

Annex II: Materials i mètodes

I. Screening de doble híbrid en llevat (Y2H)

La regió intracel.lular predita per LERN1 va ser amplificada a partir del clon IMAGE 172219 mitjançant PCR amb els oligonucleòtids següents:

R3 (5'CCTGGTGCTGCTGTTTC3')

403modSall (5'CTCGTCGACTATCATCTTCATGTTGAACTTG3')

El producte de l'amplificació va ser subclonat en pGEM T-vector (Promega) i a partir d'aquest es va generar un fragment de 155 parells de bases amb els enzims de restricció NcoI i Sall. Aquest fragment corresponent a la regió intracel.lular de LERN1 va ser clonat en el vector d'expressió de llevat pAS2-1 en pauta de lectura oberta amb el domini d'unió a DNA de GAL4 (Clontech). Es va utilitzar la llibreria pACT2 de cervell fetal (MatchMaker System, Clontech) per identificar potencials clons interaccionants amb la regió intracel.lular de LERN1 seguint les instruccions del fabricant. La soca Y190 de llevat va ser cotransformada mitjançant el mètode de l'acetat de liti (Clontech Yeast Transformation System 2). Els clons transformants van ser crescuts a 30°C en medi sense triptòfan, leucina i histidina. Els clons amb capacitat de créixer en medi sense cap dels tres aminoàcids (potencials clons transformats amb plasmidis codificants de proteïnes interaccionants amb LERN1) van ser testats per activitat β -galactosidasa mitjançant assaig de colònia en filtre. Els clons positius resultants van ser rescatats per transformació de plasmidi de llevat en cèl.lules DH5 α d'*E.coli* (LifeTech). Aquests clons van ser seqüenciats usant oligonucleòtids específics de vector pACT2. Es van confirmar els clons positius mitjançant retrotransformació en llevat Y109 i assaig β -galactosidasa.

II. Assajos de precipitació amb Glutatió-S-transferasa (GST) (pull-down)

La porció de LRRN6A codificant per la regió intracel.lular va ser amplificada per PCR amb els oligonucleòtids següents:

F1 (5'TGGGAAGGACTGGAGAG3')

403BamHI (5'GAGGGATCCTGCCTGGTGCTGCTGTTTCTCTG3')

El producte de PCR va ser subclonat en pGEM T-vector (Promega) i aleshores digerit amb els enzims BamHI i EcoRI per a una lligació en el vector

d'expressió pGEX-2T (Amersham-Pharmacia Biotech) mantenint la pauta de lectura oberta amb el gen per a l'enzim glutatió S-transferasa (GST). Es va sobreexpressar la proteïna de fusió LERN1intracel-GST i la proteïna GST lliure en bacteris *E.coli* de la soca BL21 després d'una inducció amb 0.1 mM IPTG a 37°C durant 3.5 hores. El pellet de cèl.lules va ser resuspès en tampó fosfat (PBS) contenint 0.75% sarcosil i 2% tritó X-100. Les fraccions solubles del lisat bacterià van ser immobilitzades amb glutatió-sefarosa 4B (Amersham-Pharmacia Biotech). La proteïna no unida a sefarosa va ser eliminada mitjançant rentats successius amb tampó fosfat. Posteriorment extractes de cèl.lules HEK293 obtingudes per sonicació en tampó de lisi contenint 1% tritó X-100 van ser incubats amb sefarosa-LERN1intracel durant 6 hores a 4°C en rotació. Es van eliminar inespecificitats mitjançant rentats en tampó de lisi, es va precipitar la sefarosa i després d'una desnaturalització de 5 minuts les mostres es van analitzar per transferència de Western amb els anticossos antiMyt1-like (dilució 1/750) i anti-conill-peroxidasa (HRP) (Dako, 1/2000) mitjançant detecció quimioluminiscent (Pierce).

III. Generació d'anticossos policlonals

Mitjançant gels de poliacrilamida 10% es va separar i purificar proteïna LERN1ep-GST 60kDa expressada a *E.coli* BL21 com en l'apartat anterior. Aquesta proteïna de fusió conté part del domini extracel.lular més proximal i no conté el domini transmembrana ni la regió intracel.lular de LERN1. Es va purificar la proteïna a partir de poliacrilamida mitjançant la fragmentació de la banda i la seva trituració a través de xeringa. Un cop ben triturada es va afegir tampó fosfat (PBS), i es va mantenir en rotació, 4°C, tota la nit per tal d'eluir-ne el màxim de proteïna. Mitjançant una centrifugació suau es vadescartar la poliacrilamida i es va reservar la part sol.luble. Mitjançant columnes de concentració Ym-30 Microcon (Amicon) i seguint les instruccions del fabricant es van aconseguir concentracions de proteïna LERN1ep-GST de l'ordre de 2 µg/µl. Es va utilitzar aquesta proteïna per immunitzar en 4 inoculacions (0.8-1mg total) dos conills i dues gallines seguint els protocols estàndar i recollint el sèrum en el cas dels conills i els ous en el cas de les gallines al llarg del procés. Les IgY dels rovells d'ou es van aïllar amb un *kit* de purificació d'IgY (Eggcellent Chicken IgY Purification kit, Pierce) seguint el protocol i instruccions

proporcionats pel fabricant. Amb l'objectiu d'obtenir anticossos policlonals més específics es va dissenyar i sintetitzar un pèptid de seqüència RSYSPDWPHQPKNKTFK corresponent a la regió extracel·lular proximal al domini transmembrana de LERN1. Es van realitzar 4 inoculacions de 250 µg de pèptid per immunitzar cada conill. Es van recollir els sèrums corresponents tal i com es va fer amb l'immunització amb LERN1ep-GST 60kDa.

