

III. MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS.

El cultiu cel·lular consisteix en el manteniment de cèl·lules eucariotes *ex vivo*, en un entorn artificial *in vitro* sobre el qual és possible exercir un control variable amb la finalitat de preservar al màxim les propietats fisiològiques, bioquímiques i genètiques originals. Aquest tipus d'estudi és útil no només en el camp de la investigació bàsica, també té aplicacions dins de l'àmbit del diagnòstic, en estudis farmacològics i de toxicitat o en teràpia gènica.

Els cultius de cèl·lules animals s'han classificat segons la seva capacitat d'adherència. És a dir que poden créixer formant una monocapa, com és el cas de la majoria de cèl·lules que provenen d'òrgans, o al contrari poden créixer en suspensió, com les cèl·lules del sistema immunitari. D'altra banda, es parla de cultiu primari quan són cultius cel·lulars provinents de cèl·lules disgregades a partir d'un teixit original d'un animal recentment sacrificat o bé de línia cel·lular quan el cultiu ha estat sotmès a processos de transformació que li permeten la capacitat de multiplicació il·limitada.

1.1 INSTRUMENTACIÓ NECESSÀRIA.

La manipulació de cultius cel·lulars implica l'adopció de tota una sèrie de mesures per poder garantir al màxim les condicions d'esterilitat necessàries. Tant el material que entra en contacte amb les cèl·lules com la superfície de treball han de ser estèrils, per això és necessari treballar sota una campana de flux laminar prèviament esterilitzada amb radiacions ultraviolades i tots els medis de cultiu, solucions i materials han de ser estèrils de tal manera que es pogui mantenir la viabilitat i esterilitat del cultiu.

- Campana de flux laminar vertical amb sistema de llum ultraviolada, sistema d'aspiració de líquids mitjançant el buit i bec de Bunsen.
- Incubador de cèl·lules amb atmosfera controlada (5% CO₂, 95% O₂, 95% d'humitat i 37°C de temperatura).
- Microscopi invertit (Olympus CK2).
- Congeladors (-20°C i -80°C).
- Instal·lació de criogènia (dipòsit de congelació gradual de cèl·lules i tanc de nitrogen líquid).
- Bany amb termostat.

- Altre material: pipetes Pasteur de vidre estèrils, plaques multiwell de poliestirè de 6 i 24 pous, plaques de poliestirè de 35 i 100 mm de diàmetre, flascons de poliestirè i filtres de 0.2 μM de mida de porus.

1.2 MANTENIMENT DELS CULTIUS CEL·LULARS.

Una de les avantatges que presenta el treball de cèl·lules en cultiu és que una vegada validat el sistema, les línies cel·lulars mantingudes *in vitro* constitueixen una alternativa viable a la utilització d'animals d'experimentació, i permeten treballar amb cèl·lules d'origen humà. A més, l'entorn *in vitro* facilita la interpretació dels resultats obtinguts, ja que es redueixen el nombre de variables pròpies d'un organisme sencer. Tanmateix, és precisament la naturalesa d'aquest entorn i les manipulacions el que comporta la principal causa d'objeccions, ja que la transferència de cèl·lules fora del seu entorn produeix una sèrie de canvis fenotípics i en general, una tendència a la progressiva desdiferenciació a mesura que augmenta el nombre de duplicacions en cultiu. De la mateixa manera es perd l'estructura tridimensional i manquen tota una sèrie de factors circulants i d'inervació indeterminats, fet que s'intenta pal·liar suplementant el medi de cultiu amb sèrum. Per això, el treball en cultiu necessita un treball previ de validació.

1.2.1 Tripsinització i replaqueig.

El cultiu en línies cel·lulars implica la propagació de cèl·lules immortalitzades i/o transformades en superfícies, principalment de plàstic, en les quals s'adhereixen i formen una monocapa. Quan el cultiu arriba a confluència és necessari realitzar un replaqueig per així assegurar la seva viabilitat. La tripsinització consisteix en la disgregació de les cèl·lules mitjançant un mètode enzimàtic i permet el replaqueig i la conservació de la línia cel·lular.

Medis i Reactius:

- Tripsina Versene (BioWhittaker), formada per 200 mg/l de Versene (EDTA) i 500 mg/l de tripsina (1:250).
- Tampó PBS: 140 mM NaCl, 2.7 mM KH_2PO_4 i 8.1 mM Na_2PO_4 i s'ajusta a un pH de 7.4.

Procediment:

Les cèl·lules es mantenen dins l'incubador a 37°C en flascons de 75 cm². Una vegada les cèl·lules arriben a un 80%-90% de confluència cal tripsinitzar-les i replaquejar-les per tal de mantenir el cultiu cel·lular. Així doncs, s'extreu el medi mitjançant la bomba de buit i es fa un rentat amb 10 ml de PBS atemperat per tal d'evitar que el sèrum del medi interfereixi amb la tripsina. A continuació s'extreu el PBS i s'afegeix 1 ml de la solució de tripsina que es deixa actuar aproximadament 5 min a 37°C (temps que depèn del grau d'adhesió al plàstic de la línia cel·lular de treball) fins que s'observa que la monocapa de cèl·lules s'ha desenganxat completament de la superfície del flascó. Llavors s'afegeixen 10 ml del seu medi de cultiu atemperat, inhibint així qualsevol acció enzimàtica posterior i es procedeix a la disgregació mecànica utilitzant una pipeta de plàstic a fi d'obtenir una suspensió homogènia (0.5-1.10⁶ cel/ml).

		Superfície (mm ²)	Inòcul inicial (X 10 ⁶)	Nº de cèl·lules en confluència* (X 10 ⁶)	Medi de cultiu (ml)
Plaques	35 mm	962	0,3	1,2	2
	60 mm	2827	0,8	3,2	3
	100 mm	7854	2,2	8,8	10
	150 mm	17671	5	20	20
Plaques agrupades	6 pous	962	0,3	1,2	3-5
	12 pous	401	0,1	0,4	1-2
	24 pous	200	0,5	0,2	,5-1
Flascons	T-25	2500	0,7	2,8	3-5
	T-75	7500	2,1	8,4	8-15
	T-160	16000	4,6	18,4	15-30

Taula 4: Dades útils sobre el cultiu cel·lular. El número de cèl·lules en confluència varia segons el tipus cel·lular. En aquesta taula s'ha agafat com a referència les cèl·lules HeLa.

Arribats a aquest punt, si el que es pretén és el manteniment de la línia cel·lular, el que es fa és traspasar 0.5-1 ml d'aquesta suspensió a nous flascons de 75 cm² en els que caldrà afegir 12-15 ml del medi de cultiu fresc. Si en canvi es volen realitzar assajos diversos, a partir de la suspensió es sembren plaques de diferent

mida segons l'assaig que es vulgui realitzar amb el nombre de cèl·lules per ml adient en cada cas (**taula 4**). Normalment per fer assajos de transport es sembren plaques multiwell de 24 pous que s'omplen amb 0.5 ml de medi per pou. Però quan es tracta d'obtenir proteïna, RNA o realitzar assajos quinasa cal un nombre més elevat de cèl·lules i per això es sembren plaques de mida superior com plaques de 60 mm o plaques de 100mm que s'omplen amb 4 ml i 10 ml respectivament.

1.2.2 Congelació- Descongelació.

Degut al fet que després d'un temps en cultiu les cèl·lules perden característiques pròpies, per raons pràctiques i tècniques, és aconsellable mantenir una reserva de cèl·lules congelades en nitrogen líquid.

Materials i reactius:

- medi de congelació.
- DMSO estèril (Sigma D-2650).
- Tanc de congelació gradual de isopropanol.
- Criotubs de 2 ml.

Per realitzar la congelació mantenint la viabilitat de les cèl·lules cal l'ús de crioprotectors, com el glicerol o el DMSO (dimetilsulfòxid). La composició del medi de congelació pot variar lleugerament en les diferents línies cel·lulars, però com a norma general s'utilitza el medi de cultiu de la pròpia línia al qual s'afegeix un 10% de DMSO estèril, tot i que es recomana augmentar la proporció de sèrum. Les línies cel·lulars utilitzades en aquesta tesi han estat congelades directament en sèrum suplementat amb un 10% de DMSO ja que és el mètode que ens ha proporcionat resultats més satisfactoris així com una millor viabilitat cel·lular.

Procediment:

En el procés de congelació és també necessari el pas previ de tripsinització. En aquest cas, és a dir si la finalitat de la tripsinització és la criopreservació de les cèl·lules, el total de la suspensió cel·lular dissolta en 10 ml de medi es traspasa a un tub de plàstic de 15 ml (Corning) i es centrifuga durant 3 min a 1500 rpm. S'elimina el sobrenedant i finalment les cèl·lules es ressuspenen en 1.5 ml del medi de congelació.

Cal tenir en compte que el DMSO, així com d'altres crioprotectors és tòxic per les cèl·lules per això cal ràpidament traspasar-les a un criotub de congelació que es guarda en el dipòsit de congelació gradual de cèl·lules i es deixa dins el congelador de -80°C . Després d'un mínim de 4 hores i un màxim d'un mes es traslladen les cèl·lules al tanc de nitrogen líquid on seguiran emmagatzemades fins ésser necessàries en futures aplicacions.

Per tal d'obtenir de nou cultius cel·lulars, es selecciona el criotub d'interès en el tanc de nitrogen líquid. Aquest es descongela en un bany a 37°C i es transpassa a un tub de plàstic de 15 ml que conté 10 ml de medi de cultiu. Les cèl·lules es precipiten per centrifugació a 1500 rpm durant 3 min i d'aquesta manera es pot eliminar ràpidament el DMSO, finalment es resuspenen en medi fresc i es sembren en un o més flascons de 75 cm^2 en els que s'ha afegit 15 ml del seu medi de cultiu. Alternativament es pot eliminar el pas previ de centrifugació i sembrar les cèl·lules directament en un flascó en el que s'han prèviament afegit 15 ml de medi de cultiu. D'aquesta manera el procés és més ràpid i com que el DMSO queda ràpidament diluït es minimitza la seva toxicitat i no es veu afectada la viabilitat cel·lular. Però en aquest cas és necessari canviar el medi de les cèl·lules per medi de cultiu fresc l'endemà.

1.3 LÍNIES CEL·LULARS UTILITZADES.

Línia cel·lular IEC-6.

La línia cel·lular IEC-6 consisteix en una població homogènia de cèl·lules de cripta d'intestí prim obtinguda a partir d'una biòpsia d'intestí de rata adulta (*Rattus norvegicus*). Té una morfologia epitelial amb un nucli gran i ovalat i creixen en forma de colònies de cèl·lules poligonals fins arribar a formar una monocapa relativament diferenciada. Els estudis ultraestructurals denoten una morfologia clarament epitelial reflectida per la presència de microvilli, unions cèl·lula-cèl·lula, un extens complex de Golgi i la presència de cossos citoplasmàtics densos. Aquesta línia cel·lular es caracteritza per l'expressió d'antígens típics de l'epiteli intestinal i manté moltes de les funcions de l'epiteli absortiu.

• Condicions de cultiu i creixement

El medi usat és medi DMEM-High glucose (BioWhittaker) però cal suplementar-lo prèviament. Suplements:

- 1% de glutamina 2 mM (Bio-Whittaker).
- 1% de piruvat sòdic 5 mM (Bio-Whittaker).
- 1% d'una barreja d'antibiòtics i fungicida (Bio-Whittaker): 100 U/ml de penicil·lina, 0.1 mg/ml d'estreptomicina i 0.25 µg/ml d'amfotericina B.
- 5% de sèrum fetal boví (Gibco).
- 0.1 U/ml d'insulina (Sigma) filtrada amb filtres de 0.2 µm per tal de que sigui estèril.

Presenten un creixement força ràpid sobretot quan es sembren a baixa densitat i els assaigs es duen a terme a confluència. En la fase logarítmica, el seu temps de duplicació és de 20 hores. El creixement cel·lular pot ésser inhibit per cortisol (Quaroni i col. 1979). La línia cel·lular IEC-6 no és una línia immortal. Són cèl·lules no transformades i presenten una vida limitada *in vitro*. Després de 30-40 passatges la taxa de creixement es veu afectada i disminueix clarament la viabilitat cel·lular.

Línia cel·lular Caco-2.

La línia cel·lular Caco-2 que deriva d'un adenocarcinoma de colon humà pot diferenciar-se espontàniament *in vitro* de manera que en dues o tres setmanes es forma una monocapa de cèl·lules altament polaritzades, unides per unions *tight* funcionals i presenten microvil·li ben desenvolupats i organitzats a nivell de la membrana apical. Aquesta diferenciació de les cèl·lules Caco-2 comporta l'expressió polaritzada de *brush border hydrolases* (disacaridases i peptidases) i diverses proteïnes de transport, generalment presents en l'epiteli absortiu intestinal tot i que també presenta tota una sèrie de característiques colòniques. La línia cel·lular Caco-2 es considera un dels millors models d'epiteli absortiu intestinal i s'ha utilitzat àmpliament en estudis de transport i toxicitat de nutrients i xenobiòtics (Ranaldi et al. 2003).

- Condicions de cultiu i creixement

El medi utilitzat és DMEM High Glucose (BioWhittaker) que cal suplementar amb:

- 1% d'aminoàcids no essencials (BioWhittaker).
- 1% de glutamina 200 mM (BioWhittaker).
- 10% de sèrum fetal boví (Gibco).
- 1% d'una barreja de penicil·lina i estreptomicina (BioWhittaker).

En el cas de les cèl·lules Caco-2 és important no tripsinitzar-les més d'una vegada a la setmana ja que estariem seleccionant clons de creixement molt ràpid però que no arribarien a diferenciar-se correctament. Per això, quan es volen mantenir les cèl·lules, s'han de sembrar de tal manera que arribin a confluència als set dies, moment en el qual es replaquejen.

- Condicions de cultiu sobre filtres de policarbonat

La diferenciació morfològica de les cèl·lules Caco-2 no s'aconsegueix completament quan creixen en placa. La polarització, és a dir, la diferenciació de la membrana apical i basolateral només s'aconsegueix quan les cèl·lules creixen sobre filtres permeables. Això implica la formació de *tight junctions* entre les membranes de dues cèl·lules adjacents. Els filtres sobre els quals creixen les cèl·lules es troben dins d'una cambra que separa el medi que està en contacte amb la membrana apical del que està en contacte amb la membrana basolateral. Cada unitat de cambra i filtre es denomina insert o *transwell*.

Materials i reactius:

- plaques de 12 *transwells* (12 mm, 3 mm por; Corning Costar).
- col·lagen tipus I de cua de rata 10 µg/ml en medi de cultiu sense sèrum. Es dilueix a partir d'una solució de 3.7 mg/ml (Upstate Biotechnology).

Procediment:

Abans de sembrar les cèl·lules cal tractar cada filtre de policarbonat amb 200 µl de medi de cultiu (sense sèrum) suplementat amb col·lagen tipus I de cua de rata.

Després de 16-20 hores d'incubació a 37°C s'aspira el col·lagen i es deixen assecar els filtres. Mentrestant, es tripsinitzen les cèl·lules i una vegada ressuspeses en medi de cultiu es du a terme el recompte en el microscopi òptic mitjançant una cambra de Neubauer. Es sembren $4,2 \cdot 10^5$ cèl·lules per filtre ressuspeses en 200µl de medi de cultiu i una hora després de la sembra s'afegeix 1 ml del mateix medi a les cambres apical i basal de l'insert. Es canvia el medi de cultiu regularment cada 48 hores fins el dia en que es realitza l'experiment desitjat (dia 20 o 21 després de la sembra). Per tal d'evitar qualsevol alteració de la monocapa, alhora de canviar el medi és important aspirar primer el medi basal i a continuació l'apical i afegir sempre primer el medi a la cambra apical i finalment a la basal.

La formació de la monocapa polaritzada es monitoritza mitjançant un control de la resistència elèctrica present entre les dues cambres (apical i basal). Per realitzar aquesta mesura hem utilitzat el Millicell-Electrical Resistance System (Millipore Co., Bedford, MA). La mesura regular d'aquest paràmetre demostra que la monocapa cel·lular arriba a una resistència màxima del voltant de 2000 oms/cm² aproximadament als 20 o 21 dies de cultiu, moment en el qual s'han realitzat tots els experiments.

Línia cel·lular MDCK.

La línia MDCK va ser generada per Madin i Darby a partir de ronyó d'un cocker spaniel. Aquestes cèl·lules, sota condicions de cultiu adients, poden formar una monocapa polaritzada i desenvolupar moltes de les propietats típiques d'un epitelí renal. De la mateixa manera que les cèl·lules Caco-2, les cèl·lules MDCK sembrades en plaques tipus *transwell* formen una barrera permeable amb propietats morfològiques i funcionals pròpies d'epitelis naturals com el de túbul proximal de ronyó.

● **Condicions de cultiu i creixement**

El medi utilitzat és DMEM High Glucose (BioWhittaker) que cal suplementar amb:

- 1% de glutamina 200 mM (BioWhittaker).
- 10% de sèrum fetal boví (Gibco).
- 1% de la barreja d'antibiòtics i antimicòtics (BioWhittaker).

Són cèl·lules de creixement ràpid i cal subcultivar-les quan arriben a confluència, moment en el que es dilueixen entre 1:8-1:10. A diferència de les cèl·lules Caco-2, aquestes cèl·lules quan es sembren en plaques de transwell, a la mateixa densitat que les anteriors, arriben a formar una monocapa polaritzada ràpidament (entre 4 i 7 dies). Els valors de resistència màxima són d'entre 300 i 400 oms/ cm².

Línia cel·lular FAO.

La línia cel·lular Fao, derivada de la línia H2-II-E-C3 que prové de l'hepatoma de rata Reuber H35, es caracteritza per un elevat nivell de diferenciació i per la seva retenció de característiques pròpies de l'hepatòcit adult.

• Condicions de cultiu i creixement

El medi de cultiu usat és COON'S F-12 MODIFICATION (Sigma) al qual cal afegir:

- 10% de sèrum fetal boví (BioWhittaker).
- 1% de la barreja d'antibiòtics i antimicòtics (BioWhittaker).
- 1% de L-glutamina (BioWhittaker) 200 mM (en solució de NaCl 0.85%).

