

Tesi Doctoral

**EFFECTES DE FÀRMACS INTERCALANTS DEL  
DNA EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA A  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Marta Rojas Amadó**





Barcelona, Setembre 2007

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
Programa de Doctorat de Biomedicina  
Bienni 2002-2004

**EFFECTES DE FÀRMACS INTERCALANTS DEL DNA EN L'EXPRESSION  
GÈNICA A *Saccharomyces cerevisiae***

Memòria presentada per **Marta Rojas Amadó**  
Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

**Tesis Doctoral realitzada en el Departament de Biologia  
Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona  
(IBMB-CSIC)**

Directors

**José Portugal Minguela**

**Benjamin Piña Capó**

Tutor

**Rafael Franco Fernández**

## **Material i Mètodes**

---

## I. PREPARACIÓ DELS FÀRMACS

### I.1 Preparació i determinació de la concentració de Daunorubicina

- Es pesa aproximadament 1 mg del fàrmac, s'afegeix el volum necessari de 150mM NaCl estèril per la Daunorubicina (Sigma) o Metanol per la Criptolepina, cedida pel Dr. C. Wright (Univerity of Bradford, UK), per ajustar la concentració teòrica a 1mM.
- S'agita en la foscor per rotació entre 4-16 hores per a què es dissolgui bé el fàrmac. Es centrifuga lleugerament per comprovar que el fàrmac està ben dissolt.
- La concentració real de fàrmac es determina a partir del coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) de la Daunorubicina i la Criptolepina (Bonjean et al., 1998; Leng and Leno, 1997). Es tracta d'un mètode electroforètic basat en la determinació de l'absorbància de la Daunorubicina a 480nm, i de la Criptolepina a 369nm. Conegut el coeficient d'extinció molar, és possible determinar la concentració del fàrmac (c) mitjançant la fórmula:

$$A = \epsilon * l * c$$

sent,  $\epsilon$  (Daunorubicina)= 11500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

$\epsilon$  (Criptolepina)= 28600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

$l$ = pas de llum de la cubeta en cm (generalment 1 cm)

$A$ = lectura espectrofotomètrica;

per la Daunorubicina a 480 nm

per la Criptolepina a 369 nm

L'estoc del fàrmac es conserva a -20°C.

A l'hora de realitzar els diferents experiments es descongelen els estocs i es dilueixen fins arribar a les concentracions apropiades, utilitzant el medi de cultiu, amb 150mM NaCl estèril per la Daunorubicina o Metanol per la Criptolepina.

#### Solucions

- 150mM NaCl estèril filtrat amb una xeringa i un filtre de 0.22  $\mu$ m (Millipore) en una campana de flux laminar.

## Observacions

Tant la Daunorubicina com la Criptolepina s'intercalen al DNA, són molècules molt tòxiques. Cal treballar sempre amb guants i llençar els residus generats de manera apropiada (citotòxics).

## II. TÈCNiques DE TREBALL AMB EL LLEVAT *Saccharomyces cerevisiae*

### II.1 Soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades en aquest treball

SOCA	GENOTIP	ORIGEN
<b>BY4741</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>Δerg6</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 erg6::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δrad52</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 rad52::kanMX4</i>	Euroscarf
<b>JN362a</b>	<i>MATa ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1 ISE2</i>	(Nitiss et al., 1992)
<b>JN394</b>	<i>MATa ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1 ISE2 rad52::LEU2</i>	(Nitiss et al., 1992)

**Taula M1. Llistat de soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades.** S'indica el nom de la soca, el genotip i l'origen.

### II.2 Creixement i manteniment de soques de *Saccharomyces cerevisiae*

Les cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* poden ser crescudes en medi ric de composició desconeguda, anomenat YEP o en medi sintètic amb la composició definida, anomenat medi SD (*Synthetic Dropout*) i per tant permetrà créixer selectivament les soques auxotròfiques a les quals s'haurà de complementar el medi amb el producte del gen necessari per eliminar l'auxotrofia.

Les cèl·lules de llevat poden ser crescudes tant en medi líquid com en medi sòlid, preparats ambdós amb els mateixos components afegint agar en els medis sòlids per a la seva solidificació.

#### II.2.1 Composició dels medis utilitzats per créixer llevats

##### Medi Ric (YEP)

- Extracte de llevat 10 g/l,
- Peptona Bacteriològica 20 g/l

### Medi sintètic (SD)

- Medi sintètic complet suplementat o CSM, menys Uracil i Histidina (CSM-HIS-URA, Bio 101) 0.67 g/l
- *Yeast Nitrogen Base* o YNB (Difco) 1.7 g/l
- Sulfat amoni 5 g/l

Els medis sòlids contenen, a més, 20 g/l d'Agar (Difco).

Ambdós tipus de medis es preparen autoclavant aquests components en el recipient adequat (*erlenmeyers* o ampolles de vidre segons les necessitats) no superant dos terços del volum del recipient. L'autoclau es realitza a 121°C durant 20min. Un cop autoclavats, s'afegeixen els components adients en cada cas.

### Fonts de Carboni:

- Glucosa 2% (d'un estoc estèril de 40 g/l)
- Galactosa 2% (d'un estoc estèril de 20 g/l)
- Rafinosa 2% (d'un estoc estèril de 20 g/l)

### Aminoàcids i nucleòtids necessaris per complementar el medi:

Al medi SD s'afegeixen diferents combinacions d'aminoàcids i nucleòtids amb alguns components omesos per tal d'obtenir un medi selectiu per la presència dels gens marcadors capaços de recuperar les auxotròfies que presenta una determinada soca. Les diferents combinacions d'aminoàcids i nucleòtids es preparen en forma de *dropout* 10x amb les següents concentracions finals:

- Histidina 200 mg/l
- Uracil 200 mg/l

### Components addicionals

- G418 300 mg/l
- 3-Aminotriazol (3-AT) dissolt en aigua estèril

## Observacions

Tots els components utilitzats en els medis per créixer llevats han de ser estèrils, ja estiguin autoclavats o filtrats amb els filtres Millex de 0.22 µm (Millipore). S'esterilitzen mitjançant filtració aquells components susceptibles de fer-se malbé en ser autoclavats, com la galactosa, el G418, o el 3-AT.

Tant l'aminoàcid Histidina, com el nucleòtid Uracil es preparen en forma d'estocs esterilitzats a l'1%.

### II.2.2 Creixement i manteniment rutinari de *Saccharomyces cerevisiae*

La temperatura òptima de creixement de *Saccharomyces cerevisiae* és de 30°C, al ser un microorganisme microaeròfil els cultius líquids es creixen en agitació per tal d'afavorir l'intercanvi gasós i evitar la formació de grumolls. Els cultius sòlids es creixen en plaques de Petri en el medi solidificat per l'agar i segellades amb *parafilm* per tal d'evitar que s'assequin excessivament.

### Manteniment de les soques de *Saccharomyces cerevisiae*

Les soques de *Saccharomyces cerevisiae* poden mantenir-se indefinidament en medi YPD amb glicerol al 15% a -80°C. Aquests estocs congelats s'anomenen glicerinat.

### Descongelació d'estocs

Per recuperar cèl·lules de llevat a partir dels estocs es rasca lleugerament el glicerinat (amb un escuradent estèril i s'estria en el medi adient, procurant que no es descongeli el glicerinat. Les plaques s'incubaran a 30°C fins l'aparició de colònies (pot oscil·lar entre 3 i 5 dies aproximadament). Un cop han crescut en el medi sòlid, les plaques segellades es poden guardar a 4°C durant 2 mesos.

### Preparació de cultius cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae*

A partir d'una colònia crescuda en medi sòlid s'inocula en un minicultiu (cultiu de 2-4 ml de medi líquid). A partir del minicultiu en fase exponencial s'inocula un nou medi, el cultiu resultant serà la mostra esperada per procedir l'experiment.



## Observacions

Per determinar el nombre de cèl·lules de llevat en suspensió, es parteix de la correlació entre la densitat òptica (OD), mesurada com l'Absorbància a 600 nm en un espectrofotòmetre, i el nombre de cèl·lules teòric;

$$1 \text{ OD (Abs 600nm)} = 2 \cdot 10^7 \text{ cèl·lules/ml.}$$

### II.2.3 Anàlisi de creixement en medi líquid de *Saccharomyces cerevisiae*

La capacitat inhibidora del creixement per la Daunorubicina i la Criptolepina es va estudiar mitjançant un assaig clonogènic en les diverses condicions i soques. L'assaig clonogènic és un mètode experimental *in vivo* que mesura la sensibilitat cel·lular enfront un agent citotòxic. Consisteix en determinar la taxa proliferativa d'una població després del tractament amb el compost. A partir de l'assaig clonogènic es pot establir una relació dosi-resposta o una corba de supervivència cel·lular.

## Procediment

A partir d'un cultiu en fase exponencial s'inoculen 20 ml de medi fresc. La densitat òptica inicial s'ajusta entre 0.05 i 0.1 OD, es deixa temperar 30 minuts a 30°C en agitació.

- En una placa de microtitulació de 96 pous (amb pous de base plana) estèril es sembren 200 µl del cultiu temperat.
- Es realitza un banc de dilucions seriades amb la Daunorubicina o la Criptolepina, i es tracten les cèl·lules amb les diferents dosis (per triplicat). S'incuben a 30°C en agitació i a les fosques.
- A diferents temps es mesura la densitat òptica a una absorbància de 600 nm mitjançant un lector de plaques.
- A partir dels valors obtinguts es calcula el pendent del creixement en la fase exponencial.

$$\text{Taxa de Creixement} = (\text{OD}_{\text{final}} - \text{OD}_{\text{inicial}}) / \text{Temps transcorregut}$$

### III. MESURA DE L'ACUMULACIÓ INTRACEL·LULAR DE LA DAUNORUBICINA

Alguns cromòfors emeten fluorescència quan s'exciten a una determinada longitud d'ona. S'utilitza aquesta propietat per determinar, utilitzant un espectrofluorímetre, la incorporació del fàrmac en l'interior de les cèl·lules de diverses soques de llevat, tenint en compte tant l'acumulació de dins la cèl·lula, com en les membranes. L'acumulació intracel·lular de la Daunorubicina es va determinar seguint el mètode descrit pel Dr. Horowitz amb modificacions (Horowitz et al., 1992).

#### Procediment

Les diverses soques es tracten amb la concentració corresponent de Daunorubicina, 5 $\mu$ M o 30 $\mu$ M, durant 10 o 16 hores respectivament, procurant que les cèl·lules estiguin en fase exponencial. S'ajusta el mateix número de cèl·lules per a totes les condicions.

