem les cèl·lules viables (no tenyides) en els diferents camps.
3. Realitzar el següent càlcul:  
 $N^{\circ} \text{ cèl·lules/ml} = N^{\circ} \text{ cèl·lules promig dels 4 camps} \times \text{factor de dilució} \times 10^4$ .
4. Agafar el volum necessari de suspensió cel·lular per sembrar quantitat desitjada.

### 5.1.3. Conservació de cèl·lules

Les cèl·lules es poden conservar congelades i sense perdre la viabilitat en un medi criopreservant i amb nitrogen líquid. Ha de ser un procés lent i gradual.

### Reactius:

- Criotubs 1,5 ml
- *Freezing Container* (NALGENE)
- Dimetilsulfòxid (DMSO)

**Procediment:**

1. Tripsinitzar el cultiu cel·lular.
2. Refredar els criotubs amb 100 µl de DMSO i esperar que aquest es solidifiqui.
3. Afegir al criotub 900 µl de suspensió cel·lular, barrejar ràpidament la suspensió fins que el DMSO s'hagi liquat.
4. Col·locar els criotubs a l'interior del *freezing container*. Prèviament s'ha omplert d'isopropanol i s'ha guardat a la nevera fins a la seva utilització.
5. Col·locar el freezing container a -80° C. Aquest sistema permet que la temperatura vagi baixant gradualment sense malmetre les cèl·lules.
6. Després d'unes hores transferir les cèl·lules als tanc de N<sub>2</sub> líquid.

**5.1.4. Descongelació de cèl·lules**

A diferència del procés de conservació de les cèl·lules, aquest ha de ser un procés ràpid per no perdre viabilitat de les cèl·lules.

**Procediment:**

1. Treure les cèl·lules del N<sub>2</sub> líquid i descongelar-les en un bany de 37° C, fins que es descongelin pràcticament del tot.
2. Afegir al criotub 1 ml de medi de cultiu fred gota a gota.
3. Passar el contingut del criotub en un tub que contingui 5ml de medi de cultiu.
4. Centrifugar durant 5 min. a 1500 rpm (4°C).
5. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 1 ml de medi de cultiu .
6. Sembrar en un flascó de cultius la totalitat de les cèl·lules.

**5.2. TRANFECCIONS TRANSITÒRIA I ESTABLE**

La transfecció consisteix en la introducció de DNA plasmídic dins de cèl·lules eucariotes. Existeixen diferents mecanismes per fer-ho com per exemple la precipitació amb fosfat càlcic, la vehiculació del DNA amb vesícules lipídiques o l'electroporació. La transfecció serà transitòria quan el DNA extern romangui dins la cèl·lula 2-3 dies, mentre que serà estable quan estigui present dins la cèl·lula durant molt de temps gràcies a la pressió selectiva d'un antibiòtic.

**5.2.1. Transfecció transitòria**

Per a dur a terme la transfecció transitòria s'han utilitzat els liposomes, concretament la LIPO-FECTAMINE PLUS™ Reagent (GIBCOBRL), que és una barreja liposòmica 3:1 d'un lípid policatiónic 2,3-dioleiloxi-N-[2(spermincarboxaminado)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetat (DOSPA) i d'un lípid neutre dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). El reactiu PLUS s'acomplexa al DNA afavorint

així la unió als liposomes i augmentant l'eficiència de transfecció.

El temps en què el DNA roman a l'interior de la cèl·lula és curt (3-4 dies), a més a més el percentatge de cèl·lules transfectades, depèn de la línia cel·lular, però normalment sol ser baix. Per les cèl·lules PCT3 l'eficiència de transfecció està al voltant del 20-30%. A continuació es descriu el protocol optimitzat per a la transfecció de les cèl·lules PCT3.

#### Reactius:

- LIPOFECTAMINE Reagent (GIBCOBRL)
- Plus Reagent (GIBCOBRL)
- Medi Opti MEM® (GIBCOBRL)
- PBS 1x
- Medi de cultiu

#### Procediment:

1. El dia anterior a la transfecció, sembrar la quantitat de cèl·lules pertinents segons la mida de la placa, per tal que en el moment de la transfecció estiguin al 60% de confluència.
2. Barrejar el DNA, diluït amb Opti MEM, amb el reactiu PLUS (solució A). Incubar 15 min. a temperatura ambient.
3. Diluir la LIPOFECTAMINE amb l'Opti MEM (solució B).
4. Combinar la barreja del DNA-PLUS amb la LIPOFECTAMINE, i incubar-ho 15 min. a temperatura ambient.
5. Aspirar el medi de cultiu a les cèl·lules i rentar-les dues vegades amb PBS 1x temperat a 37°C.
6. Afegir a les cèl·lules la barreja de transfecció (TAULA 7) i incubar les cèl·lules durant 3h a l'incubador de cultius.
7. Rentar les cèl·lules dues vegades amb PBS 1x i afegir-hi el medi complet.
8. Assajar l'expressió del gen exogen 24, 48 o 72h posttransfecció.

Taula 7. Volums i quantitats de transfecció

Mida de placa	Superfície placa (cm <sup>2</sup> )	Cèl·lules a sembrar	DNA *(µg)	LIPOECTAMINE Reagent (µl)	PLUS Reagent (µl)	Volum solució A i B (µl)	Volum final de transfecció (ml)
24 pous	2	80.000	0.4 - 0.5	1	4	25	0.250
6 pous	10	250.000	2.5	4	6	100	1
60 mm	20	500.000	4 - 7	12	8	250	2.5
10 mm	56	1,5x10 <sup>6</sup>	15	30	12	750	6.5

\* És la quantitat de DNA total, tan si es transfecta 1 sol plasmidi com varis.

Per a la transfecció transitòria dels siRNA-Cy3™ s'ha seguit el protocol recomanat per la casa comercial AMBION (*Silencer™ siRNA Transfection Kit*). Aquest *Kit* proposa la utilització de dos agents per a la transfecció que presenten diferents propietats.

*siPORT Amine* és una barreja de poliamines que permet l'expansió dels siRNA a l'interior de les cèl·lules sense produir citotoxicitat.

