

**TESI DOCTORAL**

**CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA DE CÈL·LULES  
TUMORALS A LES MITRAMICINES**

**Marc Bataller Chardi**  
**Barcelona, maig de 2009**

## **MATERIALS I MÈTODES.**



### 3. MATERIALS I MÈTODES.

#### 3.1. MITRAMICINES.

En aquest treball s'analitzen els efectes dels antibiòtics antitumorals Mitramicina A i Mitramicina SK. Tots dos compostos van ser obtinguts al laboratori del Dr. J. A. Salas (Universidad de Oviedo).

##### 3.1.1. Preparació i determinació de la concentració de les Mitramicines.

1. Pesar aproximadament 1 mg de fàrmac i afegir el volum necessari de 10 mM NaCl en 20mM HEPES estèril (pH 7,4) per obtenir una concentració teòrica de 1 mM. Agitar a la foscor mitjançant rotació entre 4-16 hores per a que es dissolgui bé el fàrmac.
2. Centrifugar breument per comprovar que el fàrmac està ben dissolt. Si hi ha presència de precipitat, guardar el sobrenedant.
3. Determinar la concentració real de fàrmac en el sobrenedant.

La concentració dels fàrmacs es va determinar a partir dels coeficients d'extinció molar ( $\epsilon$ ) de cada molècula. Es tracta d'un mètode espectrofotomètric basat en la determinació de l'absorbància de la Mitramicina A a 400 nm i de la Mitramicina SK a 420 nm. Coneguts els coeficients d'extinció molar, és possible determinar la concentració dels fàrmacs (c) mitjançant la fórmula:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

$$\text{On, } \epsilon_{\text{MTA}} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{MSK}} = 10600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

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

$A$  = lectura espectrofotomètrica a 400 nm (MTA) o 420 nm (MSK)

Els estocs dels fàrmacs es conserven a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Per realitzar els diferents experiments es descongelaven els estocs i es diluïen per obtenir les concentracions apropiades, usant 10 mM NaCl - 20mM HEPES estèril o medi de cultiu (veure apartat 3.2.2).

### **Solucions**

- 10 mM NaCl en 20mM HEPES (pH 7.4) estèril filtrat amb una xeringa i un filtre de 0.22  $\mu$ M (Millipore) en una campana de flux laminar.

### **Observacions**

Les Mitramicines són molècules molt tòxiques. Per aquest motiu, és necessari treballar sempre amb guants i rebutjar els residus generats de manera apropiada (citotòxics).

## **3.2. LÍNIES CEL·LULARS I CONDICIONS DE CULTIU.**

### **3.2.1. Descripció de les línies cel·lulars.**

Les línies cel·lulars HCT116 p53+/+, HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/- van ser obtingudes del Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University). HCT116 és una línia cel·lular de carcinoma de còlon humà àmpliament utilitzada en l'estudi de la biologia del càncer. Presenten una morfologia epitelial i creixen adherides al flascó de cultiu. Aquesta línia té una mutació al codó 13 del protooncogen Ras, a més sobreexpressa TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 2 (*Transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2*). En aquesta línia cel·lular els punts de control dependents tan de dany al DNA com del fus mitòtic estan intactes i és idònia per poder realitzar assaigs de recombinació homòloga (Bunz et al., 1998).

Les línies cel·lulars HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/- han estat generades gracies a la disrupció dels dos al·lels dels gens *p53* i *p21* respectivament, mitjançant recombinació homòloga a partir de la línia parental HCT116 (aquí anomenada HCT116 p53+/+) (Bunz et al., 1998). Donada la rellevància d'aquest dos gens, aquestes tres línies cel·lulars ens permetran estudiar quin efecte tenen els fàrmac analitzats sobre gran part de les diferents respostes cel·lulars a fàrmacs antitumorals.

### 3.2.2. Manteniment de les cèl·lules.

Totes tres línies cel·lulars són mantingudes amb una proporció igual de medi D-MEM (Gibco) i Ham's F-12 (Cambrex) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví inactivat (FBS), 100 U/ml de Penicil·lina i 100 µg/ml d'Estreptomicina.

Les cèl·lules s'incuben a 37°C amb una atmosfera humida, contenen un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Solucions i materials

- FBS: Sèrum fetal boví.

El sèrum que s'utilitza per a suplementar el medi ha d'estar prèviament inactivat. Així es desnaturalitzen les proteïnes i s'evita la producció de cascades de lisis en les cèl·lules.

- Incubar a 56°C durant 30 min.
- Fer alíquotes de 50 ml.
- Mantenir a -20°C fins el seu ús.

- Penicil·lina/Estreptomicina: 10.000 unitats/ml de Penicil·lina i 10.000 µg/ml de Estreptomicina.

- Mantenir a -20°C fins el seu ús.

- Flascons de poliestirè estèrils tractats per a cultius cel·lulars (Corning Costar Corporation): 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> i 175 cm<sup>2</sup>, segons les necessitats.

#### Observacions

La manipulació dels cultius i la preparació de les solucions s'han de realitzar en les màximes condicions d'esterilitat possibles, en una campana de flux laminar.

### 3.2.3. Tractament amb tripsina-EDTA.

Com les línies cel·lulars utilitzades creixen adherides al flascó del cultiu, cada vegada que s'han de realitzar subcultius es tractaven amb tripsina-EDTA per a resuspendre les cèl·lules en el medi de cultiu.

1. Aspirar el medi de cultiu del flascó amb una pipeta Pasteur connectada a una bomba de buit.

2. Afegir 5 ml de 1x PBS, incubar durant 2 min i aspirar el PBS.
3. Afegir 1 ml de tripsina-EDTA i incubar durant 5-10 min fins que les cèl·lules s'hagin desenganxat.
4. Afegir 10 ml de medi de cultiu temperat.
5. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
6. Aspirar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 5 ml de 1x PBS.
7. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
8. Aspirar el sobrenedant i resuspendre el sediment amb el volum de medi de cultiu necessari.

### Materials i solucions

#### - 0.5 % Tripsina (10 ml):

- Pesar 0.05 g de tripsina (Sigma).
- H<sub>2</sub>O miliQ fins 10 ml.
- Esterilitzar per filtració.
- Mantenir a -20°C fins el seu ús.

#### - 25 mM EDTA (10 ml):

- 0.5 ml 0.5 M EDTA
- 9.5 ml H<sub>2</sub>O mili Q.
- Esterilitzar per filtració.
- Mantenir a -20°C fins el seu ús.

#### - Tripsina-EDTA:

- 1 ml de 0.5% Tripsina.
- 0.4 ml de 25 mM EDTA.
- 18.6 ml de TD.
- Esterilitzar per filtració.
- Mantenir a -20°C fins el seu ús.

#### - TD (500 ml):

- 17.125 ml de 4 M NaCl.
- 625 µl de 4 M KCl.
- 0.087 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O.
- 10 ml de 1 M Tris.
- Ajustar el pH a 7.4.

- 10x PBS: Tampó fosfat salí.

- Es dissolen:  
73 g de Na Cl  
29.6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O.  
11.7 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>· H<sub>2</sub>O
- Es porta a 1000 ml amb H<sub>2</sub>O miliQ. Una vegada dissolt, autoclavar i guardar a temperatura ambient.

### 3.2.4. Congelació i descongelació.

Per a la congelació es necessita una gran quantitat de cèl·lules (mínim  $2 \times 10^7$  cèl·lules), per això utilitzem cèl·lules que hagin estat subcultivades poques vegades.

#### Procediment de congelació

1. Tractar les cèl·lules amb tripsina-EDTA (veure 3.2.3) fins el pas en que s'afegeixen 10 ml de medi de cultiu temperat.
2. Agafar el volum necessari del medi de cultiu per a obtenir  $2 \times 10^7$  cèl·lules (veure recompte amb blau de tripà en punt 3.4.2.1.).
3. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
4. Eliminar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur connectada a una bomba de buit.
5. Resuspendre el sediment en 5 ml de 1x PBS.
6. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
7. Eliminar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur connectada a una bomba de buit.
8. Resuspendre el sediment de 5 ml de 1x PBS.
9. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
10. Eliminar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur connectada a una bomba de buit.
11. Resuspendre el sediment en un volum final de congelació de 1 ml en un vial (criotub).
  - 100 µl DMSO (Sigma).
  - 400 µl de medi de cultiu suplementat amb sèrum temperat.



- 500 µl de medi de cultiu suplementat amb sèrum fred.
12. Els estocs es mantenen congelats en un tanc de N<sub>2</sub> líquid.

### **Procediment de descongelació**

1. Descongelar el vial (criotub) ràpidament amb l'escalfor de les mans.
2. Afegir gota a gota el contingut del vial en un tub amb 5 ml de medi de cultiu fred.
3. Barrejar per inversió.
4. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
5. Eliminar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur connectada a una bomba de buit.
6. Resuspendre el sediment amb 5 ml de medi de cultiu suplementat i temperat a 37°C.
7. Passar a un flascó de cultiu de 25 cm<sup>2</sup>.
8. Guardar-lo dins del incubador i controlar el creixement cel·lular.

### **Observacions**

És important portar ulleres i guants protectores per treure el vial del tanc de N<sub>2</sub> líquid, a més de tapar el vial amb un vas de precipitats de plàstic.

## **3.3. ASSAIGS D'INHIBICIÓ DEL CREIXEMENT CEL·LULAR, TRACTAMENTS FARMACOLÒGICS I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES.**

### **3.3.1. Mètode del MTT**

L'assaig MTT, també anomenat Test d'Inhibició de la Succinat Deshidrogenasa, és un assaig colorimètric que mesura l'activitat metabòlica de les cèl·lules viables. Es basa en el trencament de la sal de tetrazoli (MTT), concretament del seu anell de tetrazoli, per varies deshidrogenases mitocondrials. Aquesta reacció produeix cristalls de formazà, insolubles amb aigua però que poden ser solubilitzats amb dissolvents orgànics. La quantitat de formazà format és proporcional al número de cèl·lules metabòlicament actives, que tenen la capacitat de trencar l'anell de tetrazoli i formar formazà (Mosmann, 1983).

Aquest mètode es va utilitzar per determinar les corbes de creixement de les diferents línies cel·lulars i la capacitat de les Mitramicines d'inhibir el creixement cel·lular.

### 3.3.1.1. Determinació de les corbes de creixement.

La determinació de les corbes de creixement és l'etapa prèvia al disseny d'experiments posteriors que permeten saber la densitat del inòcul inicial per a cada línia cel·lular que ens assegura que treballem en condicions de creixement exponencial.

#### Procediment:

1. Sembrar 5 microplaques de 96 pous en el que cada un contingui: una columna amb 625 cèl·lules en 100 µl de medi de cultiu per pou (6 pous, que correspondran a les rèpliques), el mateix amb: 1250, 2500, 5000 i 10000 cèl·lules. Carregar una altra columna amb 6 pous que continguin 100 µl de medi de cultiu sense cèl·lules.
2. A intervals de 0, 48, 72, 96 i 120 h d'incubació, treure una placa i tractar-la de la següent forma:
  - Afegir 10 µl de MTT (5mg/ml) i incubar durant 3 h a 37 °C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub> i protegit de la llum.
  - Solubilitzar el formazà produït en la placa de 100 µl de 0.08 M HCl en isopropanol agitant amb una pipeta multicanal.
  - Agitar la placa durant 30 min a temperatura ambient.
  - Les mostres es quantifiquen en un lector de plaques a una longitud d'onda de 570 nm. Es va utilitzar un Elx800 (Bio-Tek) i el programa KC Junior (Bio-Tek). La absorbància a 570 nm està correlacionada directament amb el número de cèl·lules metabòlicament actives.