- a. Centrifugar 5 ml del cultiu ( $10^7$  cèl·lules, aproximadament) a 1700xg durant 10 minuts a temperatura ambient, eliminar el sobrenedant i rentar el precipitat amb aigua estèril.
- b. Ressuspendre el precipitat en 500  $\mu$ l de Tampó Liticasa.
- c. Incubar a 37°C mínim 6 hores.
- d. Centrifugar a 1700xg durant 10 minuts a temperatura ambient.
- e. Ressuspendre el precipitat en 2.5 ml de 0.08M HCl en isopropanol.
- f. Vortejar i llisar les cèl·lules en un bany d'ultrasons durant 10 minuts per alliberar el fàrmac intracel·lular.
- g. Mantenir les cèl·lules a 4°C protegides de la llum 16 hores, aproximadament.
- h. Centrifugar a 10000xg durant 20 minuts a 4°C.

En el sobrenedant queda el fàrmac cel·lular i en el precipitat, les restes de la lisis cel·lular.

Determinar la fluorescència emesa pel fàrmac intracel·lular (proporcional a la quantitat de fàrmac incorporat) amb un espectrofluorímetre. Es va utilitzar l'espectrofluorímetre Shimadzu RF1505, a unes longituds d'ona d'excitació i emissió de 480 i 555 nm, respectivament.

- i. Quantificar la quantitat acumulada del fàrmac intracel·lular a partir de la recta patró corresponent a la Daunorubicina. Representar les quantitats de fàrmac

incorporat en ng equivalents (el fàrmac i els seus metabòlits) per cada  $10^7$  cèl·lules.

### Solucions

- Tampó Liticasa: 1M Sorbitol, 0.1M EDTA, 0.15mg de liticasa, ajustar a pH 7.5.
- 0.08M isopropanol en HCl.

## IV. MÈTODES DE MANIPULACIÓ I EXTRACCIÓ DEL DNA

### IV.1 Obtenció de DNA plasmídic

#### IV.1.1 Transformació en bacteris

Les transformacions dels plasmidis es van realitzar utilitzant la soca d'*E.coli* DH-5 $\alpha$  competent. Les cèl·lules competents són prèviament preparades mitjançant el mètode de clorur de rubidi (Hanahan, 1983), aliquidades i congelades a -80°C.

#### Procediment

Consisteix en obrir la paret bacteriana utilitzant un tractament conjunt amb el lisozim, un detergent no aniónic i calor.

- Afegir 100  $\mu$ l de cèl·lules en un tub de centrífuga amb el DNA plasmídic.
- Incubar durant 15 minuts en gel.
- Incubar les cèl·lules a 37°C durant 15 minuts per provocar el xoc tèrmic.
- Incubar 2 minuts en gel.
- Afegir 800  $\mu$ l de SOC.
- Incubar 30 minuts a 37°C.
- Sembrar en plaques amb medi selectiu (LB agar amb antibiòtic).

### Solucions

- LB (*Luria Broth*)-agar medi selectiu: 1% bactotripton, 0.5% extracte de llevat, 1% clorur sòdic, 2% agar; autoclavar i afegir 50  $\mu$ g/ml d'ampicil·lina.
- SOC: 2% tripton, 0.5% extracte de llevat; autoclavar i afegir 25% 1M KCl, 1% 1M MgCl<sub>2</sub>, 1% 1M MgSO<sub>4</sub>, 0.2% 5 M NaCl.

#### IV.1.2 Minicultius i glicerinat

Les plaques obtingudes es van utilitzar per picar colònies aïllades i inocular-les en minicultius. A partir dels minicultius es podien obtenir glicerinat per conservar els estocs de cèl·lules bacterianes transformades amb els plasmidis d'interès o per obtenir els plasmidis a petita escala.

- a. Inocular en 2-5 ml d'LB-Ampicil·lina i es deixa en agitació a 37°C durant 16 hores.
- b. Pipetejar 1 volum del cultiu en un criotub estèril, i afegir 1 volum de la solució de glicerinat. Ben ressuspès, es guarda a -80°C.

#### Solucions

- LB (*Luria Broth*)-agar medi selectiu: veure apartat IV.1.1.
- Solució de glicerinat: 40% glicerol, 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 25 mM Tris·HCl (pH 8.0).

#### IV.1.3 Obtenció de plasmidi a petita escala (Minipreparacions)

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic a partir de colònies bacterianes s'ha emprat el mètode de lisi per ebullició (Holmes and Quigley, 1981). Consisteix en obrir la paret bacteriana utilitzant un tractament conjunt amb el lizozim, un detergent no aniònic i calor. El cromosoma bacterià resta unit a la paret, mentre que el DNA plasmídic s'allibera al medi.

#### Procediment

- a. Inocular una colònia en 2-5ml LB-Antibiòtic, créixer a 37°C durant 16 hores en agitació.
- b. Transferir el minicultiu a un tub de microcentrífuga. Centrifugar a 14000xg durant 20 segons i eliminar el sobrenedant.
- c. Ressuspèndre el sediment en 0.7ml d'STET. Reposar en gel.
- d. Afegir 25 µl de lizozim. Reposar en gel durant 5 minuts.
- e. Incubar a 95-100°C durant 2 minuts.
- f. Recollir el sobrenedant, el DNA plasmídic, i precipitar amb 0.7 ml d'isopropanol durant 29 minuts a -20°C.
- g. Centrifugar a 14000xg durant 5 minuts.
- h. Rentar el sediment amb 70% etanol. Deixar assecar a temperatura ambient.
- i. Ressuspèndre en 100µl de TE.

## Solucions

- LB (*Luria Broth*)-agar medi selectiu: veure apartat IV.1.1.
- STET: 8% sacarosa, 5% Triton X-100, 17 g/l EDTA, 6g/l Tris·HCl; pH 8.0.
- Isopropanol
- 1x TE: 10mM Tris·HCl, 1mM EDTA; pH 8.0.

### IV.1.4 Transformació del DNA plasmídic en llevats

Per transformar de DNA plasmídic en *S.cerevisiae* és va realitzar seguint el mètode de l'acetat de liti (AcLi) descrit per (Gietz et al., 1995). Aquest mètode consisteix en permeabilitzar les cèl·lules de llevat amb acetat de liti. Les cèl·lules competents es mesclen amb el DNA en presència de polietilenglicol (PEG) per conservar l'estructura de la membrana plasmàtica quan se'ls sotmet a un xoc tèrmic que afavorirà l'entrada del DNA plasmídic en l'interior cel·lular.

### Procediment

- a. Inocular cultiu en medi YPD i créixer a 30°C en agitació 16 hores fins  $1-2 \cdot 10^7$  cèl·lules per ml.
- b. Diluir el cultiu en medi YPD fresc i temperat fins obtenir  $2 \cdot 10^6$  cèl·lules per ml, deixar créixer a 30°C en agitació fins  $1 \cdot 10^7$  cèl·lules per ml.
- c. Centrifugar durant 5 minuts a 1700xg a temperatura ambient. Ressuspendre'les en 1ml d'aigua estèril i transferir a un tub de microcentrífuga, precipitar les cèl·lules (14000xg durant 5 minuts) i llençar el sobrenedant.
- d. Rentar el precipitat en 1ml de TE/AcLi, finalment ressuspendre les cèl·lules en 1xTE/AcLi.
- e. Mesclar 50 µl de cèl·lules amb 1 µg de DNA plasmidi i 50 µg de ssDNA (DNA d'esperma de salmó de cadena senzilla).
- f. Afegir 300 µl Solució 40% PEG4000 estèril, i mesclar.
- g. Incubar a 30°C durant 30 minuts en agitació.
- h. Transferir a un bany a 42°C durant 15 minuts.
- i. Centrifugar a 14000xg, 5 segons.
- j. Ressuspendre el precipitat en 1 ml de 1xTE i sembrar en placa.

## Solucions

- TE/AcLi: 10xTE [0.1M Tris-HCl, 0.01M EDTA, pH 7.5], 10xLiAc [1M AcLi pH 7.5].
- Solució PEG4000: 40% PEG4000, 1xTE, 1xAcLi.
- DNA d'esperma de salmó: L'esperma de salmó (Sigma-D1626 Tipus3 en forma de sal de sodi) es ressuspèn en 1xTE (10 mg/ml) a 4°C durant 16 hores. Es sonica 2 vegades, 30 segons, s'extreu amb fenol:cloroform:alcohol isoamils (25:24:1) dues vegades i es precipita amb etanol. Es dissol en 1xTE a 10mg/ml i es desnatura a 95°C durant 20min. S'aliquota i es guarda a -20°C.

## Observacions

L'eficiència de transformació en la soca *Δerg6* és molt baixa, cal procurar que tant els cultius inicials estiguin en la fase exponencial, com que les solucions estiguin recent fetes al moment d'usar-les, sobretot el TE/AcLi.

### IV.1.5 DNA plasmídic utilitzat

PLÀSMID	ÚS	ORIGEN
pRS413	Plasmidi centromèric amb el gens HIS3 com a marcador	(Sikorski and Hieter, 1989)

Taula M2. DNA plasmídic usat en aquest estudi.

### IV.1.6 Soca bacteriana utilitzades per a la preparació de DNA plasmídic

SOCA	GENOTIP
DH5α	<i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r<sub>K</sub>m<sub>K</sub>) recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[traD36 proAB+ lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]</i>

Taula M3. Soca d'*E.coli* usada en aquest estudi.

## V. MÈTODES MANIPULACIÓ I EXTRACCIÓ DEL RNA TOTAL

### V.1 Extracció RNA total de llevat

L'RNA total es va utilitzar per determinar l'efecte en la transcripció de la Daunorubicina i la Criptolepina en el *Saccharomyces cerevisiae*.

### V.1.1 Mètode extracció RNA del fenol calent

L'RNA total utilitzat per avaluar la resposta transcripcional en el *S.cerevisiae* dels fàrmacs mitjançant les tècniques dels microarrays de cDNA i la RT-PCR semiquantitativa, es va extreure seguint el mètode del fenol calent (*hot phenol*) amb modificacions (Kohrer and Domdey, 1991).