#### Reactius:

- *siPORT Amine* (AMBION)
- siRNA
- Medi Opti MEM® (GIBCOBRL)
- PBS 1x
- Medi de cultiu

#### Procediment:

1. El dia anterior a la transfecció, sembrar la quantitat de cèl·lules pertinents segons la mida de la placa, per tal que en el moment de la transfecció estiguin al 60% de confluència.
2. Diluir el *siPORT Amine* amb l'Opti MEM (solució A). Vortexar i incubar 10-30 min a temperatura ambient.
3. Afegir l'siRNA a la solució A. Barrejar-ho bé i incubar 15-20 min a temperatura ambient.
4. Aspirar el medi de cultiu a les cèl·lules i rentar-les dues vegades amb PBS 1x temperat a 37°C.
5. Afegir a les cèl·lules la barreja de transfecció (TAULA 8) i incubar les cèl·lules durant 3h a l'incubador de cultius.
6. Rentar les cèl·lules dues vegades amb PBS 1x i afegir-hi el medi complet.
7. Determinar eficiència de transfecció mitjançant un microscopi invertit de fluorescència DM IRBE (LEICA) i assajar l'expressió del gen exogen 48 i 72 h posttransfecció.

Taula 8. Volums i quantitats de transfecció recomanats al utilitzar *siPORT Amine*

Mida de placa	Superfície placa (cm <sup>2</sup> )	Cèl·lules a sembrar	siRNA* (µl)	siPORT Amine (µl)	Volum solució A (µl)	Volum final de transfecció (µl)
96 pous	0.3	0.2-2x10 <sup>4</sup>	0.005-0.05	1-2	19	100
24pous	2	1x10 <sup>6</sup>	0.2-1.2	3	49	250
12 pous	4	0.5-2x10 <sup>6</sup>	0.25-2.5	4-6	99	500
6 pous	10	1-5x10 <sup>6</sup>	0.5-5	6-10	197	1000

\*Utilitzar una concentració final de siRNA entre 1-25 mM. En aquest treball experimental els siRNA es transfecten a les concentracions de 10 i 20 nM.

*siPORT Lipid* és una barreja de lípids que s'acomplexen amb els siRNA facilitant-ne l'entrada a l'interior de la cèl·lules. A continuació es descriuen els passos més importants.

#### Reactius:

- *siPORT Lipid* (AMBION)
- siRNA
- Medi Opti MEM® (GIBCOBRL)
- PBS 1×
- Medi de cultiu

#### Procediment:

1. El dia anterior a la transfecció, sembrar la quantitat de cèl·lules pertinents segons la mida de la placa, per tal que en el moment de la transfecció estiguin al 60% de confluència.
2. Diluir el *siPORT Lipid* amb l'Opti MEM (solució A). Vortexar i incubar 10-30 min a temperatura ambient.
3. Diluir l'siRNA amb l'Opti MEM (solució B). Vortexar i incubar 10-30 min a temperatura ambient.
4. Combinar la solució A amb la solució B. Barrejar-ho bé i incubar 15-20 min a temperatura ambient.
5. Aspirar el medi de cultiu a les cèl·lules i rentar-les dues vegades amb PBS 1x temperat a 37°C.
6. Afegir a les cèl·lules la barreja de transfecció (TAULA 9) i incubar les cèl·lules durant 3h a l'incubador de cultius.
7. Rentar les cèl·lules dues vegades amb PBS 1x i afegir-hi el medi complet.
8. Determinar eficiència de transfecció mitjançant un microscopi invertit de fluorescència DM IRBE (LEICA) i assajar l'expressió del gen exogen 48 i 72 h posttransfecció.

Taula 9. Volums i quantitats de transfecció recomanats al utilitzar *siPORT Lipid*

Mida de placa	Superfície placa (cm <sup>2</sup> )	Cèl·lules a sembrar	siRNA* (µl)	siPORT Lipid (µl)	Volum solució A (µl)	Volum solució B (µl)	Volum final de transfecció (µl)
96 pous	0.3	0.2-2x10 <sup>4</sup>	0.005-0.05	1-2	3	16.5	100
24pous	2	1x10 <sup>6</sup>	0.2-1.2	3	7.5	42	250
12 pous	4	0.5-2x10 <sup>6</sup>	0.25-2.5	4-6	10	88	500
6 pous	10	1-5x10 <sup>6</sup>	0.5-5	6-10	15	182	1000

\*Utilitzar una concentració final de siRNA entre 1-25 mM

### 5.2.2. Transfecció estable

La transfecció estable permet que el DNA romangui dins la cèl·lula un temps constant gràcies a la pressió selectiva d'un antibiòtic.

En primer lloc es realitza una transfecció transitòria seguida de la selecció dels clons amb antibiòtic.

#### Reactius:

- LIPOFECTAMINE *Reagent* (GIBCOBRL)
- PLUS *Reagent* (GIBCOBRL)
- Medi Opti MEM®I (GIBCOBRL)
- PBS 1x
- Medi de cultiu
- Antibiòtic: *Hygromycin B* (INVIVOGEN)

#### Procediment:

1. La transfecció estable es realitza amb placa de 10 cm i es procedeix igual que la transfecció transitòria fins el pas 7. En aquest cas es transfecten 4 µg de DNA.
2. 24h després de la transfecció, tripsinitzar i expandir les cèl·lules en 3 plaques de 10 cm.
3. 24h després de tripsinitzar les cèl·lules, afegir l'antibiòtic; hygromicina 400 µg/ml.
4. Afegir medi fresc amb antibiòtic a la concentració de 400 µg/ml cada dia. Les cèl·lules que no hagin incorporat el plasmidi començaran a morir de manera massiva.
5. Aparició i aïllament de clons.
6. Expansió i comprovació de l'expressió del gen inserit al genoma.

## 6. ESTUDI DE LA VIABILITAT I MORTALITAT CEL·LULAR

### 6.1. TRACTAMENT CEL·LULAR AMB ELS DIFERENTS FÀRMACS

Els diferents tipus cel·lulars han estat sotmesos al tractament de diferents compostos com són la ciclosporina SANDIMMUM® (NOVARTIS), la ciclosporina A (CALBIOCHEM®) i la barreja Cremophor® EL i etanol al 94%.

El tractament s'ha realitzat amb dosis creixents de CsA i durant diferents temps de tractament. En funció de l'experiment a realitzar s'han utilitzat uns fàrmacs, dosis i temps concrets detallats a continuació en les taules 10,11, 12 i 13.