#### Materials i solucions:

- MTT: bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli (Sigma).

Tot el procediment s'ha de realitzar en una campana de flux laminar. Es prepara una solució estoc de 5 mg/ml en tampó PBS i es barreja per inversió.

- Aliquotar 1.5 ml en tubs nous.
- Mantenir fins el seu ús a -20°C.

- 0.08 M HCl en isopropanol:

- 500 µl HCl al 25%.
- Portar fins a 50 ml de isopropanol.

### 3.3.1.2. Determinació de la citotoxicitat de les Mitramicines.

Un cop hem determinat la densitat del inòcul inicial per cada línia cel·lular que ens assegura que treballem en condicions de creixement exponencial des de les 24 a les 120 hores, es va determinar la citotoxicitat de la Mitramicina A i Mitramicina SK. Els assaigs de citotoxicitat ens permeten conèixer la capacitat dels fàrmacs per inhibir el creixement de les diferents línies cel·lulars.

#### Procediment:

1. Sembrar 3 microplaques de 96 pous amb una densitat de cèl·lules que ens assegurari un creixement exponencial de cada línia. Incubar 24 hores a 37°C en una atmosfera amb un 5% CO<sub>2</sub>.
2. Realitzar un banc de dilucions seriades amb les diferents Mitramicines i tractar les cèl·lules amb les diferents dosis (per triplicat). Incubar a 37°C en una atmosfera amb un 5% CO<sub>2</sub> durant diferents temps, treure les plaques i seguir amb l'assaig del MTT (veure apartat 3.3.1.1.).

#### Solucions

- 5 mg/ml MTT (Sigma).
- 0.08 HCl en isopropanol.

### 3.3.2. Tractaments farmacològics i obtenció de les mostres.

Un cop determinats els valors de les dosis de Mitramicina A i Mitramicina SK que inhibien un 50 o un 75% el creixement cel·lular en les diferents línies, varem dissenyar els experiments basant-nos en les condicions de duració dels tractaments farmacològics que es detallen a continuació.

**Procediment:**

1. Subcultivar, sembrant el inòcul inicial que assegurí un creixement exponencial per a cada línia cel·lular (veure apartat 3.3.1.1.). Incubar durant 24 hores a 37°C.
2. Tractar amb les dosis de Mitramicines equivalents als valors IC<sub>50</sub> i IC<sub>75</sub> per a cada línia cel·lular (veure apartat 3.3.1.2.). Incubar durant el temps necessari. Varem realitzar tractaments continus de 72 hores, moment en que varem determinar les dosis IC<sub>50</sub> i IC<sub>75</sub>, segons la línia cel·lular (veure Resultats). Després varem canviar el medi de cultiu i varem incubar les cèl·lules amb medi lliure de fàrmac. D'aquesta manera ens asseguràvem que els efectes dels fàrmacs sobre el creixement cel·lular tenien lloc de forma ràpida i es mantenien en el temps.
3. Treure els flascons a diferents temps de tractament i obtenir les cèl·lules per a la realització dels diferents experiments.

Cada cop que s'obtenien mostres es realitzava un recompte de cèl·lules i el càlcul de la viabilitat amb blau de tripà (veure apartat 3.4.2.1).

**3.4. ANÀLISI DELS EFECTES ANTITUMORALS DE LES MITRAMICINES: EFECTES CITOSTÀTICS I CITOTÒXICS.**

L'assaig del MTT es va utilitzar per determinar la capacitat de les mitramicines d'inhibir el creixement cel·lular (veure apartat 3.3.1.2.). No obstant això, aquest tipus d'assaig no permet diferenciar si la inhibició de la proliferació es deu al fet que els antitumorals inhibeixen la proliferació cel·lular (efecte citostàtic), o indueixen la mort de les cèl·lules (efecte citotòxic). Per poder destriar entre aquests efectes, varem realitzar els experiments que es detallen a continuació.

**3.4.1. Assaigs per analitzar els efectes citostàtics dels antitumorals.****3.4.1.1. Tinció amb iodur de propidi.**

L'anàlisi del contingut de DNA utilitzant iodur de propidi proporciona informació sobre la distribució de les cèl·lules en les fases del cicle cel·lular (la fracció

de cèl·lules en G0/1, S i G2+M), la ploïdia i les pertorbacions del cicle cel·lular induïdes per xenobiòtics.

### **Procediment:**

Es va seguir el mètode de Doyle (Doyle et al., 1995) amb petites modificacions:

1. Sembrar  $2.5 \times 10^4$  cèl·lules/ml en medi de cultiu en flascons de poliestirè estèrils.
2. Incubar durant 24 h per a que el cultiu estigui en fase de creixement exponencial, i afegir la concentració de Mitramicina corresponent.
3. Incubar durant 2 h, aspirar el medi de tots els flascons i afegir medi de cultiu.
4. Treure a diferents temps les mostres tractades i els seus controls i fixar-les de la següent manera:
  - Tractar les cèl·lules amb Tripsina-EDTA (veure 3.1.3)
  - Centrifugar a 800 g durant 5 min i rentar amb 5 ml de 1x PBS.
  - Centrifugar a 800 g durant 5 min i resuspendre en 0.5 ml de 1x PBS.
  - Afegir, mentre s'agita en vòrtex, 4.5 ml de 70% d'etanol fred, i monodispersar pipetejant repetidament.
5. Les diferents mostres acumulades es tenyeixen abans d'analitzar-les al citometre de flux de la següent manera:
  - Agitar les cèl·lules en 70% etanol a 4°C amb un vòrtex.
  - Centrifugar a 800 g durant 5 min i rentar-les en 5 ml de 1x PBS.
  - Eliminar el sobrenedant i afegir 450 µl de 1x PBS amb 25 µl d'RNAasa A i 25 µl de iodur de propidi.
  - Incubar a 37°C durant 30 min.
  - Mantenir a 4°C en la foscor fins a l'anàlisi.
6. Les mostres es van analitzar en un citometre de flux Coulter Epics Elite XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona) utilitzant un laser d'argó blau (488 nm, 15mW). La fluorescència es va detectar a 665-685 nm.

### **Materials i solucions**

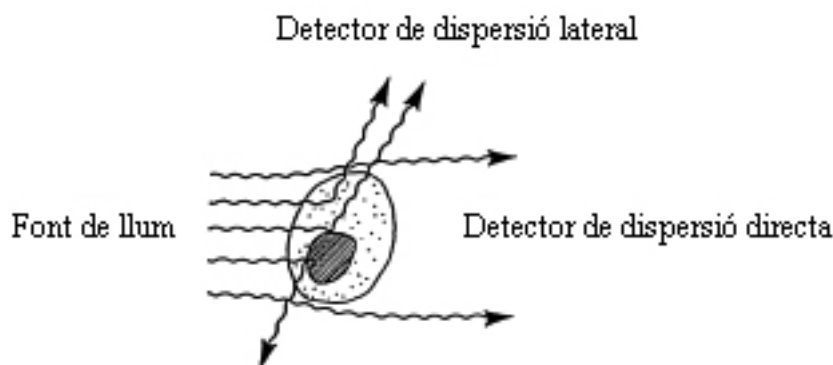
- 10x PBS (veure 3.2.3).
- 70% etanol.
- 10 mg/ml RNAasa A (Fermentas).

- 5 mg/ml de iodur de propidi (Sigma).

### 3.4.1.2. Assaigs per a determinar la presència de senescència cel·lular.

#### 3.4.1.2.1. Detecció de granularitat i augment de la mida cel·lular mitjançant citometria.

Morfològicament les cèl·lules senescentes es caracteritzen per tenir una mida major i un augment de granularitat citoplasmàtica (Biroccio et al., 2003; Chang et al., 1999). En qualsevol assaig de citometria es pot calcular tant la dispersió directa (FS, de l'anglès *Forward Scatter*) com la dispersió lateral (SS, de l'anglès *Side Scatter*) de les cèl·lules analitzades (Figura M1). Un augment en el FS es correlaciona amb un augment en la mida de les cèl·lules, mentre que un augment en el SS es correlaciona amb un augment en la granularitat citoplasmàtica.



**Figura M1.** Esquema on es mostra com es detecta la dispersió directa i la dispersió lateral en un citòmetre de flux. Com més gran sigui la mida de la cèl·lula més gran és el senyal que rep el detector de dispersió directa. Com més granularitat citoplasmàtica presenta la cèl·lula més gran és la senyal que rep el detector de dispersió lateral.

#### 3.4.1.2.2. Tinció SA- $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0.

La tinció SA- $\beta$ -gal (*Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase*) és un assaig citoquímic utilitzat per la detecció de cèl·lules senescentes *in vivo* (Dimri et al., 1995). Es basa en la mesura de la activitat de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0. L'enzim  $\beta$ -galactosidasa àcida és una hidrolasa que es localitza en els lisosomes de les cèl·lules

eucariotes, la qual té un pH òptim de 4.0. La  $\beta$ -galactosidasa lisosomal és capaç de processar el substrat 5-bromo-4-cloro-3-indoil  $\beta$ -D-galactopiranòsid (X-Gal) a pH 4.0, formant-se precipitats blaus en el interior de les cèl·lules (Dimri et al., 1995). La  $\beta$ -galactosidasa amb pH òptim de 6.0 només està present en cèl·lules senescentes. Aquesta  $\beta$ -galactosidasa es coneix com SA- $\beta$ -gal. La tinció SA- $\beta$ -gal permet discriminar cèl·lules senescentes (positives per la tinció SA- $\beta$ -gal a pH 4.0 i 6.0) de la resta de cèl·lules (únicament positives per la tinció a pH 4.0) (Dimri et al., 1995).

### Procediment

1. Obtenir les cèl·lules a diferents temps de tractament i els seus controls (veure apartat 3.3.2.). Les cèl·lules es van sembrar en SlideFlask (Nunc), per a poder realitzar les tincions directament en portaobjectes.
2. Aspirar el medi de tots els flascons.
3. Afegir 1 ml de la solució de fixació per flascó.
4. Incubar 5 min a temperatura ambient.
5. Rentar amb 1x PBS.
6. Afegir 1 ml de la solució de tinció.
7. Incubar a 37°C (sense CO<sub>2</sub>) tota la nit.
8. Separar el flascó del portaobjectes i col·locar un cobreobjectes.
9. Observar al microscopi òptic.

### Material i solucions

- SlideFlask (Nunc).
- 10x PBS (ver 3.2.3.)
- Solució de fixació: 3% Formaldehid
  - 0.8 ml 37% Formaldehid (Merck)
  - 9.2 ml H<sub>2</sub>O miliQ.
  - Guardar en tub de plàstic.
- Solució de tinció:
  - Solució de tinció a pH 6: 1 mg/ml X-gal (Promega), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>), 5 mM K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)·3 H<sub>2</sub>O, en 40 mM MES (pH 6.0) (Sigma).