Les cèl·lules es cultiven en medi COON'S F-12 MOFICATION, que prové de la modificació del medi Ham's F-12, consistent en duplicar la quantitat d'aminoàcids i piruvat sòdic, a més d'addicionar àcid ascòrbic. Aquest medi, que es caracteritza per un suplement addicional de 0,863 mg/ml de sulfat de zinc, es subministra en pols i cal restaurar-lo en aigua destil·lada segons les indicacions del fabricant. Una vegada solubilitzat, és necessari afegir 2,68 g/l de bicarbonat de sodi i ajustar posteriorment el pH desitjat, 7.2, ja que aquest augmenta durant el procés de filtració necessari per garantir la seva esterilitat. Aquest últim pas es realitza mitjançant una bomba de filtrat Millipore i filtres de 0.22 µm de diàmetre de porus.

Les cèl·lules Fao, petites i romboèdriques, presenten una morfologia intermitja entre la de l'hepatòcit i l'observada en la línia d'hepatoma humà HepG2. Creixen d'una forma regular sobre un suport on arriben a formar una monocapa, el seu temps de duplicació és ràpid, entre 20 i 24 hores. Tant en els estudis de transport en placa, com per l'extracció de RNA o de proteïna és convenient treballar a un 70-75% ja que a més confluència perden viabilitat.

Línia cel·lular CHO-K1.

Les cèl·lules CHO-K1, de tipus fibroblast, són el resultat de l'aïllament d'un subclon de la línia parental CHO, obtinguda a partir d'una biòpsia d'ovari de hàmmster xinès adult (*Cricetulus griseus*) l'any 1957. Són auxòtrofes per a la prolina i el seu creixement pot ésser inhibit per elevades quantitats d'alanina.

• Condicions de cultiu i creixement

El medi emprat és EMEM (Medi Mínim Essencial d'Eagle) sense L-glutamina (BioWhittaker) suplementat amb:

- 1% de L-glutamina (Bio-Whittaker) 200 mM (en 0.85% de solució de NaCl).
- 1% de piruvat sòdic (Bio-Whittaker) 100 mM.
- 1% d'aminoàcids no essencials (NEAA) (BioWhittaker) 10 mM.
- 1% de la barreja d'antibiòtics i antimicòtics (Bio-Whittaker).
- 5% de sèrum fetal boví (Gibco).

Les cèl·lules CHO-K1, de morfologia fusiforme, creixen formant una monocapa fins assolir la confluència, punt a partir del qual perden viabilitat.

Línia cel·lular HeLa.

La línia cel·lular HeLa prové d'un adenocarcinoma de cèrvix humà. Presenten un fenotip epitelial i ténen incorporades seqüències del papilomavirus humà 18 (HPV-18). Aquestes cèl·lules són àmpliament utilitzades per a l'estudi de diferents proteïnes expressades de manera transitòria.

• Condicions de cultiu i creixement

El medi utilitzat és DMEM High Glucose (BioWhittaker) que cal suplementar amb:

- 1% de glutamina 200 mM (BioWhittaker).
- 10% de sèrum fetal boví (Gibco).
- 1% de la barreja d'antibiòtics i antimicòtics (BioWhittaker).

Aquestes cèl·lules proliferen molt ràpid i cal subcultivar-les un mínim de dos cops per setmana. El nombre de passatges afecta a l'eficiència de transfecció transitòria. A partir del passatge 35-40 el percentatge de cèl·lules transfectades disminueix considerablement.

1.4 CULTIUS PRIMARIS.

1.4.1 Avantatges dels cultius primaris.

Els cultius primaris de molts tipus cel·lulars són possibles degut a la pèrdua d'algunes de les propietats diferenciades de les cèl·lules, entre elles la incapacitat de dividir-se, convertint-se en cèl·lules que mantenen tant sols algunes de les propietats que les caracteritzaven. Aquesta pèrdua de propietats pot ser deguda a un procés de desdiferenciació o desadaptació. El primer cas implica una pèrdua irreversible d'una propietat diferencial del tipus cel·lular (per exemple un hepatòcit en cultiu perd alguns enzims característics, no pot emmagatzemar glucogen, ni sintetitzar les proteïnes del sèrum). D'altre banda, el procés de desadaptació implica que la característica especialitzada perduda no és irreversible sinó conseqüència de la pèrdua de la senyal (per exemple externa, hormonal, nerviosa, etc.).

Els cultius primaris presenten característiques especials que els diferencien de les línies cel·lulars i que els converteixen en models d'estudi imprescindibles en alguns casos. Així, conserven la morfologia de les cèl·lules de l'òrgan del que han estat aïllades, tenen un número diploide ($2n$) de cromosomes i el fet d'estar més pròximes a les cèl·lules que les van originar i no haver patit un procés de transformació es veu reflexat en una millor activitat i funcionalitat al seu ambient.

1.4.2 Aïllament d'hepatòcits de rata adulta.

Animals d'experimentació i condicions d'estabulació:

Els animals emprats han estat rates albines de la soca Wistar pertanyents a una colònia ja establerta a l'estabulari de la facultat de biologia. S'han utilitzat mascles d'un pes comprès entre els 200 i 250 g mantinguts en condicions ambientals controlades (22°C de temperatura i 75% d'humitat) i seguint un cicle d'il·luminació diari de dotze hores de fosc, iniciant-se el període de llum a les vuit del matí. El tipus

d'alimentació administrada consisteix en un pinso compactat subministrat per B.K. UNIVERSAL G.J.,S.L. amb un valor calòric de 3.4 Kcal/g.

Aparells i Material:

- Bany termòstat Selecta.
- Bomba persitàtica Gilson Minipuls.
- Centrífuga Super Minor (MSE).
- Microscopi Nikon amb objectius de 10X i 40X i oculars de 10X.
- Material divers de plàstic i vidre.
- Cànules Gilson de clorur de polivinil.
- Malla de niló.
- Hemocitòmetre de Neubauer.

Reactius i medis d'aïllament:

- Carbogen (O₂/CO₂ 19:1).
- Solució de pentobarbital sòdic (30 mg/ml).
- Col·lagenasa A (clostridiopeptidasa A) 0.3 U/mg de Clostridium hystolyticum (Boehringer Mannheim).
- Tampó 1: Solució de sals de Hank, lliure de calci i magnesi i amb EGTA, agent segrestador de calci. S'utilitza com a tampó de rentat durant la perfusió del fetge de l'animal i es prepara 10 vegades concentrat. Es conserva a -4°C, aproximadament durant un mes, i la seva composició és:

	<u>g/litre</u>	<u>Concentració 10X (mM)</u>
KCl	4.0	54.0
KH ₂ PO ₄	0.6	4.40
NaCl	80.0	1368
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	0.6	3.30

Abans de ser utilitzat es dilueix 10 cops i s'hi afegeix:

	<u>g/litre</u>	<u>Concentració (mM)</u>
NaHCO ₃	0.35	4.20
D-glucosa	1.00	5.50
HEPES	4.8	20.0
EGTA	0.19	0.50

Es preparen 500 ml de tampó que se saturen amb carbogen durant uns vint minuts. Un cop gasejat, el tampó s'ajusta a pH 7.3 amb KOH 10 N i es manté en el bany termostatitzat a 38-39°C, carbogenant-se.

- Tampó 2: Medi Leibovitz que ha resultat d'una modificació de la solució de sals del medi de Leibovitz original (1963). És el tampó de perfusió i en ell es dissol la col·lagenasa. Es prepara 10 vegades concentrat i es conserva a 4°C. Consta de:

	<u>g/litre</u>	<u>Concentració 10X (mM)</u>
KCl	4.0	54.0
KH ₂ PO ₄	0.6	4.40
MgCl ₂ x 6H ₂ O	2.0	9.80
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2.0	8.10
NaCl	80.0	1368
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	2.4	13.3

Prèviament a l'aïllament es dilueix 1/10 i s'hi afegeix:

	<u>g/litre</u>	<u>Concentració (mM)</u>
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.18	5.00
D-glucosa	1.00	5.50
HEPES	4.8	20.0

Es prepara un litre de tampó. Es gaseja amb carbogen durant vint minuts i s'ajusta el pH a 7.4 amb KOH 10 N. Es manté al bany termostatitzat a 38-39°C carbogenant-se i, just abans de començar la perfusió, s'afegeixen entre 0.4-0.5 mg de col·lagenasa per ml de tampó.

- Tampó 3: Es prepara com el tampó 2, però, un cop carbogenat durant vint minuts i ajustat el pH a 7.4, s'hi afegeix un 1% d'albumina sèrica bovina lliure d'àcids grassos (Boehringer), en lloc de col·lagenasa, i es manté en gel fins al moment de fer-lo servir. Es preparen 300 ml.

Procediment:

L'aïllament dels hepatòcits de rata adulta es realitza mitjançant el mètode clàssic de perfusió amb col·lagenasa establert per Moreno i col·laboradors (1989) amb les modificacions descrites posteriorment per Gómez-Angelats i col·laboradors (1995). Ambdós treballs procedeixen del mètode original descrit per Berry i Friend (1969) i readaptat per Seglen (1976).

Les cèl·lules aïllades s'han utilitzat per estudis de regulació, un cop establerts els corresponents cultius primaris. És per tant, important mantenir unes condicions d'esterilitat adients que evitin la potencial contaminació d'aquests. En començar, s'anestesien els animals per injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic (60 mg/Kg de pes corporal). Un cop adormits, se'ls practica una laparotomia en V invertida des de la línia alba inferior. Quan la paret abdominal ja és oberta, es col·loca un fil al voltant de la vena porta, 1.5-2 cm de l'entrada del fetge, i un altre al voltant de la vena cava inferior per sobre el ronyó dret. Es canula la vena porta amb una cànula de plàstic amb una agulla de 1 mm de diàmetre. Ràpidament es lliga la vena amb el fil, per tal de mantenir la cànula fixada i s'endega la perfusió del fetge amb el tampó de rentat (tampó 1) que és impulsat per una bomba peristàltica que manté un flux continu de 40 ml/min. En aquest precís moment se secciona la vena cava inferior per sota del lligam.

El tampó perfundit renta de sang i els ions calci l'òrgan durant 10-15 minuts. Pot apreciar-se de seguida el canvi de color del fetge cap a una tonalitat marró clara. Durant aquest temps s'obra la caixa toràcica, es passa un tercer fil al voltant de la vena cava superior, just abans de l'entrada al cor per l'aurícula dreta, i s'introdueix una segona cànula que baixarà per la vena cava fins a l'alçada del diafragma. Es lliga el fil per tal de fixar l'agulla de la cànula i es fa un nus passant al voltant de la vena cava posterior, permetent que el tampó eflueixi per la cava a nivell del cor. A continuació s'endega la perfusió amb el tampó 2, que conté la col·lagenasa, iniciant-se així la digestió enzimàtica del fetge, que dura entre 20 i 30 minuts. Cal tenir molta cura de que no arribi cap bombolla d'aire per la cànula ja que el fetge quedaria afectat i la

viabilitat cel·lular compromesa. Un cop l'òrgan ha assolit una aparença esponjosa, es finalitza la perfusió i s'extreu aquest amb cura, dipositant-lo en una placa de Petri amb uns quants mil·lilitres de tampó 2. En aquest moment s'inicia la disgregació mecànica mitjançant el "pentinat" del fetge amb una espàtula de plàstic en forma de pinta i amb oxigenació constant. La suspensió resultant es filtra a través d'una malla de niló col·locada en un embut i es recull en un tub corning de plàstic, enrasant-la fins a 50 ml amb tampó 3.

El filtrat es centrifuga a 1000 rpm durant dos minuts a temperatura ambient i, descartat el sobrenadant, es resuspèn amb tampó 3 fins a 40 ml. Es torna a centrifugar sota les mateixes condicions i el procés es repeteix una tercera vegada. El grau de compactació del precipitat és un bon indicador de la viabilitat cel·lular, de manera que si és alt la viabilitat està assegurada. Després de l'última resuspensió, la preparació d'hepatòcits es manté en gel fins al moment de la sembra de les cèl·lules, que prèviament es dilueixen en un medi ric, adient per al seu cultiu. La viabilitat cel·lular de la suspensió d'hepatòcits es mesura mitjançant el mètode del blau tripà i amb una càmera de Neubauer.

1.4.3 Cultiu primari d'hepatòcits.

Medis i suplementes:

- Medi 1: medi E-199 de sals d'Earl (BioWhittaker) suplementat amb un 2% de sèrum fetal boví (BioWhittaker) i un 1% de la barreja d'antibiòtics i antimicòtics (BioWhittaker) formada per penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10000 U/ml i fungizona 25 UG/ml.
- Medio 2: medi E-199 de sals d'Earl suplementat amb un 0.2% d'albumina sèrica bovina (fracció V lliure d'àcids grassos, Boehringer) i un 1% de la barreja d'antibiòtics i antimicòtics (BioWhittaker). L'albumina es prepara al 10%, es filtra amb un filtre de 0.2 µm y es conserva a -20°C.

Procediment:

La suspensió d'hepatòcits resultant de l'aïllament de fetge de rata adulta es centrifuga a 1000 r.p.m i 4°C durant un minut. Des d'aquest moment es treballa en condicions d'esterilitat i, per tant, el sobrenadant procedent de la centrifugació s'aspira

mitjançant una pipeta pasteur estèril dins de la campana de flux laminar. El precipitat d'hepatòcits es resuspèn en medi 1, prèviament atemperat a 37°C, i es torna a realitzar una segona centrifugació i aspiració del medi, igual que l'anterior, per tal de garantir les condicions d'esterilitat. El precipitat final es resuspèn en 10 ml de medi 1 i, en aquest punt, és convenient tornar a realitzar un comptatge cel·lular perquè és possible que, amb les noves centrifugacions, el nombre total d'hepatòcits hagi disminuït. Tot seguit les cèl·lules es dilueixen en el volum total de medi que permeti la sembra de 2×10^6 cèl·lules per placa de 10 mm, a raó de 8-10 ml/placa. transcorregudes 4 hores, temps necessari per tal que els hepatòcits s'adhereixin, s'aspira el medi de cultiu, substituïnt-se per medi 2. D'aquesta manera s'eliminen les cèl·lules no enganxades i les restes cel·lulars.

2. TRACTAMENTS EN CULTIUS CEL·LULARS.

En aquest apartat es descriuen els diferents tractaments als que s'han sotmès algunes de les línies anteriorment descrites amb l'objectiu d'estudiar la regulació dels transportadors de nucleòsids i en segon lloc de la proteïna quinasa dependent d'AMP (AMPK). S'han utilitzat diferents tècniques: anàlisi d'expressió de RNA i de proteïnes, anàlisi del nivell de fosforil·lació i mesura de l'activitat quinasa, a més de transport de nucleòsids.

El primer punt a tenir en compte alhora de realitzar estudis de regulació ja sigui per assequibilitat de substrat o per regulació hormonal fa referència al sèrum, component habitual i imprescindible per la majoria de medis de cultiu. El sèrum presenta una composició complexa i indeterminada, presentant traces d'hormones, de factors de creixement i de nucleòsids, la concentració dels quals pot variar entre els diferents lots comercials. Aquest fet pot provocar interferències en els resultats experimentals, és per això que tots els tractaments als quals s'han sotmès les cèl·lules s'han dut a terme en medi de cultiu sense sèrum, essent aquest substituït per albúmina sèrica bovina al 0.2%. Addicionalment, un mínim de 2 i màxim de 12 hores abans d'incubar les cèl·lules amb els diferents efectors es canvia el seu medi de cultiu per medi de cultiu sense sèrum. L'objectiu de la deprivació de sèrum és aclimatar-les prèviament al nou medi abans de realitzar el tractament desitjat.

2.1 REGULACIÓ HORMONAL I PER FACTORS DE CREIXEMENT.

- **Dexametasona**

La dexametasona es comercialitza en forma de pols (Sigma) i es recomana el seu manteniment entre 2-8°C. La solució mare es prepara a una concentració de 10^{-3} M en etanol al 95% i es conserva aliquidada a -20°C fins a la seva utilització. La concentració emprada en els assajos experimentals és de 100 nM.

- **EGF (Factor de creixement epidèrmic)**

Es treballa amb el producte extret de les glàndules submaxilars de ratolí (Sigma), en forma de pols estèril. La solució mare es prepara a una concentració de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampó PBS suplementat amb albúmina (0.1%). Aquesta solució també es conserva a -20°C fins a la seva utilització. Experimentalment es treballa a una concentració final de entre 1 i 100 ng/ml . La majoria d'experiments han estat realitzats a una concentració de 20 ng/ml .

- **TGF α (Factor de creixement transformant alfa):**

El factor que s'utilitza és la variant sintètica de la isoforma de rata (Sigma). Aquest sòlid estèril, conservat a -20°C , requereix la seva dissolució en PBS/albúmina 0.1% a raó de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per ser utilitzat a una concentració final de 10 ng/ml . Els seus efectes són mediats a través del receptor d'EGF.

Es sembren les cèl·lules en plaques multiwell de 24 o plaques de 60 mm i 100 mm segons si es vol fer un estudi de captació de substrat o d'expressió de RNA o proteïna. Una vegada les cèl·lules arriben a confluència es priven de sèrum *overnight*. Es suplementa el medi de cultiu amb els diferents efectors a la concentració desitjada i s'afegeix 0.5 ml, 4 ml o 8 ml per pou de la placa multiwell de 24, per placa de 60 mm o de 100 mm respectivament. Per aquests assaigs es van realitzar incubacions llargues desde 3 fins 48 hores. Una vegada ha tingut lloc la incubació amb els diferents factors, s'elimina el medi de cultiu i es procedeix a fer l'assaig de captació de substrat o es recol·lecten les cèl·lules pels estudis d'expressió proteica mitjançant la tècnica de *Western Blot* i/o de missatger duts a terme per RT-PCR a temps real.