**Reactius:**

- Ciclosporina A (CALBIOCHEM®)
- Ciclosporina SANDIMMUM® (CsA 50 mg/ml, Cremophor® EL 650 mg/ml i etanol 94% (p/p) 278 mg/ml) (NOVARTIS)
- Cremophor® EL (BASF)
- Etanol 94%
- Medi de cultiu
- Medi Opti MEM®

**Procediment:**

1. Sembrar les cèl·lules 18h prèvies al tractament (TAULA 10)
2. Fer el banc de dilucions dels diferents fàrmacs:
  - 2.1. En el cas de la CsA CALBIOCHEM® cal en primer lloc pesar-la en condicions d'esterilitat i diluir-la per obtenir-ne la concentració de 25 mg/ml. Per a la resta de fàrmacs agafar el volum necessari de la solució mare per obtenir la primera dilució a la concentració de 25

mg/ml. En qualsevol cas la dilució es realitza amb etanol al 94%.

- 2.2. Realitzar el banc de dilucions :10 mg/ml, 1 mg/ml, 10<sup>-1</sup> mg/ml, 10<sup>-2</sup> mg/ml i 10<sup>-3</sup> mg/ml. La concentració 10 mg/ml es dilueix amb etanol, la resta, en medi de cultiu (TAULES 11 i 12).

3. Aspirar medi de cultiu i afegir el tractament en funció de l'experiment a realitzar (TAULA 13).

**Taula 10. Quantitat de cèl·lules PCT3/HK-2 sembrades segons el tamany de la placa**

Mida de placa	Cèl·lules a sembrar	Volum final (ml)
96 pous	10.000	0.1
24 pous	20.000*/66.000	1
60 mm	660.000	5

\* Per l'experiment de marcatge TUNEL es sembren 20.000 cèl·lules i sobre cobreobjectes. Per la resta d'assajos s'utilitzen 66.000 cèl·lules.

**Taula 11. Esquema de les dilucions i volums emprats en el tractament cel·lular amb els diferents tipus de ciclosporina**

		CsA (CALBIOCHEM®), SANDIMMUM® (NOVARTIS)					
[CsA]final (nM)		10	100	1.000	10.000	20.000	50.000
Dilució emprada (mg/ml)		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	1		
V dilució emprada (µl)	96 pous	1.2	1.2	1.2	1.2	2.4	6
	24 pous	12	12	12	12	24	60
	60 mm	60	60	60	60	120	300

Taula 12. Esquema de les dilucions i volums emprats en el tractament cel·lular amb Cremophor®EL

		Cremophor® EL					
[CsA] <sub>final</sub> (nM)		10	100	1.000	10.000	20.000	50.000
[Cremophor®EL] (µg/ml)		0.156	1.56	15,6	156	313	780
Dilució emprada (mg/ml)		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
V dilució emprada (µl)	96 pous	2.4	2.4	2.4	2.4	4.8	1.2

Taula 13. Resum de les condicions emprades en els diferents experiments realitzats

Tipus d'assaig	Mida de placa	Fàrmac	Durada tractament (h)	Dosi de fàrmac (nM)	Línia cel·lular
Assaig XTT (temps llargs de tractament)	96 pous	CsA CALBIOCHEM®# CsA SANDIMUM®# Cremophor EL	24, 48, 72	0, 10, 100, 1.000, 10.000, 20.000, 50.000	PCT3, PR10, HK-2, HeLa
Assaig XTT (temps curts de tractament)	96 pous	CsA CALBIOCHEM®	2, 4, 6	0, 10, 100, 1.000, 10.000, 20.000	PCT3, HK-2
MTT en temps real	24 pous	CsA CALBIOCHEM®	15 min	0, 10, 100, 1.000	PCT3, HK-2
TUNEL*	24 pous sobre cobreobjectes	CsA CALBIOCHEM®	24	0, 10, 100, 1.000, 10.000, 20.000	PCT3, HK-2
Cell Death ELISA <sup>PLUS</sup>	24 pous	CsA CALBIOCHEM®	24	0, 10, 100, 1.000, 10.000, 20.000	PCT3, HK-2
Cicle cel·lular	60 mm	CsA CALBIOCHEM®	24	1.000, 10.000	PCT3, PR10, HK-2
Consum d'oxigen	60 mm	CsA CALBIOCHEM®	24	10.000	HK-2
2D	60 mm	CsA CALBIOCHEM®	24	0, 10, 100, 1.000, 10.000, 20.000	PCT3, HK-2

\* L'experiment es realitza amb el medi de cultiu complet i amb el medi Opti-MEM.

#Amb aquests fàrmacs només es realitza el tractament amb les diferents dosis de CsA durant 24h i amb les tres línies renals.

## 6.2. ESTUDI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR

Existeixen molts mètodes per estudiar la viabilitat i la toxicitat cel·lular. Es poden quantificar el nombre de cèl·lules al llarg del temps, mesurar la síntesi de DNA, etcètera.



### 6.2.1. Assaig XTT

La viabilitat i/o la toxicitat cel·lular s'han avaluat mitjançant un mètode colorimètric basat en el sistema XTT de gran sensibilitat i que evita l'ús d'isòtops radioactius. L'XTT és una salt de tetrazoli que s'utilitza per quantificar cèl·lules viables gràcies a la capacitat metabòlica d'aquestes. La salt de tetrazoli és convertida per les deshidrogenases mitocondrials de cèl·lules metabòlicament actives a formazan (producte hidrofílic i de color taronja) quantificable en un lector d'ELISA. D'aquesta manera podem dir que un augment en la quantitat de formazan format correlaciona amb un augment del nombre de cèl·lules viables. També, quantes menys cèl·lules metabòlicament actives, menys formazan generat.

Per avaluar la toxicitat cel·lular produïda pel fàrmac immunosupressor CsA s'ha utilitzat el *Cell Proliferation Kit II* (XTT) de ROCHE. A continuació s'esmenta breument el protocol seguit:

#### Reactius:

- *Cell Proliferation kit II* (XTT)

#### Procediment:

1. Descongelar el reactiu de marcatge XTT i el reactiu acoblador d'electrons en un bany a 37°C. Agitar fins a obtenir una solució transparent.
2. Preparar la solució de marcatge barrejant 100 µl del reactiu acoblador d'electrons amb 5 ml del reactiu de marcatge XTT.
3. Afegir a cada pou 50 µl de reactiu de marcatge i incubar les cèl·lules a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant 2h.
4. Mesurar l'absorbància a una longitud d'ona de 450 nm utilitzant un lector de plaques d'ELISA.

### 6.2.2. MTT en temps real

La viabilitat cel·lular en temps real s'ha avaluat utilitzant la salt de metilazotetrazoli MTT. Aquesta salt és convertida a formazan (producte de color blau i insoluble en aigua) per les deshidrogenases mitocondrials de cèl·lules metabòlicament actives. La reducció de l'MTT en temps real és possible mesurant l'absorbància a 595 nm amb un microscopi de fluorescència invertit acoblat a un fotomultiplicador controlat des d'un fluorímetre.