- Solució de tinció a pH 4: 1 mg/ml X-gal, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>), 5 mM K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)·3 H<sub>2</sub>O, tampó 40 mM citrat/fosfat (pH 4.0).

Per un volum final de 10 ml:

- 0.2 ml 50 mg/ml X-gal (Promega).
- 20 µl 1M MgCl<sub>2</sub>.
- 375 µl 4 M NaCl.
- 500 µl 100 mM K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>).
- 500 µl 100 mM K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)·3 H<sub>2</sub>O.
- 2 ml tampó 200 mM MES a pH 6.0 o tampó 200 mM citrat/fosfat a pH4.0.

Preparació de l'stock del tampó 200 mM citrat/fosfat:

- Àcid cítric
- Fosfat disòdic (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)
  - Tampó 400 mM fosfato disòdic:
    - 0.72 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.
    - 8 ml H<sub>2</sub>O miliQ. Comprovar que el pH sigui superior a 9.0.
    - Enrasar a 10 ml.
  - Tampó 400 mM àcid cítric:
    - 0.84 g àcid cítric.
    - 8 ml H<sub>2</sub>O miliQ. Comprovar que el pH sigui inferior a 2.0.
    - Enrasar a 10 ml.
  - Tampó 200 mM citrat/fosfat pH 4.0:
    - Usant un pH-metre, afegir 400 mM àcid cítric al tampó 400 mM fosfat disòdic fins arribar a un pH de 4.0.
    - Diluir el tampó a la meitat per obtenir una concentració de 200 mM.

### Observacions

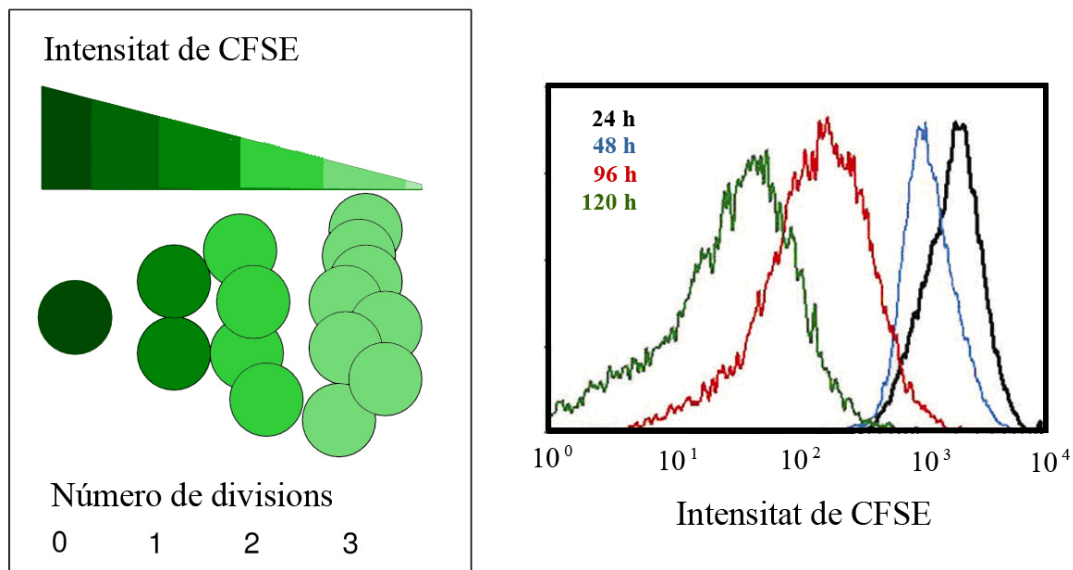
Degut a la inestabilitat del substrat X-Gal, i de les solucions dels ferrocianats potàssics, la solució de tinció SA-β-gal s'ha de preparar fresca cada cop que s'utilitza.



### 3.4.1.3 Assaig per determinar la divisió cel·lular: Tinció amb CFSE.

La tinció amb *carboxifluoresceïn succinimidil ester* (CFSE) permet fer un seguiment de la divisió cel·lular (Parish, 1999). Es tracta d'una tinció intracel·lular noletal. Les cèl·lules es tracten amb *carboxifluoresceïndiacetat succinimidil ester* (CFDASE) que és permeable a la membrana cel·lular i no produeix fluorescència. Les esterases de la cèl·lula metabolitzen els grups carboxil del CFDASE donant com a producte el CFSE que és impermeable a la membrana cel·lular i emet fluorescència. Durant la divisió cel·lular, el CFSE es distribueix equitativament entre les cèl·lules filles (Figura M2). Si per alguna raó un determinat nombre de cèl·lules no s'hagués dividit, emetrien major fluorescència que la resta de cèl·lules.

Per obtenir una senyal òptima, sincronitzem les cèl·lules en G0 així la gran majoria de les cèl·lules es dividiran al mateix temps i la senyal detectada pel citometre de flux serà més uniforme.



**Figura M2.** La tinció amb CFSE permet seguir la divisió cel·lular mitjançant citometria de flux. A mida que passa el temps i les cèl·lules es van dividint, la fluorescència es va diluint entre les cèl·lules filles.

#### Procediment

1. Sembrar  $2.5 \times 10^4$  cèl·lules/ml de medi de cultiu suplementat amb 0.25% FBS en flascons de poliestirè estèrils.
2. Incubar durant 36 h.
3. Aspirar el medi de cultiu i rentar amb 5 ml de 1x PBS.

4. Afegir el volum necessari de 1x PBS per cobrir el flascó.
5. Afegir el volum necessari de CFSE per una concentració final de 10  $\mu$ M.
6. Incubar 10 min a 37°C. Agitar suaument els flascons cada 2 min per homogeneïtzar la tinció.
7. Afegir 5 volums de medi fred.
8. Incubar 5 min en gel.
9. Rentar 3 vegades amb 1x PBS.
10. Afegir el medi de cultiu suplementat segons 3.2.2.
11. Tractar les cèl·lules amb la concentració adient de Mitramicina.
12. Analitzar a diferents temps les mostres tractades i els seus controls.
13. Les mostres es van analitzar en un citometre de flux Coulter Epics Elite XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona). Utilitzar una longitud d'ona de 488 nm i un filtre bandpass de 525 nm per a la detecció del CFSE.

### Materials i solucions

- 1x PBS (veure 3.2.3.)
- 5 mM CFDASE (*Carboxifluoresceindiacetat succinimidil ester*, Molecular Probes)

### Observacions

Les cèl·lules s'han d'analitzar al moment i no es poden emmagatzemar les mostres.

El medi de cultiu suplementat amb 0.25 % de FBS conté 100 U/ml de Penicil·lina i 100  $\mu$ g/ml de Estreptomicina. La parada en G0 es deguda a la no síntesis proteica.

#### 3.4.1.4. Determinació de la síntesi de DNA.

La 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) és un anàleg de la timidina, que s'incorpora al DNA durant el procés de síntesi. Basant-nos en aquest principi, determinem si després de tractar les cèl·lules amb Mitramicina, aquestes eren capaces de sintetitzar DNA. Hidrolitzem parcialment el DNA de les cèl·lules per deixar accessible el BrdU incorporat al anticòs monoclonal anti-BrdU-FITC (Becton Dickinson). Marquem el DNA amb iodur de propidi i analitzem les mostres al citometre de flux.

**Procediment:**

1. Obtenir les cèl·lules a diferents temps de tractament i els seus controls (veure apartat 3.3.2.).
2. Afegir 10 µl de 1 mM BrdU per cada ml de medi de cultiu.
3. Incubar durant 30 min a 37°C i una atmosfera al 5% CO<sub>2</sub>.
4. Tripsinitzar les cèl·lules (veure apartat 3.2.3.).
5. Rentar dos cops amb 1x PBS.
6. Fixar les cèl·lules amb 70% etanol.
7. Deixar 30 min en gel i 16 hores a -20°C.
8. Passar pel vòrtex les mostres.
9. Centrifugar a 800 g durant 5 min a 4°C i rentar amb 1x PBS.
10. Resuspendre el sediment afegint gota a gota i amb vòrtex 1.5 ml de 2 M HCl - 0.5% Tritó X-100.
11. Incubar durant 30 min a temperatura ambient.
12. Centrifugar a 800 g durant 5 min a 4°C.
13. Resuspendre el sediment amb 3 ml de 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (pH 8.5).
14. Centrifugar a 800 g durant 10 min a 4°C.
15. Repetir els passos 13 i 14. Comprovar que el pH de les mostres sigui neutre.
16. Resuspendre el sediment amb 1 ml de solució de bloqueig.
17. Afegir 20 µl d'anticòs anti-BrdU-FITC i incubar durant 1 h a temperatura ambient a la foscor.
18. Centrifugar a 800 g durant 5 min a 4°C.
19. Resuspendre el sediment amb 450 µl de 1x PBS, 25 µl RNAasa A i 2.5 µl de iodur de propidi.
20. Les mostres es van analitzar en un citometre de flux Coulter Epics Elite XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona). Utilitzar un laser d'argó blau (488 nm, 15 mW) i un filtre bandpass de 515 nm per la detecció de la fluorescència i un filtre de 665-685 nm per la detecció del iodur de propidi.

**Materials i solucions**

- Tripsina-EDTA (veure apartat 3.2.3.).
- 1mM BrdU (Sigma).
- 1x PBS (veure apartat 3.2.3.).
- 70% etanol.

- 2 M HCl – 0.5% Tritó X-100 (10 ml).
  - 2.61 ml 25% HCl.
  - 50 µl Tritó X-100 (Roche).
  - H<sub>2</sub>O miliQ fins 10 ml.
- 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (pH 8.5) (20 ml).
  - Pesar 0.763 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.
  - Portar fins a 20 ml de H<sub>2</sub>O miliQ.
  - Comprovar el pH.
- Solució de bloqueig: 0.5% Tween 20 – 0.1% BSA en 1x PBS (50 ml).
  - 50 mg BSA.
  - 25 µl Tween 20 (Sigma).
  - 50 ml 1x PBS.
- Anticòs anti-BrdU-FITC (Becton Dickinson).
- 10 mg/ml RNAasa A (Fermentas).
- 5 mg/ml de iodur de propidi (Sigma).

#### 3.4.1.5. Anàlisi de l'índex mitòtic.

La tinció de iodur de propidi ens permet analitzar la distribució de les cèl·lules en el cicle cel·lular, però no pot destriar entre cèl·lules en G2 i mitosis. L'índex mitòtic es pot analitzar gràcies a una modificació a la Histona H3 present només en les cèl·lules en mitosis. Aquesta modificació és la fosforilació de la serina 10 (H3pS10) i es pot detectar amb un anticòs específic. Un cop detectada per immunofluorescència aquesta modificació, marquem el DNA amb iodur de propidi i analitzem les mostres al citometre de flux.

#### **Procediment:**

1. Obtenir les cèl·lules a diferents temps de tractament i els seus controls (veure apartat 3.3.2.).
2. Tripsinitzar les cèl·lules (veure apartat 3.2.3.).
3. Rentar dos cops amb 1x PBS.
4. Fixar les cèl·lules amb 70% etanol.
5. Deixar 30 min en gel i 16 hores a -20°C.

