

Estudis estructurals i enzimàtics de la Uroporfirinogen III Sintasa humana. Bases moleculars de la Porfíria Eritropoiètica Congènita

Arola Fortian Bernabeu

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

III. Material i mètodes

ÍNDIX

III.1. Clonació i obtenció de mostres pures dels enzims humans PBGD i U3S.....	41
III.1.1. Mètodes generals.....	41
III.1.2. Clonació del fragment d'ADN codificant per la PBGD.....	46
III.1.3. Expressió de les proteïnes PBGD i U3S en medis bacterians.....	51
III.1.3.1. Cultius d' <i>E. coli</i> i cèl·lules competents.....	51
III.1.3.2. Expressió de proteïnes en <i>E. Coli</i>	51
III.1.4. Purificació de les proteïnes U3S i PBGD.....	52
III.1.4.1. Purificació de la U3S.....	52
III.1.4.1.1. Càlcul dels rendiments d'expressió dels mutants de la U3S.....	53
III.1.4.2. Purificació de la PBGD.....	54
III.2. Estudis d'interacció <i>in vitro</i> dels enzims PBGD i U3S mitjançant la RMN.....	56
III.3. Determinació de l'activitat enzimàtica de la U3S salvatge i dels enzims mutants...57	57
III.4. Determinació de l'estabilitat cinètica de la U3S salvatge i dels enzims mutants.....58	58
III.4.1. Breu introducció al dicroisme circular.....	58
III.4.2. Mesures d'estabilitat amb DC.....	59
III.5. Difusió dinàmica de la llum (DLS).....	61
III.6. Cultius cel·lulars eucariotes.....	63
III.6.1. Cultius cel·lulars.....	63
III.6.1.1. Línies cel·lulars emprades.....	63
III.6.1.2. Tripsinització.....	64
III.6.1.3. Recompte de cèl·lules.....	65
III.6.2. Transfecció.....	66
III.6.2.1. Vectors i constructes.....	66
III.6.2.2. El procés de transfecció.....	68
III.6.3. Anàlisi de proteïna per immunotransferència de proteïnes.....	69
III.6.3.1. Lisis cel·lular.....	70
III.6.3.2. Quantificació per Bradford de la proteïna total.....	70
III.6.3.3. Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	71
III.6.3.4. Immunotransferència.....	71
III.6.4. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant PCR a Temps Real Quantitativa.....	72
III.6.5. Immunofluorescència.....	75
III.6.5.1. Obtenció de mostres.....	75
III.6.5.2. Tinció indirecta amb anticossos i obtenció d'imatges.....	77
III.6.6. Xaperones químiques i inhibidor del proteasoma.....	77
BIBLIOGRAFIA CAPÍTOL III.....	82

III.1. CLONACIÓ I OBTENCIÓ DE MOSTRES PURES DELS ENZIMS HUMANS PBGD I U3S

En la present tesi doctoral s'ha treballat amb els enzims recombinants PBGD i U3S humans. Com ja s'ha comentat en la introducció, la porfobilinogen desaminasa i la uroporfirinogen III sintasa són dos enzims essencials per a la biosíntesi del grup hemo, que catalitzen de manera seqüencial la formació de la biomolècula uroporfirinogen III a partir de quatre molècules de porfobilinogen. Degut a que el substrat de la U3S, el preuroporfirinogen, és inestable, és necessari treballar amb la proteïna predecessora en la síntesi del grup hemo, la PBGD, per poder determinar l'activitat enzimàtica relativa de l'enzim U3S.

L'estratègia a seguir per a l'obtenció de les mostres pures de les proteïnes porfobilinogen desaminasa (PBGD) i uroporfirinogen III sintasa (U3S) es basa en tècniques d'ADN recombinant, amb les quals és possible aïllar i manipular un fragment d'ADN d'un organisme per introduir-lo en un altre organisme (hoste). En aquest cas, els fragments d'ADN contindran la informació necessària per a l'obtenció dels enzims PBGD i U3S humans, mentre que l'organisme hoste encarregat de l'expressió d'aquestes proteïnes serà la soca bacteriana *E. coli* BL21(DE3)¹.

L'enzim PBGD ha sigut obtingut a partir del producte gènic de l'ADNc (ADN complementari: molècula d'ADN sintetitzada com a resultat de la còpia d'una molècula d'ARN per l'enzim transcriptasa inversa) inserit en el vector d'expressió pETM-11, mentre que l'ADNc corresponent al gen de l'enzim U3S ha sigut proporcionat pel laboratori del Professor J. Phillips de la Universitat de Utah, USA.

III.1.1. Mètodes generals

- a) Per al creixement independent de clons de cèl·lules s'utilitza un medi sòlid que en limita la mobilitat. El procediment general per preparar **plaques d'agar amb antibiòtic** és el següent: s'esterilitza el medi de Luria-Bertani (composició per L de cultiu: 10 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat, 5 g de NaCl, 15 g d'agar bacteriològic, pH en solució de 7 ± 0.2 a 25 °C; Pronadisa # 1083.00), LB agar, s'esterilitza a 120 °C durant 20 min. S'afegeix l'antibiòtic un cop el medi s'ha refredat però abans de que es solidifiqui, en el cas de ampil·lina ($C_{16}H_{18}N_3O_4SNa$; Sigma # A9518; pes molecular 371.39) a 100 mg/mL, mentre que en el cas de la kanamicina A ($C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$; Sigma-Aldrich # 70560-51-9; pes molecular 582.57712) a 50 mg/mL. Es distribueix el medi en plaques de Petri (20 mL per placa). S'inoculen cultius molt diluïts i es fan créixer a 37 °C. Passades 10 hores les colònies comencen a ser visibles.

- b) Preparació de **cèl·lules competents** per a la posterior introducció de material genètic: s'inoculen 3 mL de medi LB amb les cèl·lules d'interès i s'incuben tota la nit a 37 °C. Es barreja l'inòcul amb 500 mL de medi SOB (Pronadisa # 1541.00; 20 g/L de bacto-triptona, 5 g/L d'extracte cel·lular, 0.5 g/L de NaCl, 0.186 g/L de KCl, 10mM de MgCl₂ i 10 mM de MgSO₄) i s'incuba el cultiu a 30 °C fins que l'absorbància a 600 nm és aproximadament 0.5±0.1. Es posa el cultiu en gel durant 10 min (en els passos successius es manté la suspensió cel·lular en gel sempre que sigui possible). Es centrifuga el cultiu durant 10 min a 1000g i a una temperatura de 4 °C. Es solubilitza amb cura el sediment amb 100 mL de solució tampó TB prèviament refredat en gel: HEPES (Sigma # H3375) 10 mM pH 6.7; CaCl₂ (Fluka # 06991) 15 mM; MnCl₂ (Fluka # 63063) 55 mM i KCl (Scharlau # 7447-40-7) 250 mM). S'incuba la suspensió cel·lular en gel durant 10 min. Es centrifuga durant 10 min a 1000g i a una temperatura de 4 °C. Es solubilitza amb cura el sediment amb 18.6 mL de solució tampó TB prèviament refredat amb gel, i s'afegeixen 1.4 mL de DMSO (Sigma # D8418, pes molecular 78.3). S'incuba la suspensió cel·lular en gel durant 10 min. Es divideix la suspensió cel·lular en alíquotes de 600 µL. Es congelen ràpidament les alíquotes en nitrogen líquid i s'emmagatzemen a -80 °C.
- c) La **transformació de cèl·lules competents amb plasmidis exògens** s'ha dut a terme com es detalla a continuació: es descongelen 50 µL de cèl·lules competents dipositant-les durant 5 min en gel. Seguidament s'afegeixen 2 µL de la solució de plasmidi (concentració mínima en ADN 100 ng/µL); es deixen en gel 30 min. Es realitza un xoc tèrmic: s'escalfa la mostra a 42 °C (ja sigui amb l'ajut d'un bloc tèrmic o en bany d'aigua milli Q) durant 50 seg. Seguidament, la mostra es torna a posar en gel durant 2 min. Aquest pas facilita que els vectors penetrin a l'interior de la cèl·lula. Tot seguit es du a terme l'expressió fenotípica: s'afegeix 1 mL de medi SOC a la barreja de cèl·lules i vectors, i es posa a incubar a 37 °C, 180 rpm, durant 1 h. Es dipositen 150 µL de la barreja de cèl·lules, plasmidis i medi SOC en una placa d'ampicil·lina, i amb l'ajut d'una nansa de Digralsky s'estén de forma homogènia per la superfície de la placa. Es manté la placa a 37 °C durant tota la nit.
- Un resultat positiu de la transformació implica l'aparició de colònies que creixen a la superfície del medi de la placa. Si la quantitat de cèl·lules i ADN és l'adequada, aquestes colònies estaran prou separades entre sí i, donat que cada colònia prové d'una sola cèl·lula bacteriana, totes les cèl·lules que formen la colònia tindran el mateix material genètic que la cèl·lula de la qual provenen.
- d) Per quantificar i comprovar la puresa de l'ADN plasmídic es sol realitzar una **electroforesi en gel d'agarosa** on es carrega tant les mostres d'interès com un marcador de pes molecular. Aquesta tècnica s'utilitza per separar i quantificar de fragments d'ADN en funció de la seva mida i tipus (cadena simple o doble, circular o lineal). És possible també emprar aquesta tècnica amb finalitats preparatives per aïllar i purificar fragments d'ADN. En tots els casos, la concentració d'agarosa utilitzada per la preparació dels gels fou de l'1%. El

procediment és el següent: es dissolen 0.5 g d'agarosa en 50 mL de solució tampó TAE 1X [4.84 g de Tris Base (Sigma # T1503; $C_4H_{11}NO_3$; pes molecular 121.14), 1.142 g Àcid Acètic glacial (Panreac # 131008.1211, $C_2H_4O_2$, densitat de 1.050 a 20 °C, 99.7% de puresa), 2 mL d'EDTA (0.5 M) ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$; àcid etilendiaminotetraacètic; Sigma # E7889; pes molecular 336.21), 98 mL d'aigua milli Q, pH 8.0]. Es deixa refredar la solució sense que arribi a solidificar, i s'afegeixen 0.75 μ L de una solució 10 mg/mL de bromur d'etidi (agent fluorescent que s'intercala entre les bases nitrogenades i és visible quan s'il·lumina amb llum UV). S'aboca la solució en una cubeta d'electroforesi, en la qual s'ha col·locat una pinta per formar 10 pous, i es deixa refredar fins a la seva completa polimerització. Es retira la pinta amb precaució i es submergeix el gel en la cubeta d'electroforesi que conté solució tampó TAE 1X. Càrrega del gel: a) 5 μ L de marcador de pes molecular (1 Kb o 10 Kb; Biotools), que conté fragments creixents d'ADN des de 250 pb fins a 10 Kb, a més d'1 μ L de solució tampó de càrrega d'ADN 6X, i b) fins a un màxim de 25 μ L de mostra per pou del gel, amb solució tampó de càrrega d'ADN 6X. El gel es resol a 90 V, i s'atura el corrent quan el front blau del colorant (blau de bromofenol) està arribant al fons de la cubeta. El temps aproximat sol ser entre 20 i 45 min, depenent del grau de resolució que es busqui i la mida de les bandes a separar.

Tot i l'efectivitat del bromur d'etidi en el marcatge de material genètic, el seu ús en l'àmbit laboral resulta perillós per a la salut i per al medi ambient. Aquest compost permet detectar seqüències de nucleòtids degut a que s'intercala entre les bases nitrogenades, emetent fluorescència a la regió de l'ultraviolat, suposant un doble risc per a la salut: primer, aquesta intercalació és llargament perdurable en el temps, i per tant, es tracta d'un agent altament mutagènic; i segon, el fet d'emprar llum ultraviolada també resulta perillós per a la salut degut al seu poder mutagènic. Actualment existeix al mercat un compost capaç de marcar el material genètic, però amb un efecte mutagènic menor que en el cas de l'EtBr: el tint de gels d'ADN SYBR[®] Safe (Invitrogen # S33102). La sensibilitat de detecció del SYBR[®] és comparable a la que s'obté amb el EtBr, amb una fluorescència màxima d'excitació a 280 i 502 nm, i un màxim d'emissió a 530 nm.

- e) **Preparació i resolució d'electroforesi SDS-PAGE, en gels desnaturalitzants de 10% de poliacrilamida.** La separació de proteïnes en gels desnaturalitzants depèn exclusivament del seu pes molecular. Prenent com a referència un marcador de pesos moleculars, es pot estimar la mida de la proteïna d'interès. En el cas de la present tesi s'han emprat el marcador de pes molecular d'Invitrogen, Mark12[™] (núm. cat.LC5677), i el marcador *Dual Color* de BioRad (núm. cat.161-0374).

A més, en aquest tipus de gels, també és possible realitzar una quantificació aproximada en la banda si s'utilitza un marcador de concentració de proteïna conegut. Els gels al 10% de poliacrilamida no comercials utilitzats en la present tesi es divideixen en dues parts, que contenen concentracions diferents de polímer: la part del gel concentrador, de menor

concentració d'acrilamida, i el gel separador. Per preparar un total de quatre gels, calen les següents solucions i reactius:

<i>Solucions i reactius</i>	<i>Gel separador</i>	<i>Gel concentrador</i>
30% acrilamida / 0.8% bisacrilamida	6.52 mL	1.56 mL
Tris base/SDS pH 8.45^a	6.64 mL	2.98 mL
Aigua Millipore	4.68 mL	7.47 mL
Glicerol 100%	1.65 mL	-
10% (m/v) persulfat amònic^b	120 µL	120 µL
TEMED^b	120 µL	12 µL

^a Concentració final 3 M Tris base, 0.3% SDS pH 8.45

^b S'afegeix al final de la reacció.

Taula III.1. Reactius i solucions per preparar 4 gels de poliacrilamida al 10% d'agarosa.

El solució tampó de càrrega reductor 10X que s'afegeix a les mostres està format per 4.8 mL de glicerol 100%, 9 mL de solució tampó 2 M Tris-HCl pH 8.45, 1.6 g de SDS, 30 mg blau de bromofenol, 1 mL de β-mercaptoetanol, 5.2 mL d'aigua milli Q. La dissolució superior per a l'electroforesi està formada per 100 mM Tris base, 100 mM Tricina, 0.1% SDS i aigua milli Q, mentre que la dissolució inferior per a l'electroforesi està formada per 200 mM Tris base.

La composició de la dissolució per tenyir gels està formada per: la dissolució de Blau Brillant (1 g de Blau Brillant R250, 25 mL de metanol, CH₃OH, 5 mL d'àcid acètic glacial), a sobre de la qual s'afegeixen 500 mL de metanol, 100 mL d'àcid acètic glacial i 370 mL d'aigua milli Q.

En cada pou del gel es carreguen entre 20 i 25 µL de mostra amb solució tampó de càrrega, i el gel es resol a un voltatge de 120 V. El voltatge es pot augmentar fins a 220 V quan l'electroforesi SDS-PAGE es porta a terme a 4 °C.

Un cop el blau de bromofenol arriba a la part inferior del gel, s'atura el camp elèctric i es submergeix el gel en la dissolució per tenyir gels durant 20 min amb agitació. Passat aquest temps s'elimina l'excés de colorant deixant el gel amb solució per revelar gels i agitació, fins que es distingeixen les bandes de proteïnes. Per preparar 1 L de dissolució per a revelar gels calen 100 mL de metanol, 100 mL d'àcid acètic glacial i 800 mL d'aigua milli Q.

- f) Per la **determinació de la concentració de proteïna** s'utilitza el mètode de l'absorbància mesurada a 280 nm. Aquesta detecció té l'avantatge de ser econòmica i ràpida, però per contra és inespecífica, ja que qualsevol contaminant d'origen proteic és susceptible d'alterar-ne el valor.

La concentració de proteïna es determina a partir de la llei de Lambert-Beer. El càlcul del coeficient d'extinció s'ha dut a terme segons els autors Pace i Gray,² tot i que pot ser calculat a partir d'altres valors similars.³

$$\epsilon = 5500n_W + 1490n_Y + 125n_C \quad \text{Equació III.1}$$

on n_W , n_Y i n_C són el número de triptòfans, tirosines i cisteïnes de la proteïna. Un cop calculat el valor de l'èpsilon (ϵ) per a mostres peptídiques, es determina la concentració de proteïna:

$$A_\lambda = \epsilon \cdot c \cdot l; \quad \text{Equació III.2}$$

on A_λ és l'absorbància mesurada a λ nm; ϵ és el coeficient d'extinció*: ϵ_{PBGD} (280 nm) = $15970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ϵ_{U3S} a 280 nm = $25410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; c és la concentració molar de proteïna, i l és la longitud en cm de la cubeta, en el cas de la cubeta Hellma[®] de quars és d'entre 0.2 i 1 cm.