#### Reactius:

- 1-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (MTT), (SIGMA)
- Microscopi de fluorescència invertit (IX70, OLYMPUS)
- Fluorímetre SLM Aminco 2000
- Fotomultiplicador
- Placa escalfadora

**Procediment:**

- |   |  |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparar l'MTT a una concentració de 0.5 mg/ml i les diferents dilucions de CsA.</li> <li>2. Afegir l'MTT i mesurar-ne la seva reducció en temps real durant 15 minuts per les</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>cèl·lules control.</li> <li>3. Afegir l'MTT i la CsA i mesurar-ne la reducció en temps real durant 15 minuts per a cada una de les dosis de CsA.</li> </ol> |
|---|--|

**6.2.3. Citometria de flux. Anàlisi del cycle cel·lular**

La citometria de flux és una tècnica destinada a la quantificació de components o característiques estructurals de les cèl·lules mitjançant bàsicament mètodes òptics. Tot i que les mesures són realitzades sobre cèl·lules individuals i per unitat de temps, ens permet analitzar milers de cèl·lules en pocs segons.

Aquesta tècnica permet l'estudi de la distribució d'una població cel·lular al llarg de les diferents fases del cycle cel·lular, en funció del seu contingut de DNA. La citometria de flux també és útil per determinar agents que indueixen o paren la proliferació cel·lular, com també per quantificar l'apoptosi. Per això, cal l'ús de fluorocroms que s'uneixen al DNA cel·lular. Els colorants més utilitzats són el iodur de propidi i el bromur d'etidi. Ambdós s'exciten a una longitud d'ona de 488 nm i s'uneixen de manera estequiomètrica al DNA. Donat que aquests fluorocrom s'uneixen també a l'RNA cal prèviament tractar les cèl·lules amb RNasa.

L'anàlisi de mostres s'ha dut a terme a la Unitat de Citometria de la UCTS de l'HUVH. El protocol seguit ha estat el següent:

**Reactius:**

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PBS 1×</li> <li>▪ Tripsina</li> <li>▪ PFA 4%</li> <li>▪ PBS 1×–10 mM EDTA</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ BSA 1% (diluïda en PBS-EDTA)</li> <li>▪ RNasa A 10 mg/ml</li> <li>▪ Etanol 70%</li> <li>▪ Iodur de propidi 1 mg/ml</li> </ul> |
|---|--|

**Procediment:**

- |  |  |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tripsinitzar i comptar les cèl·lules.</li> <li>2. Passar <math>1 \times 10^6</math> cèl·lules/ml en un tub falcon de 15 ml. Centrifugar durant 5 min a 1000g.</li> <li>3. Rentar les cèl·lules amb 10 ml de PBS 1×–10 mM EDTA (per tal de desfer els grumolls de cèl·lules). Repetir-ho dues vegades més.</li> <li>4. Permeabilitzar les cèl·lules amb 1% BSA. Centrifugar durant 15 min a 1000g.</li> <li>5. Fixar les cèl·lules amb etanol al 70% a <math>-20^\circ\text{C}</math> o/n (no guardar-les més d'una setma-</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>na) abans d'anar al citòmetre</li> <li>6. Rentar les cèl·lules amb PBS1x-1% BSA. Repetir-ho dues vegades més. En l'últim rentat resuspendre les cèl·lules a la concentració de <math>1 \times 10^6</math> cèl·lules/ml.</li> <li>7. Incubar les cèl·lules amb 250 <math>\mu\text{g/ml}</math> d'RNasa A durant 1h a <math>37^\circ\text{C}</math>.</li> <li>8. Afegir el iodur de propidi a 30 <math>\mu\text{g/ml}</math>.</li> <li>9. Guardar les mostres a <math>4^\circ\text{C}</math> i a les fosques fins al moment d'anar al citòmetre.</li> </ol> |
|--|--|

Preparació de RNasa A lliure de DNases:

1. Dissoldre la RNasa A pancreàtica a 10 mg/ml en Tris-HCl pH 7.5, NaCl 15 mM
2. Escalfar a 100°C durant 15 min
3. Deixar refredar lentament a temperatura ambient
4. Aliquotar i guardar a -20°C

### 6.2.4. Mesures de la respiració endògena. El consum d'oxigen

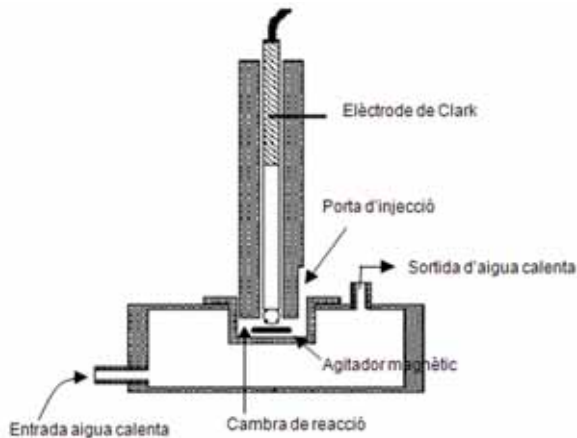


Figura 26. Esquema de la cambra d'oxigen

La mesura del consum d'oxigen es va realitzar per polarografia d'oxigen utilitzant l'elèctrode de *Clark*, que consisteix en un càtode de platí i en un ànode de Ag-ClAg immerss en una solució de clorur potàssic i separats per una membrana de tefló permeable a l'oxigen. Sobre la peça base que conté el càtode i l'ànode es col·locà una peça cilíndrica que inclou la cambra de reacció, rodejada d'una camisa d'aigua connectada a un bany termoestable. La cambra es segella amb un èmbol que conté una obertura capil·lar en el centre que permet la sortida d'aire i l'addició dels reactius amb l'ajuda d'una xeringa *Hamilton*. Les cèl·lules s'afegeixen a la cambra de reacció, on són homogeneïtzades per agitació magnètica. Les dades es registren en un ordinador mitjançant el programa Oxyg32, HANSATECH. Les mesures de consum d'oxigen es realitzaren a 37°C i 650 mV de potencial del elèctrode.