6. Passar pel vòrtex les mostres.
7. Centrifugar a 800 g durant 5 min a 4°C i rentar amb 1x PBS.
8. Resuspendre el sediment afegint 2 ml de solució de bloqueig.
9. Incubar durant 30 min a temperatura ambient.
10. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
11. Resuspendre el sediment amb 1 ml de solució de bloqueig.
12. Afegir 2 µl de l'anticòs H3pS10 (Upstate) durant 1 h a temperatura ambient i 16 h a 4°C.
13. Rentar tres cops amb 1x PBS.
14. Resuspendre el sediment amb 400 µl de solució de bloqueig.
15. Afegir 1 µl de l'anticòs secundari conjugat amb el fluorocrom Cy2 durant 2 h.
16. Rentar tres cops amb 1x PBS.
17. Resuspendre el sediment amb 450 µl de 1x PBS, 25 µl RNAasa A i 2.5 µl de iodur de propidi.

Les mostres es van analitzar en un citometre de flux Coulter Epics Elite XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona). Utilitzar un laser d'argó blau (488 nm, 15 mW) i un filtre bandpass de 515 nm per la detecció de la fluorescència i un filtre de 665-685 nm per la detecció del iodur de propidi.

### **Materials i solucions**

- Tripsina-EDTA (veure apartat 3.2.3.).
- 1x PBS (veure apartat 3.2.3.).
- 70% etanol.
- Solució de bloqueig: 0.5% Tween 20 – 0.1% BSA en 1x PBS (50 ml).
  - 50 mg BSA.
  - 25 µl Tween 20 (Sigma).
  - 50 ml 1x PBS.
- Anticòs anti-H3pS10 (Upstate).
- Anticòs anti-rabbit-Cy2 (Jackson ImmunoResearch).
- 10 mg/ml RNAasa A (Fermentas).
- 5 mg/ml de iodur de propidi (Sigma).

### 3.4.2. Assaigs per determinar els efectes citotòxics dels antitumorals.

#### 3.4.2.1. Assaig de viabilitat: Blau de tripà.

El blau de tripà (Trypan Blue) és un colorant vital que permet distingir les cèl·lules viables de les que no ho són. És un mètode ràpid que només requereix una petita fracció del total de la població. Les cèl·lules viables no incorporen la tinció, mentre que les cèl·lules no viables queden tenyides de blau. Aquesta tinció combinada amb la utilització d'una càmera de Neubauer (Brand) permet fer mesures de la viabilitat. Es va utilitzar per determinar:

- La concentració cel·lular (nº de cèl·lules/ml) en els cultius cel·lulars i assegurar que el cultiu havia arribat al seu nivell òptim de creixement i densitat cel·lular abans del subcultiu rutinari, congelació o qualsevol altre experiment.
- El percentatge de viabilitat, calculat a partir de la següent fórmula:

$$\text{Viabilitat (\%)} = \left( \frac{\text{núm. de cèl. vives}}{\text{núm. de cèl. vives} + \text{núm. de cèl. mortes}} \right) \times 100$$

Sent, núm. de cèl. vives = cèl·lules negatives per la tinció de blau de tripà.

núm de cèl. mortes = cèl·lules positives per la tinció de blau de tripà.

#### Procediment

1. Tractar les cèl·lules amb tripsina-EDTA (veure 3.2.3)
2. Agafar una alíquota de 10 µl de la suspensió del cultiu cel·lular.
3. Afegir 5 µl de blau de triptà.
4. Muntar sobre la càmera de Neubauer i observar al microscopi òptic.

En la càmera de Neubauer hi ha quatre camps visuals. Es compta el número de cèl·lules per camp. S'obté la mitjana de cèl·lules (número total de cèl·lules/4) i es multiplica per 1.5 (factor de dilució amb el blau de tripà i la suspensió del cultiu cel·lular) i per 10<sup>4</sup>. El resultat obtingut correspon al número de cèl·lules/ml de suspensió cel·lular. La viabilitat cel·lular es determina per la relació entre el número de cèl·lules viables respecte al total.

**Material i solucions**

- Blau de tripà (Trypan Blue, Fluka).
- Càmera de Neubauer (Brand)

**3.4.2.2. Tinció doble amb iodur de propidi i Anexina-V-fluoresceïna.**

La tinció amb iodur de propidi i Anexina-V-fluoresceïna permet detectar i quantificar inequívocament l'apoptosi i diferenciar-la de la necrosi. Es va utilitzar el kit "Anexina-V-FLUOS Staining" (Roche).

En els primers estadis de l'apoptosi es donen canvis en la superfície cel·lular. Un d'aquests canvis és l'alteració de la membrana plasmàtica, amb la que hi ha una translocació de la fosfatidilserina de la capa interna a l'externa. L'Anexina-V és una proteïna dependent de  $Ca^{2+}$  que s'uneix a fosfolípids carregats negativament, amb una alta afinitat per la fosfatidilserina (Vermes et al., 1995). L'Anexina-V s'utilitza com a marcador per detectar cèl·lules apoptòtiques.

La integritat de la membrana plasmàtica es veu compromesa en les cèl·lules necròtiques, de manera que al tenyir-les amb iodur de propidi, aquest pot accedir al nucli cel·lular i unir-se al DNA. La tinció simultània amb iodur de propidi i Anexina-V-Fluos permet destriar les cèl·lules apoptòtiques de les necròtiques en les seves fases inicials, i de les cèl·lules viables (Vermes et al., 1995) (Taula M1.). Les cèl·lules viables no presenten translocació de la fosfatidilserina ni ruptura de la membrana plasmàtica i són negatives per les dues tincions. Les cèl·lules en fases inicials de l'apoptosi són positives per a l'Anexina-V-Fluos i negatives per el iodur de propidi, ja que tenen translocada la fosfatidilserina però mantenen la membrana íntegra. Les cèl·lules en fases inicials de necrosi són positives per el iodur de propidi, però negatives per l'Anexina-V-Fluos, ja que la fosfatidilserina no està prou accessible a l'Anexina-V fins a estadis més avançats de la necrosi (necrosi secundària). El mateix passa en el cas de cèl·lules en fase d'apoptosi secundària, ja que la membrana plasmàtica està prou desestabilitzada i permet l'entrada del iodur de propidi, i per tant en tots dos casos, són doble positives per la tinció.

**Taula M1.** Patró de tinció de les cèl·lules viables, apoptòtiques i necròtiques amb iodur de propidi i Anexina-V-Fluos.

	Viables	Apoptosi primària	Necrosi primària	Necrosi / Apoptosi secundària
Anexina-V-Fluos	-	+	-	+
Iodur de propidi	-	-	+	+

### Procediment

1. Rentar  $1 \times 10^6$  cèl·lules amb 1x PBS i centrifugar a 200 g durant 5 min.
2. Resuspendre el sediment en 100 µl de solució de tinció i incubar durant 15 min a temperatura ambient.
3. Afegir 0.6 ml de HEPES.
4. Analitzar immediatament les mostres en un citòmetre de flux Coulter Epics Elite XL (Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona). Utilitzar una longitud d'onda de 488 nm i un filtre bandpass de 515 nm per a la detecció de fluoresceïna i un filtre de més de 600 nm per a la detecció de iodur de propidi.

### Materials i solucions

- Tampó de tinció: per a 10 mostres, es predilueix 20 µl de Anexina-V-fluoresceïna en 1000 µl de HEPES pH 7.4 i s'afegeix 20 µl de iodur de propidi.
- 1x PBS (veure 3.2.3)

### Observacions

No es poden emmagatzemar les mostres. Les cèl·lules s'han d'analitzar immediatament.

#### 3.4.2.3. Detecció de cèl·lules poliploides.

Varem utilitzar la tinció amb iodur de propidi per comparar els canvis en la distribució del cicle cel·lular induïts per fàrmacs, analitzant-los quantitativament en un citometre de flux convencional (veure apartat 3.4.1.1.). A més, varem utilitzar un LSC (*Laser Scanning Cytometer*) per obtenir imatges de les pertorbacions del cicle induïdes per la Mitramicina SK. El LSC permet obtenir les mateixes dades que un citometre de flux convencional, però pot treballar amb petits volums de mostra, col·locada en un portaobjectes. El LSC té l'avantatge de poder relocalitzar, visualitzar i fotografiar les



cèl·lules d'interès, en el nostre cas, cèl·lules poliploides. El LSC recull la senyal emesa de les cèl·lules tenyides amb iodur de propidi, que serà major o menor segons el contingut de DNA (ploïdia). Les senyals recollides es digitalitzen i es creen imatges basades en píxels. Varem configurar el LSC per a que reconegués *clusters* de píxels amb un llinar mínim de cèl·lules amb ploïdia  $2n$ . D'aquesta manera, els *clusters* amb un valor múltiple respecte al llinar es van identificar com cèl·lules  $4n$ ,  $8n$ , etc.

### Procediment

Les mostres es varen tenyir amb iodur de propidi tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.4.1.1., es varen col·locar en un portaobjectes i es varen analitzar en un LSC. L'observació morfològica de cèl·lules poliploides multinucleades es va realitzar mitjançant un LSC CompuCyte (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona), usant una longitud d'onda de 665-685 per a la detecció de la fluorescència del iodur de propidi. Per a la localització i l'obtenció de imatges, es va utilitzar el *software* WinCyte 3.4 (CompuCyte).

#### 3.4.2.4. Detecció de mitosis aberrants.

La tinció amb DAPI permet diferenciar entre cèl·lules en interfase i cèl·lules en procés de divisió, així com la detecció de les diferents fases mitòtiques. Amb la detecció simultània de  $\beta$ -tubulina per immunofluorescència podem comprovar l'existència de malformacions en el fus mitòtic.

### Procediment

1. Obtenir les mostres a diferents temps de tractament i els seus controls. Les cèl·lules es subcultivaren en Slideflasks (Nunc) per obtenir el creixement cel·lular directament sobre un portaobjectes.
2. Eliminar el medi de cultiu i incubar amb 1 ml de solució fixadora durant 20 min a temperatura ambient sense agitació.
3. Eliminar la solució fixadora i realitzar 3 rentats amb 1x PBS.
4. Incubar amb solució de bloqueig durant 1 h a temperatura ambient.
5. Eliminar la solució de bloqueig i desmuntar el flascó per a obtenir el portaobjectes.