A més dels tractaments amb diferents factors endocrins es va analitzar la regulació dels transportadors de nucleòsids en un model *in vitro* de dany epitelial. Aquest model de dany epitelial, com ha estat descrit per d'altres autors (Mc Cormack et al., 1992; Ciacci et al., 1993) consisteix en realitzar una sèrie de talls paral·lels mitjançant un bisturi (50-70 talls per 2 cm²), sobre la monocapa de cèl·lules, que com en la resta de tractaments han estat privades de sèrum durant 12 hores. En aquest cas es van realitzar els estudis d'expressió gènica o els assaigs de transport entre 6 i 10 hores respectivament després de provocar la lesió cel·lular.

2.2 REGULACIÓ PER ASSEQUIBILITAT DE SUBSTRAT.

Els nucleòsids es presenten comercialment en forma de pols (Sigma). Les solucions mare dels diferents nucleòsids (Adenosina, Inosina, Citidina, Timidina i Uridina) i de l'anàleg no metabolitzable Formicina B es preparen a una concentració 10 mM en aigua destil·lada. L'única excepció és la Guanosina que degut a la seva baixa solubilitat en aigua cal dissoldre-la en DMSO a la mateixa concentració. Una vegada preparades, cal esterilitzar les solucions mare mitjançant la seva filtració amb filtres de 0.2 µm de diàmetre (Schleicher & Schuell) dins la campana de flux laminar. S'aliquoten i es conserven a -20°C fins a la seva utilització.

Es sembren plaques multiwell de 24 pouets i una vegada les cèl·lules arriben a la confluència desitjada en cada cas, es canvia el seu medi de cultiu per medi de cultiu sense sèrum suplementat amb un 0.2% d'albúmina sèrica bovina. Un mínim de dues hores després de la privació s'afegeixen els nucleòsids o les diferents barreges directament en el medi de cultiu sense sèrum. S'incuben les cèl·lules a 37°C el temps desitjat i es procedeix a fer l'assaig de transport.

2.3 REGULACIÓ DE L'AMPK PER ADENOSINA.

Els diferents nucleòsids es preparen com s'ha explicat a l'apartat anterior, és a dir a una concentració de 10 mM en aigua i es guarden alíquotats i congelats a -20°C.

Es sembren plaques de 60 mm o 100 mm per tal d'obtenir suficient proteïna per poder immunoprecipitar l'AMPK i mesurar l'activitat quinasa. En el cas de les cèl·lules IEC-6 l'assaig es realitza a confluència, en cèl·lules FAO es fa quan aquestes han arribat al 60-70%, i en cultius primaris d'hepatòcits es realitza el dia següent a la

sembla. Es canvia el medi de les cèl·lules a medi sense sèrum unes dues hores abans d'afegir els diferents tractaments. De la mateixa manera que a l'apartat anterior l'adenosina i els altres nucleòsids s'afegeixen directament sobre les cèl·lules sense canviar novament el medi ja que aquest fet per si sol pot produir una lleugera activació de l'AMPK. Així doncs una vegada s'ha afegit l'efector i s'ha incubat el temps desitjat, s'aspira el medi i ràpidament es procedeix al lisat de les cèl·lules amb el tampó de lisi adequat (veure apartat). Una vegada centrifugades les mostres es congelen a -80°C per tal de que no es vegi afectada l'activitat de l'AMPK.

2.4 INHIBIDORS DE DIFERENTS VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS.

Inhibició de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K).

La **Wortmanina** (Sigma) és un metabòlit d'origen fúngic que actua com un inhibidor potent, selectiu, permeable a la cèl·lula i irreversible de la PI3K. Es prepara a una dissolució stock de 1 mM en DMSO i es conserva a -20°C fins a la seva utilització. Els assajos de transport es realitzen a una concentració final de 100 nM. S'incuben les cèl·lules 30 min amb wortmanina 100 nM durant els quals s'inhibeix de manera irreversible la PI3K i a continuació es canvia el medi i es duen a terme els diferents tractaments.

Un altre inhibidor potent i més específic però reversible de la PI3K és el **LY249002**, que presenta una IC_{50} de $1.4 \mu\text{M}$. S'addiciona a una concentració de $10 \mu\text{M}$ aproximadament 20 min abans d'incubar les cèl·lules amb els diferents efectors i es manté durant tot el tractament.

Inhibició de les proteïna tirosina quinases.

Per tal d'inhibir l'acció de les proteïna tirosina quinases es va emprar la **Genisteïna**. Es tracta alhora d'un inhibidor competitiu de l'ATP en altres reaccions de proteïna quinases. La genisteïna (Sigma) es prepara a una dissolució stock de 10 mM en DMSO i s'utilitza a una concentració de $60 \mu\text{M}$ addicionant-se conjuntament amb el tractament que es desitgi realitzar. Es guarda congelada a -20°C .

Regulació de la proteïna quinasa A (PKA).

Per tal d'analitzar la implicació de la PKA en els efectes observats s'ha utilitzat un activador d'aquesta proteïna, el **dibutiril AMP cíclic** (Sigma), un anàleg del AMPc permeable a la membrana cel·lular, l'augment del qual indueix l'alliberació de les subunitats catalítiques de la PKA (proteïna quinasa dependent d'AMPc). El dibutiril AMPc es dissol en aigua destil·lada a una concentració stock de 100 mM i es guarda a -20°C fins a la seva posterior utilització a una concentració final de 100 μM .

Regulació de la proteïna quinasa C.

Per tal d'inhibir l'acció de les diferents isoformes de PKC es va utilitzar un inhibidor general d'aquesta proteïna quinasa, la **Chelerythrine chloride** (1,2-dimethoxy-N-methyl(1,3)benzodioxolo(5,6-c)phenanthridinium chloride) (Sigma). Es tracta d'un inhibidor potent i específic que actua inhibint la translocació d'aquesta proteïna des del citosol a la membrana plasmàtica. S'utilitza a una concentració final d'1 μM a partir d'una solució stock preparada a 1 mM en DMSO.

Inhibició de la Tor quinasa.

Per tal d'inhibir la via de la Tor quinasa es va emprar la **Rapamycin** (Calbiochem). Es tracta d'un producte natural antifúngic i immunosupressor que dins la cèl·lula forma un complex amb la *prolil isomerasa* FKBP12. Aquest complex s'uneix a les proteïnes Tor quinases, una família de proteïnes implicades en la regulació del creixement i diferenciació en resposta a nutrients, i les inhibeix. Es tracten les cèl·lules amb l'inhibidor a una concentració final de 100 nM.

Inhibició dels diferents elements de la cascada de les MAP quinases.

- **PD98059** (2'-amino-3'-metoxiflavona) (Calbiochem): és un inhibidor selectiu de la fosforilació i l'activació de la proteïna quinasa ERK1/2. La inhibició es produeix per la unió del producte a la proteïna quinasa MEK1, activadora d'ERK, ja que es bloqueja l'accés dels enzims activadors. Es prepara una solució stock 10 mM en DMSO i es guarda a -20°C . S'utilitza a una concentració experimental de 10 μM i és necessari realitzar la incubació amb l'inhibidor 30 minuts abans i durant l'addició del medi inductor.

- **SB202190** (4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol) (Calbiochem): es considera un inhibidor potent i permeable a la membrana cel·lular de les MAP quinases p38 i p38 β . No té efecte sobre l'activitat d'altres MAP quinases com JNK i ERK. És capaç d'inhibir la fosforilació del ATF-2 per part de p38. Es prepara una solució stock 1 mM en DMSO i la concentració experimental és d'1 μ M. També cal addicionar-lo 30 minuts abans i mantenir-lo durant el medi inductor.
- **SP600125**: (antra(1-9-cd)pirazol-6(2H)ona) (Tocris): és un inhibidor selectiu de JNK (c-Jun N-terminal kinase). Actua de manera competitiva i reversible inhibint les proteïnes JNK1, 2 i 3 sense afectar a la resta d'elements de la cascada de les MAP quinases com ERK i p38. Es prepara a una solució stock 100 mM en DMSO i s'utilitza a una concentració experimental de 20 μ M. Cal addicional-lo 30 minuts abans i mantenir-lo durant el tractament posterior.

Regulació de la proteïna quinasa dependent d'AMP (AMPK).

Degut al fet que no existeixen inhibidors específics d'aquesta proteïna quinasa, es va utilitzar l'**Aicar** (5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- β -D-Ribofuranoside) (TCR) per tal d'estudiar la implicació d'aquesta proteïna quinasa en els efectes estudiats en aquesta memòria. L'Aicar és un anàleg de nucleòsid que una vegada dins la cèl·lula és fosforilat a ZMP mitjançant l'acció de l'adenosina quinasa i actua com anàleg de l'AMP activant l'AMPK. Es prepara una solució stock de 100 mM en aigua i s'utilitza generalment a una concentració final de 500 μ M durant una hora.

Inhibició de l'adenosina quinasa.

El producte més utilitzat per tal d'inhibir l'activitat de l'adenosina quinasa és la **5'-iodotubercidin** (4-amino-5-iodo-7-(β -D-ribofutanosyl)-pyrrolo(2,3-d)pirimidine) (Biomol). Presenta un K_i de 30 nM per aquesta proteïna tot i que a concentracions més elevades també pot modular l'activitat de les caseïna quinases I i II i ERK2. Es prepara una solució stock de 10 mM en DMSO i la concentració experimental usada en aquesta tesi és de 0.2-0.5 μ M. S'afegeix 30 min abans dels tractaments i es manté tota la seva durada.

3. TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS.

El mètode emprat per la mesura de captació de nucleòsids en cultius cel·lulars en monocapa és una variació del mètode descrit per Quamme i col (1989). Consisteix en la incubació de les cèl·lules en presència del substrat fred i del substrat marcat radioactivament a unes concentracions conegudes durant un temps determinat. S'atura el transport i es du a terme la solubilització de les cèl·lules per tal de determinar la quantitat de substrat radioactiu que ha estat incorporat per les cèl·lules.

3.1 ASSAIG DE TRANSPORT.

Reactius:

- Tampó amb sodi: NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Hepes 10 mM. S'afegeix un 0.5% de roig de fenol i s'ajusta el pH a 7.4 amb Tris-Base 1 M. Es guarda a 4°C.
- Tampó amb colina: Clorur de Colina 137 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Hepes 10 mM. S'afegeix un 0.5% de roig de fenol i s'ajusta el pH a 7.4 amb Tris-Base 1 M. El tampó de colina cal guardar-lo a -20°C.
- Dissolució d'atur: NaCl 137 mM, Hepes 10 mM i s'ajusta el pH a 7.4 amb Tris-Base 1 M

Altres reactius i material necessaris:

- Nucleòsids freds: Guanosina, Uridina, Adenosina, Citidina (Sigma)
- Nucleòsids marcats radioactivament: Guanosina [8³H] 8.6 Ci/mmol (Moravek)
Citidina [5-3H(N)] 21 Ci/mmol (Moravek)
Uridina [5,6-³H] 38.0 Ci/mmol (Sigma)
Adenosina [2³H] 21 Ci/mmol (Sigma)
- Líquid d'escintil·lació Fórmula-989 (Dupont).
- Solució de lisi: Tritó X-100 0.5%, 100 mM NaOH.

Procediment:

- Preparació dels medis de transport

Per la mesura de la captació de nucleòsids es suplementen en paral·lel els medis sodi i colina amb el nucleòsid desitjat fred a una concentració final generalment d'1 μM i s'afegeixen de 1-4 $\mu\text{Ci/ml}$ del nucleòsid radioactiu, segons la taxa de transport de la línia amb la qual es treballa. L'assaig en ambdós medis ha de tenir lloc en les mateixes condicions. D'aquesta manera el resultat obtingut amb el medi sodi dóna la taxa total de transport, és a dir transport independent de sodi, transport dependent de sodi i difusió simple. En canvi l'assaig en medi colina només indica la taxa de transport independent de sodi i la difusió simple. Així doncs mitjançant una simple substracció d'ambdues s'obté la taxa de transport sodi-dependent. Es prepara la quantitat necessària de medi de transport tenint en compte que es requereixen 250 μl de medi per pouet de placa multiwell de 24 pous i 500 μl per cada filtre de placa de *transwell*.

- Assaig de transport en placa

Els assajos de transport es realitzen a temperatura ambient; cal doncs atemperar prèviament els medis de rentat i de transport en un bany a 37°C i les cèl·lules es mantenen dins l'incubador fins a l'inici de l'assaig. S'extreu el medi de cultiu i es renten les cèl·lules dues vegades amb 2 ml de tampó (sodi o colina). El transport s'inicia en el moment en què es substitueix aquest medi de rentat per 230 μl de medi de transport radioactiu. En el temps desitjat s'atura el transport mitjançant dos rentats de 2.5 ml de solució d'atur a 4°C (en gel). A continuació s'afegeixen 100-200 μl (segons el grau de confluència de les cèl·lules) de la solució Tritó X-100 0.5%, NaOH 100 mM que promourà la lisi de les cèl·lules i l'alliberament del contingut intracel·lular. Aquest pas es facilita per agitació vigorosa en un agitador horitzontal durant uns 15 min aproximadament. De cada pou, després d'haver homogeneitzat bé el contingut, es recull una alíquota de 10 μl , que s'usarà posteriorment per medir la concentració de proteïna, i la resta del lisat es traspassa en vials d'escintil·lació prèviament omplerts amb 4 ml de líquid d'escintil·lació per tal de realitzar el recompte de la radioactivitat. Per altra banda cal preparar per triplicat uns vials amb 5 μl de cadascun dels medis de transport (sodi i colina) per tal d'obtenir els estàndards als que es referiran els

resultats. Els vials amb les mostres radioactives i els estàndards es mesuren al comptador beta amb un programa que proporciona dpm de triti.

És important que les mesures de transport es realitzin sota condicions de velocitat inicial. Això implica la caracterització prèvia del sistema, mitjançant el seguiment al llarg del temps de la incorporació d'una concentració fixe de substrat. Una vegada definit l'interval en què la captació del substrat es manté linial en funció del temps, s'escull el temps de treball. Generalment en el cas del transport de nucleòsids es treballa a temps curts d'entre 1 i 3 min.

- Mesures de flux vectorial en transwell

Les mesures de flux vectorial han estat realitzades a 37°C de manera que les cèl·lules es mantenen durant el temps de transport en una cabina termostatitzada i els tampons i medis de transport es mantenen en un bany. S'apira el medi apical i basal de tres inserts i es renten les dues superfícies amb el tampó de transport corresponent (tampó sodi o tampó colina) seguint el mateix procediment que en el canvi de medi de cultiu. S'afegeixen 500 µl de medi de transport radioactiu en una de les cambres (apical o basal) i el tampó corresponent a la cambra contrària. Per tal de valorar el flux vectorial, es recullen alíquotes de 50 µl de la cambra contrària on s'ha afegit el medi de transport a diferents temps (generalment 1, 5, 10 i 20 min) i es dipositen directament en un vial que conté 3 ml de líquid d'escintil·lació. Als 20 min s'atura el transport mitjançant 3 rentats amb tampó d'atur a 4°C (en gel) i es deixen assecar els filtres. Cadascun dels filtres es separa de la placa de *transwell*, es col·loca dins d'un eppendorf en el què s'afegeixen 200 µl de solució de SDS 10% NaOH i s'incuben aproximadament 1 h a 37°C per tal que de que tingui lloc la lisi de les cèl·lules. Una vegada les cèl·lules estan lisades es resuspenen bé amb una pipeta i es recullen alíquotes de 10 µl (per duplicat) que serviran per a la valoració de proteïna de cadascun dels inserts. Per altra banda es recullen 100 µl de tots els lisats i es dipositen dins de vials de cintil·lació prèviament omplerts amb líquid d'escintil·lació i s'obtindrà la taxa d'acumulació intracel·lular del nucleòsid radioactiu.

3.2 VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA.

Tot i que s'intenta realitzar una sembra homogènia, el nombre de cèl·lules per pou mai és exactament igual. Aquesta diferència cal tenir-la en compte perquè els

resultats de les mesures de transport i de flux vectorial siguin comparables entre si. Per això, és necessari corregir els valors de les mesures de captació per la concentració de proteïna present a cada mostra.

Materials i Reactiu:

- Dissolució aquosa al 0.1% d'albumina sèrica.
- Cubetes semi-micro d'espectrofotòmetre (Afora).
- Espectrofotòmetre (Shimadzu).

Procediment:

La valoració de la concentració de proteïna es realitza mitjançant el mètode de Bradford (1976). Aquest mètode es basa en el canvi de coloració del blau brillant de Coomassie respecte diferents concentracions de proteïna. En presència d'una dissolució àcida, el màxim d'absorbància del reactiu passa de 465 a 595 nm al unir-se a aquests substrats.

La dissolució comercial "Bio-Rad protein assay" (Biorad) es dilueix $\frac{1}{4}$ en aigua destil·lada i es dispensa 1 ml per cubeta semimicro de plàstic. S'afegeixen els 10 μ l que hem guardat de cadascuna de les mostres i s'homogenitza la barreja. En paral·lel es prepara una patró amb albumina sèrica bovina al 0.1% a concentracions 0, 5, 10, 15 μ g/ μ l, per tal de poder extrapolar els valors de les absorbàncies de cada mostra a 595nm de longitud d'ona.