Un mètode alternatiu consisteix en utilitzar la tecnologia NanoDrop (en concret en el present estudi s'ha fet servir el model NanoDrop ND-1000, de NanoDrop Technologies), que permet l'anàlisi de volum 2 μL , mitjançant el qual s'obtenen els valors equivalents d'absorbància de les mostres.

- g) L'**esterilització** dels medis de cultiu líquids comporta autoclavar-los a 20 min a 120 °C abans de la seva utilització, així com la resta de material que és utilitzat en el creixement.
- h) Obtenció de mutants patogènics de la U3S mitjançant **mutagènesi dirigida**.^{4, 5} S'ha emprat el *kit* QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene #200516). Per a cada reacció de mutació es preparen:
- 5 μL del tampó de reacció 10X
 - 10 ng d'ADN motlle
 - 125 ng de l'encebador 1 (el llistat a la Taula III.2)
 - 125 ng de l'encebador 2 (l'encebador complementari als llistats a la Taula III.2)
 - 1 μL de la barreja de dNTP
 - 3 μL de la solució QuikSolution
 - Aigua desionitzada i estèril fins a un volum de 50 μL
 - 1 μL d'ADN polimerasa *Pfu Turbo* (2.5 U/ μL)

El programa de PCR emprat consisteix en els següents passos:

1. Desnaturalització a 95 °C (1 min).
2. Desnaturalització a 95 °C (50 s).
3. Hibridació dels encebadors amb les cadenes motlle a 50 °C (50 s).
4. Elongació de les cadenes per la polimerasa *Pfu Turbo*[®] a 68 °C (12 min).

5. Repetició consecutiva dels passos 2-4 17 vegades.

6. Finalització de la síntesi de noves cadenes a 68 °C (7 min).

Finalment es digereix la reacció d'amplificació amb 1 µL de l'enzim DpnI, durant 2h a 37 °C.

Mutant	Encebador ^(a) (5'-seqüència-3')	Codó U3S salvatge
V3F	ATGAAG TTT CTTTACTGAAGGATGCGAAGGAAGATGACTGTGG	GTT
L4F	ATGAAGG TTTT TTACTGAAGGATGCGAAGG	CTT
Y19C	CTGTGGCCAGGATCCG TG TATCAGGGAATTAGG	TAT
S47P	GTCTCTTCCCAGTTT CC TGAGAAGCTTTCTCATCCTGAAGATTACGG	TCT
P53L	CTCTGAGAAGCTTTCTCAT CTT GAAGATTACGGGGGACTC	CCT
T62A	GGGGGACTCATT TTT GCCAG CCC CAGAGCAGTGG	ACC
A66V	CCAGCCCAGAG TAG TGGAAGCAGCAGAG	GCA
A69T	ACCAGCCCAGAGCAGTGGAA AC AGCAGAGTTATGTTTGG	GCA
C73R	GCAGTGGAAAGCAGCAGAGTTA CG TTTGGAGCAAAAACAATAAAACT	TGT
E81D	GGAGCAAAAACAATAAAACT GAC GTCTGGGAAAGGTCTCTG	GAA
V82F	GGAGCAAAAACAATAAAACTGA ATT CTGGGAAAGGTCTCTG	GTC
V99A	GCCAAGTCAGTGTATGT GCT GGAATGCTACTGC	GTT
A104V	GTGGTTGGAAATGCTACT GTT TCTCTAGTGAGTAAAATTGGCC	GCT
I129T	AAGCTTGAGAATATA ACT TGTTCCAGG	ATT
H173Y	CAGACAGTTGCAT ACC CAGGAATCCAAG	CAC
Q187P	TACTATTCCCAG CCG GGGGTTCCAGCCAGC	CAG
G188R	CAGTACTATTCCCAGCAG AGG GTCCAGCCAGCATCAC	GGG
G188W	TACTATTCCCAGCAG TGG GTCCAGCCAGC	GGG
S212P	CAGTCTCAAGCACATTCAGGAGTTA CCT GGTGACAATATCGATC	TCT
I219S	CTGGTGACAATATCGATCAAAGTA AG TTTGCAGCCATCGGCCCC	ATT
G225S	GTTTGCAGCCATC AG CCCCACTACGGCTCGCGCGCT	GGC
T228M	GCCATCGGCCCCACT ATG GCTCGCGCGCTGGCCGCC	ACG
G236V	GCCGCCAG GT CCTTCTGTAAGCTGCACTGCAGAGAG	GGC
L237P	GCCGCCAGGG CC CTCCTGTAAGCTGCACTGCAGAGAG	CTT
P248Q	GAGAGCCCCACG CA ACAAGCCCTGGCCAC	CCA

Taula III.2. Encebadors utilitzats en la generació de mutants de la U3S. En negreta es detallen els codons mutats.

III.1.2. Clonació del fragment d'ADN codificant per la PBGD

L'estratègia per obtenir el gen de la PBGD en un plasmidi d'expressió bacteriana passa per aconseguir-ne l'ADNc. Amb aquesta finalitat, s'ha treballat amb tres construccions per tal d'obtenir el gen de la PBGD. Els *encebadors* (oligonucleòtids que hibriden amb un fragment de

la seqüència d'ADN) emprats per la clonació de la PBGD estan preparats a una concentració 25 µM, i es troben detallats a la taula iii.3:

NOM	ENCEBADORS (dianes d'inserció)
T7prom	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7term	5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
M13(-21)	5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'
M13invers	5'-AACAGCTATGACCATG-3'
PBGDpETM-11d	5'-TCA <u>CCATGG</u> CAATGTCTGGTAACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAGG-3' NcoI
VP1.5	5'-GGACTTTCCAAAATGTCG-3'
XL39	5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGGG-3'
HPBGDinvers	5'-GGGG <u>AAGCTT</u> TTAATGGGCATCGTTAAGCTGC-3' HindIII
Variant_inversa	5'-CTT <u>CTTAAG</u> TTAATGGGCATCGTTAAGCTGCCGTGC-3' EcoRI
228	5'- CGC <u>GAATTC</u> ATGAAGGTTCTTTACTGAAG -3' EcoRI
229	5'- CCC <u>GCGGCCGC/GTCGAC</u> TCAGCAGCAACCATGGGGCTG -3' NotI / Sall
230	5'- CGC <u>GTCGAC</u> GCAACCATGGGGCTGGAG -3' Sall

Taula III.3. Seqüències dels encebadors utilitzats en les diverses amplificacions realitzades al llarg del present treball, així com de les dianes per als diversos enzims de restricció.

1) Construcció pT7T3D-Pac-PBGD

- Origen: Unitat de Transcriptòmica del Parc Científic de Barcelona, UT-PCB).
- Amplificació biològica del material genètic de partida: el clon de la PBGD humana es troba inserit dins del vector pT7T3D-Pac (Pharmacia®) resistent a ampicil·lina, i clonat en la soca bacteriana *E. coli* BL21(DE3). S'agafa 1 mL d'aquests bacteris i se'ls afegeixen 50 mL de medi LB de Lennox i 50 µL d'ampicil·lina 100 mg/mL. El conjunt es posa a créixer en un agitador orbital a 37 °C i 200 rpm durant tota la nit. Un cop finalitzat aquest temps, es fa una extracció de l'ADN plasmídic del cultiu mitjançant el *kit* de QIAGEN *Plasmid Midi/Maxi* 09/2000.

- Seqüenciació automàtica de l'ADN: seguint el protocol *ABI PrismTM BIGDYE[®] Terminator V3.1*, es preparen les mostres per seqüenciar al Servei de Seqüenciació del Parc Científic de Barcelona amb els oligonucleòtids T7prom i M13(-21), detallats a la Taula III.3.

2) Construcció pCMV6-XL4-PBGD

- Origen: Origen[®].
- Amplificació biològica del clon pCMV6-XL4-PBGD d'Origen[®] (1700 pb): es preparen plaques de cultiu amb antibiòtic ampicil·lina a una concentració final de 0.1 mg/mL. Es transforma la construcció pCMV6-XL4-PBGD en cèl·lules d'*E. coli* DH5 α .⁶ Un cop s'obtenen les colònies de la transformació, es preparen 10 cultius amb 5 mL de medi LB i 5 μ L d'ampicil·lina 100 mg/mL cadascun d'ells, i s'afegeix el material cel·lular provinent d'una colònia diferent a cadascun dels tubs. Els cultius es fan créixer en un agitador orbital a 37 °C i 180 rpm, durant tota la nit. Per a extreure l'ADN plasmídic, es centrifuga el cultiu, i es tracta el sediment amb el *kit* de QIAGEN per a extreure i purificar ADN plasmídic.
- Seqüenciació automàtica de l'ADN: emprant els encebadors VP1.5 i XL39 (Taula III.3), la seqüenciació ha estat realitzada al Servei de Seqüenciació del CSIC de Barcelona, mitjançant el *kit* convencional *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit* i el seqüenciador model 3730 *DNA Analyzer Biosystems*.

3) Construcció pENTR(tm)221-PBGD

- a) Origen: Invitrogen[®].
- b) Amplificació biològica del plasmidi pENTR(tm)221-PBGD: el gen de la PBGD humana està inserit en el vector pENTR(tm)221, resistent a kanamicina. Per a obtenir còpies del ADN genòmic, el protocol a seguir és el mateix que a l'amplificació biològica de l'apartat III.1.2.b, però emprant kanamicina A com a antibiòtic, a una concentració final de 25 μ g/mL.
- c) Seqüenciació del fragment corresponent a la PBGD del plasmidi pENTR(tm)221: protocol descrit a l'apartat III.1.2.1, emprant els encebadors M13(-21) i M13invers (veure taula iii.3).
- d) Amplificació del fragment codificant per a la PBGD humana (HPBGD-361invi): mitjançant els encebadors PBGDpETM-11d i HPBGD_invers (taula iii.3) es realitza una amplificació

del clon de la PBGD per PCR (reacció en cadena de la polimerasa), les condicions de les quals es detallen a la Taula III.4.

Reactius	Volum (μL)
Solució tampó polimerasa 10X (Biotools)	5
MgCl_2 (50 mM)	2
DMSO (Sigma #D8418)	3
dNTPs (10 mM)	1
Encebador PBGDpET-11d (25 μM)	0,8
Encebador HPBGD_invers (25 μM)	0,8
Clon de la PBGD (50 ng/ μL)	1
ADN polimerasa (Biotools) (5U/ μL)	0,25
H_2O MilliQ	36,15
Volum final	50

Taula III.4. Condicions de reacció de la PCR.

El programa de PCR utilitzat en el termociclador *Mini CyclerTM MJ research* (model PTC-150; amb placa escalfadora *Hot bonnetTM*) es compon de 36 cicles de:

- Desnaturalització a 96 °C (30 s)
- Hibridació dels encebadors amb les cadenes motlle a 50 °C (1 min)
- Elongació de les cadenes per part de la polimerasa *Taq*, a 72 °C (3 min)

- e) Purificació del producte de PCR mitjançant gel d'agarosa a l'1%: es carrega tot el volum de la PCR (25 μL per pou) al gel. El gel es resol seguint el procediment de l'apartat III.1.1.d. Seguidament es retallen les bandes de la mida esperada (uns 1000 pb) i es purifiquen emprant el *kit* de QIAGEN "QIAquick Gel Extraction Kit".
- f) Digestió del fragment d'ADN purificat del gel d'agarosa, amb els enzims *NcoI* i *HindIII*. La digestió es porta a terme amb les següents condicions: 5 μL de tampó número 2 (10X de Biotools), 1,5 μL de cada enzim, 42 μL de la reacció de PCR; es deixa 2h a 37 °C. La inactivació dels enzims de restricció consisteix en escalfar la barreja de reacció a 65 °C durant 20 min.
- g) Amplificació biològica del plasmidi pETM-11 i digestió amb els enzims *NcoI* i *HindIII*. El vector pETM-11⁷ és un vector d'expressió de 6029 pb (veure Figura III.1). Presenta un origen de replicació d'*E. coli* (ori) i un promotor del tipus T7lac, la qual cosa vol dir que està format per la fusió de l'operó lac i el promotor de la T7 ARN polimerasa. El vector codifica pel repressor lac (*lacI*) i es portador del gen de resistència a kanamicina[®]. Presenta, a més, una cua d'histidines o His-Tag[®] (cua d'histidines, facilita entre d'altres, la purificació per columna de níquel) en la regió N-terminal del vector (la zona més propera al promotor de la regió de clonació del vector). Per poder separar la seqüència

d'histidines del pèptid expressat, aquest vector presenta entre la seqüència de nucleòtids que codifica per a la His-Tag[®] i el fragment d'ADN d'interès, una diana de digestió per TEV (enzim que reconeix una seqüència de set aminoàcids i genera un tall en l'enllaç peptídic). L'amplificació biològica del plasmidi es realitza segons el protocol descrit a l'apartat III.1.2.1, mentre que per a la digestió s'utilitzen enzims de Biotools.

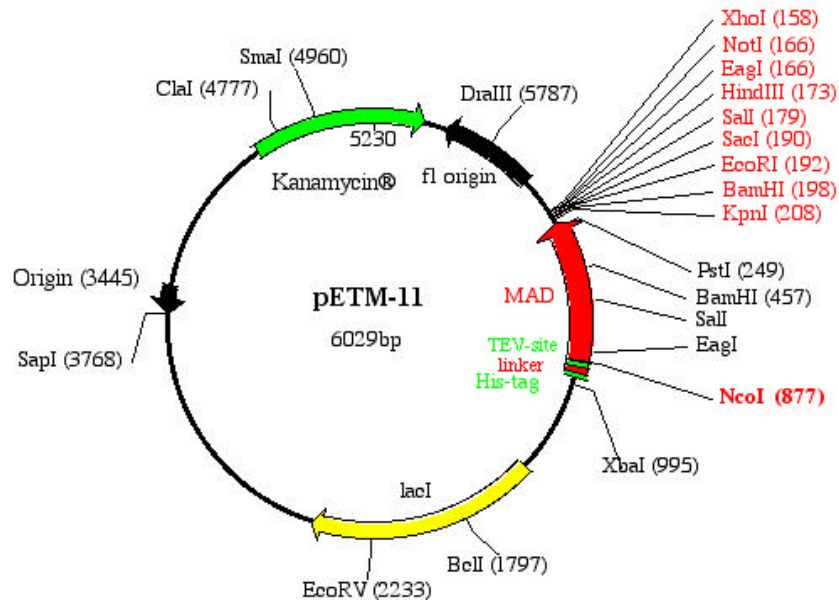


Figura III.1. Esquema del vector pETM-11 (EMBL), modificació del plasmidi pET-24d amb la seqüència MAD inserida.

- h) Lligació del vector pETM-11 amb el fragment d'ADN HPBGD-361invi, utilitzant la lligasa T4 (Fermentas, #EL0014) seguint el protocol de la casa comercial:
- 90 ng de vector pETM-11.
 - 2 µL de tampó T4 de lligasa d'ADN a 10X.
 - 1 µL de lligasa d'ADN T4.
 - Tres relacions molars d'insert respecte al vector: 1:1, 3:1, 6:1.
 - Les reaccions de lligació es deixen a temperatura ambient (20-25 °C) durant tota la nit.
- i) Amplificació i purificació de l'ADN lligat: es barregen els 20 µL de la reacció de lligació amb 200 µL de cèl·lules competents *E. coli* DH5α i es transformen, seguint el protocol de transformació descrit a l'apartat III.1.1.c. La posterior extracció de l'ADN plasmídic de les construccions pETM-11-HPBGD-361invi es fa mitjançant el *kit* de QIAGEN (QIAGEN[®] Miniprep).
- j) Seqüenciació automàtica de la construcció pETM-11-HPBGD-361invi: es fa servir un protocol idèntic al descrit a l'apartat III.1.2.1, emprant els encebadors T7prom i T7term (Taula III.3).