El protocol seguit ha estat el següent:

#### Reactius:

- Tripsina 2mM glutamina, 1mM piruvat sòdic)
- Medi de respiració (DMEM sense glucosa,

#### Procediment:

1. Preparació del medi de respiració i de l'agent desacoblant.
2. Tripisinitzar i comptar les cèl·lules.
3. Resuspendre  $1.5 \times 10^6$  cèl·lules en 300  $\mu$ l de medi de respiració. Fer duplicats de cada situació.
4. Introduir les cèl·lules dins la cambra de
5. Afegir 1.5  $\mu$ l d'FCCP per desacoblar la cadena respiratòria i enregistrar el consum d'oxigen durant 2 minuts més.
6. Càlcul del consum d'oxigen. S'expressa com (nmols d'oxigen  $\times 10^6$  cèl·lules)/ml.

## 6.3. ESTUDI DE LA MORT CEL·LULAR

Alguns compostos químics tenen propietats citotòxiques, és a dir, poden provocar la mort cel·lular. La mort cel·lular es pot donar per dos mecanismes diferents, l'apoptosi i la necrosi. L'apoptosi és un procés fisiològic de mort programada que es dona quan hi ha la necessitat d'eliminar cèl·lules en processos fisiològics normals. La necrosi, en canvi, és un procés patològic pel qual les cèl·lules moren al ser exposades a un dany químic i/o físic.

### 6.3.1. Assaig de la mort cel·lular

La mort cel·lular es pot donar per dos mecanismes diferents, l'apoptosi i la necrosi. L'apoptosi es caracteritza per una agregació de la cromatina, la fragmentació del DNA seguint un patró concret, la condensació del nucli i del citoplasma de la cèl·lula, l'alliberació diferents factors com el citocrom C al citoplasma de la cèl·lula, l'activació de les caspases, etcètera.

En les fases inicials de l'apoptosi la permeabilitat de la membrana citoplasmàtica i l'activitat mitocondrial romanen intactes. Per aquest motiu s'han desenvolupat tècniques que mesuren els diferents efectes que tenen lloc en els estadis inicials d'aquest procés. En aquest treball s'ha utilitzat el marcatge enzimàtic TUNEL amb el *In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* de la casa ROCHE. Aquest mètode permet detectar la fragmentació del DNA en les fases inicials de l'apoptosi en cèl·lules individuals. Els talls de DNA generats són marcats en el seu extrem 3'-OH lliure amb nucleòtids modificats (*Fluorescein*, dUTP) per una reacció enzimàtica catalitzada per la *Terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT). A més, també s'ha utilitzat un assaig d'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) que permet quantificar els fragments de DNA acomplexats amb histones presents al citoplasma de les cèl·lules amb el *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> kit* de la casa ROCHE. Aquesta tècnica es basa en el principi d'immunoassaig-enzim-sandwich utilitzant anticossos monoclonals anti-histona-biotina i anti-DNA-peroxidasa, permetent una determinació específica dels mono i oligonucleosomes presents a la fracció soluble citoplasmàtica.

La reacció de marcatge TUNEL ha tingut lloc sobre cèl·lules sembrades sobre cobreobjectes en plaques de 24 pous, mentre que l'assaig d'ELISA ha tingut lloc en plaques de 24 pous.

#### 6.3.1.1. *In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*

##### **Reactius:**

- *In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*, Roche
- PFA 4%
- PBS 1x
- Solució permeabilització (0.1% TritóX-100 en 0.1% citrat sòdic)
- Solució de bloqueig (1% BSA en PBS 1x)
- Iodur de propidi 1 mg/ml
- *SlowFade<sup>TM</sup> Antifade Kit* (MOLECULAR PROBES)

### Procediment:

1. Rentar les cèl·lules amb PBS 1×.
2. Fixar amb PFA al 4% durant 1h a temperatura ambient.
3. Rentar les cèl·lules amb PBS 1×.
4. Permeabilitzar les cèl·lules amb la solució de premeabilització durant 2 min en gel.
5. Rentar les cèl·lules amb PBS 1×.
6. Preparar la reacció de marcatge TUNEL: afegir 50 µl de l'*Enzime Solution* als 450 µl de la *Label Solution* i barrejar-los bé.
7. Afegir 50 µl de reacció de marcatge TUNEL a cada mostra i incubar 1h a 37°C i a les fosques.
8. Rentar les cèl·lules amb PBS 1×.
9. Incubació amb la solució de bloqueig durant 30 min a temperatura ambient.
10. Contra tinció amb iodur de propidi durant 2 min i protegit de la llum. Dilució 1:1.500.
11. Rentar les cèl·lules amb PBS 1×.
12. Muntar les cèl·lules amb el *SlowFade™ Antifade kit* i mantenir-les a 4°C i protegides de la llum fins al moment de visualitzar-les al microscopi.
13. Visualització i comptatge de les cèl·lules al microscopi invertit LEICA (UCTS, Servei de Microscòpia, HUVH).

### 6.3.1.2. Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>

#### Reactius:

- *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> kit*, ROCHE

#### Procediment:

1. Preparació de les solucions de treball:  
Immunoreactiu: Barrejar 1/20 volums anti-DNA-POD, 1/20 volums *Anti-Histone-Biotin* amb 18/20 volums del tampó d'incubació.  
ABTS: Resuspendre 1, 2 o 3 pastilles ABTS amb 5, 10 o 15 ml del tampó substrat.
2. Eliminar el sobrenedant i afegir 200 µl de tampó de lisi. Incubar durant 30 min a temperatura ambient.
3. Passar el lisat a *ependorfs* i centrifugar 10 min a 200g.
4. Retirar el sobrenedant (conté la fracció citoplasmàtica) amb molt de compte de no agafar *pellet* (que conté els nuclis amb el DNA no fragmentat d'elevat pes molecular).
5. Afegir a la placa d'ELISA\* i per duplicat 20 µl del lisat cel·lular de cada una de les mostres, el control positiu (barreja de DNA i histones) i el control de *background*.
6. Afegir a cada pouet de la placa 80 µl d'immunoreactiu. Tapar la placa d'ELISA amb l'adhesiu\* i incubar 2h a temperatura ambient i amb agitació.
7. Retirar la solució.
8. Rentar amb 250 -300 µl amb el tampó d'incubació. Repetir-ho dues vegades més.
9. Retirar amb molt de compte la solució de rentat.

10. Afegir a cada pouet 100 µl d'ABTS. Incubar amb agitació fins que adquireixi coloració.
11. Mesurar a una longitud d'ona de 405 nm. Utilitzar com a longitud d'ona de referència 490 nm.
12. Calcular el factor d'enriquiment:

FE = Absorbància de la mostra/ Absorbància del control negatiu.