3.3 CÀLCULS

Els vials que contenen les mostres radioactives i els corresponents estàndars es mesuren en un comptador beta amb un programa de dpms de triti. En primer lloc és necessari calcular l'activitat específica (AE) del medi de transport radioactiu segons la fórmula:

$$\text{Activitat específica (dpm/pmol)} = \text{dpm Std/volum Std} \times [\text{substrat}]$$

Amb aquest valor, i tenint en compte el temps del transport en minuts, ja es pot obtenir el valor de transport de cada mostra, expressat en pmol substrat/ mg prot.min

$$\text{Activitat mostra (pmol/mg.min)} = \text{dpm mostra} \times 10^3 / \text{volum mostra} \times \text{AE} \times [\text{proteïna } \mu\text{g}/\mu\text{l}] \times \text{min}$$

4. ANÀLISI DELS NUCLEÒTIDS D'ADENINA INTRACEL·LARS PER HPLC.

4.1 EXTRACCIÓ DE LES MOSTRES.

Es sembren cèl·lules IEC-6 en plaques de 100 mm i al cap de 2-3 dies, quan arriben a confluència, es realitza el tractament desitjat. En el nostre cas, es tracten les cèl·lules amb adenosina 10 μM i una vegada finalitzada la incubació s'aspira el medi de cultiu i ràpidament s'afegeixen 300 μl d'àcid perclòric. Les plaques es segellen amb parafilm i es congelen immediatament a -80°C . Després d'un mínim de 4 $^\circ\text{C}$, es descongelen en gel, es desenganxen les cèl·lules amb l'ajut d'un *scraper* i els lisats cel·lulars es traspassen a tubs eppendorf de 1.5 ml. Es centrifuguen a 13.000 rpm a 4°C durant 10 minuts i es recuperen els sobrenadants. Finalment es neutralitzen les mostres amb carbonat de potassi 5 M i es filtren mitjançant una centrifugació a 13.000 rpm durant 10 minuts amb els filtres Ultrafree- MC Centrifugal Filter Units (NMWL 10,000) (Millipore, Bedford MA). Els extractes neutralitzats es congelen a -80°C i ja estan llestos per ser valorats mitjançant HPLC (high- performance liquid chromatography).

4.2 CONDICIONS DE LA CROMATOGRAFIA.

S'injecten 20 μl de les mostres en una columna de fase reversa Excel 120 ODS B 3 μm (20 cm X 0.46 cm) utilitzant un gradient de tampó A (KH_2PO_4 0.5 mM TBA pH 6.4) i tampó B (70% tampó A i 30% metanol) a un flux de 0.6 ml/min. Es realitza un gradient lineal durant 30 minuts passant de 0% de tampó B a un 100% de tampó B. L'aparell utilitzat és el Alliance 2695 Waters equipat amb un detector PDA Waters 2996. Els diversos pics dels extractes han estat identificat comparant els temps de retenció amb estàndards externs i la seva relativa absorbància a 260 nm. En els extractes s'han quantificat els nivells d'AMP, ADP i ATP i els resultats obtinguts s'han expressat en $\text{nmol}/10^7$ cèl·lules.

5. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES.

5.1 OBTENCIÓ DELS LISATS CEL·LULARS.

Es sembren plaques de 60 mm o 100 mm i es realitza el tractament desitjat o es canvia el medi de les cèl·lules per medi de cultiu fresc com a mínim 2 hores abans de la obtenció dels lisats. El tampó de lisi és un factor crític que cal optimitzar en cada cas concret. La naturalesa de la proteïna que es vol estudiar (sobretot si es tracta d'una proteïna de membrana o citosòlica o si es troba en estat fosforilat) determinarà el tampó de lisi que cal usar.

Reactius i materials:

- Tampó PBS: NaCl 140mM, KH_2PO_4 2.7 mM i Na_2PO_4 8.1mM i s'ajusta a un pH de 7.4.
- Complete™ Mini Protease inhibitor cocktail tablets (Roche).
- Scrapers (Costar).
- Tampons de lisi usats:
 - Tampó Tris-HCl 10 mM pH 7.4/ Tritó X-100 0.5% (v/v).
 - Tampó A de lisi: Hepes 50 mM pH 7.4, NaF 50 mM, NaPPi 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Glycerol 10%, Tritó X-100 1% (v/v).
 - Tampó ERK: Hepes 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, NaF 100 mM, EDTA 10 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, Na_3VO_4 2 mM, Tritó X-100 1% (v/v).
 - Tampó Sacarosa: 25 mM Hepes pH 7.4, Sacarosa 0.25 mM, EDTA 2 mM.
 - Tampó Fosfats: Na_2HPO_4 0.5 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.

Procediment:

S'aspira el medi de cultiu de les plaques i es fan un parell de rentats amb 5-10 ml de PBS fred. Mantinent-les sobre gel, es procedeix a la lisi, afegint un volum variable del tampó prèviament suplementat amb inhibidors de proteases, en funció del diàmetre de la placa i de la densitat cel·lular. A partir d'aquí les cèl·lules es desenganxen rasant amb un *scraper*, la solució resultant es recull en tubs eppendorf, i s'acaba d'homogeneïtzar amb l'ajut d'un agitador tipus *vortex*. Els lisats així obtinguts es centrifuguen 10-15 minuts a 4000 x g en una minifuga a 4°C, per tal de precipitar

les restes de material no disgregat, i els sobrenadants corresponents es conserven a – 20°C o s'utilitzen directament en un assaig tipus *Western blot*.

En el cas que es vulgui obtenir un lisat cel·lular enriquit en membrana total, es realitza una segona centrifugació a 14.000 rpm durant 1 hora a 4°C. El precipitat obtingut representa la fracció de proteïna enriquida en membrana.

Finalment es valora la quantitat de proteïna de les mostres mitjançant el mètode de Bradford, descrit anteriorment en l'**apartat 3.2**.

5.2 ELECTROFORESI EN SDS-PAGE.

El sistema més clàssic per a la resolució de barreges de proteïnes en funció de la seva mida és l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (Laemmli, 1970). Aquest sistema es basa en tractar la barreja de proteïnes amb un tampó que conté el detergent iònic SDS, de tal manera que es confereix una càrrega negativa a les proteïnes, però es manté la relació càrrega/massa constant. La barreja de proteïnes es fa córrer per l'acció d'un camp elèctric en una xarxa formada per un polímer d'acrilamida i bisacrilamida.

Reactius i Materials:

- Tampó d'Electroforesi: Format per Tris-Base 250 mM, glicina 1.91 M i SDS a l'1%. Es prepara deu vegades concentrat i es conserva a temperatura ambient.
- Tampó de càrrega: Es prepara 5 vegades concentrat. Per a 100 ml calen 32 ml de tampó Tris-HCl 1 M a pH 6.8, 10 g de SDS, 10 mg de blau de bromofenol, 50 ml de glicerol i s'enrasa amb aigua destil·lada fins a 100 ml. Alhora de la seva utilització s'afegeix 2-mercaptoetanol a una concentració final del 10% per tal que sigui reductor.
- Estàndard Rainbow Mix RPN 756 (Amersham Pharmacia Biotech) que conté marcadors de pesos moleculars pretenyits entre 14.3 i 220 KDa.
- Aparell de PAGE: Sistema Mini protean (BioRad) equipat amb una font de voltatge.
- Gels d'acrilamida. Es preparen amb una dissolució comercial d'acrilamida-bisacrilamida al 30% (Biorad). Cal preparar-los en el moment en què es realitzi l'assaig.

- El gel separador està format per 4 ml d'aigua destil·lada, 3.3 ml de la dissolució acrilamida-bis-acrilamida, 2.5 ml de tampó Tris-Base 1.5 M a pH 8.8, 0.1 ml de SDS al 10%, 0.1 ml de persulfat amònic al 10%. Finalment s'afegeixen 4 µl de TEMED (Biorad) que és el desencadenant de la reacció de polimerització.

- El gel concentrador està format per 2.7 ml d'aigua destil·lada, 0.67 ml de la dissolució comercial d'acrilamida, 0.5 ml de tampó Tris 1 M a pH 6.8, 40 µl de SDS al 10%, 40 µl de persulfat amònic al 10% i 4 µl de TEMED.

Procediment:

- Preparació de les mostres.

Les mostres a analitzar poden diferir tant pel seu origen com pel processat previ, i addicionalment existeixen variacions en la sensibilitat dels diferents anticossos primaris usats. Per això, la quantitat necessària de proteïna ha de ser determinada experimentalment en cada cas. Generalment, es carreguen entre 10 i 50 µg de proteïnes. És important que la valoració de proteïna de les mostres sigui precisa per garantir una càrrega homogènia i poder realitzar una anàlisi de caràcter quantitatiu. En funció del tipus d'anticòs s'utilitzarà un tampó de càrrega reductor o no reductor.

- Preparació dels gels.

Com a sistema d'electroforesi s'utilitza el MiniProtean II SDS-PAGE de Bio-Rad i es realitza el muntatge seguint les instruccions del fabricant. El gruix del gel d'acrilamida ve determinat per el gruix dels separadors, de manera que si són de 1.5 mm la quantitat del gel separador és aproximadament de 10 ml. Una vegada afegit el TEMED, l'agent polimeritzant, s'introdueix el gel separador amb una pipeta pasteur entre els dos vidres i s'enrasa amb aigua destil·lada afavorint que la superfície del gel quedi ben anivellada. Una vegada el gel ha polimeritzat (10-15 min), es retira l'aigua destil·lada eliminant amb un paper de filtre els possibles restes i s'afegeixen tot seguit 4 ml de gel concentrador. Finalment s'introdueix una pinta de 10 o 15 pous del mateix gruix que els separadors i es deixa que polimeritzi. Un cop polimeritzat es retira la pinta i es munta el sistema. Es posa el suport amb els gels i els electodes a dins la cubeta d'electroforesi i s'omple el sistema amb el tampó d'electroforesi. Mitjançant un

xeringa Hamilton es carreguen les mostres i l'estàndard. Finalment, es tanca el circuit elèctric aplicant un voltatge de 120 V aproximadament una 1 hora 30 min.

5.3 ASSAIG D'IMMUNOBLLOT (WESTERN-BLOT).

La tècnica del *Western Blotting* o *immunoblot*, descrita per primera vegada l'any 1981 per Burnette, consisteix en la transferència electroforètica de proteïnes des de gels de SDS-PAGE a membranes de nitrocel·lulosa i la detecció autoradiogràfica d'una determinada proteïna mitjançant anticossos específics.

5.3.1 Electrotransferència de proteïnes

Reactius i Materials:

- Tampó de transferència. Format per Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM i metanol al 20% (v/v). Es conserva a temperatura ambient.
- Metanol.
- Paper de filtre Whatman 3MM.
- Membrana Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore).
- Aparell de transferència de gels a membranes: Sistema Mini Protean (BioRad).

Procediment:

Es talla prèviament la membrana Immobilon de la mateixa mida que el gel (5 cm x 9 cm) i es submergeix durant 1 min en metanol per tal d'activar-la. Sempre cal manipular la membrana amb guants per no tocar-la. Quan ha passat 1 min es deixa submergida en el tampó de transferència, on també s'han submergit 6 trossos de paper Whatman de la mateixa mida i dues espongetes. Després de 10 min aproximadament es procedeix a fer el muntatge de transferència evitant sobretot la formació de bombolles entre el gel i la membrana de nitrocel·lulosa. Es diposita el sistema en la cubeta d'electroforesi i s'omple de tampó de transferència. S'afegeix un recipient que conté un bloc de gel i un agitador dins la cubeta per mantenir el muntatge refrigerat. Finalment es tanca el circuit aplicant un voltatge de 100 V durant 60 o 90 min.

5.3.2 Immunodetecció.

La immunodetecció es basa en un procediment indirecte en el qual la interacció entre l'antigen fixat en la membrana i l'anticòs primari es detecta mitjançant la reacció de la peroxidasa de rave que es troba unida a l'anticòs secundari.

Reactius i Materials:

- Solució de PBS-Tween-20 (Sigma) al 0.5%.
- Dissolució de Bloqueig: Formada per un 5-10% (p/v) de llet descremada en pols (Molico Sveltesse) dissolta en PBS-Tween-20 al 0.5%.
- Plàstic per preparar bosses.
- Segelladora.
- Agitador orbital

Anticossos utilitzats:

- Anti-rCNT1 i anti-rCNT2: Anticossos policlonals mono específics, generats i caracteritzats en el nostre laboratori dins del marc de la tesi doctoral de la Dra. Raquel Valdés. Una vegada purificada la fracció de IgGs s'utilitzen a una dilució 1/2000 (rCNT1) i 1/1000 (rCNT2) en la solució de bloqueig.
- Anti-hCNT1: Anticòs policlonal mono específic generat i caracteritzat en el nostre laboratori dins del marc de la tesi doctoral de l'Elena Guillén. S'utilitza a una dilució 1/1000 de la fracció d' IgGs purificada.
- Anti-ERK1/2 (Promega): anticòs comercial policlonal purificat a partir de serum de conill que reconeix les formes inactives de ERK1 i ERK2. S'aconsella una dilució 1/5000 per les tècniques de Western blotting.
- Anti-active MAPK pAb (Promega): anticòs policlonal comercial que reconeix la forma fosforilada i activa de MAPK (p44 o ERK1 i p42 o ERK2). S'ha generat contra la seqüència peptídica que constitueix el centre de regulació de l'enzim actiu (residus Thr 183 de ERK1 i Tyr 185 de ERK2). S'usa a una dilució 1/5000.
- Anti-phospho AMPK (Cell Signalling Technology): anticòs comercial policlonal que detecta la subunitat catalítica α , tant la isoforma α_1 com α_2 , en estat fosforilat. S'ha generat en conills immunitzats amb un pèptid sintètic corresponent als residus que envolten la Thr 172 de la isoforma humana de l'AMPK. S'usa a una dilució 1/1000 i s'incuba a 4°C tota la nit.

- Anti α_1 AMPK: anticòs contra la isoforma catalítica α_1 de la AMPK, cedit pel Dr. Grahame Hardie (Dundee, UK). S'ha utilitzat per *Western blot* a una dilució 1/5000 i per immunoprecipitació (veure **apartat 5.1** assaig quinasa).
- Anti-phospho ACC (Cell Signalling Technology): anticòs policlonal, generat en conill que reconeix la forma fosforilada de l'ACC en la Ser 79. S'usa a una dilució 1/2000 i s'incuba a 4°C tota la nit.
- Anticossos secundaris: Goat anti-rabbit IgG(H+L)-HPR conjugate (Biorad)
Goat anti-mouse IgG(H+L)-HPR conjugate (Biorad)

Procediment:

Una vegada acabada la transferència, s'introdueix la membrana de nitrocel·lulosa dins una bossa de plàstic a la qual s'afegeixen 10 ml de la dissolució de bloqueig i s'incuba amb agitació suau 1 hora a temperatura ambient o, alternativament, tota la nit a 4°C. L'objectiu del bloqueig és evitar la unió inespecífica de l'anticòs primari a les proteïnes electrotransferides i a d'altres llocs d'unió inespecífics de la pròpia membrana. Amb aquesta finalitat s'utilitza aquesta dissolució rica en proteïnes. Una vegada finalitzat el bloqueig, es renta la membrana durant 5 min amb PBS Tween-20 0.5%. A continuació es realitza la incubació amb 5 ml d'una solució que conté l'anticòs primari a la dilució corresponent amb una agitació suau. El temps d'incubació depen de l'anticòs utilitzat i generalment té lloc durant 1-2 h a temperatura ambient o *overnight* a 4°C. Per tal d'eliminar l'excés d'anticòs, una vegada acabada la incubació es fan tres rentats de 10 min PBS-Tween-20 al 0.2%. A partir d'aquí, es prepara una dilució 1/2000 de l'anticòs secundari en la solució de bloqueig i es realitza una incubació de la membrana d'una hora a temperatura ambient. Per acabar es fan tres últims rentats amb PBS 1X i la membrana ja està llesta per ésser revelada.

5.4.3 Revelat amb el mètode ECL.

És un mètode de detecció luminescent per a antígens específics immobilitzats que estan conjugats de manera directa o indirecta amb anticossos marcats amb peroxidasa de rave. Així doncs la detecció de l'anticòs secundari permet localitzar la unió específica de l'anticòs primari a la proteïna d'interès. Els resultats es visualitzen mitjançant una autoradiografia.

Material i Reactius:

- Cassette d'exposició.
- Film d'alta sensibilitat Hyperfilm ECL RPN 31034 (Amersham Pharmacia Biotech).
- Reactiu comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Procediment:

Mitjançant una pipeta pasteur s'afegeixen 2 ml de ECL (preparat segons les instruccions del fabricant) sobre la membrana de manera que quedi totalment submergida i es deixa actuar durant 1 min. S'elimina l'excés d'ECL i s'introdueix la membrana dins una bossa de plàstic. Per revelar cal introduir la membrana dins un cassette i s'exposa un film durant un temps variable segons la sensibilitat de l'anticòs i les mostres utilitzades, requerint doncs una primera determinació empírica a fi d'establir les condicions més adequades.

Per tal d'analitzar les imatges obtingudes s'utilitza el software Corel Photo-Paint 9 per realitzar la captació i el Phoretix 1D Gel Analysis per realitzar les densitometries de les imatges.

6. MESURA DE L'ACTIVITAT QUINASA.

Les proteïna quinases catalitzen la transferència d'un grup fosfat provinent de l'ATP a un residu de serina, treonina o tirosina de les seves proteïnes substrat. Com que cada proteïna quinasa actua de manera específica sobre substrats concrets, es poden dissenyar pèptids sintètics (de seqüències conegudes) a fi de poder mesurar la seva activitat. L'assaig d'activitat es realitza mitjançant la fosforilació d'aquest pèptid substrat amb $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Seguidament, es procedeix a la separació del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ que s'ha incorporat al pèptid substrat de la resta del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ que no ha reaccionat gràcies a la unió del ^{32}P -pèptid a una membrana de fosfocel·lulosa. Finalment es realitza la mesura de la radioactivitat incorporada en un comptador beta amb un programa que proporciona cpm de fòsfor. La determinació de l'activitat quinasa es pot realitzar a partir d'un extracte cel·lular total, d'un extracte parcialment purificat (mitjançant polietilenglicol) o de la proteïna d'interès immunoprecipitada. En aquesta tesi s'han

realitzat mesures de l'activitat endògena de l'AMPK en cèl·lules IEC-6 i FAO, prèvia immunoprecipitació de les isoformes catalítiques α_1 i α_2 d'aquesta proteïna quinasa.

6.1 IMMUNOPRECIPITACIÓ.

Aquesta tècnica consisteix en la interacció entre una determinada proteïna i un anticòs específic contra aquesta proteïna i la posterior precipitació dels complexos proteïna-anticòs mitjançant la unió a la proteïna A o G conjugada amb Sepharosa. La immunoprecipitació permetrà doncs l'aïllament de la nostra proteïna d'interès (α_1 AMPK i α_2 AMPK) de la resta del lisat cel·lular de tal manera que es podrà mesurar l'activitat quinasa de la proteïna purificada.