6. Afegir 100 µl d'anticòs  $\beta$ -tubulina diluït 1:5000 amb solució de bloqueig, tapar el portaobjectes amb un cobreobjectes amb suavitat per a que la gota cobreixi tota la mostra.
7. Incubar durant 1 h a temperatura ambient en una càmera humida.
8. Incubar durant 16 h a 4°C.
9. Extreure amb molta cura el cobreobjectes per a no perdre mostra i realitzar tres rentats amb 1x PBS per extreure l'excés d'anticòs.
10. Afegir 100 µl d'anticòs secundari conjugat amb el fluorocrom Cy3 diluït 1:400 amb solució de bloqueig, tapar el portaobjectes amb un cobreobjectes amb suavitat per a que la gota cobreixi tota la mostra.
11. Incubar durant 1 h a temperatura ambient en una càmera humida a la foscor.
12. Extreure amb molta cura el cobreobjectes per a no perdre mostra i realitzar tres rentats amb 1x PBS per extreure l'excés d'anticòs.
13. Afegir 100 µl de DAPI diluït 1:100 amb 1x PBS, tapar el portaobjectes amb un cobreobjectes amb suavitat per a que la gota cobreixi tota la mostra.
14. Incubar durant 10 min a temperatura ambient en una càmera humida a la foscor.
15. Extreure amb molta cura el cobreobjectes per a no perdre mostra i realitzar tres rentats amb 1x PBS per extreure l'excés de DAPI.
16. Muntar la preparació amb 40 µl de Mowiol i observar en un microscopi de fluorescència Eclipse E-800 (Nikon).

### **Materials i solucions**

- Solució fixadora: 4% Paraformaldehyd.
- 1x PBS (veure apartat 3.2.3.).
- Solució de bloqueig: 0.1% BSA en 1x PBS (50 ml).
  - 50 mg BSA.
  - 50 ml 1x PBS.
- Anticòs anti- $\beta$ -tubulina (Chemicon International).
- Anticòs anti-mouse-Cy3 (Jackson ImmunoResearch).
- 2 ng/µl DAPI (Sigma).
- Mowiol (Calbiochem).

### 3.4.2.5. Anàlisi de l'activació de les caspases 2 i 3.

Varem utilitzar els *kits* Caspase-2/Ich-1 Colorimetric Assay (MBL) i ApoAlert™ Caspase-3 Colorimetric Assay (BD Biosciences) per a determinar si els diferents tractaments con Mitramicina induïen l'activació de les caspases 2 i 3. Quan aquestes proteases s'activen reconeixen les seqüències aminoacídiques VDVAV i DEVD dels seus substrats, respectivament. Els assaigs realitzats es basen en la detecció espectrofotomètrica del cromòfor *p*-nitroanilina (*pNA*), que s'allibera quan les caspases s'activen i processen els substrats marcats VDVAV-*pNA* i DEVD- *pNA*. L'activitat caspasa és proporcional a la quantitat de *pNA* lliure, que es pot quantificar espectrofotomètricament a 405 nm.

#### Procediment

1. Resuspendre  $2-5 \times 10^6$  cèl·lules tractades amb MSK o sense tractar en 50 µl de tampó de lisi. Incubar les cèl·lules en gel durant 10 min.
2. Centrifugar a 10.000 g durant 1 minut.
3. Transferir el sobrenedant a tubs de microcentrífuga nous i determinar la concentració de proteïnes, mitjançant el mètode de Bradford (veure apartat 3.6.2.).
4. Diluir els extractes amb tampó de lisi per obtenir 100-250 µg de proteïnes en 50 µl de tampó i disposar les mostres en una placa de microtitulació de 96 pous.
5. Afegir a cada mostra 50 µl de 2X Tampó de reacció contenint 10 mM DTT.
6. Afegir a cada mostra 5 µl dels substrats VDVAV-*pNA* (caspasa 2) o DEVD-*pNA* (caspasa 3). Incubar durant 1-3 h.
7. Llegir l'absorbància de les mostres en un espectrofotòmetre. El *pNA* lliure es va quantificar a 405 nm, utilitzant un lector de plaques de microtitulació Elx800 (Bio-Tek) i el programa KC Junior (Bio-Tek).

#### Materials i solucions

- Components dels *kits* Caspase-2/Ich-1 Colorimetric Assay (MBL) i ApoAlert™ Caspase-3 Colorimetric Assay (BD Biosciences)

- Tampó de lisi.
- 2X Tampó de reacció.

- Substrats de les caspases 2 i 3: VDVAD-*p*NA (caspasa 2) i DEVD- *p*NA (caspasa 3), a 4 mM.
- 1M DTT.

#### **3.4.2.6. Detecció per immunofluorescència de l'activació de la caspasa 3.**

La immunofluorescència ens permet visualitzar la distribució subcel·lular de biomolècules d'interès. Aquesta tècnica s'utilitza per localitzar cèl·lules que expressin activitat caspasa 3 i juntament amb la tinció de DAPI veure si presenten aberracions nuclears. L'activació de la caspasa 3 requereix un procés proteolític que talla la proteïna en dos fragments actius, p17 i p12. L'anticòs utilitzat per a la detecció de l'activitat de la caspasa 3 (Cell Signaling Technology) detecta el fragment de 17/19 kDa de la forma activa de caspasa 3 (Casp-3a). L'anticòs no detecta ni la forma inactiva de la caspasa 3 ni les formes actives d'altres caspases.

#### **Procediment**

1. Obtenir les mostres a diferents temps de tractament i els seus controls. Les cèl·lules es subcultivaren en Slideflasks (Nunc, Brand) per obtenir el creixement cel·lular directament sobre un portaobjectes.
2. Eliminar el medi de cultiu i incubar amb 1 ml de solució fixadora durant 20 min a temperatura ambient sense agitació.
3. Eliminar la solució fixadora i realitzar 3 rentats amb 1x PBS.
4. Incubar amb solució de bloqueig durant 1 h a temperatura ambient.
5. Eliminar la solució de bloqueig i desmuntar el flascó per a obtenir el portaobjectes.
6. Afegir 100 µl d'anticòs Casp-3a diluït 1:500 amb solució de bloqueig, tancar el portaobjectes amb un cobreobjectes amb suavitat per a que la gota cobreixi tota la mostra.
7. Incubar durant 1 h a temperatura ambient en una càmera humida.
8. Incubar durant 16 h a 4°C.
9. Extreure amb molta cura el cobreobjectes per a no perdre mostra i realitzar tres rentats amb 1x PBS per extreure l'excés d'anticòs.

10. Afegir 100 µl d'anticòs secundari conjugat amb el fluorocrom Cy3 diluït 1:400 amb solució de bloqueig, tapar el portaobjectes amb un cobreobjectes amb suavitat per a que la gota cobreixi tota la mostra.
11. Incubar durant 1 h a temperatura ambient en una càmera humida a la foscor.
12. Extreure amb molta cura el cobreobjectes per a no perdre mostra i realitzar tres rentats amb 1x PBS per extreure l'excés d'anticòs.
13. Afegir 100 µl de DAPI diluït 1:100 amb 1x PBS, tapar el portaobjectes amb un cobreobjectes amb suavitat per a que la gota cobreixi tota la mostra.
14. Incubar durant 10 min a temperatura ambient en una càmera humida a la foscor.
15. Extreure amb molta cura el cobreobjectes per a no perdre mostra i realitzar tres rentats amb 1x PBS per extreure l'excés de DAPI.
16. Muntar la preparació amb 40 µl de Mowiol i observar en un microscopi de fluorescència Eclipse E-800 (Nikon).

### Materials i solucions

- Solució fixadora: 4% Paraformaldehyd.
- 1x PBS (veure apartat 3.2.3.).
- Solució de bloqueig: 0.1% BSA en 1x PBS (50 ml).
  - 50 mg BSA.
  - 50 ml 1x PBS.
- Anticòs anti-Casp3a (Cell Signaling Technology).
- Anticòs anti-rabbit-Cy3 (Jackson ImmunoResearch).
- 2 ng/µl DAPI (Sigma).
- Mowiol (Calbiochem).

#### 3.4.2.7. Anàlisi dels canvis de potencial de membrana mitocondrial.

L'activitat de la cadena respiratòria mitocondrial provoca l'acumulació de protons en el espai intermembrana de la mitocòndria. Aquest potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mi}$ ) es dissipa mitjançant el complex V de la cadena respiratòria acoblant-lo a la síntesi d'ATP. Durant l'apoptosi, les mitocòndries pateixen certs canvis com ara la reducció del potencial de membrana, el desacoblament de la cadena de transport d'electrons per la síntesi d'ATP i el increment en la generació de espècies

reactives d'oxigen. Per la detecció de canvis del  $\Delta\Psi_{mi}$  ha estat de gran utilitat el desenvolupament de sondes fluorescents que s'acumulen específicament en la mitocondria. Les tincions amb cianines catióniques han demostrat ser molt efectives per estudiar els canvis del  $\Delta\Psi_{mi}$  mitjançant citometria (Cossarizza & Salvioli, 2001). Varem utilitzar el *kit* MitoProbe DiIC<sub>1</sub>(5) Assay (Molecular Probes) el qual incorpora la sonda DiIC<sub>1</sub>(5) (iodur de 1,1',3,3,3',3'-hexametilindocarbocianina) i el desacoblador de membrana mitocondrial CCCP (carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona) per validar la mesura. La sonda DiIC<sub>1</sub>(5) s'uneix preferentment a la membrana mitocondrial, però pot unir-se també a la citoplasmàtica, així que el senyal que detectem ha de ser corregit. Si paral·lelament es tracten les cèl·lules amb la sonda DiIC<sub>1</sub>(5) i el desacoblador CCCP, el senyal que detectem només correspon a la membrana citoplasmàtica (ja que la mitocondria està desacoblada i el DiIC<sub>1</sub>(5) no pot entrar). El quocient entre els dos senyals ens permet saber l'estat del  $\Delta\Psi_{mi}$ . Un cop feta la lectura varem afegir iodur de propidi a les mostres per discriminar entre cèl·lules viables i no viables.

### Procediment

1. Obtenir les cèl·lules a diferents temps de tractament i els seus controls (veure apartat 3.3.2.).
2. Tripsinitzar les cèl·lules (veure apartat 3.2.3.).
3. Rentar amb 1x PBS.
4. Centrifugar, separar en dos tubs cada mostra i resuspendre en 1 ml 1x PBS.
5. Afegir 1  $\mu$ l de CCCP a un dels dos tubs per cada mostra.
6. Incubar 5 minuts a 37°C.
7. Afegir 5  $\mu$ l de DiIC<sub>1</sub>(5) a tots els tubs.
8. Incubar 30 minuts a 37°C amb 5% CO<sub>2</sub>.
9. Centrifugar i resuspendre amb 500  $\mu$ l 1x PBS.
10. Analitzar immediatament les mostres en un citometre de flux Coulter Epics Elite XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona). Utilitzar una longitud d'onda de 633 nm i un filtre d'emissió de vermell llunyà i un filtre de més de 600 nm per a la detecció de iodur de propidi.
11. Un cop analitzades totes les mostres afegir 2  $\mu$ l de iodur de propidi i tornar a analitzar.

**Materials i solucions**

- Tripsina-EDTA (veure apartat 3.2.3.).
- 1x PBS (veure apartat 3.2.3.).
- Components del *kit* MitoProbe DiIC<sub>1</sub>(5) Assay (Molecular Probes):
  - 50 mM CCCP.
  - 10µM DiIC<sub>1</sub>(5).
- 5 mg/ml de iodur de propidi (Sigma).

**3.4.2.8. Assaig clonogènic.**

Amb la finalitat d'estudiar el destí final de les cèl·lules HCT116 p53<sup>+/+</sup> tractades amb MSK, es va realitzar un assaig clonogènic per detectar la capacitat proliferativa de cèl·lules aïllades. Com es veurà més endavant, és del nostre interès poder estudiar la capacitat proliferativa de les cèl·lules poliploides generades pel tractament amb MSK. D'aquesta manera, primer detectarem les cèl·lules poliploides mitjançant un colorant vital que tenyeix el DNA, les separarem i les observarem de forma individual al llarg de 14 dies.