#### Procediment

- a. Inocular cultiu de la soca *Δerg6* en 100 ml medi fresc, deixar créixer a 30°C en agitació 16 hores, fins obtenir  $1-2 \cdot 10^7$  cèl·lules/ml.
- b. Diluir cultiu en 25 ml de medi fresc i temperat a  $1-2 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml. S'aplica el tractament corresponent i s'incuba a 30°C en agitació fins a tenir el número de cèl·lules desitjat.
- c. Centrifugar 5 minuts a 1700xg a 4°C. Rentar amb Aigua DEPC el precipitat.
- d. Ressuspendre les cèl·lules amb 10 ml Tampó AcNa, 1ml 10%SDS, 10 ml fenol saturat en aigua, en aquest ordre. Totes les solucions estan prèviament temperades a 65°C.
- e. Mesclar 5 minuts l'ajut del vòrtex.
- f. Incubar a 65°C durant 10 minuts, vortejant 10 segons la mostra cada minut.
- g. Centrifugar a 1700xg durant 10 minuts.
- h. Recuperar fase aquosa i afegir 10 ml Fenol saturat en aigua.
- i. Vortejar 30 segons, i centrifugar 15 minuts a 1700xg.
- j. Recuperar fase aquosa, afegir Fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1) i vortejar 2 minuts.
- k. Centrifugar a 1700xg durant 15 minuts.
- l. Recuperar fase aquosa, mesclar-la amb 1 volum d'isopropanol i 0.1 volum AcNa 3M. Deixar precipitar l'RNA 1 hora a -20°C.
- m. Centrifugar a 1700xg durant 30 minuts a 4°C.
- n. Rentar el precipitat amb Etanol 75% i precipitar-les per centrifugació. Repetir el pas. Precipitat deixar-lo assecar a temperatura ambient.
- o. Dissoldre el precipitat en un volum petit d'aigua DEPC (l'RNA es pot conservar a -80°C). Es va comprovar l'estat qualitatiu de l'RNA (apartat V.2.2) i el quantitatiu (apartat V.1).

## Solucions

- Tampó AcNa: 50mM AcNa, 10mM EDTA, pH 5.0
- Fenol saturat en aigua: S'afegeix 1mg 8-hidroxiquinoleïna (Fluka) per ml i 0.5 ml  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) per litre. S'agita i es protegeix de la llum.
- Aigua DEPC, aigua lliure d'RNases: realitzar una dilució 1/500-1/1000 de DEPC (dietilpirocarbonat, Sigma) en aigua miliQ, en una campana d'extracció de gasos agitar entre 4 i 16 hores amb un agitador magnètic, i autoclavar dues vegades per inactivar les restes de DEPC.
- Fenol:Cloroform:Alcohol isoamílic (25:24:1)
- Isopropanol
- 3M Acetat sòdic
- Etanol 75%, en aigua DEPC.

## Observacions

- Treballar en condicions RNase-*free*, amb guants, material autoclavat i preparar les solucions necessàries amb aigua DEPC, per evitar la degradació de l'RNA.
- Treballar en campana d'extracció de gasos i amb guants, degut a la manipulació d'agents tòxics com el fenol i el DEPC.

### V.1.2 Tractament amb DNasa I

Per eliminar possibles contaminacions amb DNA genòmic que pogués interferir en els resultats obtinguts en els anàlisis d'expressió gènica induïts pel tractament amb els fàrmacs, es van tractar les mostres d'RNA total amb DNasa I lliure d'RNases.

## Procediment

- a. A partir de 100  $\mu$ l d'RNA mesurats en l'espectrofotòmetre (apartat VI.1), s'afegeix el 10  $\mu$ l de tampó DNasa I, 10  $\mu$ l de DNasa I, i 0.5  $\mu$ l aigua DEPC.
- b. Incubar 30 minuts a 37°C.
- c. Aturar la reacció amb un volum de la Solució de Finalització 10x.
- d. Eliminar la DNasa I rentant amb fenol àcid, seguidament vortejar.
- e. Centrifugar 14000xg durant 5 minuts.
- f. Transferir a fase aquosa (la superior) a un nou tub de microcentrífuga.
- g. Afegir un volum de cloroform:alcohol isoamílic (24:1), i vortejar.



- h. Centrifugar 14000xg durant 5 minuts.
- i. Recuperar fase aquosa (part superior), afegir un volum d'isopropanol i precipitar l'RNA (apartat V.1.1).

### Solucions

- 1 U/ $\mu$ l DNasa I lliure d'RNases (BD Clontech)
- Tampó DNasa I 10x: 400 mM Tris·HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>.
- Solució de Finalització 10x: 1 mg/ml glicogen, i 0.1M EDTA pH 8.0, Fenol àcid: fenol a pH 4.3  $\pm$ 0.2 saturat amb 0.1 M tampó citrat (Sigma). S'afegeix 1mg 8-hidroxiquinoleïna (Fluka) per ml i 0.5 ml  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) per litre.
- Cloroform:Alcohol isoamílic (24:1).
- Isopropanol.
- Etanol 75%, en aigua DEPC.

### V.1.3 Extracció RNA total amb el *Kit RiboPure<sup>TM</sup> Yeast* (Ambion)

L'RNA total utilitzat per avaluar la resposta transcripcional en el *S.cerevisiae* als fàrmacs mitjançant les tècniques dels microarrays d'oligonucleòtids i la qRT-PCR, es va extreure amb un procediment que no requereix tractament enzimàtic per trencar les cèl·lules, si no que recórrer a l'acció de la lisi cel·lular amb boletes de zircònia juntament amb el fenol, *Kit Ribopure* (Ambion) i requereix un número inferior de cèl·lules que el mètode del fenol calent.

### Procediment

- a. Inocular cultiu de la soca *Aerg6* en 400 ml medi YPD fresc per triplicat, deixar créixer a 30°C en agitació 16 hores. Cultius finals en fase exponencial.
- b. Diluir cultiu medi fresc i temperat a  $8 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml. S'aplica el tractament corresponent i s'incuba a 30°C en agitació fins haver transcorregut el temps desitjat.
- c. Centrifugar 5 minuts a 1700xg a 4°C. Rentar el precipitat amb aigua DEPC. Les cèl·lules es guardaren a -80°C fins l'hora de l'extracció de l'RNA.
- d. En tub de microcentrífuga amb 750  $\mu$ l de boles de Zircònia s'afegeix les cèl·lules ressuspeses en la Solució de Lisis, 480  $\mu$ l Tampó de lisis, 48  $\mu$ l 10%SDS i 480  $\mu$ l Fenol:Cloroform:Alcohol isoamílic.

- e. Utilitzar el FastPrep (Bio101 Systems) 10 segons a 6.5 m/s, un total de tres vegades, enmig de cada vegada incubar les cèl·lules 3 minuts en gel.
- f. Centrifugar 14000xg durant 5 minuts a temperatura ambient.
- g. Purificar l'RNA de la fase aquosa. Afegir 1.9 ml de Tampó d'unió i mesclar, més 1.25 ml Etanol 100%.
- h. Aplicar 700 µl de la solució a un filtre, centrifugar 1 minut a 14000xg, llençar volum filtrat, repetir el pas fins haver filtrat tot el volum.
- i. Afegir 700 µl Solució rentat 1 al filtre i centrifugar 1 minut a 14000xg, desestimar volum filtrat.
- j. Rentar filtre amb dues aplicacions de 500 µl de Solució rentat 2/3. Centrifugar 1 minut a 14000xg per eliminar l'excés. Transferir el filtre en nou tub i eluir amb dues aplicacions de 50 µl de Solució d'elució (atemperada a 95°C).

### Solucions

- Tampó de Lisis
- 10%SDS
- Fenol:Cloroform:Alcohol isoamílic.
- Tampó d'unió
- Etanol 100%
- Tampó d'unió
- Solució rentat 1
- Solució rentat 2/3
- Solució d'Elució

### Observacions

- Treballar en condicions RNase-free (apartat V.1.1)

#### V.1.4 Tractament amb DNasa I amb el *Kit RiboPure<sup>TM</sup> Yeast* (Ambion)

L'RNA aïllat conté DNA cromosomal, per digerir el DNA s'incuba amb 8 unitats de DNasa I del *Kit RiboPure<sup>TM</sup> Yeast* (Ambion). La DNasa I s'inactivarà amb una solució d'inactivació.

## Procediment

- Mesclar 100µl d'RNA amb 10µl Tampó DNasa I, i 4µl de DNasa I.
- Incubar 30-45 minuts a 37°C.
- Afegir 0.1 volum de Solució d'inactivació, vortejar, centrifugar 2-3 minuts per recuperar l'RNA, el sobrenedant. L'RNA es guarda a -80°C.
- Es comprova l'estat qualitatiu de l'RNA (apartat V. 2.2) i el quantitatiu (apartat V.1).

## Solucions

- Tampó DNasa I 10x.
- DNasa I (0.5 U/µl).
- Solució d'inactivació

## VI. ANÀLISI QUANTITATIU I QUALITATIU DELS ÀCIDS NUCLEICS

### VI.1 Determinació de la puresa i la concentració dels àcids nucleics

La concentració i la puresa dels àcids nucleics es determina mitjançant la lectura espectrofotomètrica a 260 i 280 nm. Es determina la concentració dels àcids nucleics, considerant que una unitat d'absorció a 260 nm equival a 50 µg de DNA de doble cadena per ml i a 40µg d'RNA per ml, mitjançant les següents fórmules:

$$[\text{DNA}] = A_{260 \text{ nm}} \times [(50 \text{ µg RNA/ml}) / 1 A_{260 \text{ nm}}] \times l \times D$$

$$[\text{RNA}] = A_{260 \text{ nm}} \times [(40 \text{ µg RNA/ml}) / 1 A_{260 \text{ nm}}] \times l \times D$$

sent,  $l$  = pas de llum de la cubeta en cm (normalment 1 cm)

$D$  = factor de dilució

$A_{260 \text{ nm}}$  = absorbància a 260 nm.

La relació entre  $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$  permet determinar la qualitat (puresa dels àcids nucleics. Es considera que el DNA pur té una relació d'1.8 tot i que el rang comprès entre 1.6 i 1.8 es considera un bon grau de puresa de les mostres. De la mateixa manera, l'RNA pur té una relació de 2, es considera un bon grau de puresa el rang

comprès entre 1.8 i 2 (Sambrook et al., 1989). La qualitat de l'RNA es va determinar mitjançant un gel desnaturalitzant, en un RNA no degradat la relació entre la intensitat de l'rRNA 28s i la del rRNA 18s és de 2.

## Observacions

Les mostres d'RNA total es van mesurar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 (Nucliber) excepte les mostres d'RNA usades en la RT-PCR semiquantitativa i les de DNA, mesurades amb un espectrofotòmetre convencional.

## VI. 2 Electroforesis en gel de agarosa

### VI.2.1 Gels d'agarosa per l'anàlisi del DNA

L'electroforesi en gel d'agarosa es va utilitzar com a mètode general per l'anàlisi de DNA plasmídic, per separar, identificar i purificar fragments de DNA. El percentatge d'agarosa en els gels varia de l'1% al 2.5%, en funció de la mida dels fragments per separar.