Materials i Reactius:

- Tampó A de lisi: Hepes 50 mM, NaF 50 mM, NaPPi 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Glycerol 10% amb un pH de 7.4, suplementat alhora de la seva utilització amb 1% Tritó X-100 i inhibidors de proteases.
- Anticossos anti- α_1 AMPK i anti- α_2 AMPK: anticossos policlonals, generats en cabra, contra les isoformes α_1 i α_2 de la AMPK cedits per el Dr. Grahame Hardie (Dundee, UK) i caracteritzats prèviament (Woods et al. 1996).
- Proteïna G Sepharosa (Sigma).
- Centrifuga.
- Agitador orbital.

Procediment:

- Preparació del lisat cel·lular:

Es sembren plaques de 100 mm ja que cal una elevada quantitat de proteïna; es necessiten entre 5 i 10 mil·lions de cèl·lules. Una vegada realitzat el tractament desitjat s'aspira el medi de les cèl·lules i ràpidament s'afegeix el tampó A de lisi. En el cas de l'AMPK és important que aquest pas sigui ràpid i en tot moment cal treballar amb gel ja que el simple fet d'eliminar el medi a les cèl·lules provoca una certa activació d'aquesta proteïna quinasa. Amb l'ajuda d'un *scraper* es desenganxen les cèl·lules de la superfície de la placa, es traspassa la suspensió cel·lular a un eppendorf

i es centrifuga durant 15 min a 4500 x g a 4°C. Es recupera el sobrenadant i es valora la concentració de proteïna de cadascuna de les mostres.

- Preparació de la proteïna G Sepharosa:

S'agafa el volum desitjat de la proteïna G sepharosa comercial (uns 20-30 µl per mostra) i es centrifuga 2 min a 16000 x g. S'elimina el sobrenadant i es fan un parell de rentats amb PBS fred que permeten eliminar l'etanol present en el producte original ja que es necessari per la seva conservació. Finalment es resuspèn el pellet de proteïna G en el volum de tampó de lisi apropiat per tal d'afegir una quantitat coneguda de proteïna G sepharosa a cadascuna de les mostres (100 µl/mostra).

- Immunoprecipitació

En primer lloc cal fer un seguit de controls per tal d'establir la quantitat de proteïna i anticòs que s'ha d'utilitzar en cada cas i assegurar-se que s'està immunoprecipitant tota la proteïna d'interès del lisat cel·lular. En el nostre cas, amb les cèl·lules IEC-6 i FAO, es traspassen 300-500 µg de proteïna dels lisats totals de cadascuna de les mostres a analitzar a tubs eppendorfs i s'afegeix 1 µg d'anticòs anti- α_1 AMPK o anti- α_2 AMPK portant la barreja a un volum final de 400 µl amb tampó A de lisi. Perquè tingui lloc la formació del complex es deixen els eppendorfs durant 2 hores a 4°C amb agitació orbital. A continuació, s'afegeixen els 100 µl de la proteïna G sepharosa diluïda i es tornen a incubar les mostres durant 2 hores a 4°C amb agitació orbital. Una vegada finalitzades les incubacions, es centrifuguen les motres durant 2 min a 8000 x g de manera que precipiten els complexos proteïna-anticòs-proteïna G sepharosa. Es realitzen tot un seguit de rentats (de 3 a 5) amb tampó de lisi i PBS. Finalment, després del darrer rentat és important eliminar completament el PBS mitjançant una xeringa de 20G ja que si no es fés les mostres quedarien diluïdes i la mesura d'activitat no seria comparable.

6.2 ASSAIG DE L'ACTIVITAT AMPK.

Reactius i Material:

- Tampó A: Hepes 50 mM, NaF 50 mM, NaPPi 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Glycerol 10% pH de 7.4.
- Solució de MgCl₂ 100 mM.
- Solucions d'AMP (Sigma) 10 mM i ATP (Sigma) 10 mM.
- AMARA: pèptid sintètic (AMARAASAAASARRR).
- [γ -³²P]ATP (Amersham).
- Centrifuga.
- Dissolució d'àcid fosfòric 1% (v/v).
- Paper p81 (Whatman).
- Bany o Termociclador.

- Preparació del Mix de reacció:

Reactiu	Conc.inicials	Conc.finals	Volum/reacció
ATP	10 mM	200 μ M	0.6 μ l
MgCl ₂	100 mM	5 mM	1.5 μ l
AMP	10 mM	200 μ M	0.6 μ l
Pèptid (AMARA)	10 mM	200 μ M	0.6 μ l
[γ - ³² P]ATP	10 mCi/ml		0.2 μ l
Tampó A			Fins 30 μ l

Procediment:

S'afegeixen 30 μ l del mix de reacció a cadascun dels complexos immunoprecipitats i al control negatiu (complex proteïna G-anticòs sense mostra) i s'incuben durant 15 min a 30°C que és la temperatura òptima per l'activitat d'aquesta proteïna quinasa. En el moment just es traspassen els eppendorfs a un recipient amb gel de manera que la reacció s'atura instantàniament. Seguidament es fa un *spin* per tal que precipitin els immunocomplexos, es pipetegen 20 μ l del sobrenadant i es disposen sobre troços de paper Whatman p81 de fosfocel·lulosa prèviament preparats. Una vegada els troços de paper s'han assecat es fan tres rentats amb una dissolució

d'àcid fosfòric al 1% per eliminar la radioactivitat en excès que no ha quedat incorporada en el pèptid. Després dels rentats, es deixen assecat els papers p81 (es poden submergir en acetona de tal manera que l'assecat sigui més ràpid), es traspassen en vials prèviament omplerts amb 4 ml de líquid d'escintil·lació i es procedeix al comptatge de la radioactivitat incorporada en un comptador beta amb un programa que proporciona cpm de fòsfor. En paral·lel cal preparar un vial amb 1 μ l del mix de reacció per tal d'obtenir l'estàndard al que es refereixen els resultats de manera que s'obtenen unitats de pmol d'ATP/mg proteïna.min.

7. IMMUNOCITOQUÍMICA.

Aquesta tècnica, mitjançant la utilització d'anticossos marcats amb fluorocroms, permet la detecció dels antigens d'interès així com la visualització de la seva localització subcel·lular. A més, mitjançant tècniques de doble marcatge, es poden detectar simultàniament dos o més antigens de manera que es pot comparar la distribució relativa de les diferents proteïnes.

7.1 PRETRACTAMENT DE LES MOSTRES.

Materials i Reactius:

- "Cubre-objectes" de 12 mm de vidre.
- PBS pH 7.4 suplementat amb CaCl_2 1 mM i MgCl_2 1 mM.
- PBS pH 7.4 suplementat amb glicina 20 mM.
- Solució de fixació: Solució de paraformaldehid al 3% en PBS suplementat amb sacarosa 0,06 M.
- Solució de permeabilització: PBS-glicina 20 mM suplementat amb Tritó X-100 al 0.1%.
- Solució de bloqueig: BSA 1% en PBS o PBS-Glicina 20 mM-Tritó X-100 al 0.1%.
Serum de cabra al 10% en PBS-Glicina 20 mM-Tritó 0.1%.

Procediment:

Es sembren les cèl·lules en una placa multiwell de 24 pouets sobre uns cobreobjectes prèviament esterilitzats amb ultraviolats i es canvia el medi per medi fresc com a mínim 2-3 hores abans de realitzar la immunocitoquímica. S'extreu el medi

de cultiu i es fan dos rentats de 5 min amb 0.5 ml de PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ per tal d'eliminar les restes de medi que podrien interferir amb la fixació. La presència de calci i magnesi afavoreix l'adhesió de les cèl·lules i evita que es desenganxin de la placa alhora dels rentats. S'aspira bé el PBS mitjançant una bomba de buit, s'afegeix 0.5 ml de la solució de fixació (PFA 3%, sacarosa 0.06 M) i es deixa actuar entre 10 i 20 min. És imprescindible que el mètode de fixació utilitzat mantingui l'estructura cel·lular i la integritat dels antigens de manera que puguin ser eficientment reconeguts. A continuació s'extreu la solució de fixació i es procedeix a permeabilitzar les cèl·lules amb una solució de PBS-glicina 20 mM suplementada amb Tritó X-100 a una concentració de 0.1% i es deixa actuar 10min. És recomanable mantenir el tritó en els passos següents a fi d'afavorir l'entrada de l'anticòs. Finalment per tal d'evitar les unions inespecífiques de l'anticòs amb diferents epítops cel·lulars cal incubar les cèl·lules amb la solució de bloqueig, una solució rica en proteïnes. Així doncs s'afegeix 0.5 ml d'una solució formada per albúmina sèrica bovina al 1% o sèrum de cabra al 10% i es deixa la placa en agitació durant un mínim de 30 min a temperatura ambient.

7.2 IMMUNODETECCIÓ.

Material i Reactius:

- Solució de bloqueig: BSA 1% en PBS o en PBS-glicina 20 mM-Tritó 0,1%.
Serum de cabra al 10% en PBS-Gly20 mM-Tritó 0,1%.
- portaobjectes (Afora).
- medi de muntatge: immunofluore (ICN).

Anticossos utilitzats i condicions d'ús:

- **Anti-c-Myc (A-14) sc-789:** Anticòs policlonal dissenyat contra l'extrem carboxi-terminal de c-Myc d'origen humà i conjugat amb la fluoresceïna. S'utilitza a una concentració de 1.5 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology. Inc.).

Immunogen	Orgànul	Concentració	Dilució d'ús	Casa comercial
Caveolin I	Caveoles	250 µg/ml	1:100	Transduction BD Biosciences
EELI	Endosomes primaris	250 µg/ml	1:1000	Transduction BD Biosciences
GM130	Golgi	250 µg/ml	1:1000	Transduction BD Biosciences

Com a marcador de reticle endoplasmàtic, en comptes de realitzar una immunocitoquímica amb un anticòs específic, s'ha utilitzat un plàsmid que conté una seqüència KDEL de retenció al reticle endoplasmàtic, **pDsRed2-ER** (BD Living colors). La longitud d'ona d'excitació és de 558 nm i la d'emissió és 583 nm, i es cotransfecta juntament amb el plàsmid d'interès.

Marcadors fluorescents:

Producte	Excitació	Emissió	Concentració	Dilució ús	Casa comercial
Phalloidin-TRITC	555	580	0.5 mg/ml	1:2000	Sigma
Toto-3iodide	642	660	1 mg/ml	1:500	MolecularProbes

Anticòssos secundaris:

Producte	Excitació	Emissió	Concentració	Dilució d'ús	Casa comercial
Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbitF (ab')₂	495	519	2 mg/ml	1:500	Molecular Probes
Alexa Fluor 546 Goat anti-mouse Ig G	556	573	2 mg/ml	1:500	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 Goat anti-rabbit F (ab')₂	578	603	2 mg/ml	1:500	Molecular Probes

Procediment:

En primer lloc s'han de tenir en compte tota una sèrie de controls necessaris que ens permetran assegurar-nos que el senyal que s'observa en el microscopi de fluorescència és específic i reflecteix la localització subcel·lular de la proteïna d'interès. Així doncs si es tracta de la primera vegada que s'usa la immunocitoquímica amb la línia cel·lular d'estudi, com és el nostre cas, cal fer un control d'autofluorescència

(sense incubar amb cap anticòs) i s'ha de fer un control només amb l'anticòs secundari (sense incubar prèviament les cèl·lules amb l'anticòs primari) per tal d'assegurar-nos que aquest no s'uneix per se a cap antigen cel·lular. Així doncs una vegada fet el bloqueig s'afegeixen 50 µl de la dissolució d'anticòs primari tenint en compte les dilucions necessàries en cada cas concret i es manté a temperatura ambient durant una hora. A continuació s'aspira la dissolució d'anticòs primari i es fan tres rentats amb 0.5 ml de la solució de bloqueig per eliminar l'anticòs en excés. Seguidament s'afegeixen 50 µl de la dissolució d'anticòs secundari necessari en cada cas i de la mateixa manera que per l'anticòs primari s'incuben les cèl·lules durant 1 hora a temperatura ambient, però ara cal que estiguin ben tapades de la llum amb paper d'alumini. Es fan tres rentats de 10 min amb PBS i finalment es procedeix a fer el muntatge sobre els porta objectes. Es posa una gota de medi de muntatge sobre un porta i es diposita el cobreobjecte amb l'ajuda d'unes pinces sempre amb les cèl·lules en contacte amb el porta i evitant que es formin bombolles. Cal vigilar durant el muntatge que les cèl·lules tinguin el mínim contacte amb la llum. Es deixen tots els portes en una safata, sempre tapada amb paper de plata, en posició plana perquè el medi de muntatge gelifiqui. Aproximadament 1 hora després es guarda la safata a la nevera i les mostres ja estan llestes per poder ser observades al microscopi de fluorescència.

7.3 ANÀLISI DELS RESULTATS PER MICROSCÒPIA.

La fluorescència és l'emissió luminiscent que resulta de l'absorció de fotons. El microscopi de fluorescència permet examinar de manera selectiva antigens marcats amb agents fluorescents, anomenats fluoròfors: s'il·luminen amb la llum filtrada de la longitud d'ona absorvida i es visualitzen amb la longitud d'ona emesa.

A diferència de la microscòpia òptica convencional, la microscòpia confocal permet il·luminar un petit punt de la mostra a una determinada profunditat, mitjançant un joc de diafragmes. El contrast és molt millor i usa tècniques d'anàlisi d'imatges electròniques que augmenten la sensibilitat i la resolució de les imatges obtingudes per immunofluorescència. D'aquesta manera el microscopi confocal és capaç de capturar imatges i senyals fluorescents de seccions fines de la mostra (0.2µm) representant plans senzills d'una mostra gruixuda. Addicionalment, és capaç de reconstruir una visió espacial de la mostra sumant les imatges obtingudes a diferents profunditats, oferint una imatge molt més nítida de la que s'obté quan s'utilitzen microscopis

convencionals. Els microscopis més usats per immunofluorescència són microscopis confocals de làser-scanning. El làser aporta una il·luminació intensa en un rang molt estret de longituds d'ones. La mostra és rastrejada pel làser formant-se la imatge general en el monitor de l'ordinador acoplat al microscopi. Per a l'obtenció de les imatges d'aquesta tesi s'ha utilitzat el microscopi confocal de làser-scanning (Olympus, IX-70) del servei científico-tècnics de la Universitat de Barcelona utilitzant un objectiu d'immersió de 60X.

8. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE RNA.

L'extrema fragilitat del RNA i la presència de RNAases endògenes i exògenes fa que sigui necessari prendre tota una sèrie de mesures abans i durant la seva manipulació a fi d'evitar la contaminació i degradació de les mostres. És molt important treballar amb guants i utilitzar material lliure de RNAases. Així doncs, el material de vidre ha d'estar autoclavat, així com les puntes i pipetes i les dissolucions han de preparar-se amb aigua tractada amb DEPC, un inhibidor de RNAases.

8.1 OBTENCIÓ DE RNA TOTAL DE CÈL·LULES EN CULTIU I DE TEIXIT.

Actualment existeixen diferents alternatives per a la purificació de RNA a partir de qualsevol tipus de mostra de partida. Els mètodes clàssics de purificació, com el descrit per Chomzynsky i Sacchi (1987) permeten obtenir bons rendiments. Tot i així en el nostre grup s'utilitzen kits comercials amb els que s'obtenen rendiments equivalents als dels mètodes clàssics però ofereixen un avantatge ja que el temps necessari per realitzar la purificació és molt inferior.

Per a extreure RNA tant de cèl·lules en cultiu com de teixit es va usar el **kit SV Total RNA Isolation System** (Promega). Quan es treballa amb línies cel·lulars el material de partida són generalment plaques de 100 mm o 60 mm, en les quals després d'un parell de rentats amb PBS fred s'afegeix el tampó de lisi. En canvi quan es treballa amb teixit és necessari un pas previ per tal d'homogeneïtzar-lo. Un cop extret el teixit d'interès de l'animal cal netejar-lo amb una dissolució de NaCl al 0.9% i congelar-lo ràpidament en nitrogen líquid per poder-lo guardar a -80°C fins al moment de la seva utilització. Sense deixar que es descongeli completament es trenca el teixit en trocets d'aproximadament 20-30 mg. Es dipositen en tubs eppendorf estèrils de 2

ml, s'afegeix el tampó de lisi i s'homogeneïtza mitjançant el polítró. És important mantenir en tot moment les mostres en gel.

Procediment:

El mètode es basa en les propietats disruptives i protectores dels tiocianat de guanidina (GTC) i el β -mercaptoetanol per inactivat les ribonucleases presents en els extractes cel·lulars (veure protocol comercial). En l'associació amb el SDS, el GTC disgrega els complexos nucleoproteics i permet així l'aïllament del RNA lliure de proteïnes. Després d'una centrifugació del lisat cel·lular, el RNA és precipitat selectivament i purificat mitjançant una columna de sílice a la qual queda adherit. Es realitzen diversos rentats i finalment s'elueix amb l'addició d'aigua lliure de nucleases. És aconsellable mantenir les mostres a -80°C per mantenir la seva integritat.

La majoria de mètodes utilitzats actualment per a la purificació de RNA deixen una certa quantitat de DNA contaminant. Aquest DNA pot servir de motlle en la reacció de PCR i produir falsos positius per això cal tractar el RNA amb DNAasa I per tal d'obtenir un RNA lliure de DNA. En el nostre cas no és necessari ja que el kit **SV Total RNA Isolation System** (Promega) ja presenta un pas on s'elimina aquest DNA residual mitjançant un tractament amb DNAasa I. Així doncs, el que obtenim és un RNA sense contaminacions i a punt per treballar-hi.