III.1.3. Expressió de les proteïnes PBGD i U3S en medis bacterians

S'han utilitzat dos medis per a l'expressió de les proteïnes U3S i PBGD. El primer d'ells és el medi de Luria-Bertani (LB), de composició 10g/L de Triptona, 5 g/L d'extracte de llevat i 5 g/L de NaCl (pH en solució de 7 ± 0.2 a 25 °C). La solució s'autoclava per a la seva esterilització a 121 °C i a 1 atm de sobrepressió durant 20-30 min. Els antibiòtic de selecció s'afegeix un cop el medi es refreda ja que són termolàbils. La concentració final de l'antibiòtic és de 0.1 mg/mL per a l'ampicil·lina i de 25 µg/mL per a la kanamicina.

El segon medi utilitzat és el Medi Mínim, que permet obtenir proteïnes marcades isotòpicament gràcies a la possibilitat d'emprar $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, D_2O i glucosa marcada amb ^{13}C . El Medi Mínim està format pel medi M9 (6 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 5 g de NaCl i 1 g/L de NH_4Cl o $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$), les vitamines 0,5% (p/v) de Tiamina (Pes molecular 337.27, Sigma-Aldrich #T4625), 0.5% (p/v) de Biotina (Pes molecular 244.31, Sigma-Aldrich #B4639), i enriquit amb 1 M de MgSO_4 , 0.1 M de CaCl_2 i 3 g/L de glucosa. L'esterilització del Medi Mínim també es porta a terme mitjançant autoclau, excepte en el cas de la glucosa, el MgSO_4 i el CaCl_2 que s'afegeixen a la solució final un cop filtrats amb un filtre de 0.22 µm *a posteriori* per evitar la seva precipitació durant el procés d'esterilització.

III.1.3.1. Transformació cel·lular amb plasmidis

Seguint el protocol descrit a l'apartat III.1.1.c es transformen els plasmidis portadors del fragment codificant per a les proteïnes U3S i PBGD. En el cas de la U3S, el vector on es troba clonat el gen proporciona resistència per a l'antibiòtic ampicil·lina, així que els cultius per obtenir aquesta proteïna es faran en medis amb presència d'ampicil·lina, mentre que en el cas de la construcció pETM-11-HPBGD-361invi la resistència de les cèl·lules transformades serà a l'antibiòtic kanamicina. La soca bacteriana escollida per a l'expressió de les proteïnes recombinants és *E. coli* BL21(DE3).¹

III.1.3.2. Expressió de proteïnes en *E. coli*

El protocol per a l'expressió de la proteïna **PBGD** (3.8 mg/L) en medi LB de Luria-Bertani és el següent: s'inocula una de les colònies transformades en la placa d'agar/kanamicina a un tub de creixement amb 5 mL de LB de Luria-Bertani i kanamicina (25 µg/mL). Es deixa créixer el cultiu durant 4-5 h, a 37 °C i agitació constant de 200 rpm. Passat aquest temps, s'aboca el medi a un erlenmeyer amb 50 mL de LB autoclavat i kanamicina (25 µg/mL). Quan aquests 50 mL guanyen terbolesa, es centrifuga el cultiu i el precipitat cel·lular es traspasa a 2 erlenmeyers autoclavats de 3 L de capacitat cadascun d'ells, amb 1 L de medi estèril LB i

kanamicina (25 µg/mL). Tapats amb paper d'alumini es posen a créixer a 37 °C, amb agitació de 200 rpm. Quan els cultius assoleixen una densitat òptica (A_{600}) de 0.7 ± 0.05 s'afegeix IPTG 0.5 mM (pes molecular 238.31, Sigma #I6758), i es deixen durant 3 h a 37 °C, amb agitació constant de 200 rpm. Un cop passat aquest temps, es centrifuguen els cultius a 4000g durant 30 min, s'elimina el sobrenedant i es congelen els sediments cel·lulars a -20 °C.

Per obtenir la proteïna **U3S** amb abundància isotòpica natural s'ha seguit el mateix protocol que per a la PBGD, però emprant ampicil·lina a 0.1 mg/mL de concentració final, i induint l'expressió de la U3S durant 12-16 h a 20 °C. Un cop passat aquest temps, es centrifuguen els cultius, s'elimina el sobrenedant i es congela el sediment cel·lular a -20 °C.

En el cas de les mostres de proteïna U3S isotòpicament enriquida, el procediment d'expressió varia lleugerament: es posen a créixer 4 mL de medi LB amb 0.1 mg/mL d'ampicil·lina a 37 °C i 180 rpm d'agitació, durant 5 h. S'afegeixen 100 µL d'aquest cultiu a 200 mL de medi mínim i es posa a créixer a 30 °C, 180 rpm fins assolir una densitat òptica a A_{600} de 1.0 unitats. Es centrifuguen les cèl·lules a 1500g durant 10 min, s'elimina el medi i es solubilitzen amb 20 mL de medi mínim isotòpicament enriquit amb $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Es reparteix equitativament la suspensió cel·lular entre 4 L de cultiu, i s'incuben a 37 °C, 180 rpm fins a assolir una densitat òptica a A_{600} de 0.5-0.7. L'expressió s'indueix afegint 0.5 mM d'IPTG per litre de cultiu, i es deixen produint la proteïna U3S durant 12 i 16 h a 20 °C. Un cop passat aquest temps, es centrifuguen els cultius, s'elimina el medi i es congelen els sediments cel·lulars a -20 °C.

III.1.4. Purificació de les proteïnes U3S i PBGD

Tots els protocols s'han realitzat a 4 °C per evitar al màxim la proteòlisis, i les mostres s'han concentrat fins a 5 µM i emmagatzemades a 4 °C. La quantificació total de proteïna s'ha dut a terme mesurant per espectrofotometria l'absorbància a 280 nm (A_{280}), emprant els coeficients d'extinció molar $25410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ per la U3S i $15970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ per la PBGD.⁸

III.1.4.1. Purificació de la U3S

En el cas de la U3S (massa molecular 31.1 kDa) la purificació s'ha dut a terme seguint el següent protocol:

- es centrifuga 1 L de cultiu a 4500g durant 20 min a 4 °C.;
- es solubilitza el sediment cel·lular amb 20 mL de Tampó A (20 mM de fosfat sòdic, 500 mM de NaCl, 5 mM d'imidazol, pH 7.4);

- es sonica (10 cicles d'1 min de ones ultrasòniques -0,8 i 80% d'amplitud- deixant 1 min de repòs entre cada cicle; tot el procés es fa en gel) i es centrifuga la barreja sonicada, 25000g, 40 min, 4 °C;
- es barreja el sobrenedant amb 4 mL de resina de Ni²⁺ (His-Tag Ni-NTA; Invitrogen; prèviament equilibrada amb el Tampó A) en una columna, deixant-ho en un agitador rotatori durant un mínim de 1 h, a 4 °C; posteriorment s'elueix de la columna la fracció no unida a Ni²⁺. Es renta la columna amb el Tampó A, i l'elució té lloc emprant el mateix Tampó amb 500 mM d'imidazol;
- la proteïna és aleshores purificada mitjançant una cromatografia d'exclusió molecular (Superdex™ 75; GE Healthcare) sota condicions isocràtiques (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0), a una velocitat d'elució de 1 mL per minut.

III.1.4.1.1. Càlcul dels rendiments d'expressió dels mutants de la U3S

Per al càlcul dels rendiments de les proteïnes mutants de la U3S, s'ha emprat el programa lliure PeakFit v4.12, que permet realitzar una deconvolució dels pics obtinguts en l'últim pas de purificació amb el FPLC, i comparar-los respecte als valors obtinguts de la proteïna salvatge. A partir del perfil cromatogràfic, el programa calcula les àrees dels pics que s'hi observen. En els casos en què el pic obtingut és en realitat la suma d'un seguit de pics, el programa permet calcular quin és l'aportació de cada pic al producte de l'àrea final (veure Figura III.2).

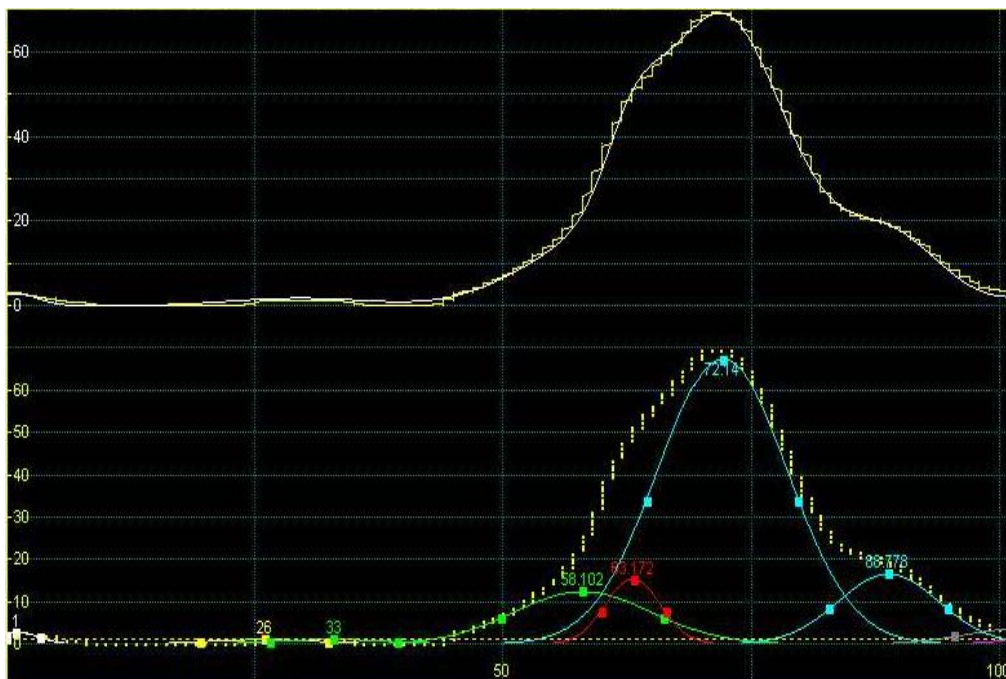


Figura III.2. Deconvolució d'un perfil cromatogràfic mitjançant el programa PeakFit v4.12.

En la part superior de la imatge s'observa un perfil cromatogràfic amb un pic central format per un solapament de diversos pics. El programa inicia una estimació de quantes espècies de la mostra estan formant l'àrea total (com s'observa en la part inferior de la imatge), i mitjançant un refinament manual s'obté quin és l'aportació de cadascuna d'elles.

III.1.4.2. Purificació de la PBGD

En el cas de la proteïna PBGD (Massa molecular 42.6 kDa) S'han emprat tres protocols diferents.

- **Protocol 1:**

- 1) Es solubilitzen de nou els sediments obtinguts de l'apartat **III.1.3.2**, amb 40 mL de solució tampó 100 mM KH_2PO_4 pH 8.0, 2 mM EDTA.
- 2) S'apliquen 10 cicles de 1 min de ones ultrasòniques a la suspensió cel·lular deixant 1 min de repòs entre cada cicle. Tot el procés es fa en gel.
- 3) La suspensió es centrifuga a 35000g durant 45 min i a una temperatura de 4 °C. El sobrenedant obtingut es separa en dues fraccions (fracció A i fracció B), d'uns 40 mL cadascuna d'elles.
 - a. La fracció A: es cromatografia en una columna Q Sepharosa[®] FF amb solució tampó 20 mM Tris-HCl pH 8.0, i s'elueix amb un gradient de 0 a 1 M NaCl.
 - b. La fracció B es sotmet a un xoc tèrmic (60 °C durant 20 min), després del qual es centrifuga la mostra i es recupera el sobrenedant amb la fracció termostable. La mostra es cromatografia en una columna Q Sepharosa[®] FF amb solució tampó 20 mM Tris-HCl pH 8.0, i s'elueix amb un gradient de 0 a 1 M NaCl.
- 4) L'electroforesi SDS-PAGE (veure apartat **III.1.1.e**) es fa servir per comprovar en quines fraccions de la cromatografia de bescanvi iònic es troba la PBGD.
- 5) Es concentren aquestes fraccions i es cromatografien en una columna Superdex 75 amb solució tampó 20 mM Tris-HCl a pH 8.0 i 150 mM NaCl.
- 6) S'emmagatzemen les fraccions que contenen la PBGD a 4 °C.

- **Protocol 2:**

- 1) Es solubilitzen els sediments cel·lulars obtinguts segons el protocol descrit a l'apartat **III.1.3.2** en 40 mL de solució tampó 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glicerol, i 1:100 de PIC (còctel d'inhibidors de proteases *-Protein Inhibitor Cocktail-* de Sigma[®], referència P2714).
- 2) S'apliquen 10 cicles de 1 min de ones ultrasòniques a la suspensió cel·lular deixant 1 min de repòs entre cada cicle. Tot el procés es fa en gel.

- 3) Es centrifuga durant 40 min a 35000g el producte de la sonicació.
 - 4) Es recupera el sobrenedant i es barreja amb 4 mL de resina de Ni²⁺ (prèviament rentada i equilibrada en el solució tampó 20 mM Tris-HCl a pH 7.9) en una columna, deixant-ho en un agitador rotatori durant un mínim d'1 h, a 4 °C. Posteriorment s'elueix de la columna la fracció no unida a Ni²⁺. Es renta la columna amb solució tampó Tris 20 mM pH 7.9 i s'elueix de la columna la fracció d'unió emprant solució tampó Tris 20 mM pH 7.9 i 100 mM EDTA.
 - 5) S'injecta l'elutri de la columna de Ni²⁺ en una columna Superdex 75 (20 mM Tris-HCl a pH 8.0, 150 mM NaCl).
 - 6) Es determina en quines fraccions es troba la PBGD mitjançant un gel de poliacrilamida (veure apartat III.1.1.e.).
 - 7) Es dialitzen les fraccions contra 2 L de solució tampó 20 mM Tris-HCl a pH 8.0 i 50 mM arginina-glutàmica, 1 mM TCEP (pes molecular 286.65, Thermo Scientific), 0.03% azida sòdica (Sigma), durant tota la nit a 4 °C i agitació suau.
 - 8) S'afegeix una solució saturada de PBG i es deixa durant 4-6 h a 37 °C en absència de llum.
 - 9) Es repeteix el pas 7 evitant l'exposició lluminosa.
- **Protocol 3:**
 - 1) Es solubilitzen de nou els sediments cel·lulars obtinguts en l'apartat III.1.3.2 en 40 mL de solució 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.0.
 - 2) S'apliquen 10 cicles de 1 min de ones ultrasòniques a la suspensió cel·lular deixant 1 min de repòs entre cada cicle. Tot el procés es fa en gel.
 - 3) Es recupera el sobrenedant i es barreja amb 4 mL de resina de Ni²⁺ (prèviament rentada i equilibrada en el solució amortidora 20 mM Na H₂PO₄, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7.4) en una columna, deixant-ho en un agitador rotatori durant un mínim de 1 h, a 4 °C. Posteriorment s'elueix de la columna la fracció no unida a Ni²⁺. Es renta la columna amb solució amortidora d'equilibrat i s'elueix de la columna la fracció d'unió emprant solució amortidora 500 mM Na H₂PO₄, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, a pH 7.4.
 - 4) S'injecta l'elutri a una columna Superdex 75 (FPLC), en solució amortidora 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.
 - 5) Es concentren les proteïnes i s'emmagatzemen a 4 °C.

III.2. ESTUDIS D'INTERACCIÓ *IN VITRO* DELS ENZIMS PBGD I U3S MITJANÇANT LA RMN

En la present tesi s'utilitzen principalment els experiments HSQC i HSQC-TROSY. L'acrònim d'HSQC prové de *Heteronuclear Single Quantum Correlation*. L'espectre que s'obté d'aquest experiment correlaciona el desplaçament químic del protó amb el d'un heteronucli (un nucli diferent a protó, ^{15}N en el present estudi). L'espectre resultant conté un senyal per cada protó unit a l'heteronucli. D'aquesta manera, si es coneix el desplaçament químic de cada protó, el desplaçament químic de l'heteronucli pot determinar-se, i *viceversa*.