L'anàlisi del DNA plasmídic en un gel d'agarosa no desnaturalitzant, posa de manifest les tres formes bàsiques en què es troben els plasmidis un cop extrets, segons l'estat de *coiling* del DNA; *supercoiling* (plasmidi intacte), *nickat* (plasmidi amb un trencament en una de les cadenes) i lineal (plasmidi amb les dos cadenes trencades). Al separar-se el DNA plasmídic en un gel d'agarosa, les tres formes avancen a velocitats diferents segons el grau de *coiling*, ja que és el determinant de l'accés del pas a través del porus d'agarosa. Un cop es tenyeix el gel amb bromur d'etidi, la banda corresponent al DNA *supercoiling* és la més abundant en mostres de qualitat.

### VI.2.2 Gels d'agarosa per l'anàlisi de l'RNA

A l'analitzar una població d'RNA total per electroforesis en un gel desnaturalitzant de formaldehid/agarosa, el mRNA es distribueix en forma d'*smear* o llapissada de 0.5 a 12 kb, mentre que el rRNA forma dos bandes, de 4.5 i 1.9 kb, corresponents al 28s i 18s, respectivament.

## Procediment

- a. Tractar les pintes i les cubetes d'electroforesis amb NaOH 10N mínim 2 hores per eliminar les RNases.

- b. El gel d'agarosa desnaturalitzant es prepara semblant a un gel estàndard però s'afegeix 2M formaldehid i el tampó és 1x MOPS.
- c. Es desnaturalitzen entre 15 i 20µg d'RNA, màxim 6 µl (ajustar amb aigua DEPC). S'afegeix 12.5 µl Formamida desionitzada, 2.5 µl MOPS10x i 4 µl de Formaldehid 37%, i s'incuba 5 minuts a 65°C.
- d. S'afegeix 2.5 µl Tampó de càrrega lliure d'RNases. Es carrega el gel d'agarosa desnaturalitzant.
- e. Un cop el gel hagi corregut, es tenyeix 10 minuts amb 0.5 mg/ml de bromur d'etidi en aigua DEPC. Un cop transcorregut el temps es renta durant 15 minuts en aigua.

### Solucions

- NaOH 10N.
- Agarosa (Boehringer Mannheim)
- Formaldehid 37%.
- MOPS 10x pH 7.0: 200 mM MOPS pH 7.0, 80 mM AcNa, 10 mM EDTA. [ajustat amb 10N NaOH i dissolt en aigua miliQ. Esterilitzat amb l'autoclau].
- Formamida desionitzada.
- Tampó de càrrega RNasa *free*: 0,2% blau de bromofenol, 10 mM EDTA pH 8.0 i 50% glicerol, en aigua DEPC.
- Aigua DEPC.
- Bromur d'Etidi 10mg/ml.

### Observacions

A l'estar manipulant RNA seguir les consideracions per un ambient *RNasa free* (apartat V.1.1).

Degut a la toxicitat dels vapors del formaldehid, és recomanable preparar el gel i córrer l'electroforesi en una campana d'extracció de gasos.

## VII. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacció en cadena de la polimerasa és una tècnica que permet l'amplificació exponencial de petites quantitats de DNA *in vitro* utilitzant dos oligonucleòtids flanquejants a la regió que es vol amplificar i que hibriden en les cadenes oposades d'aquesta regió de DNA. Aquests oligonucleòtids es coneixen amb el nom d'encebadors. Per a la reacció d'amplificació s'utilitza una DNA polimerasa termostable que permet realitzar un procés cíclic de desnaturalització, hibridació i extensió dels encebadors per l'acció de la DNA polimerasa (Saiki et al., 1988).

L'expressió d'un determinat gen és es pot mesurar mitjançant la detecció de la quantitat de transcrit present. Tanmateix, l'RNA no serveix com a motlle de la reacció de PCR, per tant és necessari retrotranscriure'l a cDNA.

Els enzims utilitzats en la retrotranscripció de l'RNA provenen del virus de la leucèmia murina de Moloney (MMLV), del virus de la mieloblastosi d'aus (AMV) o com el cas de l'*Omniscript RT* (Qiagen) enzim recombinant heterodimèric expressat en *E.coli*.

La reacció de retrotranscripció també requereix d'uns encebadors, l'elecció dels quals afecta la mida i l'especificitat del cDNA obtingut. Existeixen tres tipus d'encebadors que poden ser utilitzats per a la retrotranscripció:

- oligo(dT)<sub>12-18</sub> que s'uneixen a la cua de poli(A) endògena de l'extrem 3' dels mRNA's. Generalment produeixen cDNAs complets (*full-length*). Aquesta és la metodologia usada per a la síntesi de cDNA en aquest treball, excepte per a la RT-PCR semiquantitativa,
- els oligonucleòtids aleatoris (*random primers*) que s'uneixen a diversos llocs de l'RNA i generen cDNAs curts. Són ideals per tal d'evitar estructures secundàries en el motlle i transcriuen de forma bastant eficaç la regió 5' del mRNA;
- els encebadors específics que s'uneixen únicament a l'RNA d'interès. Aquesta és la metodologia emprada per a la síntesi de cDNA de la RT-PCR semiquantitativa.

Els estudis de l'expressió gènica abordats en aquest projecte són a partir d'RNA total. L'enzim usat per la retrotranscripció en les RT-PCR semiquantitatives és la polimerasa HotStarTaq<sup>TM</sup>DNA (Kit One Step RT-PCR, Qiagen). El pas de retrotranscripció en la PCR a temps real es realitzà amb l'*Omniscript RT* (Qiagen). El

cDNA per la hibridació dels microarrays es va sintetitzar amb la CyScript (Amersham Biosciences), per a més detalls s'especifiquen en l'apartat VIII.

### VII.1 RT-PCR semiquantitativa

Es va utilitzar el *Kit One Step RT-PCR* (Qiagen) per estimar de forma semiquantitativa l'abundància relativa dels transcrits de diferents gens d'interès, en referència a un gen control. La retrotranscripció i l'amplificació per PCR es van realitzar en una única reacció, utilitzant encebadors específics del gen. En cada reacció es va amplificar un únic gen.

Els encebadors específics per a cada gen es van dissenyar tal i com s'explica en l'apartat VII.3.

#### Procediment

- a. Es prepara una mescla de reacció, per a  $n+10\%(n)$  reaccions, sent  $n$  el número de mostres a analitzar. Cada mostra ha de contindre tots els components necessaris per a la reacció (*Master Mix*), a excepció de l'RNA motlle. La mix es prepara seguint les indicacions del producte per a un volum total, considerant el volum final per a cada reacció de 25 $\mu$ l.
  - S'ajusta a 10ng d'RNA total per evitar condicions de saturació.
  - Cada encebador estarà a una concentració final de 0.6 $\mu$ M.
  - La reacció de síntesi de cDNA es fa en un termociclador (MJ Research PTC200). En primer lloc es realitza la reacció de transcripció reversa (30 minuts a 50°C), seguida d'un pas que simultàneament inactiva la transcriptasa reversa al mateix temps que activa les DNA polimerases (15 minuts a 95°C). La reacció d'amplificació segueix fins assolir un total de 25 cicles. Cada cicle conté tres passos: la desnaturalització (1min a 94°C), la hibridació dels encebadors (1min a 55°C) i l'extensió (1min a 72°C). La RT-PCR finalitza amb l'extensió final (10min a 72°C).
- b. Els fragments amplificats es separen en un gel d'agarosa al 2% (apartat VI.2.1).
- c. La intensitat de les bandes es quantifica usant el programa *GeneTools Analysis* (SinGene).

## VII.2 PCR quantitativa a Temps Real

Els gens relacionats amb els anàlisi de la resposta global als fàrmacs, se'ls mesurà els nivells d'expressió de manera quantitativa utilitzant la PCR a temps real.

La tècnica de la PCR quantitativa en temps real o qRT-PCR permet quantificar l'expressió d'un gen d'interès, relativa a un gen control. El cDNA prèviament sintetitzat amb oligodT de l'RNA mostra, s'amplifica amb encebadors específics per a cada gen. Aquesta tècnica es basa en la unió a la doble cadena de l'àcid nucleic del fluorocrom *SYBRGreen* present en la mix de la PCR i la monitorització del seguiment al llarg del temps de la fluorescència emesa per aquest compost.

La fluorescència detectada descriu una corba sigmoïdal. En els cicles inicials de la qPCR la senyal és molt fluixa i no és distingible del soroll de fons. A mida que el producte s'acumula, la identificació del senyal creix exponencialment fins assolir la fase de saturació. En la part lineal de la fase exponencial (corba representada en eixos logarítmics), la fluorescència és proporcional a la quantitat de DNA amplificat i aquest, al seu torn, és proporcional al número de còpies de cDNA inicial en la mostra. Per tal de quantificar les molècules presents en la mostra inicial del gen d'estudi, cal determinar el número del cicle a partir del qual el senyal és superior al soroll de fons, indicat com a *Ct* (*Cycle Threshold*). Seguidament s'indica la fórmula de la corba que s'obté de la monitorització de la fluorescència;

$$N = N_o(1 + E)^{C_t}$$

sent,  $N$  = Nombre de còpies

$N_o$  = Nombre de còpies inicials

$E$  = Eficiència de la reacció

$C_t$  = *Cycle Threshold*

Per tal d'avaluar els nivells transcripcionals d'un gen entre diverses mostres cal comparar els valors de les *Ct* obtingudes per a cadascuna d'elles. El mètode de càlcul que s'ha usat és el  $\Delta\Delta C_t$ , es normalitza respecte el gen i la condició control. D'aquesta forma per a cada mostra experiment, el número de còpies representades com valor del *Ct* del gen d'interès, es corregeixen respecte el gen usat com a referència i s'obté  $\Delta C_t$ . A partir d'aquest valor es torna a normalitzar, prenent com a referència la mostra de la condició control, per exemple, el no tractat o NT, o bé, el temps inicial o 0h, obtenint



$\Delta\Delta Ct$ . La funció resultant de l'expressió gènica o *Fold Change* es calcula com  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Per tenir en compte ambdues variables a l'hora de calcular l'expressió gènica: el tractament (NT i T), i el temps (0 i x hores), s'aplica la següent fórmula;

$$Fold\ Change = \frac{(2^{C_{i,NT} - C_{i,T}})_{xh}}{(2^{C_{i,NT} - C_{i,T}})_{0h}}$$

En general, l'expressió gènica s'ha representat com a  $\text{Log}_2 [Fold\ Change]$ .