8.2 ANÀLISI DE LA QUALITAT I QUANTITAT DE RNA PURIFICAT.

8.2.1 Quantificació per espectrofotometria.

Es dilueix la mostra en aigua-DEPC (normalment entre 1 i 5 μl de mostra en 400 μl d'aigua-DEPC) i es mesura l'absorbància a 260 nm i 280 nm. És necessari l'ús de cubetes de quars ja que les cubetes de plàstic no deixen traspasar la llum d'aquestes longituds d'ona. Els àcids nucleics presenten la màxima absorbància a 260 nm, així doncs el valor obtingut en aquesta λ permetrà calcular la concentració de RNA purificat. Per altra banda el valor obtingut a 280 nm (que correspon a la λ d'absorció de les proteïnes) permetrà tenir una noció de la puresa de la mostra. El quocient entre $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ s'ha de mantenir entre 1.8 i 2.0 per garantir la qualitat d'aquesta.

$$[RNA] = \frac{D.O(260nm)}{\epsilon} \times \frac{(400+x)\mu l}{x \mu l}$$

Aplicant aquesta equació s'obté la concentració de qualsevol àcid nucleic. El valor x fa referència al volum de mostra afegit a la cubeta. El valor ϵ és una constant i és variable en funció de si l'àcid nucleic mesurat és de cadena doble o senzilla. Així per RNA i DNA de cadena senzilla la ϵ té una valor de 25 μ l/ μ g, en canvi si es mesura DNA de cadena doble té un valor de 20 μ l/ μ g.

8.2.2 Electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant al 1%.

Aquest pas és necessari ja que permet comprovar la integritat del RNA aïllat abans de prosequir amb la síntesi de cDNA. Quan es corre una mostra de RNA total en un gel d'agarosa el que s'espera són dues bandes clarament diferenciades que corresponen als RNAs ribosòmics de 28S i 18S. Si el RNA estigués degradat les dues bandes ribosomals apareixerien més difoses i s'observaria un augment de la intensitat del *smear* degut a la formació de fragments petits (Pappu et al., 1988)

Materials i Reactius:

- Cubeta Gibco-BRL Model 200.
- Tampó d'electroforesi MOPS 10X. Es dissolen 41.2 g MOPS i 6.58 g d'acetat sòdic anhidre i 20 ml d'EDTA 0.5M pH=8 en 800 ml d'aigua destil·lada. S'ajusta el pH amb NaOH i s'enrasa a 1 l. Es guarda a temperatura ambient.
- Agarosa (BioWhittaker).
- Formaldehid (com que el formaldehid és corrosiu i irrita les vies respiratòries es recomana treballar sota una campana d'extracció de gasos).
- Aigua bidestil·lada.
- Solució de càrrega:
 - 157.5 μ l de formamida desionitzada
 - 57 μ l de formaldehid
 - 33 μ l de MOPS 10X
 - 1.5 μ l de bromur d'etidi (10mg/ml) (Sigma). El bromur d'etidi és un mutagen i un potencial carcinogen de manera que la seva manipulació s'ha de realitzar sempre amb guants.

- 9 µl de loading buffer D. Per a un volum de 20 ml es dissolen 10 g de glicerol, 80 mg de cianol xilè i 80 mg de blau de bromofenol i finalment s'afegeix 40 µl d'EDTA 0.5 M.

Procediment:

Es barregen 0.3 g d'agarosa en 21.4 ml d'aigua bidestil·lada i 3.0 ml de MOPS 10X (les quantitats varien en funció del tipus de cubeta que s'utilitza) i es dissolen al microones fins que no queda cap grumoll d'agarosa. Es deixa refredar i s'afegeixen 5.6 ml de formaldehid. Prèviament cal muntar la cubeta col·locant la pinta adient segons el nombre de mostres i el volum que es vol carregar.

Les mostres es preparen afegint 3 vegades el seu volum de tampó de càrrega desnaturalitzant. En un gel d'agarosa a l'1% és aconsellable no carregar més de 20 µg de RNA, ja que es perdria resolució. Una vegada preparades s'incuben durant 5 min a 65°C per tal d'afavorir la desnaturalització del RNA. S'omple la cubeta de tampó MOPS 1X i es carrega el gel. Es connecta la font aplicant un voltatge de 50 V i s'espera 4 o 5 hores per tenir el gel resolt. S'observa el gel sobre una font d'UV, ja que el bromur d'etidi present en el gel s'uneix als àcids nucleics i emet fluorescència en ésser il·luminat amb llum UV. En aquest cas no calen marcadors de pesos moleculars ja que coneixem el patró de les bandes ribosomals i tan sols volem un resultat qualitatiu.

8.3 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA I TÈCNiques AFINS.

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) és un mètode *in vitro* que permet l'amplificació enzimàtica del DNA (Mullis i col.1986). Consisteix en una reacció on s'afegeix un motlle de DNA o *template*, un enzim termoestable amb activitat DNA polimerasa, dNTPs, una parella d'encebadors o *primers* i el tampó adient. Es col·loca la barreja en un termociclador elaborant un programa específic i es deixa que tingui lloc la reacció. Com que els productes d'extensió dels primers sintetitzats a cada cicle poden servir com a motlle en el següent, el nombre de còpies del DNA diana es duplica aproximadament a cada cicle, així doncs 20 cicles de PCR representen aproximadament un mil·lió de còpies del DNA diana.

La combinació de les tècniques de retrotranscripció i PCR generen una nova tècnica, la RT-PCR, que permet una nova manera d'analitzar el RNA. En la actualitat, la introducció de mètodes de seguiment de l'aparició del segment diana de la tècnica de PCR ha generat un nou concepte, la PCR a temps real. Aquesta nova tècnica no només permet aconseguir una millor sensibilitat i fiabilitat dels resultats, sinó que a més permet la quantificació absoluta del nombre de còpies del gen d'interès presents a la mostra.

8.3.1 Síntesi de cDNA per retrotranscripció del mRNA.

Com que el RNA no pot servir de motlle per la PCR, és necessari realitzar una retrotranscripció a fi d'obtenir el cDNA. Per a la síntesi de cDNA es pot utilitzar de motlle tant el RNA total com el mRNA. L'ús de mRNA augmenta l'amplificació de mRNAs poc abundants, ja que la proporció de mRNA en la preparació de RNA total és aproximadament de l'1%. La reacció de síntesi de cDNA requereix una retrotranscriptasa, en el nostre cas hem utilitzat la M-MLV, que procedeix del virus de la leucèmia murina de Moloney, així com la presència d'un cert tipus de *primers*. Existeixen tres tipus de primers que poden ser utilitzats durant la retrotranscripció i l'elecció d'un o altre afectarà al tamany i a l'especificitat del cDNA.

- (a) Oligo(dT)12-18: S'uneixen a la cua de poli(A) endògena de l'extrem 3' dels mRNAs de mamífers. Acostuma a generar cDNAs complets (full-length).
- (b) Hexanucleòtids aleatoris: S'uneixen a diversos llocs del RNA generant cDNAs curts. Són ideals per evitar estructures secundàries en el motlle. Transcriuen de manera eficaç les regions 5' del mRNA.
- (c) Oligonucleòtids específics: s'uneixen únicament al RNA d'interès.

Procediment:

La síntesi de cDNA es realitza a partir d'1 µg de RNA total utilitzant oligonucleòtids aleatoris com a primers de la reacció de la M-MLV. Aquesta reacció s'inicia amb la desnaturalització del RNA a 65°C durant 5 min, i després el RNA es deixa en gel i s'afegeix la barreja de reacció que conté el tampó de l'enzim, DTT 10 µM, dNTPs 500 µM cadascun, random hexamer 10 µg/ml, 0.75 U/µl de RNAsyn (Promega) i 7,2 U/µl de M-MLVRT (Gibco). La reacció té lloc durant 2 hores a 37°C i finalitza amb la inactivació de l'enzim durant 10 min a 65°C.

8.3.2 Reacció d'amplificació: PCR (*Polimerase chain reaction*).

Com hem comentat anteriorment aquesta tècnica permet l'amplificació enzimàtica del DNA i l'hem utilitzat per determinar l'expressió de determinats gens a les mostres d'interès. Es col·loca el DNA d'interès, un enzim termoestable amb activitat DNA polimerasa (Taq polimerasa de Promega), dNTPs (Promega), una parella d'encebadors o *primers* i el tampó adient en un termociclador elaborant un programa específic tenint en compte els paràmetres físico-químics i es deixa que tingui lloc la reacció. Finalment el rendiment i l'especificitat d'aquesta es comproven en un gel d'agarosa no desnaturalitzant.

Reactius i materials:

- Taq Polymerasa (Promega).
- 10X cDNA PCR tampó de reacció lliure de MgCl₂.
- aigua mili-Q. Es requereix aigua de màxima qualitat per evitar qualsevol tipus de contaminació.
- MgCl₂ 25 mM (Promega).
- dNTPs Mix 10 mM (2.5 mM de cada un: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega).
- Primers 20 µM.
- Termociclador.
- Puntetes de PCR (amb filtre) i material de plàstic estèril no reciclable.

• Primers utilitzats

Gens	Oligo Forward (5'-3')	Oligo Reverse (5'-3')	Tm (°C)	fragment (kb)
rCNT1	ttgcaggcatctgtgttctct	caacgcacaagggcgccatgac	55	0.57
rCNT2	gctcaaaggccagagcagctgatc	cagcttcaactccctcctgtctt	57	0.69
rENT1	atgacaaccagtcacc	tccttctgttaagggcacttgtg	55	1.37
rENT2	aacaactgggtgacactgctgt	ggctactcgtgtctctcacca	52	1.04
hENT1	gctgaaggaccgggggagc	tggagaaggcaaaggcagcca	55	0,5
hENT2	tccaggcccaagctcagga	ggaaccgcaggcagaccagc	55	0,43
hCNT1	ctgtgtgggtcctcaccttctg	ggagagggccaaggcacaaggg	50	0,8
hCNT2	caaaggccagagcagctgatc	ctttacccctcctcactctt	50	0,61
hCNT3	gaaacatgtttgactaccacag	gtggagttgaaggcattctctaaaacgt	52	0,48

- Reacció de PCR.

És molt important treballar sempre amb guants, amb solucions completament pures i amb material de plàstic estèril no reciclable per tal d'evitar la presència de qualsevol molècula d'àcid nucleic contaminant ja que és una tècnica molt sensible i podríem fàcilment obtenir un fals positiu. Per aquest motiu aquestes reaccions van sempre acompanyades de controls negatius (on afegim tots els reactius excepte el *template*).

Per preparar la barreja de reacció s'afegeix: 5 μ l de tampó 10X, 3 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de cadascun dels primers (a una concentració de 20 μ M), 2.5-5 μ l de cDNA i s'ajusta fins a 49.5 μ l amb aigua mili-Q. Abans d'afegir la Taq polimerasa cal fer el que s'anomena un *Hot Star*; és a dir s'escalfa prèviament la mostra a 94°C durant 5 minuts. La Taq polimerasa té certa activitat a temperatura ambient, fet que juntament amb les baixes condicions d'astringència a aquesta temperatura, provoca un aparellament dels encebadors en zones de baixa complementarietat i la síntesi d'aquests fragments. Això implica per una banda la reducció de l'especificitat de la reacció i a més, una disminució de l'eficiència de la PCR per competència d'aquest producte generat amb el motlle original. Per evitar aquest efecte en primer lloc s'escalfen les mostres durant 5 minuts a 94°C perquè es produeixi l'aparellament o *annealing* correcte, a continuació es fa baixar la temperatura a 80°C i en aquest moment s'afegeixen 0.5 μ l d'enzim a la barreja i finalment es comença la PCR. El programa usat fou de 35 cicles d'amplificació a 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 3 min i 1 cicle d'extensió a 72°C 15min (es manté la mostra a 4°C per aturar la reacció).

- Gel d'agarosa no desnaturalitzant al 1%.

L'electroforesi en gel d'agarosa és un mètode simple, ràpid i eficient per separar i identificar fragments de DNA els quals es separen en funció del seu tamany. Generalment es treballa a una concentració d'agarosa de l'1% però si es volen separar fragments petits de DNA (inferior a 300pb) és recomanable augmentar la concentració d'agarosa.

Materials i Reactius:

- Agarosa (BMA).
- Tampó TBE 10X. Per preparar un litre calen 108 g de Tris Base, 55 g d'àcid bòric i en darrer lloc s'han d'afegir 40 ml d'EDTA 0.5M pH 8.
- Loading Dye. Es dissolen 4 g de Sacarosa, 25 mg de cianol xilè i 25 mg de blau de Bromofenol en 20 ml d'aigua destil·lada. Es conserva a 4°C.
- Bromur d'etidi (10 mg/ml) (Sigma).
- 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

Procediment:

Es dissolen 0.3 g d'agarosa en 30 ml de TBE 1X al microones, es deixa refredar una mica i s'afegeixen 1.5 µl de Bromur d'Etidi. S'aboca a la cubeta, es col·loca la pinta i es deixa polimeritzar. Per altra banda les mostres es barregen amb Loading Dye (proporció 9:1) i es carreguen juntament amb el marcador de pes molecular que ens permetrà identificar la banda esperada. A diferència d'un gel desnaturalitzant en aquest cas poden usar-se voltatges més elevats (fins 150V), d'aquesta manera el gel es resol en menys d'una hora.

8.3.3 PCR a temps real.

A diferència de la PCR convencional, aquesta tècnica permet la detecció del producte de PCR a mesura que s'acumula i per tant, proporciona un mètode suficientment sensible per quantificar el nombre de còpies d'una mostra o bé comparar els nivells d'expressió entre diferents mostres. Existeixen dos tipus de tecnologia que permeten la detecció a temps reals dels productes de PCR: la basada en intercaladors de la doble cadena (com el bromur d'etidi, el Hoechst 33258 o, més actual, el SYBR Green) i la basada en sondes fluorogèniques (o tecnologia TaqMan). De les dues opcions, la darrera és amb diferència, la més específica i la que dona resultats més fiables i reproduïbles, per això l'hem escollit per realitzar els nostres estudis de regulació a nivell transcripcional. La documentació aquí recollida prové dels informes tècnics suministrats per Applied Biosystems, la majoria dels quals es troben disponibles a través de la seva pàgina Web:

(<http://www.appliedbiosystems.com/techsupp>).

La tecnologia TaqMan es basa en la utilització d'una sonda que consisteix en un oligonucleòtid que presenta dos tipus de molècules unides a la seva estructura: un marcador fluorescent (o *reporter*) a 5' i un reductor de l'emissió (o *quencher*) a 3'. Quan la sonda es troba intacte, la proximitat del *quencher* redueix la fluorescència emesa per el *reporter* degut al fenomen de FRET (*Förster resonance energy transfer*). Si la seqüència diana es troba a la mostra analitzada, la sonda s'uneix *downstream* d'un dels *primers* i es degrada degut a l'activitat 5'-nucleasa de la Taq DNA polimerasa a mesura que s'allarga el *primer*. La degradació de la sonda separa el *reporter* del *quencher*, incrementant així el senyal del *reporter*. A cada cicle, s'alliberen progressivament més molècules de *reporter*, produint-se un augment de la fluorescència proporcional a la quantitat d'amplicó produït. Una dels avantatges d'aquest tipus de tecnologia és la necessitat d'una hibridació específica entre la sonda i la diana per generar un senyal fluorescent, de tal manera que l'amplificació produïda per unions incorrectes dels *primers* o la formació de dímers de *primers* no genera cap tipus de senyal.

- Quantificació relativa de l'expressió gènica

En aquesta tesi s'ha utilitzat la PCR a Temps Real en l'estudi de la regulació de l'expressió gènica de CNT1, CNT2, ENT1 i ENT2 en la línia cel·lular IEC-6 per diferents efectors (glucocorticoids i factors de creixement).

Com que l'objectiu no era obtenir una quantificació absoluta del nombre de còpies de cada missatger, es va optar per una quantificació de tipus relatiu. En aquest tipus d'aproximació, les reaccions es caracteritzen pel cicle en el que l'amplificació d'un determinat producte es detecta per primera vegada i no per la quantitat de producte acumulat després d'un determinat nombre de cicles. Quantes més còpies d'una determinada diana existeixin a l'inici, abans es detectarà l'increment de la fluorescència emesa. En la **figura 11** es mostra una representació de l'amplificació (*amplification plot*) representativa i es mostren els termes utilitzats en l'anàlisi quantitatiu. La representació de l'amplificació mostra la relació entre la fluorescència detectada i el nombre de cicles. Durant els primers cicles de la PCR pràcticament no s'observen canvis en la fluorescència, aquest fet defineix la línia base (*baseline*) en la representació. Un increment de la fluorescència per sobre d'aquesta línia indica la detecció del producte de PCR acumulat. Es fixa un llindar (*threshold*) de fluorescència

per sobre la línia base, d'aquesta manera es denomina el parametre C_t (cicle llindar o *threshold*) com el cicle de fluorescència en el que es supera aquest llindar fixat.

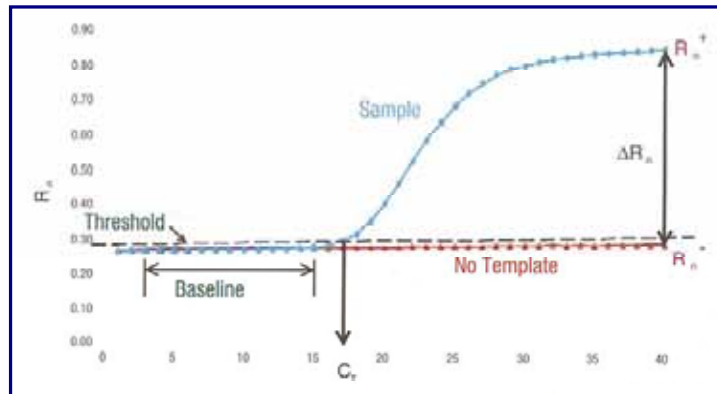


Figura 11: Representació d'una amplifcació única model, on es mostren els termes habituals de la PCR a temps real quantitativa.

És possible realitzar una quantificació relativa del missatger diana mitjançant la comparació dels seus C_t . Es tracta d'una tècnica equivalent a la PCR semiquantitativa i com en aquesta s'utilitza un control endogen que actua d'element normalitzador. El control endogen ha de mantenir-se invariable entre les diferents condicions experimentals, raó per la qual s'acostuma a utilitzar els denominats *housekeeping genes*. En el nostre estudi hem escullit com a control endogen el gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH).