L'experiment HSQC de ^{15}N és probablement l'experiment més emprat en RMN de proteïnes. Cada residu de la proteïna (excepte la prolina) té un protó amida unit a un nitrogen en l'enllaç peptídic. Si la proteïna està plegada, els senyals solen presentar un patró dispers en l'espectre, i es poden distingir nombrosos senyals aïllats. Els protons units a grups amides de les cadenes laterals (asparagina, glutamina) també produiran senyals.

Degut a que el desplaçament químic és molt sensible als canvis químics de l'entorn, l'experiment HSQC també resulta útil per la detecció d'interaccions amb lligands, així com amb d'altres proteïnes o fàrmacs. Així, comparant l'HSQC de la proteïna lliure amb la proteïna en presència d'un lligand determinat, és possible determinar la interfase de contacte entre la proteïna i el lligand.

Els experiments de ressonància magnètica nuclear (RMN) s'han portat a terme amb mostres de U3S a 50 μM a 250 μM , marcada isotòpicament amb ^{15}N , i han estat enregistrats amb un espectròmetre de 600 MHz de Bruker Avance III, a 37 °C. Els tampons utilitzats han sigut 20 mM fosfat pH 7.5, 20 mM fosfat pH 6.0, i tampó fosfat 20 mM, 50 mM L-Arginina i 50 mM L-glutàmic, a pH 6.0.

III.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA U3S SALVATGE I DELS ENZIMS MUTANTS

L'activitat enzimàtica de la U3S s'ha determinat a partir de les reaccions seqüencials de la PBGD i la U3S. La reacció s'inicia amb 50 µL del substrat de la PBGD, el porfobilinogen (Frontier Scientific), a 2 mM de concentració (dissolt en el tampó 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, a pH 8.0), que es barreja amb 20 µL de PBGD a 150 µM (tampó 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) i 145 µL d'una solució 20 mM Tris i 150 mM NaCl a pH 8.0. Després d'1 min, s'afegeixen 50 µL d'U3S a 5 µM (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) i s'incuba la reacció durant 1 min a 37 °C. En aquest pas es forma l'uroporfirinogen I (UROI), que amb els controls corresponents seran tingudes en compte en la interpretació dels valors d'activitat. La reacció s'atura per congelació amb nitrogen líquid. Seguidament s'oxiden els uroporfirinògens formats a uroporfirines afegint a la reacció 50 µL d'una dissolució de I₂ en KI. L'excés de iodina s'elimina afegint 50 µL una solució de metabisulfit sòdic saturada, i tot seguit es precipiten les proteïnes amb àcid tricloroacètic (10% m/v). El sobrenedant resultant és diluït 1/10 amb HCl a 0.1 M.

La separació dels uroporfirinògens I i III formats es porta a terme a través d'una cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase reversa, com havien descrit prèviament Shoolingin-Jordan i Leadbeater,⁹ Wayne i col·laboradors.¹⁰ La columna que s'ha utilitzat és una columna C18, Waters Symmetry[®], de partícules esfèriques de 5 µm i 100 Å de mida de porus. La separació s'ha portat a terme mitjançant una elució isocràtica amb tampó d'acetat amònic (pH 5.16)-acetonitril (87:13, v/v).

Les mesures de l'activitat específica de les proteïnes mutants es realitza tan bon punt aquestes són purificades, en paral·lel amb mostres fresques de proteïna U3S salvatge. L'activitat enzimàtica específica relativa (rESA) s'obté comparant els pics cromatogràfics de la proteïna U3S salvatge amb els mutants, i els valors d'activitat dels mutants es representen com a percentatges respecte al valor de la proteïna salvatge, emprant com a mínim dos duplicats per determinar l'error experimental.

III.4. DETERMINACIÓ DE L'ESTABILITAT CINÈTICA DE LA U3S SALVATGE I DELS ENZIMS MUTANTS

III.4.1. Breu introducció al dicroisme circular

Per a la determinació de l'estabilitat de les proteïnes U3S salvatge i dels mutants patògens s'ha emprat el dicroisme circular (DC). Les tècniques que utilitzen la llum polaritzada són sensibles a l'estructura secundària de les biomolècules, i per tant, permeten determinar els canvis conformationals, els efectes del medi i el procés de desnaturalització de les proteïnes. La llum pot polaritzar-se de diverses maneres, la més coneguda és la polarització plana, en la que només es transmet el camp elèctric variable de la radiació d'un pla determinat. En la polarització circular, la direcció de la polarització gira amb la freqüència de la radiació. Si s'observa un feix de llum polaritzada circularment que s'acosta, el camp elèctric pot estar rotant tant en el sentit de les agulles del rellotge (denominada llum polaritzada circularment cap a la dreta) com en sentit contrari (llum polaritzada circularment cap a l'esquerra).

Quan un àtom de carboni té quatre substituents diferents, la molècula resultant és quiral. Tanmateix, els elements d'estructura secundària existents a la conformació nativa de les proteïnes també tenen simetria especular: les hèlices proteïques poden ser levogires o dextrogires. Tots aquests elements augmenten el dicroisme circular de les proteïnes.

Així doncs, el perfil dels espectres de dicroisme pot proporcionar informació sobre l'estructura secundària de les proteïnes, amb espectres característics per a l'hèlix α , el full plegat β i els girs (figura iii.3). Es pot monitorar el procés de desplegament d'una proteïna (ja sigui mitjançant temperatura o substàncies químiques) observant la desaparició de la senyal de dicroisme circular provinent d'aquests elements d'estructura secundària.

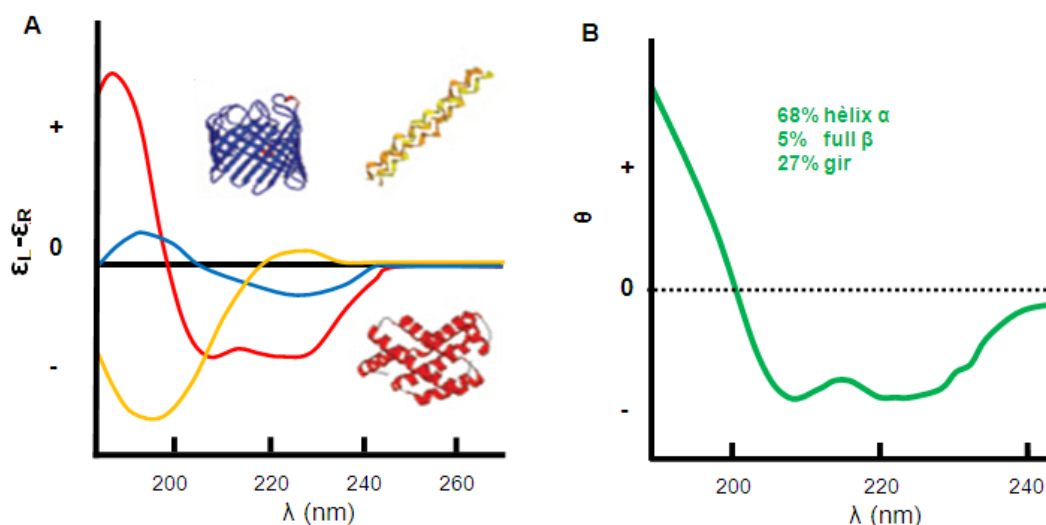


Figura III.3. Espectres de dicroisme circular. En la figura A es detallen els espectres de polipèptids amb diferents conformacions (en vermell és el perfil que s'observa en una

conformació estesa; en verd és l'espectre que dona un polipèptid majoritàriament format per hèlix α , i en groc s'observa el perfil d'una proteïna formada per fulls β , majoritàriament). En la figura B s'observa l'esquema del perfil de la mioglobina¹¹ i el percentatge d'estructura secundària calculat a partir de l'espectre, on Θ és l'el·lipticitat, i λ és la longitud d'ona.

El monitoratge del procés de desplegament tèrmic d'una proteïna per DC, dona com a resultat una corba de desnaturalització, com la representada en la Figura III.4. Assumint un equilibri de dos estats vàlid si no existeixen intermedis de desplegament, la forma de la corba de desnaturalització conté tota la informació necessària per poder determinar la constant d'equilibri del procés de desplegament.

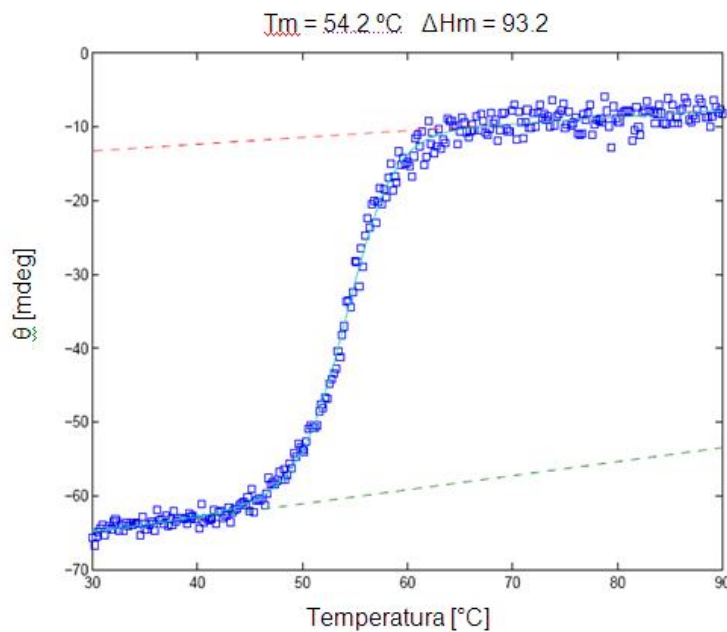


Figura III.4. Desnaturalització tèrmica del mutant T228M de la U3S enregistrada mitjançant dicromisme circular (DC). T_m = temperatura de fusió, o de desnaturalització, en la qual s'estima que el 50% de la proteïna es troba en una conformació plegada i el 50% desplegada. ΔH_m correspon a l'entàlia del sistema en el punt de fusió.

III.4.2. Mesures d'estabilitat amb DC

Per determinar l'estabilitat de la proteïna U3S, així com dels seus mutant patogènics, s'han emprat tres tipus d'experiment amb DC. L'espectropolarímetre emprat ha sigut un JASCO J-810, equipat amb una unitat *peltier* (que permet regular la temperatura de forma més precisa) i un valorador automàtic.

El primer tipus d'experiment que es va dur a terme consistí en la mesura dels valors de temperatura de desnaturalització, o T_m , per a cadascuna de les proteïnes mitjançant experiments de desnaturalització tèrmica. En aquest cas, es va utilitzar una cubeta de quars d'1 cm d'amplada, i els experiments començaren amb mostres concentrades entre 5 i 10 μM en tampó fosfat 20 mM pH 7.2, i s'enregistrà l'el·lipticitat a 222 nm de longitud d'ona, incrementant la temperatura de 30 a 90 °C (amb Peltier), a una velocitat d'1 °C/min.

Tant en el segon com en el tercer tipus d'experiment de DC s'ha utilitzat una cubeta de quars de 0.2 cm d'amplada, i les mostres han estat utilitzades a una concentració final de 5 μ M. En el segon tipus d'experiment d'estabilitat, s'enregistra la desnaturalització de la proteïna a una temperatura constant al llarg del temps, la qual cosa proporciona una velocitat de desplegament isotèrmic (k_{NU}). Aquest valor ha sigut determinat per a cada proteïna mutant de la U3S com a mínim a quatre temperatures dins del rang 37-52°C, mentre que per a la caracterització de la proteïna U3S salvatge s'han utilitzat set temperatures diferents (37, 40, 42, 44, 46, 48 i 50°C). L'espectropolarímetre s'ha escalfat prèviament a la temperatura de treball abans d'afegir les mostres acabades de purificar a 4°C, i s'ha mantingut a temperatura constant fins que l'el·lipticitat arriba a un plató. Els temps de decaïment oscil·len entre les 2 hores (a 50 °C) a 3 dies (a 37 °C). La constant del temps ha sigut obtinguda a partir del decaïment de la senyal de DC al llarg del temps monitorada a 222 nm.

El tercer experiment es tracta de mesurar la desnaturalització tèrmica de la proteïna U3S i dels mutants a diverses velocitats (°C/min) dins el rang de temperatures de 10 fins a 75°C. D'aquesta manera s'han obtingut les temperatures de fusió aparents. Les dades han sigut analitzades mitjançant programes escrits en llenguatge Matlab (Simulink) assumint el mètode d'extrapolació lineal:¹² l'el·lipticitat molar a cada punt de la transició pot ser descrit com una combinació lineal dels valors esperats per l'estat plegat (θ_F) i l'estat desplegat (θ_U). Els valors θ_F i θ_U s'han obtingut a partir de l'extrapolació de les línies de base. S'han repetit les corbes de fusió per la proteïna salvatge a quatre velocitats d'escaneig diferents (a 1, 2, 3 i 4 °C/min).

III.5. DIFUSIÓ DINÀMICA DE LA LLUM (DLS)

Els experiments de difusió dinàmica de la llum o DLS (de l'anglès *Dynamic Light Scattering*) s'han realitzat amb l'objectiu de determinar l'agregació de la U3S. L'aparell emprat ha estat el DLS Nano-S Zetasizer de Malvern.

El DLS està basat en dues premisses principals: la primera és el moviment brownià de les partícules immerses en un fluid. Aquest moviment és aleatori i és degut a que la superfície de les partícules és bombardejada per les molècules del fluid sotmeses a una agitació tèrmica intrínseca. Aquest bombardeig no és completament uniforme i pateix variacions estadístiques importants, de manera que la pressió exercida sobre els costats pot variar lleugerament amb el temps provocant el moviment brownià.

La segona assumpció és que les partícules de la mostra es poden considerar esferes amb un diàmetre petit comparat amb les dimensions de la molècula. Si això és així aleshores és possible aplicar la relació de Stoke-Einstein que permet obtenir el coeficient de difusió (D), propietat que defineix la velocitat del moviment brownià, i que permet determinar la mida de les partícules.

$$d(H) = \frac{kT}{3\eta D} \quad \text{Equació III.3}$$

on k és la constant de Boltzman, η és la viscositat, D és el coeficient de difusió i d(H) es coneix com a diàmetre hidrodinàmic. De fet, el diàmetre mesurat per DLS és un valor que es refereix a com una partícula es mou en un líquid, i correspon al diàmetre que té una esfera amb el mateix coeficient de difusió de translació que la partícula.

Els valors que s'obtenen amb els experiments de DLS són les corbes de correlació (veure Figura III.5). Dins d'aquesta corba es troba tota la informació provinent de la difusió de les partícules de la mostra que s'està mesurant. Si les partícules de la mostra són grans, el senyal canviarà lentament i la correlació es mantindrà per molt de temps. Si les partícules són petites i es mouen ràpidament, aleshores la correlació desapareixerà més ràpidament.

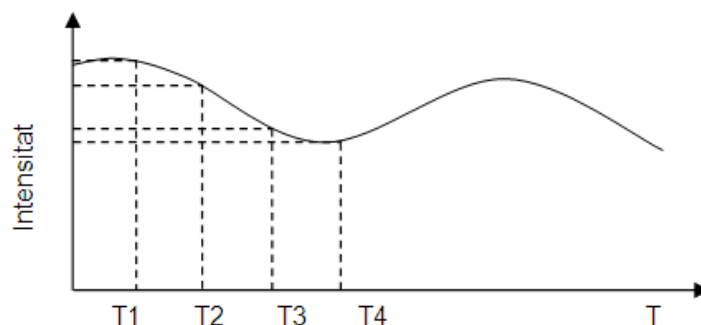


Figura III.5. Representació esquemàtica d'una corba de correlació obtinguda per DLS.

El coeficient de difusió (D) es calcula ajustant la corba de correlació a una funció exponencial, on D és proporcional al temps de vida del decaïment exponencial. Un cop es coneix D , es pot obtenir el valor del diàmetre hidrodinàmic, $d(H)$, a partir de l'equació de Stokes-Einstein (Equació III.3).

Per poder determinar l'agregació de la U3S s'han obtingut les corbes de correlació de mostres concentrades a $5 \mu\text{M}$ i a $50 \mu\text{M}$ mesurades a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ al llarg de 8 h.