### Procediment

- a. Reacció de retrotranscripció: a partir de 2µg d'RNA total quantificat i avaluat qualitativament (apartat VI) s'usen de motlle per a la síntesi del cDNA. Per a la síntesi de cDNA s'han seguit les instruccions recomenades per a l'ús del *Kit Omniscript RT* (Qiagen).
  - Tant les reaccions d'amplificació (60 minuts a 37°C) com d'inactivació (5 minuts a 95°C) es realitzen en un termociclador (MJ Research PTC200).
  - L'expressió de cada gen es quantifica a partir de 2 µl d'una dilució 1/20 del cDNA.
- b. Amplificació de l'amplicó: es prepara una *Master Mix*, per a n+10%(n) reaccions, sent n el número de mostres a analitzar. La *Master Mix* conté tots els components necessaris per la reacció, excepte el cDNA que es disposa directament a la placa de 96 pous (20 µl totals per pou):
  - 1/2 volum final de *SYBRGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems).
  - 300nM de cada encebador.
- c. La monitorització de la fluorescència es realitza mitjançant el *hardware* i el *software* proporcionat per *ABI-PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) ubicat al Servei de Genòmica de l'IBMB, CID.
- d. La reacció de PCR s'inicia amb 10 minuts a 95°C per a l'activació de la Taq-polimerasa. A continuació es realitzen 40 cicles compostos dels següents passos: 15 segons a 95°C per desnaturalitzar el DNA, 1 minut a 60°C per la hibridació dels encebadors i per a l'extensió que és mínima, ja que els amplicons tenen un longitud de 50-200pb.
- e. Per últim es dur a terme la corba de dissociació de l'amplicó. Aquest pas és important per verificar la qualitat de l'amplificació.

## Observacions

Tenir en compte que al ser una tècnica tan precisa, les condicions de treball (manipulació i material) han de ser similars a les emprades quan es treballa amb RNA (apartat V.1).

Cada placa realitzada conté: triplicats de les mostres pel gen d'estudi i pel gen control; el control negatiu sense cDNA o *Non Template Control* per duplicat, indicador de l'existència de *primer dimers* o contaminació; el control negatiu de la síntesi de la retrotranscripció sense l'enzim retrotranscriptasa o *RT minus*, indicador de la presència de contaminació per DNA genòmic; i un banc de dilucions de DNA de concentració coneguda per a cada gen, necessari per determinar l'eficiència de la reacció per a cada parella d'encebadors (en aquest treball s'usà genòmic de llevat).

La PCR a temps real o qPCR presenta avantatges enfront la PCR clàssica, per exemple, la qPCR presenta la capacitat de detectar el producte a mesura que es genera, no requereix un processament posterior de la reacció perquè els resultats són obtinguts numèricament, evitant l'ús de BrEt. A més, mentre que la PCR clàssica permet detectar diferències de 10 vegades en el número de molècules entre les mostres, la qPCR posseeix una major resolució, permetent discernir diferències de 2 vegades en el número de les molècules. Finalment, al treballar amb fluorescència s'incrementa la sensibilitat respecte la tinció amb BrEt.

### VII.3 Encebadors per les PCRs

El disseny dels encebadors per la PCR semiquantitativa es va realitzar amb el programa Windows 32 PrimerSelect 4.0 (DNASar. Inc.). Els encebadors per a la PCR a Temps Real s'han dissenyat amb el programa PrimerExpress v.2.0.0 (Applied Biosystems). Ambdós casos a partir de les seqüències accessibles en la direcció <http://www.yeastgenome.org>.

Un factor important és l'elecció del gen control o *housekeeping*. En els experiments de qRT-PCR s'ha emprat com a control l'actina (*ACT1*) en el cas dels tractaments amb Criptolepina, o el gen de la RNA polimerasa II (*RPO21*) per a la Daunorubicina.

## VII.3.1 Encebadors usats

GEN	Seqüència dels encebadors	Descripció
<i>ACO1</i>	for: 5'-GTGGTGCTGATGCCGTTG-3' rev: 5'-CCTTCAATTCCCATGGACGA-3'	Aconitasa
<i>ACT1</i>	for: 5'-TGTGTAAAGCCGGTTTTGCC-3' rev: 5'-TTGACCCATACCGACCATGAT-3'	Actina
<i>ADE13</i>	for: 5'-ATTGACATTGACGTGTTGGCTC-3' rev: 5'-TCCTCAACTTCCTTCAGGTTGG-3'	Implicat en via biosintètica dels nucleòtids purínics.
<i>ADE2</i>	for: 5'-GTGGAACAAGCCAGTGAGACG-3' rev: 5'-TTACCTCTTCCATCGTATGCCA-3'	Implicat en via biosintètica dels nucleòtids purínics.
<i>ADH5</i>	for: 5'-CCCTTGCTATGGGTTACAGGG-3' rev: 5'-GCTTGGCATTACCACCATCG-3'	Alcohol deshidrogenasa, isoenzim V
<i>ARG1</i>	for: 5'-GCCCACATTTCTTACGAGGC-3' rev: 5'-TGGTCCGAGCATCCATT-3'	Implicat en la biosíntesi d'arginina.
<i>ARG4</i>	for: 5'-AAATTTGTCCGTCATCCAAACG-3' rev: 5'-CCGGTGTGGACTTTACCAGC-3'	Implicat en la biosíntesi d'arginina.
<i>ARG7</i>	for: 5'-ATTCAAAGCTGCGCCAGTTTT-3' rev: 5'-CCGAGTTAGCACAACCGGAA-3'	Implicat en la biosíntesi d'arginina.
<i>ARN2</i>	for: 5'-CGTGGAATGGAAAGAATTACAGG-3' rev: 5'-CCGTGCGTTTGATAGTACGATTT-3'	Transportador de la família ARN, relacionat amb els sideròfors.
<i>CAR2</i>	for: 5'-CATCGCCCAATTGAAAGCTC-3' rev: 5'-CCTTGATGGGTGCGATTACG-3'	Catalitza la degradació d'arginina.
<i>CDC19</i>	for: 5'-TGGCCATTGCTTTGGACAC-3' rev: 5'-GGTGAAGATCATTTCGTGGTTTG-3'	Piruvat quinasa.
<i>CPR6</i>	for: 5'-AAAAAGCCAAGGCCAAAGCT-3' rev: 5'-CATGGTAATAGGCCAGGCCA-3'	Peptidil-propil cis-trans isomerasa.
<i>CUP1-1</i>	for: 5'-GTAGCTGCAAAAATAATGAACAATGC-3' rev: 5'-CCGTTGGGCAGCTACATGAT-3'	Metalotioneïna. Implicada en resistència a Cu i Cd.
<i>CYS3</i>	for: 5'-GAACGCTCAATACGGGTTGG-3' rev: 5'-CATCACCGATAGAGACCGCAT-3'	Cistationa gamma-liasa
<i>FBA1</i>	for: 5'-AATGCTCCATCAAGGGTGC-3' rev: 5'-CAACTGGGATACCGTAAGCTG-3'	Fructosa 1,6-bisfosfat aldolasa
<i>FIT3</i>	for: 5'-TGTCTGGACTGGTGAAGGCAG-3' rev: 5'-GAAGTACTACTTGGAGACCAGGTGTTG-	Mannoproteïna, complexe dels sideròfors.
<i>GAL1</i>	for: 5'-CCAAGACCAATTAGCCGAAA-3' rev: 5'-GACGGCGCAAAGCATATCA-3'	Galactoquinasa.
<i>GAL10</i>	for: 5'-TGACAGCTCAGTTACAAAGTG-3' rev: 5'-AGACAATCTTGGACCCGTAA-3'	UDP-glucosa 4-epimerasa
<i>GAL3</i>	for: 5'-GGCCATAGATCCGTCTGTGT-3' rev: 5'-CTAGTGCTGCCGCGCAAGT-3'	Metabolisme de la galactosa
<i>GAL7</i>	for: 5'-GGTCAACAGGAGGCTGCTT-3' rev: 5'-CGAGCCTAACGGCAGCATC-3'	Galactosa 1 fosfat uridil transferasa
<i>GPM1</i>	for: 5'-TCACCGGTTGGGTTGATGTTA-3' rev: 5'-TCCTTCAACAATTCACCGGC-3'	Fosfoglicerat mutasa
<i>HSP26</i>	for: 5'-AGAGGCTACGCACCAAGACG-3' rev: 5'-AGAATCCTTTGCGGGTGTGT-3'	Xaperona, pertany a la família de les <i>heat shock protein</i> .
<i>HXK1</i>	for: 5'-GTTGACAGCGAGACCTTGAGAA-3' rev: 5'-CAACCGGAATCATTGGAAT-3'	Hexokinasa I.
<i>LEU9</i>	for: 5'-CAAGATTCCAATTCCTCCAA-3' rev: 5'-GAAACAACCAATTCACCGCC-3'	Implicat en la via biosintètica de leucina.
<i>PAU6</i>	for: 5'-TGCTGGTGTGCGGCC-3' rev: 5'-GCTAGAGTGGTGGTTGCGGA-3'	Membre de la família multigènica de les seripauperines. Telomèric.

<i>PGII</i>	for: 5'-CTCAAAGA AACTGGTCAACGAT-3' rev: 5'-CAAACCGGTGACGTTAGCCT-3'	Fosfoglucosa isomerasa
<i>PGKI</i>	for: 5'-CCCAGGTTCCGTTCTTTTGTG-3' rev: 5'-TTGACCATCGACCTTTCTGGA-3'	3-fosfoglicerat quinasa
<i>PHO5</i>	for: 5'-CATGCTCGTGACTTCTTGGC-3' rev: 5'-GGTTTGGTTTTTCGACCATGTAAC-3'	Fosfatasa implicada en la hidròlisi de nucleòtids derivats de fosfat extracel·lulars.
<i>QCR8</i>	for: 5'-GGTCCTCCAAGCGTAAACT-3' rev: 5'-ACCACCCATGTGACCCCA-3'	Citocrom c reductasa, subunitat VIII.
<i>RPO21</i>	for: 5'-AGGTTTGCTGCAATTTGGACTT-3' rev: 5'-CAACCTCCCCTTGATACGAGC-3'	Subunitat RNA polimerasaII.
<i>RPS28A</i>	for: 5'-AGCCAAGGTCATCAAAGTTTTAGG-3' rev: 5'-TTCCAAGAATTCGACACGGAC	Proteïna ribosomal de la subunitat petita.
<i>STI1</i>	for: 5'-GTCTTGGCGATCTCGACGAA-3' rev: 5'-ACGATGAACCTGATCCAATCCT-3'	Xaperona Hsp90.
<i>SUC2</i>	for: 5'-CCATTGCTATCGCTCCCAAG-3' rev: 5'-TGGAGCCAGAGAAAGCACCT-3'	Invertasa, enzim que hidrolitza la sucrosa.
TDH(1-3)	for: 5'-AGACTGTTGACGGTCCATCCC-3' rev: 5'-AAGCGTTCTACCACCTCTCC-3'	Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa
<i>TIP1</i>	for: 5'-CGTTTCCAAGATTGCTTTGTT-3' rev: 5'-TGTCACCGATAATAGCTTGCAATT-3'	Major manoproteïna de la paret cel·lular.
<i>TIS11</i>	for: 5'-TCGGCAGTTTCATTCTCTCCA-3' rev: 5'-CCCCGGTTGAATAGCGTTT-3'	Proteïna d'unió al mRNA, implicada en el metabolisme del ferro.
<i>TPS1</i>	for: 5'-CGACGAGAATGCGTGGTTG-3' rev: 5'-TTGGTGAACGTCTGGTTTGC-3'	Trehalosa-6-fosfate sintasa/fosfatasa sintetitza la reserva de trehalosa.
<i>TUB1</i>	for: 5'-AAGGGTCTTGTTTACCC-3' rev: 5'-GCCATGTATTTACCATCT-3'	Tubulina
YJL113W	for: 5'-CCAAATAGGGAATTAGGCCTGACT-3' rev: 5'-TGTTCGTTTTGCACTGGACTTAAG-3'	Retrotransposó, amb gens TYA Gag i TYB Pol.
YJR029W	for: 5'-GGGCCACAATCACAGTTTCC-3' rev: 5'-CAGAGGCGTTCCAACCTGATGA-3'	Retrotransposó, amb gens TYA Gag i TYB Pol.