**Procediment**

1. Obtenir les mostres al temps indicat. En aquest cas serà després de 72 h de tractament amb MSK i 72 h de creixement en medi lliure de fàrmac.
2. Tripsinitzar les cèl·lules (veure apartat 3.2.3.).
3. Rentar amb 1x PBS.
4. Resuspendre en 5 ml de medi de cultiu suplementat.
5. Afegir 10 µM de Hoechst 33342.
6. Incubar durant 30 min a 37°C i una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>.
7. Detectar les cèl·lules >4N utilitzant un citometre de flux MoFlo (DakoCytomation) i separar-les mitjançant una punta de 200 µm a 5 psi en una microplaca de 96 pous amb 100 µl de medi de cultiu de tal manera que només hi hagi una cèl·lula >4N en cada pou. S'utilitzen alguns pous com a control on aïllem cèl·lules tan en fase G1 com en fase G2.

8. Cada 2-3 dies es fa un comptatge de la presència/absència de colònies alhora que es realitzen fotografies amb un microscopi òptic fins 14 dies després de l'aïllament.

### **Materials i solucions**

- Tripsina-EDTA (veure apartat 3.2.3.).
- 1x PBS (veure apartat 3.2.3.).
- Hoechst 33342 (Sigma).

## **3.5 ANÀLISIS DE L'EFECTE DE LA MITRAMICINA SK SOBRE L'EXPRESSION GÈNICA EN CÈL·LULES HCT116.**

### **3.5.1 Preparació de les cèl·lules i extracció d'RNA a partir del cultiu cel·lular.**

#### **Procediment:**

1. Sembrar  $2.5 \times 10^4$  cèl·lules/ml de medi de cultiu. A les 24 h tractar les cèl·lules.
2. Incubar durant els temps indicats. Aspirar el medi de cultiu de tots els flascons i rentar amb 1x PBS.
3. Afegir tripsina-EDTA (veure apartat 3.2.3), i inactivar amb 10 volums de medi de cultiu.
4. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
5. Eliminar el sobrenedant.

Per l'aïllament i purificació de l'RNA total es va utilitzar els components del producte comercial "UltraspecRNA isolation system" (Biotecx)

#### **Procediment**

1. Afegir 1 ml del reactiu UltraspecRNA per precipitat. L'experiment ha de realitzar-se en gel i en campana de flux laminar.
2. Pipetejar i passar a tubs nous.
3. Homogeneïtzar les mostres amb una xeringa i agulla de 20 G.



4. Mantenir el homogenat durant 5 min a 4°C per permetre la dissociació completa dels complexos nucleoproteics.
5. Afegir 0.2 ml de cloroform per cada 1 ml de UltraspecRNA, agitar vigorosament durant 15 segons i deixar en gel a 4 °C durant 5 min.
6. Centrifugar el homogenat a 12000 g a 4°C durant 15 min.  
Es formen dues fases: la fase inferior orgànica i la superior aquosa. El DNA i les proteïnes estan en la fase orgànica i en la interfase, mentre que l'RNA està en la fase aquosa. Aquesta fase aquosa ha de ser aproximadament del 40-50 % del volum total del homogenat més el cloroform.
7. Transferir la fase aquosa a un nou tub, afegir un volum igual d'isopropanol, i mantenir durant 10 min a 4°C.
8. Centrifugar les mostres a 12000 g a 4°C durant 10 min.
9. L'RNA precipita en el fons del tub. Eliminar el sobrenedant.
10. Rentar amb 1 ml de 75% etanol, agitar amb vòrtex i centrifugar a 12000 g durant 5 min i eliminar el sobrenedant.
11. Repetir el punt anterior.
12. Eliminar l'etanol el màxim possible sense assecar completament el sediment ja que disminueix la seva solubilitat.
13. Resuspendre el sediment en 50 µl H<sub>2</sub>O DEPC.

### Materials i solucions

- UltraspecRNA isolation system (Biotecx).
- Cloroform (24 volums de cloroform: 1 volum alcohol isoamílic).
- Isopropanol.
- 75% etanol.
- H<sub>2</sub>O DEPC:
  - 1 ml de DEPC (dietil pirocarbonat) en 1000 ml de H<sub>2</sub>O miliQ.
  - Barrejar-ho a la campana, agitant durant 4 h i autoclavar-ho.

### Observacions:

No rentar les cèl·lules amb PBS abans d'afegir el UltraspecRNA ja que augmenta la possibilitat de degradació de l'RNA.

Assegurar-se en tot moment que es treballa amb un material lliure d'RNAses. Els tubs i les puntes han de ser estèrils.

### 3.5.2. Determinació de la puresa i quantificació de la concentració d'RNA.

La determinació de la puresa i la quantificació del contingut en RNA de les mostres se va analitzar a partir de la lectura espectrofotomètrica a 260 nm. Considerant que 1 unitat d'absorció a 260 nm equival a 40 µg de RNA, podem calcular la concentració de l'RNA en mg/ml amb la següent expressió:

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

sent, "l" el pas de llum de la cubeta en centímetres (normalment 1 cm), "D" el factor de dilució, i  $A_{260}$  l'absorbància a 260 nm.

L'RNA pur té una relació  $A_{260}/A_{280}$  de 2. Es considera un bon grau de puresa el rang comprès entre 1.7 i 2 (Sambrook et al., 1989).

#### Procediment

1. Diluir 2 µl de les solucions d'RNA en 198 µl de H<sub>2</sub>O miliQ (1:200, v/v).
2. Llegir en l'espectrofotòmetre, a 260 i 280 nm, utilitzant una cubeta de quars de 200 µl.

#### Observacions

En certes ocasions, les mostres d'RNA total es van mesurar directament amb l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (Nucliber), utilitzant 1-2 µl de mostra.

### 3.5.3. Tractament amb DNasa I.

El tractament amb DNasa I es realitza si al quantificar l'RNA no obtenim un bon grau de puresa.

#### Procediment

1. Portar les mostres a un volum final de 100 µl amb H<sub>2</sub>O DEPC.
2. Per cada mostra, afegir:
  - 20 µl Tampó DNasa I 10X.

- 10 µl DNasa I 1 U/µl.
  - 70 µl H<sub>2</sub>O DEPC.
3. Incubar 30 min a 37°C.
  4. Afegir 100 µl de 10x *Termination Mix* per tub.
  5. Afegir 1 volum de fenol àcid i agitar amb vòrtex.
  6. Centrifugar durant 5 min a 12000 g.
  7. Passar la fase superior a tubs nous.
  8. Afegir 1 volum de cloroform i agitar amb vòrtex.
  9. Centrifugar durant 5 min a 12000 g.
  10. Passar la fase superior a tubs nous.
  11. Afegir 1 volum d'isopropanol.
  12. Incubar 10 min a 4°C.
  13. Centrifugar durant 15 min a 12000 g i eliminar el sobrenedant.
  14. Rentar amb 1 ml de 75% etanol, agitar amb vòrtex i centrifugar a 12000 g durant 5 min i eliminar el sobrenedant.
  15. Repetir el punt anterior.
  16. Eliminar l'etanol el màxim possible sense secar completament el sediment ja que disminueix la seva solubilitat.
  17. Resuspendre el sediment en el volum d'H<sub>2</sub>O DEPC necessari per a que cada mostra tingui una concentració de 2.5 µg d'RNA/µl considerant que es perd aproximadament un 50% de mostra amb el tractament de DNasa I.

### Materials i solucions

#### - H<sub>2</sub>O DEPC:

- 1 ml de DEPC (dietil pirocarbonat) en 1000 ml de H<sub>2</sub>O miliQ.
- Barrejar-ho a la campana, agitant durant 4 h i autoclavar-ho.

#### - Tampó 10x DNasa I:

- 10 mM Tris-HCl.
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>.
- 50 mM NaCl.
- 1 mM DTT.

#### - 1 U/µl DNasa I:

- 10 µl de 10 U/µl DNasa I- lliure d'RNAasas (Roche).

- 90 µl de Tampó 1x DNasa I.
- 10x *Termination Mix*:
- 0.1 M EDTA.
  - 1 mg/ml Acrilamida.
- Fenol àcid: Fenol pur saturat amb tampó citrat a pH 4.5 (Sigma).

#### **3.5.4. Anàlisi de transcrits per RT-PCR semiquantitativa.**

Varem utilitzar el *kit* “OneStep 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 o l’amplificació per PCR es va realitzar en una única reacció, utilitzant encebadors específics per a cada 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 3.6.6.

##### **3.5.4.1. Preparació de les mostres d’RNA.**

#### **Procediment**

1. Preparar una dilució 1:25 de cada mostra per obtenir 100 ng d’RNA.
2. Barrejar 2 µl de la dilució amb 23 µl de Master Mix en tubs per PCR.


#### **Materials i solucions**

- Master Mix:
- Tampó 1x Qiagen OneStep RT-PCR.
  - Barreja de 400 µM dNTPs.
  - 600 nM encebadors.
  - Barreja d’enzimes Qiagen OneStep RT-PCR.
  - H<sub>2</sub>O lliure d’RNAases.

### 3.5.4.2. Amplificació dels transcrits mitjançant RT-PCR.

#### Procediment

El programa bàsic utilitzat en un MiniCycler<sup>TM</sup> (MJ Research) amb un adaptador *Hot Bonnet* va ser el següent:

- 30 min a 50°C (Transcripció reversa)
  - 15 min a 95°C (Inactivar la retrotranscriptasa i activar la DNA polimerasa)
  - 1 min a 94°C (Desnaturalitzar)
  - 1 min a T<sub>M</sub> òptima<sup>(a)</sup> (Reassociació de les cadenes)
  - 1 min a 72°C (Extensió per la polimerasa)
  - 10 min a 72°C (Extensió final)
- 25-30 cicles
- 

Guardar les mostres a 4°C fins la seva utilització.

<sup>(a)</sup> Per a determinar la T<sub>M</sub> òptima per cada parell d'encebadors es va utilitzar el programa *Oligo Primer Analysis Software* (Molecular Biology Insights).

### 3.5.4.3. Electroforesi en gel d'agarosa.

Els productes de l'amplificació es varen comprovar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. Els encebadors utilitzats en la RT-PCR es mostren en la Taula M.2.. Per poder visualitzar correctament les bandes utilitzarem un gel d'agarosa al 2%. Una vegada hagi corregut el gel, el tenyirem amb bromur d'etidi, així la tinció serà més uniforme perquè el bromur d'etidi té carga positiva i es desplaça en direcció contrària al cDNA i les bandes petites no podrien tenyir-se adequadament.

#### Procediment

1. Pesar 1 g d'agarosa i diluir en 50 ml de 1x TBE.
2. Dissoldre l'agarosa en un microones, sense deixar-la bullir.
3. Deixar refredar.
4. Segellar amb cinta aïllant els extrems de la cubeta on es farà el gel. Deixar-la preparada amb la pinta situada en el lloc adequat per tenir un ampli marge de separació de les bandes.
5. Abocar la solució agarosa/TBE a la cubeta.