III.6. CULTIUS CEL·LULARS EUCARIOTES

III.6.1. Cultius cel·lulars

III.6.1.1. Línies cel·lulars emprades

S'han escollit els següents tipus cel·lulars per a la present tesi: M1, Huh7, HL60 i MLP29. A continuació es detallen les principals característiques de cadascuna d'elles:

- **HL60:** línia cel·lular humana, corresponent a limfoblasts comercials (ECACC 98070106) obtingudes per leucoforesi d'una dona caucàsica de 36 anys amb leucèmia promielocítica aguda.¹³ Es coneix que la línia expressa U3S, i s'acostuma a emprar en els controls de qualitat dels anticossos per la U3S, tal i com s'observa en Figura III.6.

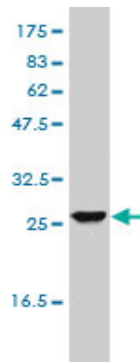


Figura III.6. Anàlisi per transferència de proteïnes de l'expressió de U3S en la línia cel·lular HL60. Figura publicada per Abnova emprant l'anticòs monoclonal ab58097. Les condicions són d'1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'anticòs i 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cèl·lules HL60 lisades. La banda d'U3S esperada és de 29 kDa.

La morfologia és típica de limfoblasts. Les cèl·lules creixen en suspensió i, a les 6 setmanes en cultiu, poden presentar diferenciació. En els experiments de la present tesi s'ha utilitzat el medi de cultiu òptim per aquesta línia cel·lular: es tracta del medi RPMI 1640, suplementat amb 2 mM de glutamina i 10-20% de sèrum fetal boví, o FBS (Invitrogen #10270106). La rutina de subcultiu és la següent:

- Partint d'un vial congelat, s'afegeixen les cèl·lules descongelades a un tub de centrífuga amb base cònica, per exemple, de 15 mL. Lentament, s'afegeixen 4 ml de medi de cultiu al tub. Es recompten les cèl·lules, i es centrifuguen a baixa velocitat (100 o 150g un màxim de 5 minuts). S'elimina el medi i es solubilitza el sediment cel·lular a una densitat de 3-5 x 100.000 cèl·lules/mL en medi fresc amb un 20% de FBS. S'incuba el vial a 37 °C, 5% CO₂. S'observa que el creixement és lent al principi, i un cop les cèl·lules recuperen la seva taxa de creixement òptima (poden trigar fins a 10 dies), la concentració de FBS del medi pot reduir-se fins al 10%. Mantenir els cultius entre 1-9 x 100.000 cèl·lules/mL, a 37 °C, 5% CO₂, per evitar la diferenciació que té lloc quan la densitat del cultiu s'incrementa.

- **Huh7**: línia cel·lular humana.¹⁴ El seu origen és hepàtic i la seva morfologia depèn del medi on es fan créixer: en presència de sèrum fetal boví (condicions en les quals s'ha treballat en la present tesi) les cèl·lules creixen en monocapa formant illes, en el centre de les quals poden apilar-se algunes cèl·lules.
- **MLP29**: línia cel·lular de ratolí (*Mus musculus*).¹⁵ En aquest cas es tracta de cèl·lules progenitores de cèl·lules epitelials hepàtiques, de mida petita amb nucli ovoide, que formen colònies denses.
- **M1**: línia cel·lular humana. Es tracta d'una línia tumoral de fibroblast humà no comercial, i la informació que se'n disposa és limitada. Es coneix que el seu creixement és en monocapa assolint la morfologia de fibroblast típica, excepte en el cas de cultius excessivament crescuts, quan s'observa la formació de diverses capes.

Tant en el cas de la línia cel·lular M1 com en les Huh7 i MLP29, el medi de creixement emprat és el medi DMEM enriquit amb 10% de FBS (sèrum fetal boví, Invitrogen #10270106) i un 1% de P/S/G (penicil·lina/estreptomicina/glutamina, Invitrogen #10378016), mentre que en el cas de les MLP29 s'utilitza un 1% de P/S/F (penicil·lina/estreptomicina/fungizona o anfotericina B; la fungizona és un agent antifúngic), de BioWhittaker[®] Cell Culture #17-745E.

III.6.1.2. Tripsinització

La majoria de línies cel·lular amb les que s'ha treballat en la present tesi creixen sobre un suport sòlid. El tractament amb tripsina-EDTA permet eliminar les unions intercel·lulars i entre les cèl·lules i la matriu, ja que la tripsina és una serin-proteasa que degrada determinades proteïnes, i l'EDTA és un quelant iònic, que entre d'altres interacciona amb el Ca^{2+} , essencial per les unions de les integrines, responsables d'interaccions de les cèl·lules amb la matriu.

El procés de tripsinització és el següent:

- Es tempera a 37 °C la tripsina-EDTA al 0.05% (GIBCO[®], Invitrogen), el PBS i el medi de cultiu.
- Es renta la monocapa de cèl·lules amb PBS 1X.
- Es retira el PBS 1X i s'afegeix la Tripsina-EDTA a les cèl·lules, a una relació aproximada de 1.5 mL/p100 (placa de 100 mm de diàmetre).
- S'incuba 5 min a 37 °C dins l'incubador de cultius.
- Es neutralitza la tripsina amb medi de cultiu, a una relació de 8.5 mL per cada 1.5mL de tripsina.

En aquest punt, es traspassen les cèl·lules a un tub de 15 mL, es centrifuguen a 232 g durant 5 minuts, s'elimina el sobrenedant i es solubilitza el sediment cel·lular amb 1-2 mL de

medi fresc. Tot seguit es sembra la quantitat de cèl·lules desitjades en una nova placa i s'incuba a 37 °C a una atmosfera al 5% de CO₂. Abans de la sembra, és convenient determinar la concentració del cultiu cel·lular.

III.6.1.3. Recompte de cèl·lules

El recompte de cèl·lules és necessari per tal de manipular-ne una quantitat concreta. El mètode més utilitzat és el recompte mitjançant la Càmera de Neubauer (Fisher Scientific #02-671-5 en la present tesi): es tracta d'un instrument emprat per al recompte de cèl·lules en medi líquid, adaptada al microscopi de camp clar o de contrast de fases, està formada per un portaobjectes amb dues zones marcades amb una quadrícula de dimensions conegudes (veure Figura III.7). Es cobreix amb un cobreobjectes que s'adhereix gràcies a la tensió superficial que proporciona la pròpia mostra.

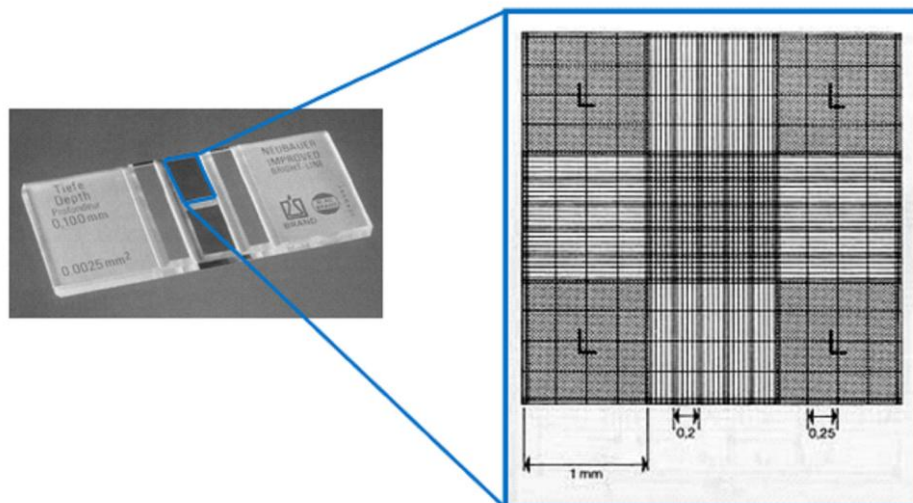


Figura III.7. Esquema d'una càmera de Neubauer.

El procediment s'inicia amb una al·lquota de la suspensió cel·lular que es dilueix (en el cas de cultius força concentrats) en blau de tripà (Sigma-Aldrich #T8154). S'omple la càmera de Neubauer amb la dilució preparada, es compten les cèl·lules viables –no tenyides amb el blau de tripà- en els diferents camps de la càmera (cada camp està marcat amb una “L” en la Figura III.7) i es realitza el càlcul següent:

$$N_c = \frac{n_c}{4} \times D \times 10^4 \quad \text{Equació III.4}$$

on N_c és el número de cèl·lules per mL de mostra; n_c és el número de cèl·lules contades en els 4 quadrants de la càmera de Neubauer (marcats amb una “L” en la Figura III.7) i D és el factor de dilució de la mostra.

III.6.2. Transfecció

III.6.2.1. Vectors i constructes

Per poder expressar les proteïnes U3S salvatge i el mutant U3S-C73R en sistemes eucariotes cal primer inserir l'ADN dins les cèl·lules. Amb aquesta finalitat, s'han clonat tres construccions, a partir dels plasmidis pEGFP-N3 (Figura III.8), pEGFP-C2 (Figura III.9) i pCR[®]3.1 (veure Figura III.10):

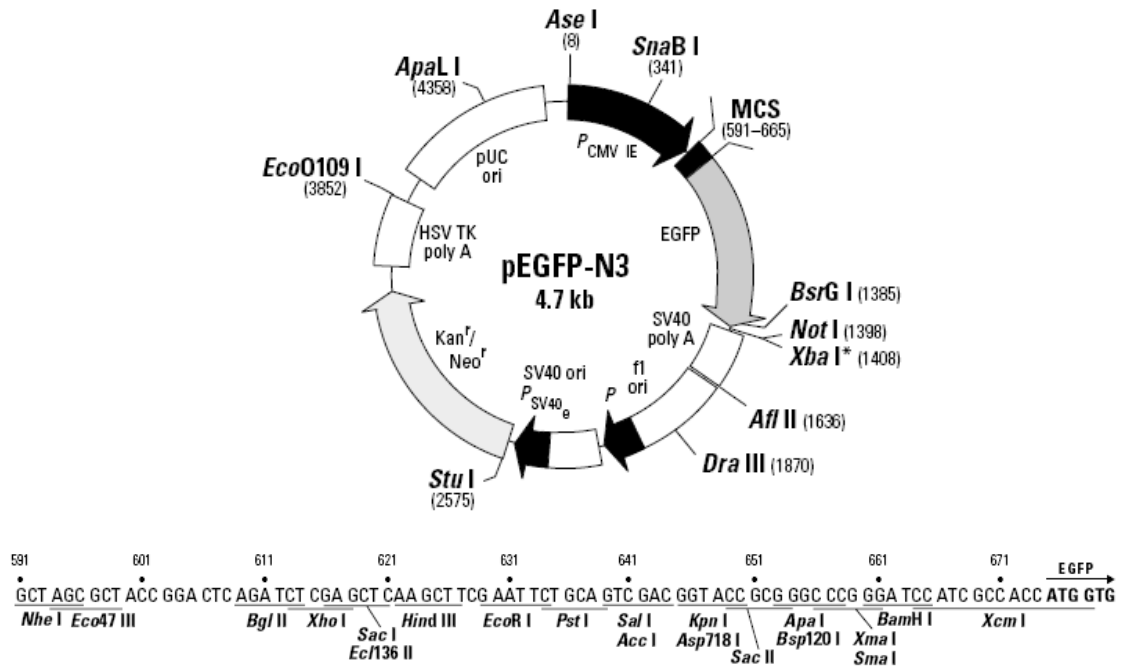
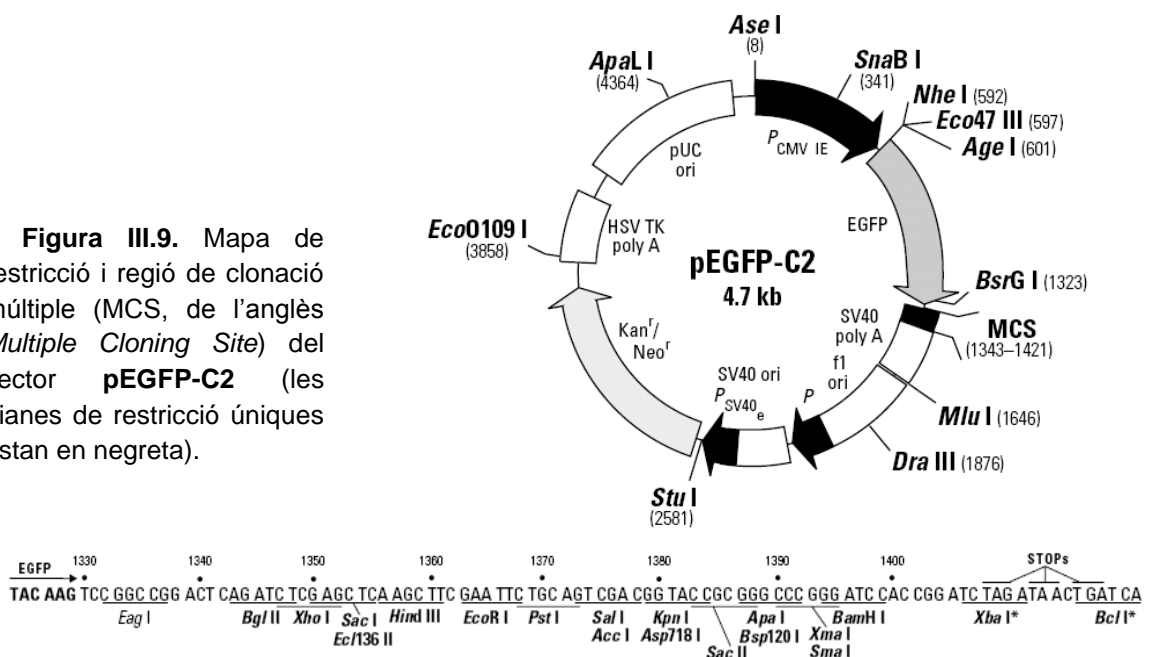


Figura III.8. Mapa de restricció i regió de clonació múltiple (MCS) del vector **pEGFP-N3** (les dianes de restricció úniques estan en negreta). La diana per a l'enzim de restricció *NotI* es troba tot seguit del codó de terminació de la EGFP, una variant de la proteïna GFP.

Figura III.9. Mapa de restricció i regió de clonació múltiple (MCS, de l'anglès *Multiple Cloning Site*) del vector **pEGFP-C2** (les dianes de restricció úniques estan en negreta).



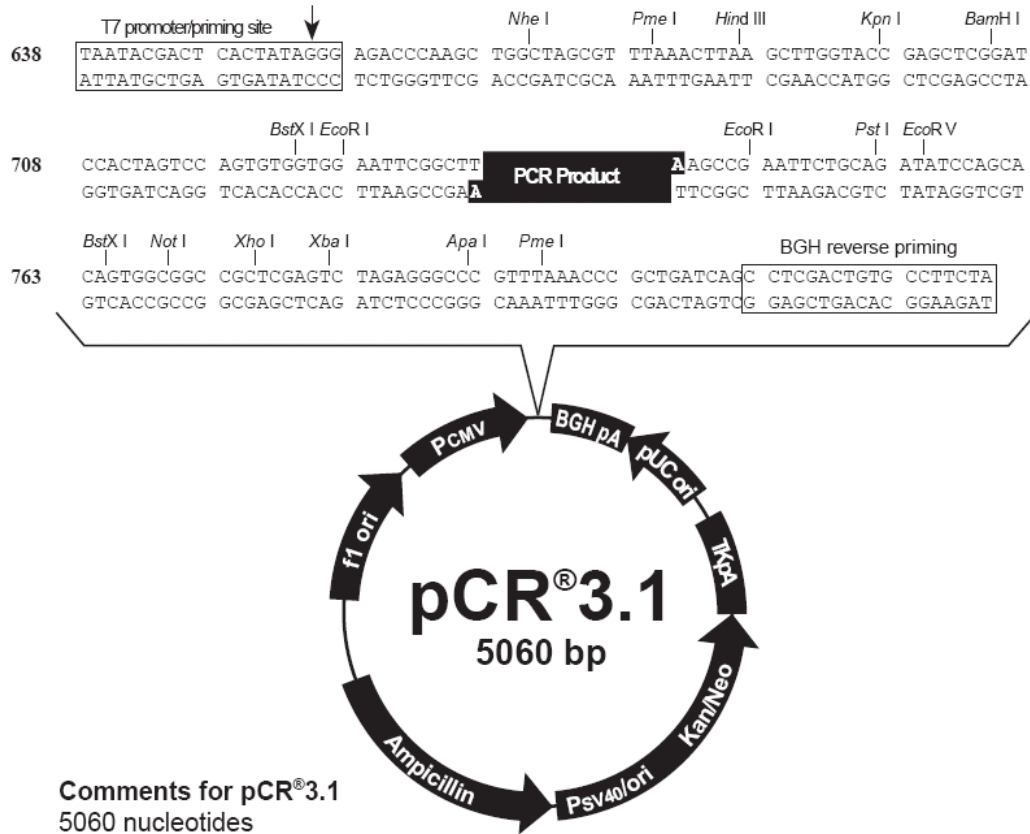


Figura III.10. Mapa de restricció del vector pCR[®]3.1 (Invitrogen Life Technologies). Les dianes de restricció representades estan indicant el punt de tall de l'enzim. La fletxa indica el punt d'inici de la transcripció de T7.