Acontinuació es calcula el factor d'enriquiment de cada mostra tractada amb CsA respecte la mostra control.

\* Subministrat amb el Kit

## 7. ANÀLISI DE PROTEÏNES

### 7.1 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES A PARTIR DE CULTIUS CEL·LULARS

Per obtenir els extractes proteics a partir de cèl·lules en cultiu s'ha utilitzat sempre el mateix protocol.

#### Reactius:

- Solució de rentat de cèl·lules (10 mM Tris i 25 mM sorbitol, pH 7)
- Tampó de lisi (8 M Urea, 4% Chaps i 40 mM Tris)

#### Procediment:

1. Descartar el medi de cultiu i rentar dues vegades les cèl·lules amb solució de rentat freda.
2. Afegir a la placa el volum adequat de tampó de lisi (150 µl/placa de 6 cm de diàmetre) i rascar les cèl·lules, sobre gel, per despendre-les de la placa.
3. Transferir les cèl·lules parcialment lisades a un *eppendorf* i passar-les seqüencialment per xeringues de 16G, 20G i 23G (5 vegades/xeringa)
4. Guardar el lisat a -80°C

La concentració de proteïna s'ha determinat utilitzant el *Kit DC Protein Assay* de BIO-RAD seguint les instruccions del fabricant.

### 7.2. SDS-PAGE D'UNA DIMENSIÓ

L'electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE) és una de les tècniques més usades per separar i caracteritzar proteïnes. La xarxa formada al barrejar acrilamida/bis-acrilamida polimeritzada permet separar les proteïnes segons la seva càrrega, forma i tamany quan es sotmet a un camp elèctric. L'SDS-PAGE permet separar les proteïnes exclusivament pel seu pes molecular. L'SDS, detergent amfipàtic amb un cap aniónic i una cua lipofílica, desnatura les proteïnes de manera que es perd

la seva estructura tridimensional donant lloc a proteïnes lineals. A més, l'SDS s'uneix de forma no covalent a les proteïnes amb una ratio de una molècula d'SDS per cada 2 aminoàcids, conferint a la proteïna una càrrega neta negativa.

S'ha utilitzat el sistema vertical mini-PROTEAN 3 de la casa BIO-RAD. S'han utilitzat gels al 12% de poliàcrilamida i condicions desnaturalitzants.

#### Reactius:

- Tampó de càrrega o de *Laemmli* 3×
- Tampó d'electroforesi

#### Procediment:

1. Preparar els gels de poliàcrilamida (TAULA 14).
2. Preparar les mostres de proteïna diluint-les en tampó de càrrega 3×. Bullir-les durant 5 min i clavar-les en gel.
3. Muntar els gels en la cubeta d'electroforesi, cobrir-los amb tampó d'electroforesi i carregar les mostres de proteïna.
4. Resoldre les mostres fins que surti el front a 20 mA/gel a amperatge constant.
5. Desmuntar els gels i tenyir-los durant 10 min amb la tinció Blau de *Coomassie*.
6. Destenyir els gels amb 10% d'àcid acètic fins a observar bandes discretes en el gel.

Taula 14. Volums necessaris per a la preparació de dos mini-gels per SDS-PAGE

GEL SEPARADOR 12%		GEL CONCENTRADOR	
30% acril/0.8% bis	6 ml	30% acril/0.8% bis	0.6 ml
4× Tris-Cl/SDS, pH 8.8	3.75 ml	4× Tris-Cl/SDS, pH 6.8	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	5.25 ml	H <sub>2</sub> O	3.05 ml
10% PA	0.05 ml	10% PA	0.025 ml
TEMED	0.01 ml	TEMED	0.001 ml

### 7.3. L'ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL (2D)

L'electroforesi bidimensional és la tècnica més emprada per analitzar barreges complexes de proteïnes extretes de teixit, cèl·lules o mostres biològiques. Aquesta consta de dues etapes. La primera es basa en una separació proteica per punt isoelèctric seguida d'una segona etapa on les proteïnes es separen segons el seu pes molecular mitjançant un SDS-PAGE. Juntament amb l'espectrometria de masses aquestes proteïnes poden ser identificades.

#### PRIMERA DIMENSÍO (ISOELECTROENFOC, IEF)

L'isoelectroenfoc o separació per punt isoelèctric es basa en el desplaçament de les proteïnes en un gradient de pH. Quan s'aplica una diferència de potencial en un gradient de pH on s'hi troba la mescla de proteïnes, aquestes migraran fins al PI que sigui igual al seu pH.

**Reactius:**

- Tires de pH de 7cm i de 24 cm
- Solució de rehidratació (8 M Urea, 2% SDS, 0.5% *ampholine buffer* pH 3-10-IPGbuffer
- 3-10, 0.002% blau de bromofenol)
- DTT

**Procediment:**

1. Afegir el DTT (0.28%) a la solució de rehidratació.
2. Preparar les mostres de proteïna diluint-les amb solució de rehidratació (TAULA 15)
3. Aplicar la mostra proteica al centre de l'*Strip holder*, eliminar les bombolles.
4. Col·locar amb cura la tira sobre la suspensió proteica, amb la cara que conté el gel de poliacrilamida cap per avall.
5. Aplicar unes gotes de *IPG Cover Fluid* fins a cobrir la tira per evitar l'evaporació. Tapar l'*Strip holder* i col·locar-lo a l'aparell IPGphor per tal de realitzar l'IEF
6. Rehidratació. Mínim 12h. Les condicions de l'IEF són diferents en funció de la longitud de la tira:
  - 7 cm: 30 min a 500V
  - 30 min a 1000V
  - 1h a 8000V
  - 24 cm: 60 min a 500V
  - 60min a 1000V
  - 6h i 30 min a 8000V
7. Un cop finalitzat l'IEF, ja es pot passar a realitzar l'SDS-PAGE o bé es poden guardar les tires en tub tancats a -80°C.