6. Deixar solidificar el gel, treure amb cura la pinta i la cinta.
7. Col·locar la cubeta amb el gel en el aparell d'electroforesi i cobrir amb tampó 1x TBE.
8. Realitzar dilucions 1:1, 1:5 i 1:10 de les mostres, carregar 5 µl de cada dilució amb 2 µl de Solució Orange G. Reservar un pou per carregar 4 µl de marcador de pes molecular.
9. Connectar la font d'electroforesi. Els pous han d'estar en el càtode (elèctrode negre), ja que els àcids nucleics migren en direcció a l'ànode (elèctrode vermell).
10. Córrer l'electroforesi a 1 V/cm.
11. Posar el gel en una cubeta amb bromur d'etidi (0.5 µg/ml). Deixar tenyir durant 15 min.
12. Destenyir amb aigua destil·lada durant 15 min.
13. Observar sota un transil·luminador de llum UV, fotografiar el gel i guardar la imatge en suport informàtic.
14. Mitjançant el programa *GeneTools Analysis Software* (SynGene) quantificar la intensitat del senyal fotogràfic.

### Materials i solucions

- TBE (pH 8.3): Tampó d'electroforesi.

Fer una solució concentrada (10x TBE)

- Es barreja:
  - 108 g Tris base.
  - 55 g Àcid bòric.
  - 9.3 g EDTA.

Es porta a 1 litre amb aigua destil·lada.

- Una vegada dissolt, es guarda a temperatura ambient.

- Solució Orange G (20 ml).

- 10 ml de 100% de Glicerol.
- 800 ml de 0.5 M EDTA.
- 0.02% de Orange G (Sigma).
- Es porta a 20 ml amb H<sub>2</sub>O i es guarda a -20°C.

- Marcador de pes molecular (DNA Ladder Mix, Fermentas).

- 10 mg/ml bromur d'etidi.

- Afegir 1 g de bromur d'etidi en 100 ml de H<sub>2</sub>O miliQ.
- Guardar a 4°C resguardat de la llum.

### 3.5.5. Anàlisi dels transcrits per PCR quantitativa en Temps Real (*Real-Time PCR*).

La tècnica de PCR quantitativa en Temps Real o *Real-Time PCR* permet quantificar l'expressió d'un gen d'interès, relativa a un gen control. El cDNA prèviament sintetitzat amb oligodT de l'RNA 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 de la fluorescència emesa per aquest compost al llarg del temps. La fluorescència detectada descriu una corba sigmoïdal. En els cicles inicials de la *Real-Time PCR* 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, la fluorescència és proporcional a la quantitat de DNA amplificat i aquest, al seu torn, és proporcional al número de còpies de cDNA inicial de 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 del monitoratge de la fluorescència:

$$N = N_0 (1 + E)^{Ct}$$

On, N = Número de còpies.

N<sub>0</sub> = Número de còpies inicials.

E = Eficiència de la reacció.

Ct = *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 utilitzat és el  $\Delta\Delta Ct$ , es normalitza respecte el gen i la condició control. D'aquesta manera per a cada mostra experimental, 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  $\Delta Ct$ . A partir d'aquest valor es torna a normalitzar, prenent com a referència la mostra de la condició control obtenint  $\Delta\Delta Ct$ . La funció resultant de l'expressió gènica o *Fold Change* es calcula com  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Prenent com a 1 el valor de la condició control es normalitzen les mostres experiment.

### 3.5.5.1. Reacció de transcripció reversa.

Varem utilitzar els components del *kit* Omniscript RT (Qiagen).

#### Procediment

1. Partint de 2  $\mu$ g d'RNA total quantificat i avaluat qualitativament (veure apartat 3.5.2.) s'usen de motlle per a la síntesi del cDNA.
2. Afegir el volum de 10x Buffer, dNTP Mix, OligodT i enzim Omniscript Reverse Transcriptasa segons les indicacions recomanades pel proveïdor.
3. Incubar durant 1h a 37°C.
4. Inactivar la reacció incubant durant 5 min a 95°C.

### 3.5.5.2. Amplificació de l'amplicó.

#### Procediment

1. Es prepara una *Master Mix* que conté tots els components necessaris per la reacció, excepte el cDNA (2  $\mu$ l) que es disposa directament a la placa de 96 pous (20  $\mu$ l per pou).
2. El monitoratge de la fluorescència es realitza mitjançant el *hardware* i el *software* proporcionat per Abi-Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) del Servei de Genòmica IBMB-CSIC.
3. La reacció de PCR s'inicia amb 10 min 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 (Desnaturalització del DNA).
  - 1 min a 60 °C (Hibridació dels encebadors i extensió).
4. Realitzar la corba de dissociació de l'amplicó. Aquest pas és important per verificar la qualitat de l'amplificació.



## Materials i solucions

- *Master Mix*:

- ½ Volum final de *SYBRGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems).
- 600 µM de cada encebador.

## Observacions

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, un indicador de l'existència de dimerització dels encebadors 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.

La *Real-Time PCR* presenta avantatges enfront la PCR clàssica, com ara, 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 Bromur d'etidi. A més, mentre que la PCR clàssica permet detectar diferències de 10 vegades en el número de molècules entre les mostres, la *Real-Time PCR* 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 a la tinció amb Bromur d'etidi.

### 3.5.6. Encebadors per les PCRs.

El disseny dels encebadors per la RT-PCR semiquantitativa es va realitzar amb el programa *Oligo Primer Analysis Software* (Molecular Biology Insights). Els encebadors per a la *Real-Time PCR* es van dissenyar amb el programa *PrimerExpress* (Applied Biosystems). Ambdós casos a partir de les seqüències accessibles en la direcció <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>.

Un factor important és l'elecció del gen control o *housekeeping*. Tant per als experiments de RT-PCR semiquantitativa com per a la *Real-Time PCR* s'ha emprat com a control el gen de l'enzim de la gliceroaldehid-3-fosfat-deshidrogenasa (GAPDH).

### 3.5.6.1. Encebadors utilitzats.

**Taula M2.** Encebadors utilitzats en RT-PCR semiquantitativa.

GEN	Seqüència dels encebadors	Longitud del cDNA
<i>c-myc</i>	for: 5'-AAA AAG CCA CAG CAT ACA TCC-3' rev: 5'-TCT CAA GAC TCA GCC AAG GTT-3'	244
<i>cycA</i>	for: 5'-CCT GCA TTT GGC TGT GAA C-3' rev: 5'-TGG TGC TTT GAG GTA GGT CTG-3'	514
<i>GAPDH</i>	for: 5'-TCA GCC GCA TCT TCT TTT G-3' rev: 5'-TGA TGG CAT GGA CTG TGG T-3'	600
<i>p21<sup>WAF1</sup></i>	for: 5'-CAG GGG ACA GCA GAG GAA GAC-3' rev: 5'-CCG GCG TTT GGA GTG GTA G-3'	144
<i>p53</i>	for: 5'-TCA GCA TCT TAT CCG AGT GG-3' rev: 5'-CCT GGG CAT CCT TGA GTT C-3'	491

**Taula M3.** Encebadors utilitzats en *Real-Time PCR*.

GEN	Seqüència dels encebadors
<i>c-myc</i>	for: 5'- AGG GAT CGC GCT GAG TAT AAA A -3' rev: 5'- GCG AGT TAG ATA AAG CCC CGA -3'
<i>Chk1</i>	for: 5'- GCC TGA ACC AGA TGC TCA GAG -3' rev: 5'- ACC ACC CCT GCC ATG AGT T -3'
<i>cycA2</i>	for: 5'- TCA CCG TTC CTC CTT GGA AA -3' rev: 5'- TGA ATG GTG AAC GCA GGC T -3'
<i>cycB1</i>	for: 5'- CAG GAT AAT TGT GTG CCC AAG A -3' rev: 5'- TGG CAG TGA CAC CAA CCA GT -3'
<i>GAPDH</i>	for: 5'- CTC TGC CCC CTC TGC TGA T -3' rev: 5'- CTT CTC ATG GTT CAC ACC CAT G -3'
<i>p21<sup>WAF1</sup></i>	for: 5'- TGT GAT GCG CTA ATG GCG -3' rev: 5'- CGA AGT TCC ATC GCT CAC G -3'
<i>p53</i>	for: 5'- CCC TTC CCA GAA AAC CTA CCA -3' rev: 5'- AAG AAG CCC AGA CGG AAA CC -3'

### 3.6. ANÀLISI DE L'EFECTE DE LA MITRAMICINA SK SOBRE ELS NIVELLS DE PROTEÏNES MITJANÇANT WESTERN-BLOT.

#### 3.6.1. Preparació de les cèl·lules i extracció de proteïna a partir del cultiu cel·lular.

##### Procediment

1. Sembrar  $2.5 \times 10^4$  cèl·lules/ml de medi de cultiu. A les 24 h tractar les cèl·lules amb MSK.
2. Incubar durant els temps indicats. Aspirar el medi de cultiu de tots els flascons i rentar amb 1x PBS.
3. Afegir tripsina-EDTA (veure apartat 3.2.3) i inactivar amb 10 volums de medi de cultiu.
4. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
5. Rentar amb 5 ml 1x PBS.
6. Centrifugar a 800 g durant 5 min.
7. Repetir els punts 5 i 6 dos vegades més.
8. Resuspendre el sediment en 500  $\mu$ l de Tampó de Lisi.
9. Incubar en gel durant 30 min.
10. Aliquotar en eppendorf de la següent manera:
  - 40  $\mu$ l de mostra per realitzar la quantificació de proteïna total.
  - 400  $\mu$ l de mostra separats en 4 tubs per realitzar els anàlisis.
11. Congelar amb neu carbònica. Guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins la seva utilització.

##### Materials i solucions

- 1x PBS (veure apartat 3.2.3.)

- Tampó de Lisi: Per a un volum final de 5 ml.

- 250  $\mu$ l de 1 M Tris base (pH 8).
- 187.5  $\mu$ l de 4 M NaCl.
- 50  $\mu$ l de 0.5 M EDTA.
- 25  $\mu$ l de 0.5% Nonidet NP-40.
- 5  $\mu$ l de 100 mM PMSF (*Phenylmethylsulphonyl Fluoride*).
- 1  $\mu$ l de 10  $\mu$ g/ml Aprotinina (Sigma).
- 0.5  $\mu$ l de 10  $\mu$ g/ml Leupeptina (Sigma).

- 4.481 ml de H<sub>2</sub>O miliQ.

### 3.6.2. Determinació de la concentració de proteïna total.

Per determinar la concentració de proteïna total varem utilitzar el mètode de Bradford. Varem utilitzar el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) diluït 1:5 amb H<sub>2</sub>O miliQ. Es tracta de un mètode colorimètric basat en la detecció de color d'una solució acídica de blau brillant de Coomassie, que, quan s'uneix a proteïnes, canvia el seu màxim d'absorbància de 465 nm a 595 nm. Té avantatges respecte a altres mètodes, ja que és més fàcil d'utilitzar, requereix un únic reactiu, és ràpid i té menys interferències. Es fa una recta patró a partir d'una proteïna de concentracions conegudes, típicament albúmina sèrica bovina (BSA). Es representen els valors d'absorbància respecte a la concentració i s'obté una regressió lineal. A partir del valor d'absorbància obtingut amb la mostra que es vulgui analitzar, es pot calcular la concentració per la interpolació en la recta patró.