Les construccions amb el gen de la U3S salvatge i el gen del mutant C73R generades es resumeixen en la següent taula:

Nom de la construcció	Vector original	Gen clonat	Dianes d'inserció	
			Extrem 5' del gen	Extrem 3' del gen
054wt	pCR [®] 3.1 mod ^a	U3S salvatge	EcoRI (GAATTC)	NotI (GC/GGCCGC)
054C73R	pCR [®] 3.1 mod ^a	Mutant C73R	EcoRI (G/AATTC)	NotI (GC/GGCCGC)
289wt	pCR [®] 3.1 mod ^b	U3S salvatge	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)
289C73R	pCR [®] 3.1 mod ^b	Mutant C73R	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)
437wt	pCR [®] 3.1 mod ^c	U3S salvatge	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)
437C73R	pCR [®] 3.1 mod ^c	Mutant C73R	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)
553wt	pEGFP-C2 mod ^d	U3S salvatge	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)
553C73R	pEGFP-C2 mod ^d	Mutant C73R	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)
607wt	pEGFP-N3 mod ^e	U3S salvatge	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)
607C73R	pEGFP-N3 mod ^e	Mutant C73R	EcoRI (G/AATTC)	Sall (G/TCGAC)

Taula III.5. Resum de les construccions utilitzades en els estudis *in vivo* de la present tesi. ^a El vector conté només 1 lloc de tall per a EcoRI enlloc dels dos originals que conté l'original pCR[®]3.1. ^b El vector conté un gen inserit que proporciona una seqüència *myc* a l'extrem C-terminal quan es realitza la inserció del gen entre EcoRI i Sall. ^c El vector conté un gen inserit

que proporciona una seqüència *myc* a l'extrem N quan es realitza la inserció del gen entre EcoRI i Sall.^d Es tracta d'una modificació del vector pEGFP-C2 amb un gen prèviament inserit de 1100 pb.^e Es tracta d'una modificació del vector pEGFP-N3 amb un gen prèviament inserit de 800 pb.

Els gens clonats que codifiquen per les proteïnes U3S salvatge i pel mutant U3S-C73R en els vectors detallats a la Taula III.5 s'han amplificat, digerit i purificat seguint el procés general especificat a l'apartat III.1.2., amb variacions en l'amplificació, que es detallen a continuació. Els encebadors utilitzats en les reaccions de PCR són els 228 i 229 en el cas dels gens amplificats per clonar en els vectors p437 i p553, i els encebadors 228 i 230 en el cas dels gens amplificats per clonar en els vectors p289 i p607. Les seqüències dels encebadors 228, 229 i 230 es troben detallades a la Taula III.3.

Reactius	Volum (µL)
Solució tampó <i>High Fidelity</i> 10X	5
MgCl ₂ (50 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
Encebador 1 (10 µM)	2
Encebador 2 (10 µM)	2
ADN motlle (50 ng/µL)	1
<i>Platinum[®] Taq High Fidelity</i>	0,5
H ₂ O MilliQ	36.5
Volum final	50

Taula III.6. Condicions de reacció de la PCR.

El programa de PCR utilitzat s'inicia amb una desnaturalització de 5 min a 95 °C, seguida de 30 cicles compostos de:

- Desnaturalització a 94 °C (30 s)
- Hibridació dels encebadors amb les cadenes motlle a 55 °C (30 s)
- Elongació de les cadenes per part de la polimerasa *Platinum[®]Taq DNA High Fidelity* (Invitrogen #11304) a 68 °C (1 min)

III.6.2.2. El procés de transfecció

La transfecció consisteix en la introducció d'ADN plasmídic dins de les cèl·lules eucariotes. Existeixen diferents mètodes fisicoquímics per transfectar entre els quals hi ha l'electroporació, la precipitació amb fosfat càlcic o el transport de l'ADN en vesícules lipídiques. En general, les transfeccions es divideixen en transitòries o estables. Es considera transfecció transitòria quan el temps de permanència de l'ADN exogen dins la cèl·lula és curt, no més de 3 o 4 dies.

Per a la transfecció de les línies cel·lulars emprades en la present tesi s'ha utilitzat un mètode basat en vesícules de lípids no liposomals, concretament el producte Fugene[®]6 de la casa comercial Roche (#11814443001). Per a les cèl·lules MLP29, M1 i Huh7 crescudes en plaques p100 (100 mm de diàmetre) s'ha seguit el següent protocol:

- Es creixen els cultius cel·lulars fins a una densitat de 3×10^5 cèl·lules per placa p100.
- Es retira el medi i s'afegeixen 5 mL de medi Opti-MEM[®] (Invitrogen #1105821) per placa p100; s'incuba entre 1 i 3h a 37 °C, en atmosfera de 5% CO₂.
- Es prepara la mescla de transfecció (solució 3) a partir de les solucions 1 i 2: la solució 1 es prepara afegint 40 µL de Fugene[®]6 a 400 µL de medi Opti-MEM[®]; la solució 2 ha de contenir 20 µg d'ADN a transfectar en 100 µL; després de 10 min a temperatura ambient, la solució 1 i la solució 2 es barregen, i el producte (solució 3) s'incuba a temperatura ambient durant 10 min més.
- Es retira el medi Opti-MEM[®] dels cultius i s'afegeix gota a gota la solució 3. S'afegeixen acuradament 3 mL de medi Opti-MEM[®], i s'incuben les plaques p100 a 37 °C, 5% CO₂ durant unes 4 h.
- S'afegeixen 5 mL de medi DMEM (Invitrogen) enriquit amb 10% de FBS (sèrum fetal boví de GIBCO[®]) i 1% de P/S/G de GIBCO[®] (penicil·lina/estreptomicina/glutamina)

En el cas de les transfeccions transitòries les cèl·lules es recullen entre les següents 12-72 h, mentre que en el cas de les transfeccions estables, entre les 12-24 h després de la transfecció s'afegeix un antibiòtic de selecció que anirà eliminant aquelles cèl·lules del cultiu no transfectades. En el present treball s'ha emprat l'antibiòtic G418 o geneticina (Sigma #A1720) a una concentració de 2g/L, un antibiòtic aminoglicòsid d'estructura similar a la gentamicina, la neomicina i la kanamicina. El G418 bloqueja la síntesi de polipèptids inhibint l'elongació proteica.

III.6.3. Anàlisi de proteïna per immunotransferència de proteïnes

Un cop s'obtenen els cultius transfectats, cal comprovar el grau d'expressió de les proteïnes d'interès. Això es pot aconseguir mitjançant un anàlisi de la fracció proteica per immunotransferència de proteïnes, que permet separar en un gel de poliacrilamida les diverses proteïnes per pes molecular i fer-ne una detecció amb anticossos. Aquesta tècnica permet no només la detecció específica de la proteïna d'interès, sinó la quantificació relativa de les mateixes respecte a proteïnes d'expressió constant. Aquest experiment és complementari a l'anàlisi de l'ARN missatger per estudiar la transcripció de l'ADN inserit.

III.6.3.1. Lisi cel·lular

La lisi dels cultius cel·lulars implica la destrucció de la membrana cel·lular, provocant la mort de les cèl·lules i l'alliberament del seu contingut. El procés s'inicia quan els cultius assoleixen una densitat suficient per preparar alíquotes de 10^6 de cèl·lules, a partir de les quals se n'obtenen els llisats. Es centrifuguen les alíquotes i es descarta el sobrenedant. Per cada 10^6 cèl·lules sedimentades s'afegeixen 100 μ L del solució tampó de lisi BL (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 2 μ L de iodoacetamida, Sigma I-1149, i 1 μ L d'inhibidor de proteases, Sigma P-8340). Es pipeteja la barreja fins a dissoldre els sediments que s'hagin pogut formar i es deixa reposar 15 min en gel. Es centrifuguen les mostres durant 15 min a 13000 rpm i la mostra queda enlestida per la quantificació proteica.

III.6.3.2. Quantificació per Bradford de la proteïna total

La quantificació de proteïna mitjançant el mètode Bradford¹⁶ ha esdevingut la tècnica més utilitzada, degut a la seva senzillesa i rapidesa. Es basa en la interacció del colorant Blau de Coomassie amb les arginines, els aminoàcids aromàtics i les histidines, que provoca un canvi colorimètric que és possible enregistrar a 595 nm. L'increment en l'absorbància a 595 nm és proporcional a la quantitat de reactiu unit i per tant, a la quantitat (o concentració) de proteïna present a la mostra.

En la present tesi s'ha utilitzat el reactiu Bradford ULTRA. A diferència del reactiu tradicional emprat en els assajos de Bradford, el reactiu ULTRA no es veu afectat per detergents, acceptant fins a un 1% de la seva presència en assajos estàndards. La quantificació es realitza a partir d'una corba de calibratge feta amb albúmina sèrica bovina, BSA, de dissolucions dins del rang de 0 a 40 μ g/mL.

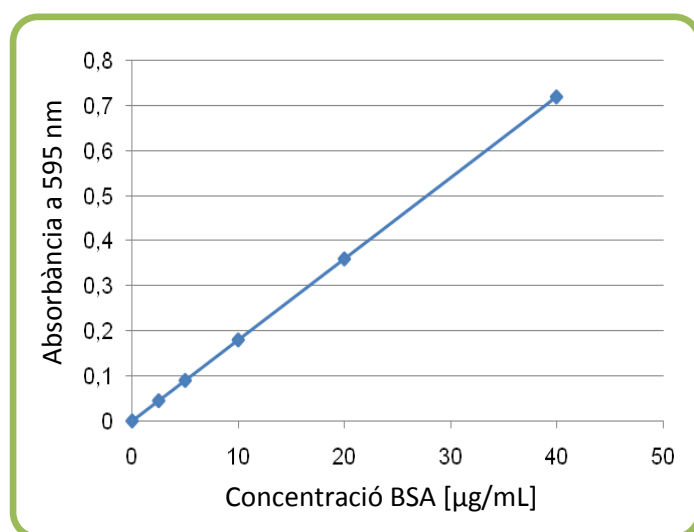


Figura III.11. Representació d'una corba de Bradford amb BSA. A baixa concentració de proteïna la funció s'ajusta bé a una recta, mentre que a mesura que s'incrementa la concentració de la mostra la tendència deixa de ser lineal i passa a corbar-se de manera asimptòtica.

III.6.3.3. Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic permet separar proteïnes segons el seu pes molecular, mitjançant un recobriment amb dodecilsulfat sòdic, detergent que adjudica a aquestes proteïnes una càrrega global en relació amb les seves dimensions.

A diferència de l'apartat III.1.1.e per la immunodetecció de proteïnes s'han emprat gels comercials NuPAGE del 4-12% d'Invitrogen (NP0336BOX) de 10 i 15 carrils, carregant entre 20 µL i 30 µL de mostra total. La solució tampó utilitzada és la MOPS SDS 20X NuPAGE d'invitrogen (o *Running Buffer* Invitrogen Cat.nºNP0001), i a les mostres s'hi han afegit amb la solució de càrrega NuPAGE® LDS *Sample Buffer* 4X (Cat. Núm. NP0007) i 1 mM de DTT.

III.6.3.4. Immunotransferència

Es coneix com a immunotransferència la tècnica de transferència elèctrica de proteïnes que permet, mitjançant una reacció immunològica en un filtre de nitrocel·lulosa, detectar una proteïna específica (o antigen) en una mescla proteica que s'ha separat per pes molecular mitjançant l'electroforesi en gel. Per la detecció d'antígens s'han emprat anticossos específics, que serveixen de diana per a un segon anticòs que porta unit un enzim capaç d'excitar un compost químic que emet luminescència que pot ser detectada mitjançant un film d'autoradiografia. S'ha emprat el sistema de detecció ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech #RPN2132 i #RPN2133).

El procés s'inicia amb la **transferència** del gel amb les mostres separades en l'apartat III.6.3.3 a una membrana Immobilon-P de PVDF (polifluorur de vinilidè) i 0.45 µm de Millipore. La transferència té lloc a 100 mV durant 90 min i limitant la intensitat del corrent a 140 mA. La solució de transferència emprada ha sigut la descrita per NuPAGE® (Invitrogen): 4.08 g de bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina) a 25 mM + 5.23 g de Bis-Tris a 25 mM + 0.29 g EDTA + 1 mL d'antioxidant de mostres NuPAGE®, 120 mL d'etanol i aigua Milli-Q fins a un volum final d'1 L.

Un cop transferides les proteïnes a la membrana de PVDF es realitza un **bloqueig** de la membrana per evitar reaccions inespecífiques entre els anticossos i antígens inespecífics: la membrana s'incuba durant 30 min a temperatura ambient amb la solució de bloqueig: 5% (p/v) de llet desnatada Biorad #1706404, 0.2% (v/v) Tween-20 en PBS (o solució tampó de fosfat salí, Fermentas), tot i que la incubació pot realitzar-se a 4 °C tota la nit. Després del bloqueig, es fan tres rentats seguits de la membrana amb PBS de 5 min cada un, a temperatura ambient amb agitació.

Un cop la membrana està bloquejada, s'inicia la detecció amb anticossos. Els primers anticossos emprats, o mix d'**anticossos primaris**, són els següents:

- Anticòs policlonal de ratolí per detectar la U3S (H00007390-B01P, d'Abnova), dilució 1:500;
- Anticòs monoclonal de ratolí per detectar la fosfotransferasa II de neomicina o *neo* (clon 4B4D1, d'Abcam), dilució 1:500;
- Anticòs monoclonal de ratolí per detectar Hsp90 (clon 68 BD Bioscience), dilució 1:5000;
- Anticòs monoclonal de ratolí per detectar Hsp70 (clon BRM-22, Sigma), dilució 1:5000;
- Anticòs monoclonal de ratolí per detectar tubulina (clon DM1A, Sigma), dilució 1:5000;
- Anticòs monoclonal de ratolí per detectar *myc* (clon 4A6, Upstate), dilució 1:1000.

S'incuba l'anticòs primari (o una barreja d'anticossos en el cas de desitjar detectar més d'un antigen per incubació) durant 30 min o 1 h amb 3 mL de solució de bloqueig. Un cop finalitzat el temps d'incubació, es realitzen tres rentats per eliminar l'excés d'anticòs no unit a membrana durant 5 minuts cadascun, amb PBS, temperatura ambient i agitació. Tot seguit, es porta a terme la incubació de l'**anticòs secundari** HRP-anti-Mo amb la peroxidasa de rave (Amersham Pharmacia) en 3 mL de solució de bloqueig durant 30 minuts en agitació, dilució de 1:6000.

En finalitzar la incubació del segon anticòs, es realitza una sèrie de tres rentats finals de 5 minuts cadascun, amb agitació i a temperatura ambient. Per acabar, es revela la membrana mitjançant el sistema ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech), seguint el protocol descrit per la casa comercial (RPN2132PL Rev D 2006).

Les membranes poden ser reutilitzades i incubades amb un anticòs diferent gràcies a la tècnica de *Stripping*. Per tal de rentar la membrana dels anticossos units i dels reactius emprats cal s'incuba amb 10 mL de solució d'*stripping* (Thermo Scientific #21059) a 37 °C durant 15 min, amb agitació. Seguidament es realitzen 3 rentats amb 15 mL de PBS de 5-10 min cadascun d'ells, deixant la membrana preparada per a futures hibridacions amb anticossos.