**Taula 15. Quantitats i volums necessaris per a la realització de l'IEF**

Longitud tira (cm)	Quantitat de proteïna (µg)	Tipus de tinció	Volum de l'IEF (µl)	Estudi
7	100	Coomassie	125	<i>Western blot</i>
	6	Plata		
24	800	Coomassie	450	Analisi diferencial
	50-150	Plata		Analisi diferencial/ MALDI-TOF-TOF

**SEGONA DIMENSIÓ, SDS-PAGE****Reactius:**

- Solució d'equilibrat I (50 mM Tris pH 8.8, 6 M Urea, 30% Glicerol al 87%, 2% SDS, 1% DTT, 0.002% blau de bromofenol)
- Solució d'equilibrat II (50 mM Tris pH 8.8, 6 M Urea, 30% Glicerol al 87%, 2% SDS, 4% iodocetamida, 0.002% blau de bromofenol)



- 30% Acrilamida/0.8% bisacrilamida (Bio-Rad)
- Tampó de gelificació 4× (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- SDS 10%
- Persulfat amònic
- Tampó d'electroforesi Tris-Glicina-SDS 10x (250 mM Tris, 1.92 M Glicina, 1% SDS)
- Solució de sellat 0.5% agarosa

**Procediment:**

1. Preparació dels gels (TAULA 16).
2. Després de l'IEF equilibrar les tires: 10 min amb solució d'equilibrat I seguits de 10 min amb solució d'equilibrat II. El procés d'equilibrat es realitza amb agitació.
3. Col·locar les tires sobre el gel SDS-PAGE de manera que, la cara de la tira que conté el gel de poliacrilamida miri a l'operador i l'ànode (extrem arrodonit) quedi a l'esquerra de l'operador. Amb l'ajuda d'una espàtula empènyer la tira cap al gel evitant la formació de bombolles.
4. Sellar el sistema amb agarosa prèviament escalfada a 60°C.
5. Muntar els gels en la cubeta d'electroforesi, cobrir-los amb tampó d'electroforesi Tris-Glicina-SDS.
6. Resoldre les mostres fins que surti el front.

Les condicions són diferents en funció de la longitud de la tira:

7 cm: 1h 200V

24cm: 2.5W/gel durant 30 min + 100W totals

7. Desmuntar els gels. Els gels corresponents a la longitud de tira de 7 cm s'electrotransfereixen (vegeu l'apartat 7.2.2 dels MÈTODES). Els gels corresponents a la longitud de tira de 24 cm es tenyeixen amb Plata (*Silver Stainig Kit Protein*, PHARMACIA) i es continua amb el procediment.

8. Analitzar i processar les imatges dels gels amb el software PD-Quest de BIO-RAD (Dr. Joan López Hellín)

9. Anàlisi per MALDI-TOF-TOF de les proteïnes diferencialment expressades. Unitat de Proteòmica, Institut de Recerca, HUVH)

**Taula 16. Volums necessaris per a la preparació del gel separador per a la segona dimensió**

	GEL SEPARADOR 12.5%	
	Mini-PROTOEAN 3 (ml) (tires de 7 cm)	EttanDalt6 (ml) (tires de 24cm)
30% acril/0.8% bisacril	8.3	187.5
Tampó gelificació 4X	5.0	112.5
H <sub>2</sub> O	6.5	145.5
SDS 10%*	0.2	4.5
10% PA	0.1	2.25
TEMED	0.01	0.225

\* Afegir l'SDS en agitació

## 7.4. WESTERN BLOT

Les proteïnes separades per SDS-PAGE es poden electrotransferir a una membrana que permetrà la detecció de la proteïna d'interès mitjançant l'ús d'anticossos i un sistema de revelat adequat.

### Reactius:

- Tampó de transferència
- Metanol
- H<sub>2</sub>O destil·lada
- Membranes WESTRAN®-PVDF (SCHLEICHER & SCHUELL)
- Llet en pols descremada
- PBS 1x
- Tween-20
- Anticòs primari i secundari (TAULES 17 i 18)
- ECL Plus i ECL (AMERSHAM)

### Procediment:

1. Després de l'electroforesi equilibrar els gels amb tampó de transferència.
2. Activar la membrana WESTRAN®-PVDF durant 5 s amb metanol.
3. Equilibrar la membrana amb tampó de transferència.
4. Muntar la transferència seguint les instruccions de l'aparell i transferir a 400 mA durant 90 min.
5. Desmuntar la transferència.
6. Bloquejar la membrana 1h a temperatura ambient amb 5% llet en pols descremada i 0.1% Tween-20 en PBS1x.
7. Incubar l'anticòs primari en solució de bloqueig o/n a 4°C.
8. Rentar la membrana amb 0.1% Tween-20 en PBS1x durant 10 min. Repetir fins a 3 vegades.
9. Incubar l'anticòs secundari en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient.
10. Rentar la membrana amb 0.1% Tween-20 en PBS1x durant 10 min. Repetir fins a 3 vegades.
11. Revelar amb ECL Plus o ECL (en funció de l'anticòs) segons les especificacions recomanades per la casa comercial.

## 8. ANÀLISI ESTADÍSTIC

S'han aplicat dos tipus d'estudis. El programa utilitzat ha estat l'STATGRAPHICS 4.1 (Virginia, U.S.A).

**Estadística no paramètrica:** les dades no compleixen els requisits per fer una ANOVA, és a dir no presenten una distribució normal, la n es petita i les variàncies no són homogènies. Els tests utilitzats han estat *Mann-Whitney (Wilcoxon)* i *Kolmogorov-Smirnov*. Les diferències entre les dues mostres comparades són significatives quan  $p \leq 0.05$ .

**Estadística paramètrica:** Model factorial d'ANOVA d'una sola via quan la comparació només té en compte un factor, quan intervenen més factors s'aplica una ANOVA multifactorial. Quan algun d'aquests factors té varis nivells d'estudi s'aplica un test *Post-Hoc*.

Taula 17. Anticossos primaris utilitzats per a la immunodetecció per *Western blot*

Anticòs	Origen	Proveïdor/ Referència	Quantitat de proteïna ( $\mu$ g)	Concen- tració de treball	Temps d'incubació	Sstema de detecció
anti-CypB	conill	ABR PA1-027	0.5	0.5 $\mu$ g/m	1h	ECL Plus
anti-CypA	conill	UPSTATE BIOTECH- NOLOGY 12-301	5	1:2.000	o/n	ECL Plus
anti-actina	conill	SIGMA A-5060	5-60*	1:1.000	o/n	ECL
anti-MAP kinase 1/2 (Erk 1/2- CT)	conill	UPSTATE BIOTECH- NOLOGY 06-182	0.5-5*	1 $\mu$ g/ml	o/n	ECL Plus
anti-NACAL	ratolí	ABNOVA CORPORA- TION H00342538- A01	60	1:1.000	o/n	ECL Plus
anti-RACK1	ratolí	SANTA CRUZ BIOTEHNOLOGY Sc-17754	20	1:500	o/n	ECL
anti-Crys- tallin alpha B	conill	ACRIS SP1088P	20	1:500	o/n	ECL