La relació entre el C_t de la diana i el del control endogen proporciona un valor C_t normalitzat (C_{t_n}) de la diana, que serveix per estandaritzar la quantitat de RNA o DNA afegit a la reacció. Aquest valor no presenta cap tipus d'unitat i pot ser utilitzat per la comparació relativa de la quantitat de diana entre les diferents mostres. És necessari designar la mostra que proporcioni el valor 1 d'expressió a fi de poder comparar els resultats. Existeixen dues alternatives: utilitzar una mostra calibrador a la qual es refereixen tots els resultats, o bé, donar el valor 1 als control de cada experiement, opció escollida per realitzar els nostres estudis.

- Validació del mètode comparatiu

En primer lloc, abans d'utilitzar el mètode de quantificació relativa per comparació de C_t , és necessari realitzar un experiment de validació amb l'objectiu de demostrar que les eficiències d'amplifcació del gen diana i del control endogen són

equivalents. Un dels mètodes més sensibles consisteix en estudiar la manera en que varia la diferència entre els *Ct* dels dos (ΔCt) amb la dilució del motlle (cDNA). El valor absolut del pendent de la representació del logaritme de la concentració inicial del motlle davant ΔCt no ha de ser significativament diferent de zero. Això és equivalent a dir que les rectes estàndar corresponents als dos amplicons son paral·leles, entenent com a recte estàndar aquella que relaciona la concentració inicial del motlle amb el valor de *Ct*. Si les eficiències dels dos sistemes no fossin equivalents, no es podria realitzar una comparació d'aquest tipus i seria necessari treballar amb rectes estàndar a cada placa.

- Disseny de primers i sondes

Els primers i sondes necessaris per realitzar els assaigs de TaqMan es dissenyen mitjançant el software Primer Express d'Applied Biosystems. Una vegada dissenyats és necessari optimitzar les concentracions mitjançant la realització d'un banc de concentracions.

Diana	Còdic Genebank	Primer Forward	Primer Reverse	Sonda
rCNT1	U10279	262-283	327-307	305-285
rCNT2	AY029302	785-803	854-836	805-831
rENT1	AF015304	765-785	836-817	807-789
rENT2	AF015305	923-943	990-979	968-945
rGAPDH	M17701	30-50	115-91	1204-1228
hCNT1	U62968	93-113	164-146	116-143
hGAPDH		Comercial (Applied Biosystems)		

- Paràmetres universals de PCR a temps real

Materials i Reactius:

Tots els materials i reactius utilitzats són d'Applied Biosystems:

- Aparell ABI PRISM 7700 Sequence Detection System
- Sondes Taqman i primers
- TaqMan Universal PCR Master Mix
- ABI PRISM Optical Adhesive Cover Starter Pack
- ABI PRISM 96-well Optical Reaction Plate with Barcode

Procediment:

Els assaigs dissenyats utilitzant el software i els reactius Master Mix d'Applied Biosystems poden ser realitzats utilitzant uns paràmetres de PCR universals

Pre-PCR	Temps	Temperatura
AmpErase UNG	2min	50°C
Hot Start	10min	95°C
PCR (40cicles)	Temps	Temperatura
Desnaturalització	15s	95°C
Unió/Extensió	1min	60°C

- Anàlisi dels resultats pel mètode de comparació de Ct

En els següents punts es detalla com s'han calculat els resultats dels experiments realitzats mitjançant aquesta tècnica

- 1.- Calcular la C_T promig de cada mostra per cadascuna de les dianes y del control endogen (a cadascuna de les plaques es disposa de cada mostra per duplicat).
- 2.- Calcular ΔC_T com C_T diana - C_T control endogen.
- 3.- L'error estàndar (SE) de ΔC_T pot ser calculat com $\sqrt{(SE_{diana})^2 + (SE_{control})^2}$, sempre que el nombre de rèpliques sigui el mateix pels dos elements.
- 4.- Calcular $\Delta\Delta C_T$ com ΔC_T mostra- ΔC_T mostra control. El càlcul de $\Delta\Delta C_T$ no es més que la substracció d'una constant arbitrària, de manera que el SE de $\Delta\Delta C_T$ és el mateix que el de ΔC_T diana.
- 5.- Calcular $2^{-\Delta\Delta C_T}$ que representa l'expressió de la mostra relativa a la mostra control escollida. El SE és el mateix que el de $\Delta\Delta C_T$.

9. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.

La biologia molecular compren un gran nombre de tècniques que permeten manipular fragments de DNA, crear fragments recombinants utilitzant enzims de restricció i l'amplificació d'aquests fragments mitjançant la transformació en bacteris, així com la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa, PCR. En aquest capítol es detallaran els protocols utilitzats en la generació de diverses construccions del

transportador rCNT2 que ens han permès estudiar la seva localització subcel·lular i tràfic a membrana.

9.1 CREIXEMENT BACTERIÀ I OBTENCIÓ DE BACTERIS COMPETENTS.

Per tal de poder transformar bacteris amb plàsmids, és a dir introduir fragments de DNA en el bacteri i així poder obtenir i aïllar els DNAs plasmídics d'interès, calen bacteris competents. Existeixen algunes soques de bacteris comercials ja competents que cal guardar congelats a -80°C però nosaltres hem utilitzat *Escherichia coli* fetes competents per nosaltres. Tots els processos que requereixin condicions d'esterilitat es fan treballant sota la flama d'un encenedor Bunsen i s'utilitza material prèviament esterilitzat amb l'autoclau.

Reactius i Materials:

- Stock de bacteris (*E.coli*) congelades en glicerol 20% a -80°C .
- Medi líquid Luria-Broth (LB) estèril (4°C): format per triptona 1% (p/v), extracte de llevat 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v) i NaOH 2 mM a pH 7. Autoclavat i emmagatzemat a 4°C .
- Medi SOB: format per triptona 2% (p/v), extracte de llevat 0.5%, NaCl 10 mM i KCl 2.5 mM. S'autoclava i es suplementa amb 2.5 ml de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 M i 2.5 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 M, prèviament esterilitzats per filtració. Es conserva a 4°C .
- Medi RF1 estèril per filtració (1l): RbCl 12 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9.9 g, KAc 1 M pH 7.5 30 ml, CaCl_2 1.11 g, glicerol 150 g. S'ajusta el pH a 5.8 amb àcid acètic 0.2 M.
- Medi RF2 estèril per filtració (1l): MOPS 0.5 M pH 6.8 20 ml, RbCl 1.2 g, CaCl_2 8.32 g, glicerol 172.4 ml al 87% (Merck). S'ajusta el pH a 6.8 amb àcid acètic 0.2 M.
- Tubs de propilè de creixement de bacteris.

Procediment:

S'inoculen cèl·lules *E.coli* de la soca XL1-Blue en 3 ml de medi líquid LB mitjançant una punta estèril i s'incuben en agitació a 37°C durant tota la nit. És aconsellable incubar un tub amb medi sense bacteris a fi de tenir un control d'esterilitat. S'inocula 1 ml del medi anterior en 50 ml de medi SOB en un Erlenmeyer estèril de 500 ml i es manté en agitació a 37°C . Cada 15 o 30 min s'agafen alíquotes

del creixement, sempre sota la flama i amb puntes estèrils, i es mesura l'absorbància a 550 nm mitjançant un espectofotòmetre. Quan la densitat òptica arriba a valors de 0.375-0.4 és el moment en què el cultiu es troba en creixement exponencial i òptim per fer competents. En aquest punt, es traspasa el creixement a dos tubs de polipropilè estèril Nalgene i es deixen en gel 15 min. Es centrifuguen a 3000 rpm (Sorvall SA-600) 15 min a 4°C, es decanta el sobrenadant i es resuspèn el pellet de cèl·lules suaument amb el vòrtex a un terç del volum inicial amb medi RF1. S'incuben els tubs 20 min en gel i es sedimenten les cèl·lules amb una altre centrifugació a 3000 rpm de 15 min a 4°C. Es descarta el sobrenadant i es resuspèn el pellet en un volum 1/12.5 del valor inicial amb medi RF2. S'incuben finalment amb gel 15 min més i ja estan llestes per congelar o bé per ser transformades. Per congelar-les s'aliquoten en tubs eppendorfs en volums petits (100-200 µl) i es congelen directament en N₂ líquid per després ser emmagatzemades a -80°C.

9.2 TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS.

El protocol de transformació de cèl·lules competents es basa en el xoc tèrmic. És a dir que es barreja el DNA amb les bacteris en fred, se les sotmet a un xoc ràpid per calor i tot seguit s'incuben en gel. Això permet als bacteris d'incorporar el fragment de DNA o el plàsmid desitjat.

Material i Reactius:

- Bacteris competents.
- Plàsmid o producte de lligació.
- Medi SOB.
- Medi SOC: Format per SOB autoclavat i suplementat amb glucosa estèril a una concentració final de 20 mM.
- MgSO₄ 1 M estèril per filtració.
- Medi Líquid Luria-Both (LB) estèril.
- Plaques de Agar/LB suplementades amb ampicilina o kanamicina (50-100 µg/ml). S'afegeix al medi LB líquid un 1.5% d'agar bacteriològic americà (Pronadisa) (p/v), s'autoclava i una vegada s'ha refredat fins uns 60°C s'afegeix l'antibiòtic. El medi obtingut es reparteix en les plaques i es deixa solidificar. Es conserven a 4°C fins a la seva utilització.
- Tubs de propilè de creixement de bacteris.

- Bany a 42°C, incubador a 37°C.
- Nansa de sembra.

Procediment:

Es descongelen en gel les alíquotes de cèl·lules competents que s'hagin d'utilitzar, generalment es fan servir de 50 µl a 100 µl per mostra. Quan es volen transformar plàsmids purificats per mini-prep o midi-prep cal una quantitat de 50 a 200 ng de DNA. En el cas de transformar un producte de lligació es fa amb la totalitat de la reacció, típicament 5-10 µl. Es barreja manualment amb suavitat i s'incuba en gel 30min. El xoc tèrmic es realitza a 42°C durant exactament 1 min i 45 s (el temps pot variar segons la soca de competents). Immediatament després es posen els tubs 2 min en gel, s'afegeix 1 ml de LB suplementat amb MgSO₄ 20 mM estèril i s'incuba a 37°C amb agitació durant 1 hora.

Finalitzada la incubació en la que té lloc el creixement bacterià en medi líquid lliure d'antibiòtics es procedeix a la sembra en plaques d'agar-LB que continguin l'antibiòtic adequat per seleccionar aquells bacteris que hagin incorporat el plàsmid. S'afegeixen diferents volums de la transformació per aconseguir un creixement en el que es puguin picar colònies aïllades. S'extén el líquid mitjançant una nansa de sembra, que cal esterilitzar amb etanol 70% i a la flama a cada ús, i s'incuben les plaques tota la nit a 37°C. A partir dels clons individuals es pot fer un segon creixement de tota la nit a 37°C en medi LB suplementat amb l'antibiòtic adequat a fi de poder aïllar el plàsmid i/o congelar les bactèries que el continguin.

9.3 AÏLLAMENT DEL DNA PLASMÍDIC.

Els protocols d'aïllament de DNA plasmídic poden classificar-se en relació a la quantitat i puresa del plàsmid que s'obté. Quan el protocol és ràpid però s'obté una quantitat petita i impura de plàsmid s'anomena mini-prep. Quan intentem obtenir més quantitat i molt més pur s'anomena midi o maxi-prep. Per a realitzar una mini-prep s'inocula un tub amb 3 ml de medi LB estèril suplementat amb l'antibiòtic adequat amb bacteris de la colònia d'interès o d'un stock congelat en glicerol i es deixa créixer tota la nit a 37°C. L'endemà es segueix el protocol de mini-prep de Promega (www.promega.com) a partir d'1 ml de creixement i la resta es guarda a 4°C, i es pot utilitzar com un inòcul per a un creixement més gran a fi de purificar una quantitat

superior de plàsmid i de més puresa utilitzant el kit de midi-maxi prep de QIAGEN (www.qiagen.com). Bàsicament els dos protocols es basen en resuspendre el pellet bacterià, realitzar una lisi alcalina i una neutralització en la que es descarten les restes cel·lulars. Seguidament s'uneix el DNA plasmídic a una reïna d'intercanvi aniònic sota les condicions apropiades de pH i força iònica, es realitzen diversos rentats per tal d'eliminar el RNA, proteïnes i altres impureses i s'elueix. En el cas de la Midi-prep, es precipita el DNA amb isopropanol i finalment es resuspèn en aigua o tampó Tris-EDTA pH 8 en un volum adequat. Els protocols detallats són accessibles a la web i acompanyen els kits comercials.

9.4 PREPARACIÓ I AÏLLAMENT DELS INSERTS I VECTORS NECESSARIS.

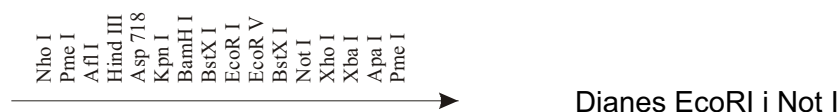
9.4.1 Tria de les dianes de restricció i disseny dels primers.

En primer lloc cal decidir les dianes de restricció mitjançant les quals es subclonarà l'insert. Generalment es fa servir una de les dianes presents en el *multicloning site* del plàsmid, però és imprescindible escullir enzims que no tallin dins de l'insert. També és convenient tenir extrems cohesius entre el plàsmid i l'insert de tal manera que ens evitem que es recircularitzin. Per trobar els enzims adequats a l'hora de digerir vectors i inserts hem utilitzat un programa de la pàgina de New England Biolabs: NEB Cutter V2. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>.

En aquesta tesi s'han emprat els següents vectors on s'han indicat les dianes escullides:

- **pcDNA3.1 (+)** de Invitrogen (5.4 kb)

Mapa de restricció:



Dianes EcoRI i Not I

Resistència a Ampicilina

- **pEGFP-C1** de Clontech (4.7 kb)

Mapa de restricció:



Dianes EcoRI i Sall

Resistència Kanamicina

Insert i plàsmid d'origen:

rCNT2 (Gene bank accession number: U66723)

Plàsmid d'origen: pCMV.SPORT6 (4396 pb), resistència a ampicilina.

Clonat en pCMV.SPORT6 entre Sal I (5') y Not I (3') en el *muti-cloning site* per Rubén Boado (UCLA).

- Disseny dels primers

Una vegada decidits els enzims amb els que volem subclonar l'insert d'interès, cal dissenyar els primers per tal d'afegir a l'insert les dianes de restricció necessàries. El model de primer ha de ser el següent:

- cua de 4 nucleòtids necessaris perquè l'enzim pogui unir-se i tallar correctament; s'han de triar de tal manera que no es formi una doble hèlix amb la resta del primer
- **diana de restricció**
- afegir el **codó d'inici (ATG)** en cas necessari (construccions amb delecció de l'extrem amino-terminal) i afegir o eliminar el **codó stop** segons el cas.
- part del primer complementària: com a mínim 12 nucleòtids

En el cas de les construccions que contenen la seqüència **Myc**, es dissenya el primer (reverse en el nostre cas) seguint les indicacions anteriorment anomenades i s'afegeix la seqüència Myc.

Construcció	Enzims emprats	Primer Forward	Primer Reverse
CNT2-pcDNA₃	EcoRI a 5' NotI a 3'	5'gggg gaattc aggag atggc gaagtc3'	5'tttg cgccgctca ggcacacac agtgc3'
CNT2Myc-pcDNA₃	EcoRI a 5' NotI a 3'	5'gggg gaattc aggag atggc gaagtc3'	5'tttg cgccgctca gaccagatc ctcctcagaaatcagctttgctcg gcacacacagtgctgg3'
EYFP-CNT2	EcoRI a 5' SmaI a 3'	5'gggg gaattc gatggcgaagt caga3'	5'ttt ccgggtca ggcacacacag tg3'

NΔCNT2-pcDNA₃	EcoRI a 5' NotI a 3'	5'cacagaattcaccatggcg agaag	5'ttttgcggccgctcaggcacacac agtgc3'
NΔCNT2Myc-pcDNA₃	EcoRI a 5' NotI a 3'	5'caca gaattcaccatggcg agaag	5'ttttgcggccgctcagaccagatc ctcctcagaaatcagctttgctcg gcacacacagtgtg3'
EYFP-NΔCNT2	EcoRI a 5' SmaI a 3'	5'gggggaattctgctggttattc a3'	5'ttttccgggtcaggcacacacag tg3'

9.4.2 Reacció de PCR.

Mitjançant una reacció d'amplificació de l'insert afegim les dianes de restricció que facilitaran la seva subclonació en els plàsmids triats. És necessari utilitzar una polimerasa d'alta fidelitat (Expand High Fidelity PCR System, Invitrogen) a fi d'evitar possibles mutacions de l'insert amplificat. L'amplificació es realitza seguint les instruccions de la casa comercial.

	Concentració inicial	Concentració final	volum per mostra
Tampó amb MgCl ₂	10 X		5 µl
Primers (F i R)	20 mM	400 µM	5 µl
dNTPs	10 mM	200 µM	1 µl
cDNA			1 µl (aprox. 1-2 µg)
Taq High Fidelity			0.75 µl
DMSO			

El programa usat fou de 35 cicles amb els següents passos:

- desnaturalització: 30 s a 94°C
- annealing: 30 s a 55°C
- extensió: 2 min a 72°C

Finalment, després del darrer cicle d'amplificació es realitza una última etapa d'extensió de 7min a 72°C per tal d'afavorir l'extensió dels primers que han pogut quedar parcialment sintetitzats.

9.5 DIGESTIÓ DELS FRAGMENTS DE DNA AMB ENDONUCLEASES.

La digestió amb enzims de restricció permet l'escissió de fragments de DNA necessaris per a les tècniques de DNA recombinant.