#### Procediment per obtenir la recta patró.

Diluïm el BSA amb el reactiu Bio-Rad 1:5 per obtenir les concentracions desitjades:

[µg/ml]	0	0.5	1	2	3	5	7	9	10	12	14
<b>BSA 100 µg/ml</b>	0	1.5	3	6	9	15	21	27	30	36	42
<b>Bio-Rad 1:5</b>	300	297.5	297	294	291	285	279	273	270	264	258

#### Preparació de mostres i mesura de la seva absorbància.

1. Diluir per duplicat les mostres 1:300, 2:300 o 5:300 amb el reactiu Bio-Rad 1:5 depenent de com de concentrades estiguin les mostres.
2. Incubar junt amb la recta patró en una placa ELISA durant 15-20 min.
3. Mesurar la absorbància a una longitud d'onda de 595 nm en un lector de plaques. Varem utilitzar un lector "Power Wave X" (Bio-Tek Instruments).

### 3.6.3. Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida.

Es va realitzar electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) per separar les proteïnes segons el seu pes molecular. Els gels estan formats per dues parts: un gel concentrador (stacking) amb un 5% d'acrilamida i un gel separador amb major percentatge d'acrilamida que separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Aquest sistema permet la separació de volums relativament grans de mostra sense pèrdua de resolució. El gel concentrador alinea les proteïnes de les mostres abans de la separació. El percentatge d'acrilamida del gel separador depèn de la mida de la proteïna que es detectarà, en nostre cas utilitzarem un gel separador de 12% d'acrilamida i el sistema d'electroforesi Miniprotean (Bio-Rad).

#### Procediment

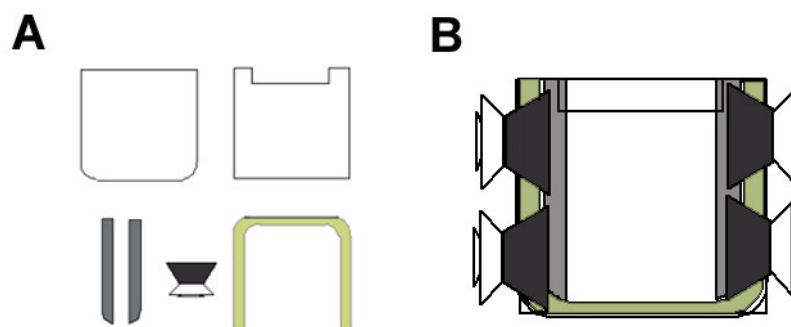
1. Muntar el sistema de vidres, separadors, pinces i gomes Miniprotean (Bio-Rad) segons la Figura M3.
2. Preparar el gel separador al percentatge d'acrilamida necessari per separar les proteïnes que ens interessin.

<b>Components de la solució</b>	<b>12%</b>
H <sub>2</sub> O	4.3 ml
40% acrilamida/bisacrilamida (29:1)	3 ml
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10 % persulfat amònic	0.1 ml
TEMED	0.004 ml
<b>Volum total</b>	<b>10 ml</b>

3. Afegir isopropanol per facilitar la polimerització de l'acrilamida.
4. Esperar fins que polimeritzi, eliminar el isopropanol i rentar amb H<sub>2</sub>O.
5. Preparar el gel concentrador.

Components de la solució	5%
H <sub>2</sub> O	7.25 ml
40% acrilamida/bisacrilamida (29:1)	1.25 ml
1 M Tris pH 6.8	1.25 ml
10% SDS	0.1 ml
10 % persulfat amònic	0.1 ml
TEMED	0.01 ml
<b>Volum total</b>	<b>10 ml</b>

6. Col·locar al moment la pinta per formar els pous.
7. Deixar polimeritzar i muntar en una cubeta de electroforesi vertical amb tampó 1x Laemmli.
8. Desnaturalitzar les mostres:
  - Centrifugar les mostres a velocitat màxima durant 5-10 min.
  - Agafar del sobrenedant el volum necessari per obtenir la concentració adequada de proteïna.
  - Afegir el volum de Tampó de càrrega 5x necessari per a que quedi 1x.
  - Incubar a 100°C durant 5 min.
  - Carregar les mostres en els pous junt amb un marcador de pes molecular.
9. Separar les mostres aplicant una intensitat continua de 20 mA.



**Figura M3.** **A.** Components del sistema de electroforesi Miniprotean (Bio-Rad) format per: dos vidres, dos separadors, quatre pinces i una goma. **B** Muntatge del sistema de electroforesi.

### Materials i solucions

- Sistema de electroforesi Miniprotean (Bio-Rad).

- Tampó 10x Laemmli:
  - Es dissolen:
    - 10 g SDS.
    - 144.2 g Glicina.
    - 30 g Tris Base.
  - Es porta a 1000 ml amb H<sub>2</sub>O miliQ. Una vegada dissolt es guarda a temperatura ambient.
- Tampó de càrrega 5x:
  - 500 µl de 5x *Protein Loading Buffer* (PLB).
  - 50 µl de β-mercaptoetanol.
- 5x *Protein Loading Buffer* (100 ml).
  - 12.5 ml de 1 M Tris pH 6.8.
  - 25 ml de 87% de Glicerol.
  - 50 ml de 10% de SDS.
  - 12.5 ml H<sub>2</sub>O.
  - 0.02% de Blau de bromofenol (Fluka).
  - Guardar a temperatura ambient.

### 3.6.4. Transferència de les proteïnes.

#### Procediment

1. Muntar la transferència segons Figura M4, tenint en compte que les proteïnes es desplaçaran cap el pol positiu, segons l'ordre següent:
  - Col·locar un o dos *scotch pads* mullats en tampó de transferència.
  - Col·locar dos papers Whatman mullats en tampó de transferència.
  - Col·locar la membrana Optitran BA-S85 mullada en tampó de transferència.
  - Col·locar el gel de proteïnes humitejat amb tampó de transferència.
  - Col·locar dos papers Whatman mullats en tampó de transferència.
  - Col·locar un o dos *scotch pads* mullats en tampó de transferència.



**Figura M4.** Muntatge de la transferència en un experiment de Western-blot.

2. Col·locar el muntatge en una cubeta de transferència i afegir tampó de transferència.
3. Transferir a 80 V durant 3 h a 4°C.
4. Desmuntar la transferència.
5. Tenyir el gel amb Blau de Coomassie i destenyir-lo amb 10% àcid acètic per comprovar que les proteïnes s'han transferit correctament.

### Materials i solucions

- Tampó de transferència: per un volum final de 5000 ml.
  - 15 g de Tris base.
  - 15 g de Glicina.
  - 25 ml de 10% SDS.
  - 1000 ml de Metanol.
  - Es porta a 5000 ml amb H<sub>2</sub>O miliQ.
- Membrana Optitran BA-S 85.
- Blau de Coomassie:
  - 10% d'àcid acètic.
  - 40% d'etanol.
  - 0.05% de Coomassie brilliant blue (Sigma).

### Observacions

Una vegada realitzada la transferència, la membrana es pot analitzar immediatament o bé conservar-la en fred (2 a 8°C) durant mesos.



### 3.6.5. Immunodetecció.

La immunodetecció permet detectar la proteïna desitjada en la membrana d'Optitran BA-S 85 mitjançant la capacitat de reconeixement dels anticossos. En aquest mètode s'usa un anticòs primari per localitzar la proteïna d'interès. S'usa un segon anticòs contra l'espècie en la que s'ha produït el primer marcat amb un enzim per localitzar la formació de complexos antígen-anticòs.

#### Procediment

1. Incubar la membrana amb Solució de bloqueig en agitació a temperatura ambient durant 1 h.
2. Descartar la Solució de bloqueig i incubar amb l'anticòs primari a temperatura ambient en agitació durant 2-3 h.
3. Realitzar tres rentats de 10 min cadascun.
4. Incubar amb l'anticòs secundari en agitació a temperatura ambient durant 1 h.
5. Realitzar tres rentats de 10 min cadascun.
6. Descartar l'últim rentat i incubar la membrana amb la Solució Luminol/Enhancer durant 1 min.
7. Exposar a films fotogràfics durant diferents temps i revelar-los.

#### Materials y soluciones

- Solució de bloqueig: Llet en pols desnatada Sveltesse (Nestlé) al 5% en PBS.
- PBS-Tween: per 1000 ml.
  - 900 ml de H<sub>2</sub>O miliQ.
  - 100 ml de 10x PBS.
  - 1 ml de Tween 20 (Sigma).
- Solucions d'anticossos primaris: preparades en solució de bloqueig diluïda 1/5 en 1x PBS, utilitzant les concentracions d'anticòs recomanades pel proveïdor:

**Taula M4.** Anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi.

Anticòs primari	Pes molecular (kDa)	Procedència	Dilució	Casa comercial
<b>c-myc</b>	64	Ratolí	1/100	Santa Cruz
<b>p53</b>	53	Ratolí	1/100-1/200	Santa Cruz
<b>p21<sup>WAF1</sup></b>	21	Ratolí	1/100	Calbiochem
<b><math>\alpha</math>-Actina</b>	43	Conill	1/1000	Sigma
<b>Ciclina B1</b>	60	Ratolí	1/500	Santa Cruz
<b>Caspasa 3</b>	17/19	Conill	1/1000	Cell Signaling Technology

- Solucions d'anticossos secundaris: preparades en solució de bloqueig diluïda 1/5 en 1x PBS, utilitzant les concentracions d'anticòs recomanades pel proveïdor:

- Anticòs policlonal anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) utilitzant una dilució 1/5000.
- Anticòs policlonal anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) utilitzant una dilució 1/10000.

Aquests anticossos incorporen una peroxidasa conjugada que reacciona amb la solució Luminol/Enhancer i emet llum.

- 1.25 mM Luminol:

- Preparar 200 ml de 0.1 M Tris-HCl pH 8.6-8.7 amb 2.42 g de Tris Base ajustant el pH amb HCl.
- Afegir 50 mg de Luminol sòdic (Sigma) i 62  $\mu$ l de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka).
- Guardar a 4°C a la foscor.

- Solució Enhancer:

- 11 mg de àcid *p*-cumàric (Sigma) dissolt en 10 ml de DMSO.

- Solució Luminol/Enhancer:

- Per cada ml de Luminol afegim 10  $\mu$ l de Solució Enhancer.

- Membrana Optitran BA-S 85 (Scheleicher & Schuell).

- Film fotogràfic Agfa Curix RP2 Plus.

**3.6.6. Quantificació dels *Western-blots*.**

Un cop detectat el senyal en un film, aquest és pot quantificar per poder determinar quins són els nivells d'expressió de les proteïnes d'interès. Varem utilitzar un densitòmetre BioRad GS-800 i el programa Quantity One 4.6.3 per realitzar la quantificació. El senyal detectat per les proteïnes d'interès va ser normalitzat respecte al senyal de la proteïna de control de càrrega  $\alpha$ -Actina.