**Taula M4. Llistat del encebadors usats en aquest estudi.** Primera columna correspon al gen, seguidament s'indica la seqüència per a cada parella, directe o *forward* (for) i l'invers o *reverse* (rev), i una breu descripció del gen. Pel gen TDH(1-3) amplifica regió comuna per les tres isoformes.

## VIII. MICROARRAYS

La tecnologia dels microarrays és una de les eines més poderoses que disposa actualment la genòmica per tal d'obtenir informació semiquantitativa dels nivells transcripcionals de diferents gens en una o diverses condicions de manera simultànea (Lashkari et al., 1997; Shalon et al., 1996).

En funció del suport utilitzat i la densitat de les sondes existeixen dos tipus de tecnologies principals: els microarrays (Schulze and Downward, 2001; van Hal et al., 2000) i els macroarrays de DNA (Alberola et al., 2004; Cox et al., 1999; Hauser et al., 1998). En la tecnologia de microarrays de DNA la sonda es disposa sobre la superfície d'un portaobjectes de vidre modificat amb grups amina o aldehyd entre d'altres (Chiu et

al., 2003; Kumar et al., 2000; Zammattéo et al., 2000), mentre que les sondes dels macroarrays estan dipositades sobre superfícies poroses (membranes de niló) carregades positivament. Actualment, els suports més utilitzats són les superfícies no poroses, les quals permeten col·locar petites quantitats de DNA en un espai molt reduït sense que difongui per capil·laritat a través de la membrana i, a més, el marcatge no és radioactiu sinó que s'utilitzen altres mètodes de marcatge basats en la fluorescència i la quimioluminescència. En aquest treball s'ha utilitzat la tecnologia dels microarrays de DNA.

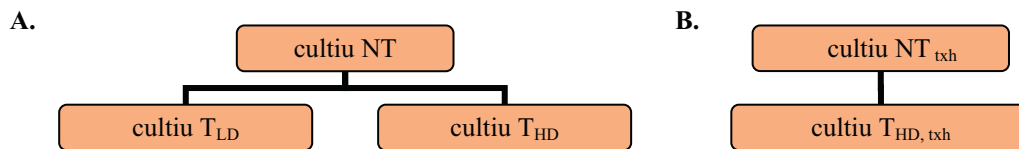
Hi ha dos tipus diferents de microarrays: els microarrays en els quals la sonda de DNA es diposita sobre la superfície de vidre, els pioners dels quals va ser el laboratori del Dr. Patrick Brown de la Universitat de Stanford (<http://brownlab.stanford.edu>), i els microarrays d'oligonucleòtids sintetitzats *in situ* fabricats inicialment per Affymetrix Inc. ([www.Affymetrix.com](http://www.Affymetrix.com)). La idea principal d'aquest tipus d'experiment és una hibridació competitiva entre una mostra marcada amb un fluorocrom (la cianina Cy3) i una altra mostra marcada amb un fluorocrom diferent (la cianina Cy5) (Fig. I8).

Per tal de dur a terme un experiment de microarrays de DNA s'han de tenir en compte una sèrie de factors: disseny experimental, tipus de sonda (cDNA, oligonucleòtids,...), marcatge de les mostres (fluorescent, radioactiu,...), tipus de suport (vidre, membranes...), deposició de les mostres (impressió, síntesi *in situ*,...), immobilització de les sondes (activa, passiva, covalent,...), detecció de la hibridació (tipus d'escàner), i processament de les dades.

### VIII.1 Disseny experimental

Abans de començar qualsevol experiment amb microarrays és necessari escollir un bon disseny experimental. Aquest disseny dependrà principalment de l'objectiu de l'estudi, però també del nombre d'experiments que es poden realitzar en funció de la disponibilitat econòmica i de la quantitat de mostres que es disposa. En aquest estudi l'objectiu que es vol assolir és determinar els patrons d'expressió del llevat enfront el tractament amb fàrmacs intercalants al DNA. Es va utilitzar un disseny que pren com a mostra de referència RNA extret a partir de cèl·lules no tractades, i es compara amb la mostra experiment, RNA extret a partir de cèl·lules tractades. El resultat és la relació dels nivells d'expressió per a cada gen en la mostra problema (tractada) respecte la mostra referència (no tractada) (Fig. M1).

El fet de tenir una mostra control per a cada condició, permet estudiar directament l'efecte del tractament mitjançant l'anàlisi i la interpretació dels resultats d'una manera relativament senzilla, en comparació amb altres tipus de disseny (per exemple els *loops*). L'assaig dels microarrays de cDNA inclou dues rèpliques biològiques, i una tècnica, per a cadascuna de les biològiques (Fig. M1,A, i Fig. M2). L'assaig dels microarrays d'oligonucleòtids inclou 3 rèpliques biològiques (Fig. M1, B i Fig. M3).



**Fig. M1. Disseny experimental.** **A. Disseny experimental utilitzat amb els microarrays de cDNA per analitzar la resposta transcripcional a diferents concentracions de fàrmac.** Aquest experiment pren com a referència la mostra corresponent al RNA del cultiu no tractat (NT). La mostra de referència es compara amb les mostres d'RNA obtingudes a partir d'uns cultius tractats (indicats com a subcategoria) amb 5µM (dosis baixa o LD) i 12µM (dosis alta o HD) per la Daunorubicina, o 7.5µM (LD) i 17µM (HD) per la Criptolepina (T<sub>LD</sub> o T<sub>HD</sub>). Tots els cultius parteixen del mateix número de cèl·lules, l'RNA del cultiu quan han arribat a una densitat òptica de 1. **B. Disseny experimental utilitzat amb els microarrays d'oligonucleòtids per analitzar la variació de la resposta transcripcional al llarg del temps (0, 1 i 4hores).** El cultiu és tractat amb 12µM Daunorubicina o 17µM Criptolepina. Aquest experiment pren com a referència la mostra de l'RNA del cultiu no tractat al temps corresponent (indicat com NT<sub>txh</sub>), 0,1 o 4 hores. La mostra de referència es compara amb la mostra d'RNA obtinguda a partir d'un cultiu tractat durant amb la mateixa concentració de fàrmac durant 0, 1 o 4 hores (indicat com a subcategoria).

### VIII.1.1 Disseny experimental per microarrays de cDNA

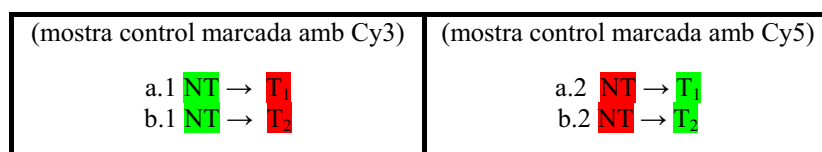
S'analitzà l'efecte de dues concentracions de la Daunorubicina (IC10 i IC40) i la Criptolepina (IC30 i IC40) en el transcriptoma de llevat.

A partir d'un cultiu en YPD en creixement exponencial es va inocular a  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules per ml sis erlenmeyers amb 25ml de medi YPD fresc i temperat, amb el tractament corresponent.

- 2 cultius sense tractar,
- 2 cultius tractats amb la dosis baixa, 5µM Daunorubicina o 7.5µM Criptolepina,
- 2 cultius tractats amb la dosis alta, 12µM Daunorubicina o 17µM Criptolepina

Els sis cultius van créixer a 30°C en agitació, fins assolir al voltant de  $2 \cdot 10^7$  cèl·lules per ml (Fig. R14).

Els microarrays de cDNA tenen imprès la seqüència codificant per a cada gen o ORF. Els microarrays de cDNA usats van ser fabricats pel Servei de Seqüenciació i Síntesi d'Àcids Nucleics de la Universitat Autònoma de Barcelona. Es componen de 6224 deposicions corresponents cadascuna a una seqüència codificant (ORF) del *Saccharomyces cerevisiae*, a més, 300 gens estan per duplicat, la majoria implicats en la resposta a estrès.



**Fig. M2. Representació gràfica del marcatge amb els fluorocroms Cy3 i Cy5 i el model d'hibridació pels microarrays de cDNA.** a.1 i b.1 Rèpliques biològiques (1 i 2), l'RNA no tractat (NT) es marca amb Cy3 i el tractat (T) amb Cy5. a.2 i b.2 les mostres es marquen a la inversa, anomenat *dye swap*. Cada rèplica biològica no tractada s'hibrida amb la tractada corresponent.

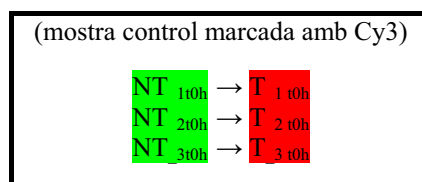
### VIII.1.2 Disseny experimental per microarrays d'oligonucleòtids

S'analitzà l'efecte de la Daunorubicina i la Criptolepina en el transcriptoma de llevat al llarg de 0, 1 i 4 hores de tractament.

A partir d'un cultiu en YPD en creixement exponencial es va inocular a  $8 \cdot 10^6$  cèl·lules per ml dividit erlenmeyers amb 25ml de medi YPD fresc i temperat, amb el tractament corresponent.