III.6.4. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant PCR a Temps Real Quantitativa

La combinació de transcripció inversa i la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) a temps real resulta ser un potent mètode per quantificar l'expressió gènica. La transcripció inversa-PCR o RT-PCR permet obtenir ADNc de doble cadena partint d'un ARNm (o ARN missatger) motlle d'interès. La tècnica consta de dues etapes: primer té lloc la transcripció inversa (RT) a partir de l'ARNm i utilitzant un encebador o oligonucleòtid antisentit específic, i tot seguit té lloc l'amplificació per PCR de la cadena d'ADNc sintetitzada inicialment.

L'extracció de l'ARN total s'ha dut a terme mitjançant el reactiu TRIzol (Invitrogen #15596-018, Carlsbad, CA, USA), seguint les indicacions del fabricant.¹⁷ Les mostres s'han resolt mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1% a 80 V durant 30 minuts per confirmar la seva integritat. La determinació de la concentració de l'ARN s'ha realitzat amb tècniques espectrofotomètriques, mesurant la longitud d'ona a 260 nm (es considera que 1 unitat d'absorbància equival a 50 µg/mL d'ARN de doble cadena).

Un cop coneguda la concentració d'ARN, s'ha dut a terme un tractament amb DNAsa per eliminar possibles contaminants que haguessin pogut quedar a la mostra (1-2 µg d'ARN, 1 µL d'DNAsa, 1 µL de tampó 10X i aigua esterilitzada fins a un volum de 9 µL) durant 15 minuts a temperatura ambient. S'afegeix 1 µL d'EDTA a 25 mM, i s'incuba la mescla resultant durant 10 min a 65 °C. Passat el temps d'incubació es mantenen les mostres a 4 °C.

Tot seguit, s'ha realitzat la transcripció inversa a ADNc (ADN complementari a l'ARN missatger):

- 1- S'incuba d'1 µg d'ARNm provinent del pas anterior amb 1 µg d'encebadors aleatoris i 1 µg de dNTPs (desoxinucleòtids), durant 10 min a 65 °C.
- 2- Seguidament la barreja anterior s'incuba 1 min a 4 °C.
- 3- S'afegeixen 4 µL del tampó *First-Strand* 5X, 2 µL de DTT 0.1 M, 1 µL d'inhibidor de ribonucleasa RNaseOUT™ (Invitrogen #10777-019), i 1 µL de transcriptasa inversa SuperScript™ II (enzim mutant de la transcriptasa inversa provinent del virus de la leucèmia murina de Moloney; tots els reactius provenen de la casa Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 4- S'incuba la mostra 12 min a 25 °C, 50 min a 42 °C i finalment 15 min a 70 °C.

La reacció de PCR a temps real s'ha dut a terme amb 5 µL d'una dilució d'ADNc 1:20, 5 µL d'aigua, 0.5 µL de cada encebador específic a 10 µM, i 9 µL de SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) amb 30 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C i 30 s a 72 °C, en un termociclador Biorad iCycler. Les mostres s'han analitzat dues vegades, fent triplicats cada vegada. Els gens analitzats han estat: *neo* o NFTII (GenBank, núm. d'accés: AAC15800.1), U3S amb el marcador *myc* (GenBank accession no. NM_000375.2) salvatge i el mutant U3S-C73R, i el gen codificant per a l'ARP humana (GenBank núm. d'accés: NM_001002.3). Els encebadors específics utilitzats (i les mides esperades del producte, en parell de bases) han sigut: 5'- AGACAATCGGCTGCTCTGAT i 5'- AGTGACAACGTCGAGCACAG per a NFTII (176 pb); 5'- AAATTAAGTTTGCAGCCATCG i 5'- TCACAAGTCTTCTTCAGAAATAAGC (o Par1 a la Figura III.12) per la seqüència C-terminal del gen codificant per la U3S amb el marcador *myc* (179 pb); 5'- TGGAACAAAAGCTTATTTCTGAAG i 5'- TCAAACGATAAAACAGGGATCA (o Par2 a la Figura III.12) per la seqüència N-terminal del gen codificant per la U3S amb el marcador *myc* (155 pb); i 5'- CGACCTGGAAGTCCAACACTAC i 5'- ATCTGCTGCATCTGCTTG per a l'ARP (109 pb).

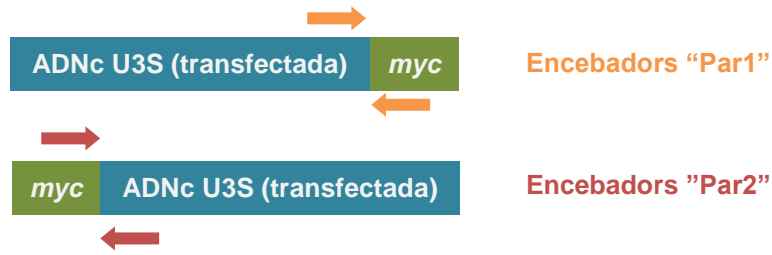


Figura III.12. Estratègia disseny d'encebadors específics per diferenciar entre la proteïna U3S clonada de l'endògena. La presència de la seqüència *myc* en el gen clonat de la U3S permet el disseny d'encebadors que només hibridaran amb l'ADNc provinent de l'ARNm del gen transfectat. A més, els dos parells d'encebadors serveixen per amplificar tant el gen U3S salvatge clonat com el del mutant U3S-C73R.

El nivell relatiu de cada transcrit s'ha calculat emprant el mètode dels $\Delta\Delta Ct$,¹⁸ o variació dels cicles llindar, i normalitzat amb els gens *ARP* i *neo* de referència. En termes generals, aquest mètode permet analitzar els canvis relatius en l'expressió gènica a partir d'experiments de PCR quantitativa a temps real, ja que permet quantificar els canvis en l'expressió d'un gen d'interès respecte l'expressió d'un gen de referència (ja sigui mitjançant un control sense tractament o una mostra a temps zero de l'estudi a realitzar). En els assajos de PCR a temps real les reaccions positives es detecten per acumulació de senyal de fluorescència. El valor de Ct (cicle llindar o *cycle threshold*) es defineix com el nombre de cicles necessaris perquè la senyal de fluorescència creui el llindar o senyal de fluorescència considerada soroll de fons (veure Figura III.13).

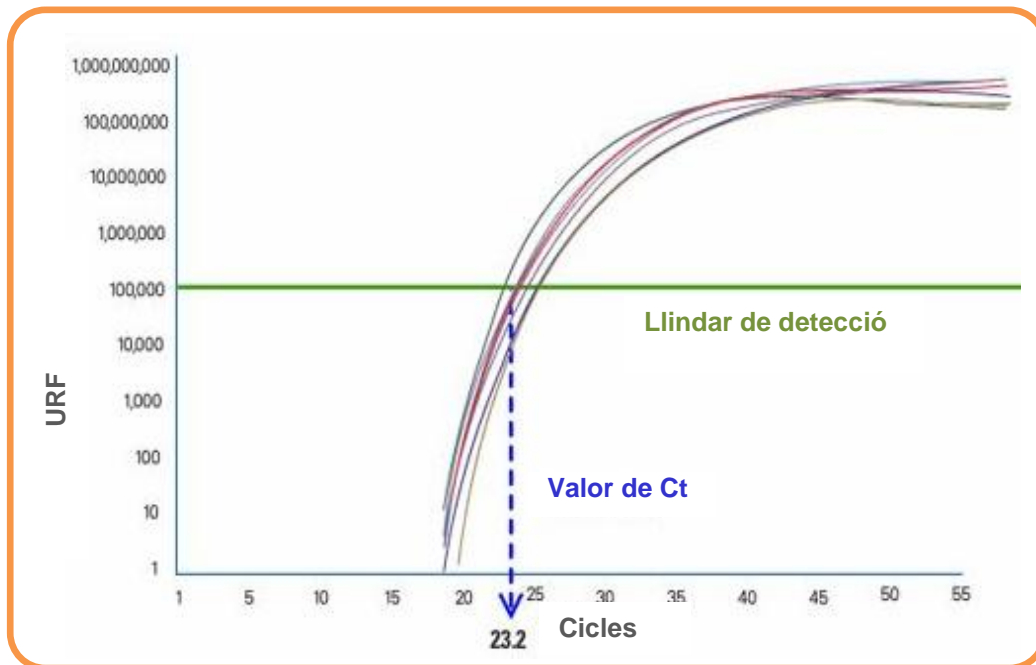


Figura III.13. Representació de l'evolució d'una reacció de PCR a temps real. UFR són les Unitats de Fluorescència Relativa (aquí representades en escala logarítmica), mentre que Ct es refereix al valor de fluorescència mesurable un cop la senyal de fluorescència supera el llindar de detecció (representat en verd a la figura).

Per poder emprar el mètode dels $\Delta\Delta Ct$, cal assumir que els estàndards i la mostra a analitzar tenen les mateixes eficiències (o capacitat de la reacció de duplicar el número de còpies d'ADN a cada cicle), i aquestes són al voltant del 100%. Breument, s'explica com obtenir el valor de les eficiències de les reaccions de PCR a realitzar:

- s'obtenen els valors de Ct d'un seguit de dilucions de cada mostra amb els seus encebadors realitzant una PCR a temps real;
- es representen els valors obtinguts respecte el logaritme de les diferents concentracions d'ADN emprades;
- de la recta resultant se n'extreu el pendent, i la relació entre aquest valor i l'eficiència dels encebadors és la següent¹⁹ :

$$E = 10^{\frac{-1}{a}} \quad \text{Equació III.5}$$

on E és l'eficiència d'amplificació, i a és el pendent de la recta en representar els valors de Ct respecte al logaritme decimal de la concentració d'ADN de diferents dilucions.

Un cop considerat que les eficiències de la reacció de PCR tant de l'estàndard com de les mostres es pot considerar equivalent, es realitza la PCR a temps real quantitativa. La mida amplificada i l'especificitat de la reacció s'ha confirmat mitjançant electroforesis en gel d'agarosa al 2.5% (p/v).

III.6.5. Immunofluorescència

La immunofluorescència és una tècnica d'anàlisi que utilitza anticossos conjugats a fluorocroms. Mitjançant aquesta tècnica és possible la detecció i localització d'anticossos o dels antigens, per observació al microscopi òptic de fluorescència. La immunofluorescència pot ser directa, en què l'anticòs es marca directament amb un fluorocrom, o indirecta, en la qual s'utilitzen dos tipus d'anticossos, un anticòs específic que reacciona amb l'antigen i un altre anticòs secundari que té especificitat per al primer i està marcat amb un fluorocrom.

III.6.5.1. Obtenció de mostres

La immunofluorescència s'ha dut a terme amb les línies cel·lulars Huh7, MLP29 i M1, transfectades amb els constructes 289wt, 289C73R, 437wt, 437C73R, 553wt, 553C73R, 607wt, 607C73R (veure Taula III.5). El procés s'inicia amb la tripsinització (veure apartat III.6.1.2.) d'un cultiu. En una placa de creixement nova, es col·loquen cobreobjectes, de manera que en posar-hi les cèl·lules aquestes es fixaran en els cobreobjectes. Quan les cèl·lules han crescut fins a la

densitat desitjada (entre un 60-70% de confluència) es realitza la fixació cel·lular. Aquest procés s'ha dut a terme seguint dos protocols de fixació: un d'ells es basa en la fixació amb formaldehid, i l'altre, amb metanol. Tota la manipulació de les cèl·lules ha de ser prou ràpida per evitar al màxim la pèrdua d'informació, com podria ser el canvi en la morfologia cel·lular o l'apoptosi deguda a l'estrès.

- Fixació amb formaldehid:
 - S'elimina el medi de cultiu de les plaques amb les cèl·lules adherides als cobreobjectes, i es fa un rentat amb PBS.
 - S'afegeix solució de formaldehid i PBS al 2% (uns 10 mL per placa p100), i es deixa actuar 10 min a 20-25 °C.
 - Es retira la solució de formaldehid i PBS i es realitzen dos rentats amb PBS fred; l'últim rentat es deixa uns 5 min a 20-25 °C i es retira.
 - S'afegeix una solució d'azida sòdica i PBS al 0.01% suficient per cobrir les cèl·lules.
 - Les mostres es poden emmagatzemar a 4 °C.

- Fixació amb metanol:
 - Refredar prèviament el metanol a -20 °C.
 - S'elimina el medi de cultiu de les plaques amb les cèl·lules adherides als cobreobjectes, i es fa un rentat amb PBS.
 - S'afegeix el metanol (7 mL per placa p100) i es deixa actuar 3 min. Es retira el metanol i es deixa assecar la placa.
 - Es fan dos rentats amb PBS fred, el primer ràpid i el segon es deixa durant 5 min a 20-25 °C, i es retira.
 - S'afegeix una solució d'azida sòdica i PBS al 0.01% suficient per cobrir les cèl·lules
 - Les mostres es poden emmagatzemar a 4 °C.

En el cas de les construccions 553wt, 553C73R, 607wt i 607C73R (veure Taula III.5), la proteïna EGFP que està unida a la proteïna U3S salvatge i al mutant C73R els proporciona una fluorescència intrínseca, per la qual cosa aquestes mostres es poden observar directament al microscopi de fluorescència.

III.6.5.2. Tinció indirecta amb anticossos i obtenció d'imatges

Un cop es tenen les mostres fixades, es porta a terme la tinció indirecta amb anticossos. Els anticossos emprats en les diverses tincions són:

- Anticòs policlonal de ratolí per detectar la U3S (H00007390-B01P, d'Abnova), dilucions 1:1000.
- Anticòs monoclonal de ratolí per detectar una seqüència d'aminoàcids de la proteïna EGFP (clons 7.1+13.1, Roche), utilitzat a la dilució 1:500.
- Anticòs secundari d'ase per detectar anticossos de ratolí; està conjugat amb el cromòfor Cy3, que té el màxim d'excitació a 550 nm i el màxim d'emissió a 570 nm, s'ha emprat a la dilució 1:600.

L'immunoassaig parteix de cèl·lules prèviament fixades, que es troben en una solució d'azida sòdica i PBS a 4 °C. En primer lloc es realitza una neteja dels cobreobjectes amb PBS a 4 °C, submergint el cobreobjectes en el PBS, canviant el PBS per PBS nou i submergint la mostra durant 5 min. Seguidament es procedeix a la incubació amb l'anticòs primari, afegint 50 µL d'una solució de 0.1% de saponina, 0.1% de BSA en PBS i l'anticòs primari (a les dilucions esmentades més amunt). Es deixa incubar les mostres durant 30 min a 20-25 °C, i es repeteix el procés de rentat inicial. S'incuben els cobreobjectes amb la mateixa solució de saponina i BSA però amb l'anticòs secundari. La incubació es torna a deixar 30 min a 20-25 °C, es repeteix el rentat inicial i les mostres queden preparades pel muntatge. Per a fixar els cobreobjectes en portaobjectes s'ha emprat el compost Fluormount-G (Southern Biotechnology #0100-01) amb 0.7 µg/mL de DAPI, colorant que s'uneix a l'ADN de doble cadena i que per tant, tenyeix els nuclis. El seu màxim d'excitació és a 258 nm, i el seu màxim d'emissió és a 461 nm.

El microscopi òptic de fluorescència emprat ha sigut el Zeiss Axiovert200, i les imatges s'han processat amb el programa AxioVision, mentre que en el cas de les imatges de microscòpia confocal s'ha emprat el microscopi confocal Leica TCS SP multifotó (Leica, Alemanya) i les imatges s'han adquirit emprant l'objectiu de 63X i s'han processat amb el programa Leica Confocal.

III.6.6. Xaperones químiques i inhibidor de proteasoma

S'han dissenyat diversos experiments amb xaperones químiques. El primer de tots ha consistit en la incubació de les línies cel·lulars estables MLP29:607_wt i MLP29:607_C73R en presència de glicerol al 0.5% i al 5% per una banda, i per una altra, incubades en presència de DMSO als mateixos percentatges. S'ha partit de cultius crescuts en plaques de 6 pous/placa,

amb una densitat cel·lular d'unes 50000 cèl·lules/pou, amb medi DMEM, 10% de FBS, 1% de P/S/F (per més detalls veure apartat III.6.1.1.) i 4 mg/mL de G418. La incubació amb DMSO i glicerol s'ha realitzat durant 72 h, observant les mostres cada 24 h. Un cop finalitzat el temps d'incubació, s'han fixat els covers on han crescut les mostres (seguint el protocol de l'apartat III.6.5.) i s'han incubat amb l'anticòs primari monoclonal de ratolí per detectar l'EGFP (clons 7.1 i 13.1, Roche), utilitzat a la dilució 1:500, i l'anticòs secundari comentat a l'inici de l'aquest apartat.