\*Són anticossos que s'utilitzen per a normalitzar el *Western blot*, per tant s'indica el rang de quantitat de proteïna pel qual s'han utilitzat. Cultiu cel·lular (5  $\mu$ g) o teixit (60  $\mu$ g)

Taula 18. Anticossos secundaris utilitzats per a la immunodetecció per *Western blot*

Anticòs	Origen	Proveïdor/ Referència	Concentració de treball	Temps d'incubació
anti-rabbit #	cabra	DAKO P0448	1:5000	1h
anti-mouse #	conill	DAKO P0260	1:2000	1h

# Conjugat amb peroxidasa

## ANNEX: COMPOSICIÓ DE TAMPONS I MEDIS

TAMPONS GENERALS		
NOM	COMPOSICIÓ	COMENTARIS
PBS 1×	NaCl (137 mM)	Esterilitzar a l'autoclau.
	KCl (2,5 mM)	
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM)	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,4mM)	
TAE 1×	Tris base (40mM)	Ajustar el pH a 8,1 i autoclavar.
	Àcid acètic (2mM)	
	EDTA (0,2mM)	

TAMPONS PER SDS-PAGE I WESTERN BLOT		
NOM	COMPOSICIÓ	COMENTARIS
Tris-HCl 4× pH 6,8	Tris-HCl pH 6,8 (0,5M)	Filtrar el Tris-HCl amb un filtre de 0,45 µm abans d'afegir l'SDS. Guardar a 4°C.
	SDS (0,4% w/v)	
Tris HCl 4× pH 8.8	Tris-HCl pH 8,8 (1,5M)	Filtrar el Tris-HCl amb un filtre de 0,45 µm abans d'afegir l'SDS. Guardar a 4°C.
	SDS (0,4% w/v)	
Tampó d'electroforesi 5×	Tris base (125mM)	Guardar a 4°C. Diluir a la concentració de treball 1x amb H <sub>2</sub> O destil·lada.
	Glicina (0,96M)	
	SDS (0.5% w/v)	
Tampó de transferència 3×	Tris base (172mM)	Guardar a 4°C. Diluir a la concentració de treball 1x amb H <sub>2</sub> O destil·lada i afegir metanol a una concentració final del 20% (v/v).
	Glicina (1.32M)	
	SDS (11.8mM)	
Tampó Laemmli 3×	Tris-HCl pH 6.8 (188mM)	Guardar a temperatura ambient.
	Glicerol (30% v/v)	
	SDS (6% v/v)	
	β-Mercaptoetanol (15% v/v)	
	Blau de bromofenol (0,02% w/v)	
Blau de <i>Coomassie</i>	Metanol (40% v/v)	Guardar a temperatura ambient.
	Àcid acètic (7% v/v)	
	Blau de <i>Coomassie</i> (0,025% w/v)	
Solució de destenyir	Metanol (50% v/v)	Guardar a temperatura ambient.
	Acid acètic (10% v/v)	

TAMPONS PER A L'ELECTROFRESI BIDIMENSIONAL			
NOM	COMPOSICIÓ	COMENTARIS	
Solució de lisi	Urea (8M)	Guardar a -20°C.	
	Chaps (4% v/v)		
	Tris (40 mM)		
Solució de rehidratació	Urea (8M)	Guardar a -20°C. Afe- gir el DTT (1,4 mg per 500 µl) en el moment d'utilitzar la solució.	
	Chaps (2% v/v)		
	IPG buffer (0,5% v/v)		
	Blau de bromofenol (0.02% w/v)		
Solució d'equilibrat	Tris 1,5 M pH 8,8	Guardar a -20°C. Afe- gir el DTT (50mg per cada 5ml) en el mo- ment d'utilitzar la so- lució.	
	Urea (6M)		
	Glicerol (30% v/v)		
	SDS (2% w/v)		
	Blau de bromofenol (0,02% w/v)		
Solució de segellat d'agarosa	Tampó d'electroforesi 1x (100ml)	Barrejar tots els in- gredients i escalfar la mescla al microones a una potència màxi- ma fins que l'agarosa s'hagi dissolt. Guardar a temperatura ambi- ent.	
	Agarosa (0,5% w/v)		
	Blau de bromofenol (0,02% w/v)		
Solució de rentat de les cèl·lules	Tris (10mM)	Ajustar a pH 7 i guard- ar a 4°C.	
	Sorbitol (25mM)		
Tinció amb plata	Fixador	Etanol (40% v/v)	Guardar a temperatura ambient.
		Àcid acètic glacial (10% v/v)	
	Sensibilitzador	Etanol (30%)	Utilitzar la solució im- mediatament després d'haver-la preparat. No afegir el glutaral- dehid si el gel és per MALDI-TOF.
		Tiosulfat sòdic (0,2% v/v)	
		Acetat de sodi (6,8% v/v)	
		Glutaraldehid (0,25% v/v)	
	Reactiu de plata	Nitrat de plata (0,25% v/v)	Utilitzar la solució im- mediatament després d'haver-la preparat. No afegir el formal- dehid si el gel és per MALDI-TOF.
		Formaldehid 37%	
	Revelador	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2,5% v/v)	Utilitzar la solució im- mediatament després d'haver-la preparat.
		Formaldehid (0,04% v/v)	
	Reactiu de parada	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O (1,46% w/v)	Guardar a tempera- tura ambient. Estable durant 6 mesos.

<b>MEDIS I TAMPONS PER A BACTERIS</b>		
<b>NOM</b>	<b>COMPOSICIÓ</b>	<b>COMENTARIS</b>
Medi LB (per a 1 litre)	Triptona (Difco) (10g)	Ajustar el pH a 7,5 i autoclavar.
	Extracte de llevat (Difco) (10g)	
	NaCl (5g)	
LB-agar (per a 1 litre)	Medi LB a pH 7,5 (1l)	Autoclavar per a esterilitzat. Deixar refredar fins a uns 50°C i afegir si cal, l'antibiòtic d'elecció. Distribuir la mescla en plaques i deixar solidificar. Guardar a 4°C.
	Agar (Difco) (15g)	
Ampicil·lina	Ampicil·lina (50 mg/ml)	Diluir l'ampicil·lina en H <sub>2</sub> O NaCl (5g)-Q estèril. Aliquotar i guardar a -20°C.