IV. Caracterització dels anticossos: transferència de Western

Els anticossos (de conill i d'ou) es van usar a dilucions diferents per tal de fer-ne un titratge empíric i determinar la dilució de treball adient. La tècnica de transferència de Western es va portar a terme seguint el protocol habitual descrit a la secció de Materials i mètodes de Carim-Todd *et al.*, 2003.

V. Caracterització dels anticossos: immunohistoquímica

Es van utilitzar seccions coronals de cervell de ratolí de 30 µm obtinguts sobre portaobjectes i guardats congelats fins el moment de ser usats. Es va tractar el teixit amb etanol 70%, 30 minuts, o amb metanol durant 10 minuts. Després dels rentats amb tampó fosfat (PBS) es va procedir a bloquejar les unions inespecífiques durant un temps mínim de 30 minuts. Les següents solucions de bloqueig es van utilitzar en diferents experiments: 4% llet descremada en pols, 5% sèrum de cabra, 2% homogenat d'escata de peix. Es van incubar les seccions amb l'anticòs primari corresponent diluït en el tampó de bloqueig, a 4°C durant 14 hores. L'excès d'anticòs es va eliminar amb 3 rentats de 5 minuts en PBS amb 0.1% Tween a temperatura ambient. Aleshores es va procedir a l'incubació amb anticòs secundari fluorescent diluït en solució de bloqueig durant 2 hores a temperatura ambient i a les fosques. Les unions inespecífiques es van eliminar mitjançant 3 rentats amb PBS-0.1% Tween com en el pas anterior. Els nuclis de les cèl·lules es van tenyir amb DAPI i els portaobjectes van ser muntats utilitzant Vectashield (Vector) com a medi de muntatge. Les seccions van ser observades amb microscopi de fluorescència, van ser capturades i posteriorment editades amb Photoshop (Adobe).

VI. Obtenció d'extractes de cervell i seccions per immunohistoquímica

Es van sacrificar ratolins a diferents estadis de desenvolupament. Es van extreure els cervells i es van congelar immediatament aquells dirigits a l'obtenció de seccions. En el cas de l'obtenció d'extractes totals, es va separar el cerebel de la resta del cervell i es van disgregar amb un homogeneïtzador elèctric en tampó de lisi (20mM TrisHCl, 150mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, antiproteàsics). Es van mantenir congelats fins el moment de la seva utilització.

VII. Immunoprecipitació

Es van obtenir extractes de cèl.lules COS transfectades amb LERN1-Flag en tampó de lisi per immunoprecipitar (1% Tritó X-100, 20mM TrisHCl, 150mM NaCl, 5 mM EDTA) amb agents antiproteàsics. Es van formar els complexos antigen-anticòs incubant a 4°C, durant 16 hores i en rotació suau, els extractes de cèl.lules transfectades amb la dilució corresponent de l'anticòs precipitador. Es va preparar la proteïna G acoblada a boles de sefarosa al 50% i es va afegir a cada mostra. Es van incubar durant 5 hores a 4°C i en rotació suau. Possibles interaccions inespecífiques es van eliminar amb rentats en tampó fosfat (PBS). Els complexos sefarosa-anticòs-antigen es van precipitar per centrifugació i es van resuspendre en tampó de càrrega amb SDS, es van desnaturalitzar i es van resoldre en gel de poliàcrilamida al 10%. Després de la transferència a membrana de niló, la detecció de proteïna LERN1-Flag precipitada es va realitzar amb l'anticòs monoclonal antiFLAG M2 dil. 1/1500 (Sigma) i amb antiLERN1-GST IgG dil. 1/750 i posterior detecció quimioluminiscent (PIERCE).

VIII. Purificació d'anticossos per afinitat

Es van utilitzar columnes HiTrap NHS-activada (Amersham-Pharmacia Biotech). En primer lloc es va immobilitzar l'antigen (LERN1-GST o el pèptid LERN1) a la columna. Es va seguir el protocol recomanat pel fabricant. Es va dialitzar i filtrar l'antigen (entre 0.7 i 1 mg total) en tampó d'unió (0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl pH8.3) amb columnes Centricon YM-30 (Millipore) i filtres de 0.45

μm . Es va incubar en la columna durant 30 minuts a temperatura ambient. L'eliminació d'unions inespecífiques i inactivació de grups NHS no units a l'antigen es va realitzar amb els tampons A (0.5M etanolamina, 0.5M NaCl pH 8.3) i B (0.1M acetat sòdic, 0.5M NaCl pH 4). Es va neutralitzar la columna amb tampó fosfat (PBS) pH 7.4. Prèviament a l'adsorció de l'anticòs a la columna, es va dialitzar el sèrum amb PBS i columnes Centricon Plus-20 (Millipore) i es va filtrar a través de porus de 0.45 μm . Es va aplicar l'anticòs a la columna amb una incubació de 15 minuts a temperatura ambient. Després dels rentats corresponents en PBS, es va eluir l'anticòs de la columna amb tampó d'elució (100mM glicina/HCl pH 2.7). A cada alíquota d'anticòs s'hi van afegir 10% de 1M Tris pH 8 i 500 $\mu\text{g/ml}$ d'albumina sèrica bovina (BSA) per tal de neutralitzar l'acidesa de la solució i estabilitzar les molècules d'anticòs.