- 3 cultius sense tractar per cada temps (0, 1 i 4 hores),
- 3 cultius tractats per cada temps (0, 1 i 4 hores) amb 12µM Daunorubicina o 17µM Criptolepina

Els cultius van créixer a 30°C en agitació, excepte el corresponent al temps 0 que es recollí al mateix instant, els cultius restants s'aturaren al cap d'1 i 4 hores (Fig. R6).



**Fig. M3. Representació gràfica del marcatge amb els fluorocroms Cy3 i Cy5, i el model d'hibridació pels microarrays d'oligonucleòtids.** Mostra no tractada (NT) marcada amb Cy3, mostra tractada amb fàrmac (T) amb Cy5. Cada rèplica biològica no tractada s'hibrida amb la tractada corresponent.

Els microarrays van ser fabricats pel Servei de Genòmica de la Universitat Complutense de Madrid. Consten de 13824 espots dels quals aproximadament uns 660 són controls, els 13162 espots restants pertanyen a oligonucleòtids per a gens codificants. Aquests representen 6389 seqüències codificants del llevat (*Open Reading Frames*) ja que estan impreses mínim per duplicat. No obstant hi ha una dotzena de gens es troben repetits 34 vegades, entre ells hi ha dos ribosomals, l'actina, proteïnes d'estrès i la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa.

## VIII.2 Síntesi del cDNA i marcatge de les mostres

A partir de l'RNA total extret dels cultius cel·lulars es sintetitza el cDNA amb la transcriptasa reversa CyScript (Amersham Biosciences), és una transcriptasa reversa modificada del MMLV. La síntesi es pot desenvolupar de dues maneres:

- incorporant un aminoàcid amb un grup fluorescent, com el dCTP o el dUTP conjugat a la cianina Cy3 o Cy5. Mètode anomenat marcatge directe (Fig. M4).
- incorporant un nucleòtid modificat amb un grup aminoalil (AA) en la síntesi de cDNA. En un segon pas el cDNA-AA es marca mitjançant la reacció del grup aminoalil amb el grup NHS-éster dels fluorocroms Cy. Mètode anomenat marcatge indirecte (Fig. M4).



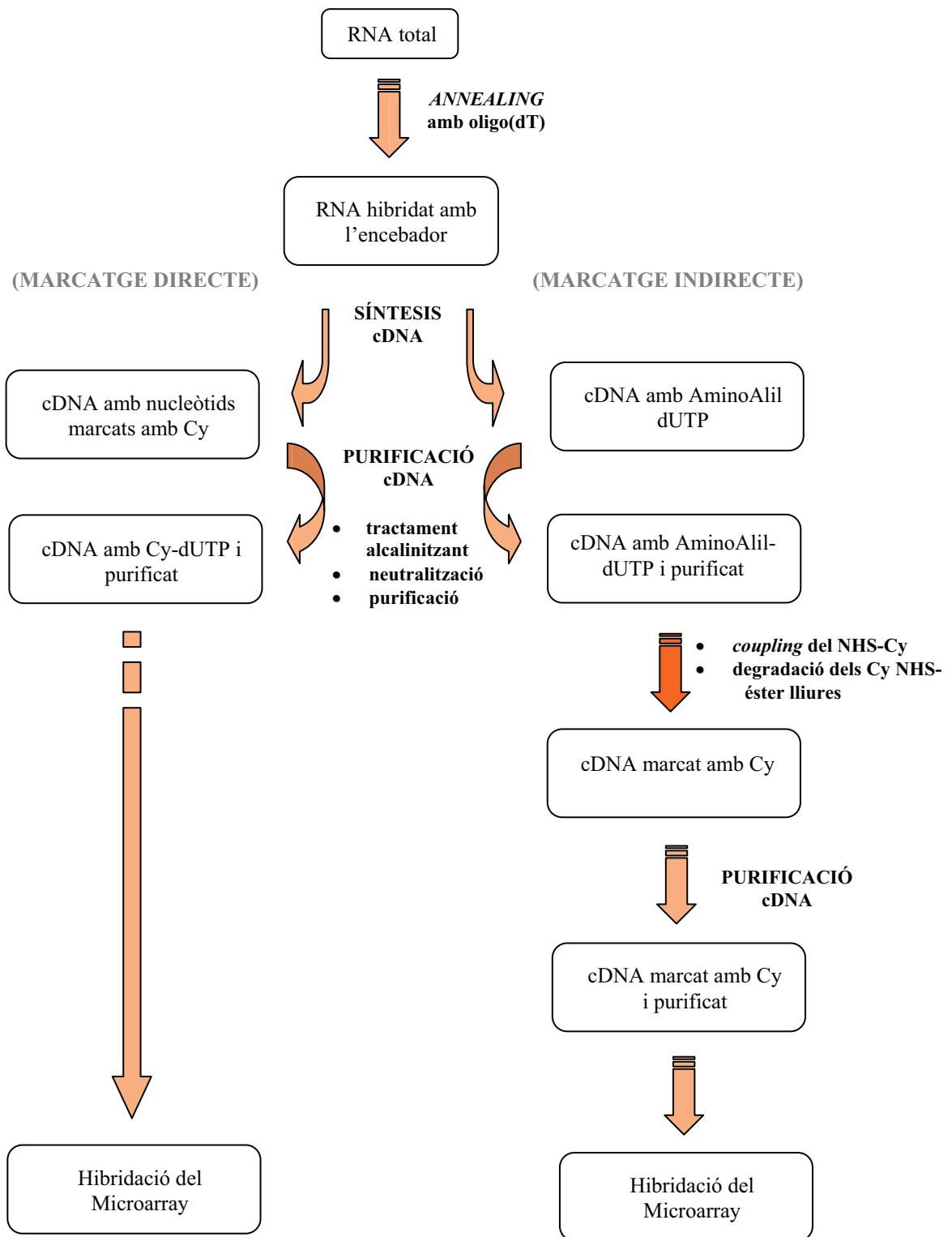


Fig. M4. Esquema dels processos a seguir pel marcatge directe i per l'indirecte.

### VIII.2.1 Marcatge directe

El marcatge directe es va realitzar seguint les indicacions del *kit First Strand Labelling Kit* (Amersham Biosciences).

#### Procediment

- A partir de 15µg d'RNA total es va sintetitzar el cDNA, en un volum total de 20µl, utilitzant com a encebador oligo(dT) el qual permetria que la síntesi fos a partir de l'extrem 5' de la cua de poliA. Aquest mètode és molt eficaç si el material imprès en els portaobjectes prové de l'extrem 3' dels transcrits i si es parteix d'RNA total.
- El nucleòtid modificat en la síntesi del cDNA és el Cy3-dUTP o el Cy5-dUTP segons la mostra.
- Per evitar hibridacions inespecífiques es degrada l'RNA motlle i els nucleòtids fluorescents no incorporats. L'RNA s'hidrolitza amb un tractament alcalinitzant amb 0.25M NaOH. Després es neutralitza amb 1M HEPES.
- Es purifica el cDNA marcat dels oligòmers d'RNA (com a màxim 50 nucleòtids de longitud) i dels nucleòtids no incorporats amb columnes de cromatografia del *CyScribe GFX Purification Kit* (Amersham Bioscience).

#### Comprovació del marcatge

La incorporació dels fluorocroms i l'eficiència de retrotranscripció es va testar mitjançant espectrofotometria, amb el NanoDrop® ND-1000 (Nucliber). Aquest sistema porta associat un software d'anàlisi específic per la detecció d'aquests dos fluorocroms.

El 10% de la sonda preparada per hibridar es va dessecar amb l'ajut d'un Concentrador 5301 (Eppendorf) protegit de la llum. El precipitat es va ressuspèndre en 1.5µl d'aigua MiliQ (volum mínim necessari per mesurar al NanoDrop). El cDNA es va mesurar segons l'absorbància, a 260nm i el marcatge a 532nm o 635nm segons el fluorocrom, Cy3 o Cy5 respectivament.

#### Observacions

Treballar en tot moment amb les mateixes condicions que l'apartat V.1. Degut a la naturalesa fotosensible de les cianines cal treballar en condicions de màxima precaució i a les fosques.

### VIII.2.2 Marcatge indirecte

El marcatge indirecte es va realitzar seguint les indicacions del *CyScribe™ Post- Labelling Kit* (Amersham Biosciences).

- a. A partir de 15µg d'RNA total es sintetitza el cDNA amb un anàleg de nucleòtid modificat químicament (aminoalil-dUTP) i amb l'oligo(dT) en un volum final de 20µl.
- b. Es fa un tractament amb sossa per degradar l'RNA (mateix procés que pel marcatge directe). El cDNA es purifica dels oligòmers d'RNA, dels AA-dUTP lliures i d'altres compostos amb les mateixes columnes de cromatografia usades en el marcatge directe, però la solució d'elució és 0.1M bicarbonat sòdic pH 9.0.
- c. El cDNA purificat s'incuba amb el fluorocrom en excés, amb la cianina Cy3 o Cy5 el qual està enllaçat mitjançant un éster a un grup derivat de l'hidroxisuccinimida (NHS). En aquest pas esdevé la reacció d'acoplament entre el grup aminoalil dels nucleòtids incorporats i el grup éster-NHS de les cianines.
- d. Després de l'acoblament del fluorocrom al cDNA, s'inactiven els grups NHS-éster de les cianines que no hagin reaccionat amb 4M hidroxilamina per evitar hibridacions inespecífiques i soroll de fons.
- e. La purificació del cDNA es realitza igual que en el marcatge directe.

### Comprovació del marcatge

Mateix procediment que en l'apartat VIII.2.1.

### Observacions

Treballar en tot moment amb les mateixes condicions que l'apartat V.1. Treballar en condicions de màxima precaució i a les fosques.

### VIII.3 Hibridació

La hibridació ve precedida d'un tractament del portaobjectes per evitar tenir unions inespecífiques en la hibridació, aquest procés s'anomena prehibridació. Les condicions d'hibridació i de rentats depenen del material en què està fet el microarray i de l'hibridador, principalment.

## Observacions

Treballar en les mateixes condicions que en l'apartat V.1. Totes les solucions s'han de filtrar, treballar en condicions de màxima precaució i a les fosques.

Cal remarcar la importància d'optimitzar les condicions en els següents passos (pre-hibridació, hibridació i rentats) per a cada tipus de microarray.

### VIII.3.1 Hibridació amb l'equip ArrayBooster

Inicialment es va hibridar en l'equip ArrayBooster AB410 (Advalytix) facilitat pel Dr. Joaquim Ariño i amb el protocol que ells posaren a punt. Aquest equip es caracteritza per mantenir les sondes en constant moviment gràcies als ultrasons.