Reactius i Material:

- enzims de restricció (2-12 U/ μ l) de Promega o Roche
- Tampó de reacció 10X
- Incubador a 37°C

Procediment:

En tots els casos s'han seguit els protocols suministrats per les cases comercials. De manera general, una reacció de digestió necessita un DNA de doble cadena, la mostra, en una quantitat variable depenent de la finalitat de la digestió. Si el què es vol és únicament comprovar la identitat d'un plàsmid, n'hi ha prou amb 500 ng per visualitzar les bandes resultants de la digestió. Però si l'objectiu és escindir un fragment per poder posteriorment lligar-lo en un altre vector o bé linearitzar un vector per tal d'insertar-hi un fragment la quantitat necessària és major, entre 5 i 10 μ g de DNA. El volum final de la reacció és important i s'ha d'intentar minimitzar-lo; de totes maneres es poden escalar els volums. A continuació es detalla un exemple de protocol de digestió per EcoRI:

- 1 μ g de DNA (5 μ l miniprep)
- 1 μ l de tampó H. 10X
- 3.5 μ l d'aigua miliQ
- 0.5 μ l d'enzim ecoRI (5U/ μ l).....Volum total 10 μ l

L'enzim ve en una solució d'emmagatzament que conté glicerol i es conserva a -20°C . És important mantenir sempre els enzims a una temperatura pròxima a -20°C per tal de conservar millor la seva activitat. La concentració dels enzims s'acostuma a donar en UI (Unitat Internacional). Es defineix una UI com la quantitat d'enzim necessari per digerir 1 μ g de DNA a 30°C en una hora. S'ajustarà doncs el volum de l'enzim en base al tipus de reacció que estem realitzant. Però s'ha de tenir en compte que el volum final dependrà de la quantitat d'enzim, ja que com a mínim s'ha de diluir l'enzim 10 vegades perquè sinó l'elevada concentració de glicerol podria inhibir la seva

activitat i la correcta digestió del DNA. D'altra banda en digestions dobles, amb dos enzims diferents, s'ha d'escollir un tampó adequat que maximitzi l'activitat dels diferents enzims, en aquest cas ens haurem de dirigir a les taules de les activitats dels enzims suministrades per els proveedors.

9.6 PURIFICACIÓ DEL DNA.

Després de la reacció de PCR o de la digestió cal separar els fragments de DNA en un gel d'agarosa no desnaturalitzant, com s'ha descrit en l'**apartat 7.3.2.**, per tal d'identificar-los i poder-los purificar. En aquest cas, és a dir quan l'objectiu és purificar les bandes de DNA, és preferible usar el tampó TAE 1X ja que l'eficiència de recuperació és més alta. Cal preparar les mostres, usant tot el volum de la PCR d'amplificació o de la reacció de digestió per tal d'obtenir la major quantitat de DNA possible, i es fa córrer el gel, a un voltatge de 100 V com a màxim, el temps suficient perquè es separin bé les bandes. Mitjançant la llum ultravioleta es comproven ràpidament els pesos de les bandes i es retalla amb l'ajut d'una ganiveta la part del gel que conté el DNA. Finalment es purifica la banda tallada amb el Kit de purificació de fragments de DNA "**QIAquick Gel Extraction Kit**" (QIAGEN).

9.7 L·LIGACIÓ DE FRAGMENTS AMB DNA L·LIGASA.

La DNA lligasa és un enzim que utilitzant l'ATP com a font d'energia catalitza la unió de dues cadenes de DNA entre els grups 5'-fosfat i el 3'-hidroxil dels nucleòtids adjacents en extrems cohesius o roms resultants de la digestió amb enzims de restricció. Es recomana provar diferents relacions molars entre vector i insert, 1:1, 1:3, 1:10. Per calcular les quantitats d'insert i vector, tenint en compte els diferents tamany, s'utilitza la següent fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb del insert}}{\text{kb del vector}} \times \text{relació molar insert} = \text{ng insert}$$

Reactius i Material:

- T4 DNA lligasa (3 U/ μ l) (Promega)
- Tampó de lligació 10X (Promega)
- Termociclador MiniCycler (MJ Research) a 16°C

Procediment:

El procediment de lligació és molt senzill, però existeixen alguns petits detalls que cal conèixer per tal de completar la lligació amb èxit. És aconsellable reduir al màxim el volum de reacció, essent recomanables volums de com a màxim 10 μ l. Per això, és important treballar amb un material de partida molt concentrat. La quantitat de vector inicial en el nostre cas s'ha fixat en 100 ng, encara que es pot partir d'una quantitat menor. A partir d'aquesta quantitat de vector es calculen els μ l de vector i d'insert necessaris, s'afegeix el volum de tampó de lligació 10X corresponent i finalment s'afegeix a la barreja 1 μ l de T4 DNA lligasa. Segons el tipus d'extrems a lligar, el temps i la temperatura de reacció poden variar, temperatura ambient durant 3 hores, a 4°C tota la nit o a 16°C de 4 a 18 hores. Totes les lligacions d'aquesta tesi s'han realitzat en incubacions de 16°C durant 16 hores. Per acabar cal transformar les cèl·lules competents amb el producte de la lligació.

9.8 MUTAGÈNESI DIRIGIDA.

Per tal d'estudiar la implicació del putatiu lloc de N-miristil·lació en la localització subcel·lular de rCNT2, es va generar una forma mutada del transportador que presenta una mutació puntual en el residu on té lloc la miristil·lació mitjançant el **QuickChange™ Site-Directed Mutagenesi Kit (Stratagene)**, manera que la seqüència conté una mutació en el residu 50 produint-se un canvi de glicina a alanina. Es van dissenyar dos primers idèntics i complementaris de 40 pb, que contenen una mutació en la base desitjada, és a dir que la base 391 originalment guanina es va canviar per citosina. Per tal de generar la mutació, es va utilitzar el vector amb l'insert d'interès (YFPCNT2), els dos primers dissenyats i la DNA polimerasa *Pfu Turbo*. I a partir d'una reacció de PCR es va obtenir el plàsmid amb l'insert mutat. A continuació es va realitzar una digestió del producte de PCR amb l'enzim de restricció DpnI, específica per DNA metilat o hemimetilat, per tal de degradar el plàsmid parental. Finalment es van transformar bacteries competents amb el plàsmid mutat (YFPCNT2G50A).

Aquest Kit permet generar les mutacions desitjades amb una alta eficiència. Per tal de disminuir la generació de possibles mutacions a l'atzar, es va utilitzar una

quantitat de plàsmid original molt baixa (5-50 ng) i es van realitzar pocs cicles de PCR utilitzant una DNA polimerasa High Fidelity.

Així, els paràmetres de la PCR són els següents:

Segment	Cicles	Temperatura	Temps
1	1	95°C	30 s
2	12-18	95°C	30 s
		55°C	1 min
		68°C	2 min/Kb (llargada plàsmid)

El nombre de cicles depèn del tipus de mutació que es vol generar. Si es tracta d'una mutació puntual són 12 cicles, si aquesta mutació produeix un canvi d'aminoàcid són 16 i si es generen múltiples deleccions o insercions d'aminoàcids són 18.

9.9 COMPROVACIÓ: SEQÜENCIACIÓ PER PCR.

La tècnica de seqüenciació emprada és la seqüenciació per PCR. Utilitzant oligonucleòtids específics, sigui en la direcció 5'-3', com en la direcció 3'-5' es sintetitzen fragments de totes les longituds en el sentit 5'-3' tant d'una cadena com de la complementària gràcies als "terminators" del kit ABIPRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction de Applied Biosystems. Després les seqüències són resoltes utilitzant un seqüenciador de DNA per electroforesi capilar ABIPRISM 3700 d'Applied Biosystems en el servei de seqüenciació dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona (Parc Científic).

Materials i Reactius:

- ABIPRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.1 (Applied Biosystems).
- Termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).
- Oligonucleòtids específics sintetitzats per Roche Molecular Biology.
- Etanol 95% i 70%.

Procediment:

En primer lloc s'afegeix el DNA motlle sobre el que volem seqüenciar, aproximadament 300-500 ng provinents d'una mini-prep o midi-prep. A continuació s'afegeixen 3.2 pmol d'oligonucleòtids, 8 ml de Reaction Mix del Kit de seqüenciació i una quantitat suficient d'aigua miliQ fins un volum final de 20 µl. El programa que es fa servir es el següent: 96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 4 min i es repeteix 25 cicles. Una vegada acabada la reacció de PCR s'ha de precipitar el DNA amb etanol. S'afegeixen als 20 µl de la reacció, 60 µl d'etanol (100%) i 5 µl de EDTA (125 mM), s'agita suaument la barreja i es deixa a temperatura ambient durant 15 min. Es centrifuga 20 min en una minifuga al màxim i s'elimina amb compte el sobrenadant. S'afegeixen 250 µl d'etanol al 70% per rentar el pellet i es torna a centrifugar 2 min. Finalment s'elimina el sobrenadant i es deixa evaporar l'etanol restant. Les mostres ja estan llestes per portar analitzar al servei de seqüenciació dels serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

10. TÈCNiques D'EXPRESSIÓ HETERÒLOGA.**10.1 TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA.**

L'estudi funcional d'una proteïna requereix en molts casos, la seva expressió transitòria en una línia cel·lular. En aquesta tesi s'ha utilitzat aquest mètode d'expressió heteròloga per tal d'estudiar la distribució i el tràfic intracel·lular del transportador de nucleòsids CNT2 mitjançant la unió d'aquest transportador a una proteïna fluorescent (*Yellow fluorescent protein*). Com a mètode de transfecció hem utilitzat la lipofectamina 2000 d'Invitrogen, es tracta d'un reactiu lipídic que facilita l'entrada del DNA a l'interior cel·lular.

Les cèl·lules es sembren de tal manera que en el moment de la transfecció es trobin a un 70-95% de confluència. Es canvia el medi de cultiu per un medi sense sèrum i sense antibiòtic ja que poden disminuir l'eficiència de transfecció o la viabilitat cel·lular respectivament. La quantitat de DNA i lipofectamina que cal usar depèn de la línia cel·lular amb què es treballa. Generalment en el cas de cèl·lules que es transfecten fàcilment com les CHO i les HeLa s'usen entre 0.2 a 0.4 µg de DNA per pou de multiwell de 24. En canvi d'altres tipus cèl·lules com la línia cel·lular FAO requereixen una quantitat més elevada de DNA i de la mateixa manera més quantitat

de lipofectamina. S'utilitza un volum total de 100 µl de medi sense suplementar per pou i s'afegeix la quantitat de DNA i lipofectamina necessàries en cada cas. S'agita bé la barreja de DNA i lípids i es deixa reposar 20 min a temperatura ambient. Passat aquest temps es distribueix la solució de transfecció gota a gota sobre les cèl·lules i s'incuben d'entre 3 a 8 hores, temps que depèn de la línia cel·lular. Es canvia el medi de cultiu de les cèl·lules per medi suplementat i al cap de 24 o 48 hores es realitza l'experiment desitjat.

En el cas de les cèl·lules MDCK sembrades en *transwells*, el protocol és pràcticament el mateix. Es sembren 135.700 cèl·lules per insert de tal manera que 24 hores després, moment de la transfecció estan a un 95% de confluència. Es prepara la barreja de transfecció comptant que calen 0.64 µg DNA i 1 µl de lipofectamina per insert dissolts en 100 µl de medi. Per tal de millorar l'eficiència de transfecció, la barreja de DNA i lípids es distribueix entre el cambra apical i la cambra basolateral. S'incuben les cèl·lules 16 hores amb la barreja de transfecció i es canvia el medi per medi de cultiu amb sèrum. Finalment al cap de 48 hores, quan s'observa que estan ben polaritzades, es pot realitzar l'assaig desitjat.

10.2 TRANSFECCIÓ ESTABLE.

En aquest treball s'ha generat un clon de cèl·lules Caco-2 que expressen de manera constitutiva el transportador hCNT1. El mètode de transfecció és exactament el mateix que en el cas de la transfecció transitòria però la diferència és que es seleccionen els clons transfectats mitjançant la resistència que presenta el vector en el què s'ha subclonat la proteïna d'interès. En el nostre cas s'ha utilitzat el vector d'expressió en eucariotes pcDNA₃ que conté un gen de resistència a ampicilina.

Es transfecten les cèl·lules de la mateixa manera com s'ha explicat en l'apartat anterior però 48 hores després de la transfecció amb pcDNA₃ o hCNT1-pcDNA₃ s'afegeix genèticina G418 0.5 mg/ml en el medi de cultiu i caldrà afegir aquest antibiòtic durant la selecció dels diferents clons i durant el seu manteniment una vegada seleccionats. La concentració de G418 que s'utilitza és la dosi mínima letal per les cèl·lules Caco-2 no transfectades al voltant de 5-6 dies després de l'aplicació. Una vegada que les cèl·lules transfectades arriben a confluència, es tripsinitzen i es fan una sèrie de dilucions 1/50, 1/100, 1/200 de la suspensió cel·lular de tal manera que es formin clons aïllats provinents d'una única cèl·lula. El procés de selecció és força llarg i

dura unes 4 setmanes. Els clons han de tenir un tamany suficient per ser aïllats a simple vista. Quan és així, es tripsinitzen i es sembren cadascun dels clons en un pou d'una multiwell de 24. Una vegada els diferents clons arriben a confluència, s'amplifiquen en plaques multiwell de 6 pouets i de 100 mm i finalment es congelen, per tal de mantenir-los fins la seva comprovació.

El mètode d'anàlisi dels 30 clons seleccionats s'ha dut a terme mitjançant la mesura de l'activitat de transport sodi-dependent, ja que les cèl·lules Caco-2 *wild type* també expressen el transportador hCNT1 a nivell de missatger i proteïna però en canvi no presenten activitat de transport dependent de sodi.

10.3 INFECCIÓ AMB ADENOVIRUS.

Els adenovirus s'utilitzen per transferir gens a un ampli espectre de tipus cel·lulars i aquesta transferència a diferència de la transfecció no depèn d'una divisió cel·lular activa. A més, es poden aconseguir títols elevats i nivells molt alts d'expressió gènica. En aquesta tesi s'ha utilitzat la infecció adenoviral per tal de inhibir l'activitat de la proteïna quinasa dependent d'AMP (AMPK) en les cèl·lules IEC-6.

L'estudi sobre la regulació de l'AMPK ha estat realitzat en col·laboració amb el laboratori del Dr. Pascal Ferré i la Dra. Fabienne Foufelle de l'INSERM, Paris. En el laboratori del Dr. Ferré, es va generar una forma mutada de l'AMPK que actua de dominant negatiu de la proteïna quinasa endògena. El cDNA que codifica per la isoforma $\alpha 1$, conté una mutació en el residu 157 de manera que es produeix un canvi d'aspàrtic a alanina. L'aspartat 157 es troba en un domini conservat DFG (subdomini VII de les subunitats catalítiques de les proteïna quinases) que és essencial per la unió del MgATP de totes les proteïna quinases. La mutació d'aquest residu produeix la inactivació de les isoformes catalítiques $\alpha 1$ i $\alpha 2$ però no afecta a la unió de les subunitats β i γ . Com que la formació del complex heterotrimèric és essencial per a l'activitat de l'AMPK, la sobreexpressió d'aquesta forma mutada actua d'inhibidor dominant negatiu, ja que competeix per la unió amb les subunitats β i γ amb les subunitats catalítiques natives. Aquest forma mutada es va subclonar en el vector llançadora pDK6 sota el control del promotor IE del citomegalovirus. El plàsmid pDK6- $\alpha 1$ DN es va cotransfectar en les cèl·lules HEK293 juntament amb el DNA del vector adenoviral E1a-Ad.gal-nls. Els adenovirus recombinants Ad. $\alpha 1$ DN es van detectar per ampliació del DNA viral utilitzant primers específics de la isoforma $\alpha 1$, i un dels clons

es va amplificar en cèl·lules HEK293. Com a control s'ha utilitzat un vector adenoviral anomenat Ad.null, que conté el mateix promotor que l'anterior en el cassette d'expressió però en el què no s'ha afegit cap gen exogen (Woods et al., 2000).

- Condicions d'infecció amb adenovirus.

Es sembren un nombre determinat de cèl·lules, en el nostre cas 1 mil·lió de cèl·lules per placa de 60mm i es realitza la infecció 24 hores després moment en el qual s'assumeix que hi ha el mateix nombre de cèl·lules. És important saber el nombre exacte de cèl·lules en el moment de la infecció per tal de calcular la dosi adequada de virus, la multiplicitat d'infecció (m.o.i) o nombre de virus per cèl·lules. Després de fer un seguit de proves canviant la multiplicitat d'infecció, i el temps d'incubació, el protocol que ens van donar millor eficiència i menys citotoxicitat és el següent. Es renten les cèl·lules amb PBS per eliminar les restes de sèrum. La solució viral es prepara per dilució del stock titulat en medi de cultiu lliure de sèrum per tal d'obtenir una multiplicitat d'infecció coneguda. En el nostre cas la que ha donat millor resultat és 30 m.o.i, ja que si s'augmentava la quantitat de virus s'observava un efecte citotòxic. S'afegeix doncs la solució viral a les cèl·lules i s'incuben 4 hores a 37°C. Transcorregut aquest temps s'afegeix a les plaques el mateix volum de medi fresc suplementat amb sèrum i s'incuben 24 hores fins a realitzar l'extracció de proteïna o l'assaig d'activitat AMPK. Les restes de virus s'eliminen tractant les solucions i les plaques en les que han estat en contacte amb lleixiu al 20% durant tota una nit dins la campana de flux laminar per adenovirus amb llum ultraviolada.

11. ESTADÍSTICA I REPRESENTACIÓ DE DADES.

Els múltiples càlculs necessaris al moment de la interpretació dels resultats obtinguts en els diferents experiments han estat realitzats mitjançant el full de càlcul del programa informàtic Microsoft Excel 2002, i la representació gràfica de les dades i els test estadístics utilitzats per la posterior anàlisi s'han dut a terme mitjançant el suport tècnic del programa GraphPad Prism 4.0.

En la representació dels resultats obtinguts la "n" correspon al nombre d'experiments realitzats. Rutinàriament, dins de cada experiment s'ha treballat amb duplicats o triplicats exceptuant les mesures de transport en les que cada condició és el resultat de quatre mesures independents.

Els resultats presents en aquesta memòria estan expressat amb la mitja i l'error estàndard associat. Les comparacions estadístiques s'han efectuat utilitzant el test de la *t* de Student, mitjançant el qual es pot calcular el valor de la probabilitat *p* d'error que existeix quan s'afirma que dos grups experimentals són diferents [$p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)].