El segon experiment ha consistit en la incubació de cèl·lules MLP29 i M1 en presència de 4-fenilbutirat sòdic o PBA (pes molecular 186.2, Calbiochem® #567616) durant 48 h, compost capaç d'actuar com a xaperona química,²⁰ i/o la incubació amb l'inhibidor del proteasoma MG132 durant 2 h (veure Taula III.7), tot a 37 °C, 5% CO₂, i el medi especificat a l'apartat III.6.1.1.

DMSO	2mM PBA	2mM PBA 2µM MG132	2µM MG132
MLP29:054_wt	MLP29:054_wt	MLP29:054_wt	MLP29:054_wt
MLP29:054_C73R	MLP29:054_C73R	MLP29:054_C73R	MLP29:054_C73R
MLP29:553_wt	MLP29:553_wt	MLP29:553_wt	MLP29:553_wt
MLP29:553_C73R	MLP29:553_C73R	MLP29:553_C73R	MLP29:553_C73R
MLP29:607_wt	MLP29:607_wt	MLP29:607_wt	MLP29:607_wt
MLP29:607_C73R	MLP29:607_C73R	MLP29:607_C73R	MLP29:607_C73R
M1	M1	M1	M1
M1:289_wt	M1:289_wt	M1:289_wt	M1:289_wt
M1:289_C73R	M1:289_C73R	M1:289_C73R	M1:289_C73R
M1:437_wt	M1:437_wt	M1:437_wt	M1:437_wt
M1:437_C73R	M1:437_C73R	M1:437_C73R	M1:437_C73R

Taula III.7. Resum de les condicions en l'experiment d'incubació dels cultius MLP29, Huh7 i M1 en presència de MG132 i/o PBA. En el cas de les mostres M1 s'han fet controls amb cèl·lules M1 sense transfectar (M1 a la taula).

Els cultius de cèl·lules M1 s'han analitzat mitjançant immunotransferència de proteïnes, mentre que en el cas de les MLP29 s'ha emprat la citometria de flux. En el primer cas els anticossos primaris emprats han sigut l'anticòs de ratolí que reconeix la seqüència *neo* (dilució 1:500) i l'anticòs de ratolí que reconeix la seqüència *myc* (dilució 1:1000), mentre que l'anticòs secundari emprat ha sigut l'HRP contra ratolí (dilució 1:6000), detallats a l'apartat III.6.3.4.

Les mostres de cèl·lules MLP29 han sigut analitzades per citometria de flux. La citometria de flux és una tècnica que permet l'anàlisi cel·lular a partir de la medicació de la dispersió de la llum i la fluorescència que posseeixen les cèl·lules, a mesura que se les fa passar per un raig de llum. Quan això passa, les cèl·lules provoquen una dispersió de la llum, i en base a la difracció en sentit frontal es pot avaluar la mida de les cèl·lules de la mostra, i mesurant la reflexió de la llum

de manera lateral s'avalua la complexitat d'aquestes. A més de la dispersió de la llum, si prèviament al seu anàlisi es tracta les cèl·lules en presència d'anticossos específics marcats amb molècules fluorescents, es pot analitzar a la vegada la presència de diversos marcadors.

El citòmetre està format per un seguit de detectors (Figura III.14). Un d'aquests detectors està enfocacat en línia amb el raig de llum, es coneix com a FSC (de l'anglès *forward scatter channel*) i correlaciona la mida de les cèl·lules amb la intensitat del corrent. La resta de detectors s'anomenen SSC (*side scatter channel* en anglès), i el senyal que detecten depèn de la complexitat interna de la partícula (per exemple la forma del nucli, la quantitat i tipus de grànuls citoplasmàtics o la rugositat de la membrana cel·lular).

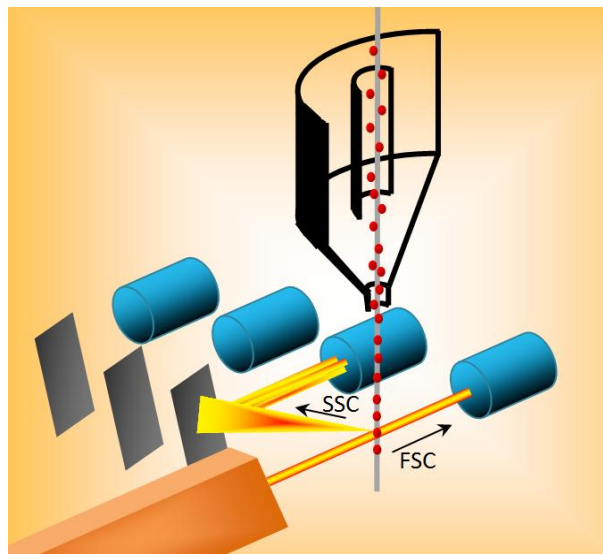


Figura III.14. Esquema del mecanisme de funcionament d'un citòmetre de flux. Les partícules (esferes vermelles) es desplacen verticalment cap avall, on un raig de llum làser les intercepta, generant-se el senyal que serà enregistrat pels diferents detectors (esquematzats en blau).

L'enregistrament dels senyals provinents del detector FSC sol fer-se en forma d'histograma que correlaciona el recompte de cèl·lules i la intensitat del senyal de voltatge, on una major intensitat de voltatge correspon a una mida de partícula més gran (histograma B, Figura III.15). Les dades que provenen dels detectors SSC també poden ser interpretades mitjançant un histograma. Aquests detectors poden registrar diferent informació a la vegada, com la complexitat de les partícules (histograma A, Figura III.15) i la desviació i/o fluorescència de les partícules. La suma de tota aquesta informació es sol representar mitjançant una gràfica de correlació de dues dimensions, com la que es pot observar en l'histograma C de la Figura III.15, on s'han representat els valors que s'obtingrien de l'anàlisi d'una mostra de glòbuls blancs.

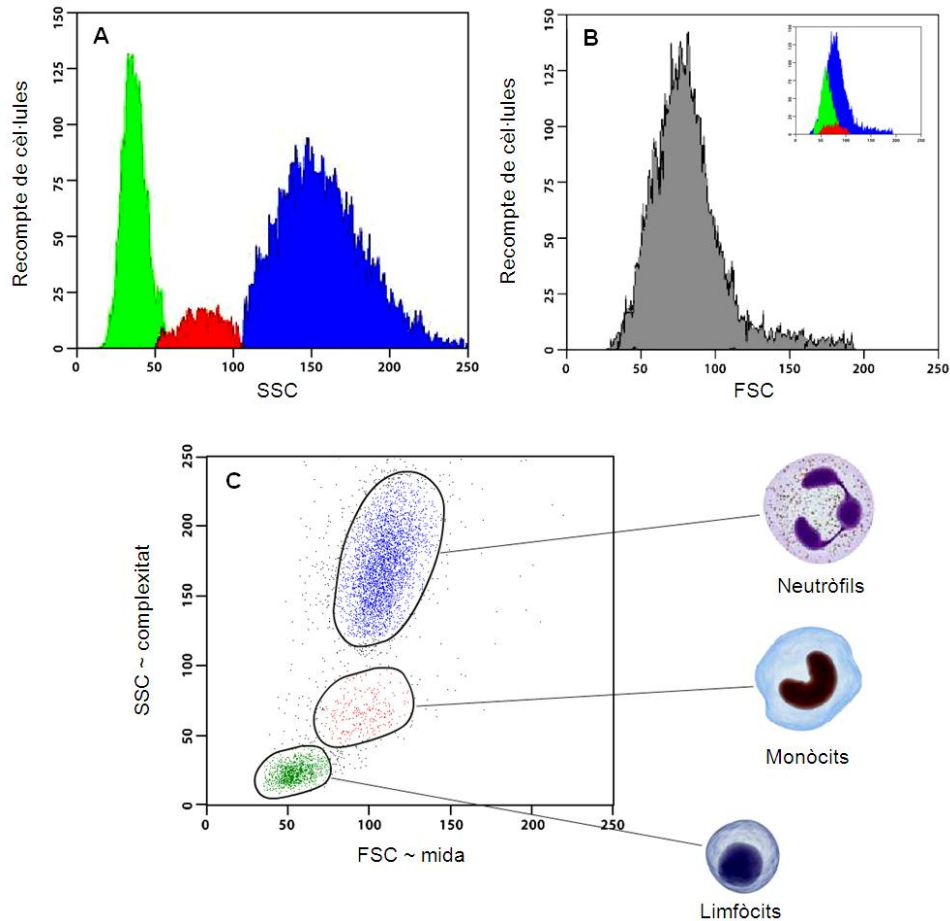


Figura III.15. Histogrames corresponents a les dades de citometria de flux d'una mostra de glòbuls blancs (font: Invitrogen Tutorials). En l'histograma A es representen les dades captades pels detectors SSC. A l'histograma B s'observen els valors de FSC de la mostra, i el sub-histograma s'hi representen els valors de FSC amb la component SSC (representada amb els colors verd, vermell i blau). L'histograma C conté els valors de SSC i FSC, on s'hi poden distingir les poblacions corresponents a neutròfils, monòcits i limfòcits.

Per l'anàlisi amb citometria de flux, s'ha seguit el següent protocol per a l'obtenció de les mostres:

- 1- es tripsinitza el cultiu (seguint el protocol descrit a l'apartat **III.6.1.2.**) i es transfereix a un tub de 15 mL;
- 2- es renta el cultiu amb 7 mL de PBS, i es centrifuga a 232 g durant;
- 3- es fixen les cèl·lules amb una solució de 500 µL de PBS amb 2% de formaldehid, durant 20 min a temperatura ambient, agitant suaument cada 5 min;
- 4- s'afegeixen 10 mL de glicina 25 mM en PBS i es deixa actuar 10 min a temperatura ambient, i es centrifuguen les cèl·lules a 232 g durant 5 min;
- 5- es retira el medi i s'afegeixen 10 mL de PBS i es deixa durant 5 min abans de bloquejar;
- 6- s'afegeixen 250 µL de la solució de bloqueig (1% BSA, 0.1% saponina), i s'incuba durant 20 min a temperatura ambient;
- 7- s'incuba amb l'anticòs primari i 250 µL de solució de bloqueig, durant 30 min a temperatura ambient;

- 8- es renta l'anticòs no unit amb 10 mL de PBS que es deixen durant 5-10 min, es centrifuguen a 232 g durant 5 min, s'aspira el sobrenedant, i es torna a repetir el procés de rentat amb PBS;
- 9- s'incuba amb l'anticòs secundari dissolt en 500 µL de solució de bloqueig, durant 30 min a temperatura ambient;
- 10- es renten les cèl·lules segons es descriu al pas 8;
- 11- es solubilitzen les cèl·lules en 300 µL de PBS;
- 12- les mostres es filtren abans de l'anàlisi amb el citòmetre de flux FACSCanto II (Becton Dickinson).

S'han emprat els següents anticossos: en les mostres MLP29:054_wt i MLP29:054_C73R s'ha utilitzat l'anticòs primari policlonal de ratolí que reconeix la proteïna U3S (dilució 1:500), mentre que en el cas de les mostres MLP29:553_wt, MLP29:553_C73R, MLP29:607_wt i MLP29:607_C73R l'anticòs primari utilitzat reconeix la seqüència de la EGFP (dilució 1:500), ambdós detallats a l'apartat **III.6.5.2.** L'anticòs secundari emprat en aquest cas ha sigut un anticòs d'ase que reconeix els anticossos de ratolí i porta unit el cromòfor Cy3 (dilució 1:500) també detallat a l'apartat **III.6.5.2.**

Els últims resultats d'aquest projecte s'han obtingut al grup del Dr. Juan Manuel Falcon, gràcies al següent experiment: la incubació de les línies cel·lulars MLP29:553_wt, MLP29:553_C73R, MLP29:607_wt i MLP29:607_C73R, amb l'inhibidor del proteasoma MG132 a 10 µM, durant 18 h, enlloc de les 2 h de temps màxim en les quals s'havia treballat. Un cop acabat el temps d'incubació, per una part s'han obtingut uns cobreobjectes amb les cèl·lules que permetran la obtenció d'imatges per microscòpia confocal, mentre que amb la resta de cèl·lules s'ha fet una extracció de la fracció de proteïnes per poder dur a terme una immunoflorescència, i els anticossos utilitzats es detallen a continuació:

- anticòs de ratolí per reconèixer la proteïna p21 (clon F-5, Santa Cruz), dilució 1:500;
- anticòs de ratolí per reconèixer la proteïna Hsp70 (clon BRM-22, SIGMA), dilució 1:1000;
- anticòs de ratolí per reconèixer la proteïna EAA1 (clon 14, BD), dilució 1:500;
- anticòs de ratolí per reconèixer la neomicina fosfo-transferasa, NFT (clon 4B4D1, Abcam), dilució 1:500;
- anticòs de ratolí que reconeix la proteïna EGFP (clons 7.1 i 13.1, Roche), dilució 1:1000;
- anticòs de ratolí que reconeix la ubiquitina (clon 6C1.17, BD), dilució 1:500.

El revelat s'ha dut a terme seguint el protocol de l'apartat **III.6.3.4.** amb els mateixos reactius i anticòs secundari.

Bibliografia Capítol III

- ¹ Studier F.W., Moffatt B.A. *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.* J. Mol. Biol. 189, 1:113-130 (1986).
- ² Pace C. N.; Vajdos F.; Fee L.; Grimsley G.; Gray. *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.* Protein Science, 4, 11:2411-2423 (1995).
- ³ Current Protocols in Molecular Biology®, Quantitation of proteins, John Wiley & Sons, Inc.
- ⁴ Smith M. *Nobel Lectures, Chemistry 1991-1995*, Editor Bo G. Malmström, World Scientific Publishing Co., Singapore, (1997).
- ⁵ Kunkel T.A. Roberts J.; Zakour R. A. *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.* Methods Enzymol. 154:367-382 (1987).
- ⁶ Hanahan D. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J. Mol. Biol. 166, 4:557-580 (1983).
- ⁷ <http://sil.biochem.uiowa.edu/vectors/pETM/pETM-11.pdf> (21/01/2010).
- ⁸ Gill S. C., and Von Hippel P. H. *Calculation of protein extinction coefficients from amino-acid sequence data.* Anal. Biochem. 182, 319–326 (1989).
- ⁹ Shoolingin-Jordan, P. M., and Leadbeater, R. *Coupled assay for uroporphyrinogen III synthase.* Methods Enzymol. 281, 327–336 (1997).
- ¹⁰ Wayne, A. W., Straight, R. C., Wales, E. E., and Englert, E. *Isomers of uroporphyrin free acids separated by HPLC.* J. High Resolut. Chromatogr. 2, 621–622 (1979).
- ¹¹ <http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Bio750/UV-VisSpectroscopy.html> (06/08/2009).
- ¹² Santoro, M. M., and Bolen, D. W. *Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants.* Biochemistry 27, 8063–8068 (1988).
- ¹³ Collins S. J., Gallo R. C., Gallagher R. E. *Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.* Nature 24;270(5635):347-349 (1977).
- ¹⁴ Nakabayashi H., Taketa K., Miyano K., Yamane T., Sato J. *Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium.* Cancer Research 42, 3858-3863 (1982).
- ¹⁵ Scianna M., Merks R. M. H., Preziosi L., Medico E. *Individual cell-based models of cell scatter of ARO and MLP-29 cells in response to Hepatocyte Growth Factor.* J. Theor. Biol. 260(1):151-160 (2009).
- ¹⁶ Bradford M. M. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.* Anal. Biochem. 72:248-54 (1976).
- ¹⁷ TRIzol, Invitrogen #15596-018, Carlsbad, CA, USA (rev. 12 juny 2007).

- ¹⁸ Livak K. J., Schmittgen T.D. *Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method.* Methods 25, 402-408 (2001).
- ¹⁹ Pfaffl M. W. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Res. 29(9):e45 (2001).
- ²⁰ Yam G. H-F., Gaplovska-Kysela K., Zuber C., Roth J. *Sodium 4-Phenylbutyrate Acts as a Chemical Chaperone on Misfolded Myocilin to Rescue Cells from Endoplasmatic Reticulum Stress and Apoptosis.* Invest. Ophthal. Visual. Science 48; 1683-1690 (2007).