## Procediment

Pre-hibridació:

- El portaobjectes es prehibrida (dins un *coupling jar*) en un bany a 42°C durant 45minuts amb la solució de pre-hibridació, prèviament temperada.
- Rentar amb aigua miliQ, dos cops, mitjançant la immersió repetida (5 vegades) del portaobjectes.
- Centrifugar el portaobjectes 1 minuts a 1300xg en una centrífuga de plaques per treure restes d'aigua.

Hibridació:

- El cDNA marcat es ressuspèn amb 35µl de la solució d'hibridació al darrer moment.
- Cada parella de mostres es mesclen, s'afegeix 4µg ssDNA (DNA d'esperma de salmó).
- Desnaturalitzar el cDNA 3 minuts a 95°C, i deixar en gel.
- Incubar el portaobjectes amb la sonda, ja en la cambra d'hibridació, durant 16h a 42°C.

Rentats:

- Rentar el portaobjectes 8 minuts a 42°C amb la Solució A (temperada a 42°C).
- Rentar durant 8 minuts en la Solució B.
- Rentar durant 8 minuts en la Solució C.
- Submergir portaobjectes repetidament en aigua miliQ.
- En centrífuga de plaques 1 minut a 800xg.

### **Solucions**

- Solució de pre-hibridació: 5x SSC, 0.1% SDS, 1% BSA i aigua miliQ.
- Solució d'hibridació: 50% formamida, 5x SSC, 0.1% SDS i aigua miliQ.
- Solució A: 1x SSC, 0.2% SDS i aigua miliQ.
- Solució B: 0.1x SSC, 0.2% SDS i aigua miliQ.
- Solució C: 0.1x SSC i aigua miliQ

### **Observacions**

Els rentats cal que siguin en un bany amb agitació magnètica.

### **VIII.3.2 Hibridació amb l'equip Lucidea SlidePro System**

Els microarrays d'oligonucleòtids es van hibridar en els serveis del Parc Científic de Barcelona amb l'equip Lucidea SlidePro System (Amersham Biosciences). Aquest equip, a diferència de l'usat anteriorment, es caracteritza per mantenir la sonda en constant moviment degut a un reflux de la solució.

### **Procediment**

Pre-hibridació:

Igual que en l'apartat VIII.3.1.

Hibridació:

- a. El cDNA marcat es ressuspèn amb 110 µl de la solució d'hibridació al darrer moment.
- b. Cada parella de mostres es mesclen i s'afegeix 10 µg ssDNA (DNA d'esperma de salmó).
- c. Incubar el portaobjectes amb la sonda, ja en la cambra d'hibridació, durant 12-16 hores a 42°C.

Rentats:

- a. Rentar 4minuts a 42°C en la Solució A.
- b. Rentar a 25°C durant 10 minuts en la Solució B, repetir.
- c. Rentar 4minuts a 25°C en la Solució C.
- d. Secar amb isopropanol 50% i aire.

## **Solucions**

- Solució de pre-hibridació (apartat VIII.3.1)
- Solució d'hibridació: 30% formamida, 5x SSC, 0.1% SDS, 5xDenhardt's, 50mM Tris pH 7.4 i aigua miliQ.
- Solució A: 2x SSC, 0.1% SDS i aigua miliQ.
- Solució B: 0.1x SSC, 0.1% SDS i aigua miliQ.
- Solució C: 0.1x SSC i aigua miliQ
- Isopropanol 50%.

## **VIII.4 Detecció de la hibridació**

Un cop la sonda s'ha hibridat i el portaobjectes s'ha rentat per eliminar les restes de la solució, s'escaneja a 532nm pel fluorocrom Cy3 i a 635nm pel Cy5 en l'escàner GenePix 4000B i amb el programa associat GenePixPro5.0 (Molecular Devices).

Els fluorocroms s'exciten, es recull la longitud d'ona emesa i es digitalitza, proporcionant mapes d'intensitat per cada longitud d'ona. El mapa obtingut per cada fluorocrom es superposa i aquesta imatge serà analitzada.

Els escàners tenen diferents variables que l'usuari pot ajustar, no obstant, aquestes variables presenten unes condicions estàndards; la mida del pixel, el percentatge de saturació de la intensitat de la imatge i la potència en què el làser excita els fluorocroms. Per tal d'ajustar la sensibilitat del fotomultiplicador (PMT) es va fer un anàlisi ràpid a baixa resolució (40µm). El PMT és un tub que capta de manera més o menys sensible la senyal emesa pel fluorocrom (converteix els fotons en electrons). A l'augmentar les PMT's s'augmenta la senyal de la intensitat i el soroll de la imatge, per evitar obtenir imatges distorsionades el valor ha d'oscil·lar entre 500 i 900. Amb els valors òptims per a cada paràmetre, s'escaneja la imatge a 10µm i es guarda pels posteriors anàlisis.

## **VIII.5 Transformació de les dades obtingudes**

La imatge guardada s'analitza amb el programa GenePixPro5.0. Aquest programa permet a través d'una sèrie de passos, quantificar la intensitat de fluorescència de les diferents senyals del microarrays. El primer pas consisteix en la creació d'una matriu on s'identifica la posició de cadascun dels senyals i se li assigna el nom del gen

corresponent. Un cop localitzades cadascuna de les senyals es determina el valor de la intensitat i el soroll de fons de les regions circumdants per a cadascuna d'elles. La informació generada per a cadascun dels espots es descriu com el quocient (*ratio* o R) de la mitjana de la intensitat de fluorescència de cada un dels pixels que conformen la senyal, extret el valor corresponent al soroll de fons, tal com s'expressa en la següent equació:

$$R = \frac{(F_{635} - B_{635})}{(F_{532} - B_{532})}$$

sent,  $F_{635}$  = valor de la intensitat del senyal emesa pel Cy5

$B_{635}$  = valor de la intensitat del soroll de fons emesa pel Cy5

$F_{532}$  = valor de la intensitat del senyal emesa pel Cy3

$B_{532}$  = valor de la intensitat del soroll de fons emesa pel Cy3

Prèviament a la identificació, les dades generades requereixen un anàlisi més exhaustiu. El primer pas és la normalització de les intensitats de fluorescència relatives de cadascun dels fluorocroms analitzats. Es va assumir que en una situació d'estrès, com el tractament amb la Daunorubicina o la Criptolepina, la proporció de gens amb canvis transcripcionals seria baixa respecte el total de gens presents en el microarray, aquest fet comporta, que la mitja aritmètica de totes les *ratios* és 1.

### VIII.6 Criteris de selecció

A partir de la imatge digitalitzada s'imposen uns criteris de qualitat per discriminar les senyals artefactuals i els falsos positius. Es seleccionen els espots amb una intensitat neta de la senyal, del doble que el soroll de fons i que com a mínim el 75% dels pixels superin en intensitat el soroll de fons en més de dues desviacions estàndard.

Les dades obtingudes dels tractaments a curt termini (0, 1 i 4 hores) es varen ordenar per cada gen segons el temps. Al ser una cinètica, cada gens es va corregir pel respectiu valor promig del temps inicial (0 hores).

Cal tenir en compte, que per obtenir dades reproduïbles es varen escollir:

- microarrays de cDNA; els gens presents, mínim, en 3 de les 4 rèpliques (dues biològiques, i dues tècniques corresponents al *dye swap*) per cada concentració de fàrmac,
- microarrays d'oligonucleòtids; aquells valors presents, mínim, en 4 de les 6 rèpliques (tres rèpliques biològiques, i dues tècniques degut a què cada gen està imprès per duplicat), per a cada temps de tractament. A partir dels valors logarítmics dels gens que passaren el criteri de reproductibilitat es realitzà un estudi estadístic al llarg del temps. Aquest test correspon a un anàlisi de la variància unidireccional, *one-way* ANOVA (amb el valor de p ajustat a 0.001), aplicat en el programa TIGR (MultiExperiment Viewer, MEV). Els gens resultants significativament diferents es tornaren a sotmetre a una altra selecció per eliminar els falsos positius, la qual consistia en què la senyal mesurada per un dels dos fluorocroms, havia de superar les 700U.A. El valor de 700U.A. es va escollir per tal de superar el valor màxim presentat entre els controls negatius.

## VIII.7 Anàlisi amb els gens expressats diferencialment

### VIII.7.1 Anàlisi de les categories ontològiques

Els gens amb una expressió diferencial superior al llindar establert, es varen categoritzar ontològicament mitjançant el programa *GO-TermFinder*, de la base de dades *Saccharomyces Genome Database*, direccionada en [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org). Els termes ontològics escollits varen ser els relacionats amb el procés i la funció gènica.

### VIII.7.2 Anàlisi de la regulació transcripcional

Els mateixos gens de l'anterior anàlisi es varen agrupar segons els factors de transcripció mitjançant el programa YEASTRACT direccionat en [www.yeasttract.com](http://www.yeasttract.com) (Teixeira et al., 2006). Es varen escollir els deu factors de transcripció que regulen una major proporció de gens per a cada condició.

Amb els resultats obtinguts de l'agrupació anterior i utilitzant la informació proporcionada pel YEASTRACT, es va procedir a la identificació dels factors de transcripció més enriquits entre els gens alterats, és a dir aquells que apareixien amb una freqüència superior a l'esperada per atzar. Els passos a seguir varen ser els mateixos que



es segueixen per a determinar la categoria ontològica en el *GO-TermFinder* (SGD) (Boyle et al., 2004).

El valor de  $p$ , corresponent a la freqüència, es va calcular mitjançant una distribució hipergeomètrica (Fig. M5). Aquesta distribució considera els elements (els factors de transcripció, en aquest cas) com a elements no reemplaçables i una població finita, sent,  $i$  la mostra (quantitat de gens expressat diferencialment regulats per un mateix factor de transcripció),  $n$  la mida de la mostra (total de gens expressats diferencialment),  $M$  la població (quantitat de gens regulats per un mateix factor de transcripció),  $N$  la mida de la població (total de gens regulats per algun factor de transcripció). El valor de  $p$  es considera significatiu quan és inferior al factor de certesa o valor  $\alpha$  (0.05).

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

**Fig. M5. Fórmula de la distribució hipergeomètrica.** Sent,  $i$  la mostra,  $n$  la mida de la mostra,  $M$  la població i  $N$  la mida de la població.

El mètode usat per a la correcció de múltiples hipòtesis, és la correcció de Bonferroni, el qual té en compte la població total de la qual pertany la mostra, en aquest cas correspondria al total de factors de transcripció (170) presents en el genoma i descrits pel YEASTRACT. La correcció de Bonferroni és un ajust conservatiu, és el producte del valor  $p$  pel total d'elements possibles, els 170 factor de transcripció, considerats elements independents.

