

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL I MÈTODES

I. Animals i Tractaments

S'han utilitzat ratolins de la soca C57BL/6 mascles i femelles adquirits a IFA-CREDO a les 8 setmanes d'edat. Els animals varen ser estabulats a 22 °C amb períodes de llum de 12 hores, amb dieta estàndard (PanLab) i aigua *ad libitum*. Les cries es varen obtenir per encreuaments realitzats en el nostre estabulari.

I.a. Castració

Els mascles es van castrar quirúrgicament per extirpació testicular. A tal efecte varen ser anestesiats amb 20µL /g (pes de l'animal) d'una barreja de droperidol (417 µg/mL) i dormicum (833 µg/mL). Un cop castrats es van deixar recuperar durant 8 dies abans de l'inici del tractament.

I.b. Tractament amb KClO₄ 1%

Per administració de perclorat potàssic (KClO₄, Fluka) a l'1% (w/v) en l'aigua de beguda es va produir hipotiroïdisme farmacològic (112) en diferents períodes de la vida postnatal de ratolins mascles i femelles C57BL/6.

I.c. Tractament amb 3,5,3'-triiodotironina (T₃)

Els mascles amb hipotiroïdisme farmacològic postnatal es van tractar amb 1,2 µg/dia de T₃ (Sigma) reconstituïda amb KOH 10 mM (111) per via subcutània des del dia 7è al 21è postnatal.

I.d. Tractament amb hormona de creixement (GH)

Els mascles amb hipotiroïdisme farmacològic postnatal es van tractar amb 18 µg/dia de hGH (Kabi-Pharmacia) reconstituïda amb Na₂CO₃ 25 mM pH 9,4 en NaCl 0,9% (124) per via subcutània des del dia 7è al 21è postnatal.

I.e. Sacrifici dels animals

Els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical un cop finalitzat el tractament. Els ronyons es van recollir en condicions lliures de ribonucleases congelant-los immediatament, després de desencapsular-los, amb nitrogen líquid o col·locant-los en criomotlles de plàstic de 15x15x5 mm (Lipshaw) en presència d'OCT (*OCT embedding compound*, Miles Laboratories) i congelant-los ràpidament en 2-metil-butà (Isopentà, Fluka) refredat en nitrogen líquid.

Tots els experiments s'han realitzat d'acord amb l'establert per la Comunitat Europea (real decreto 223/1988: B.O.E. nº 67, 18/3/88 i B.O.E. nº 256, 25/10/90).

I.f. Disseny experimental

I.f.a. Anàlisi de la necessitat de T_3 i/o GH postnatal

I.f.a.1. Per administració exògena de T_3 i/o GH– Es van analitzar 6 grups que inclouen almenys 3 femelles prenyades per grup.

Grup 1: *Grup control*- Aigua durant tot l'experiment.

Grup 2: *Hipotiroidisme postnatal*- Administració de $KClO_4$ 1% en l'aigua de beguda des del naixament fins al final de l'experiment.

Grup 3: *Presència de T_3 des del dia 7è al 21è postnatal*- Administració de $KClO_4$ 1% en l'aigua de beguda des del naixament fins al final de l'experiment, juntament amb l'administració diària de T_3 des del dia 7è al 21è postnatal.

Grup 4: *Presència de GH des del dia 7è al 21è postnatal*- Administració de $KClO_4$ 1% en l'aigua de beguda des del naixament fins al final de l'experiment, juntament amb la injecció puntual diària de GH des del dia 7è al 21è postnatal.

Grup 5: *Presència de T_3 i GH des del dia 7è al 21è postnatal*- Administració de $KClO_4$ 1% en l'aigua de beguda des del naixament fins al final de l'experiment, juntament amb la injecció subcutània diària de T_3 i de GH des del dia 7è al 21è postnatal.

Grup 6: *Substitució del $KClO_4$ 1% per aigua des del dia 7è al 21è postnatal*.

I.f.a.2. Per substitució del KClO_4 1% per aigua- Es van analitzar onze grups d'animals incloent almenys 2 femelles prenyades per grup.

Grup 1: KClO_4 1% des del naixament fins al final de l'experiment.

Control tractament hipotiroïdisme.

Grup 2: Aigua des del naixament fins al dia 7. KClO_4 1% fins al final de l'experiment (dia 40 postnatal).

Els grups especificats a continuació presenten KClO_4 1% des del naixament fins al dia del sacrifici (dia 40 postnatal) a excepció de la substitució d'aquest per aigua els dies indicats per grup:

Grup 3: Aigua des del dia 7 al 8.

Grup 4: Aigua des del dia 9 al 10.

Grup 5: Aigua des del dia 11 al 12.

Grup 6: Aigua des del dia 13 al 14.

Grup 7: Aigua des del dia 15 al 16.

Grup 8: Aigua des del dia 16 al 26.

Grup 9: Aigua des del dia 22 al 40.

Grup 10: Aigua des del dia 0 al 14.

Grup 11: Aigua durant tot l'experiment.

Control no tractats.

II. Hibridació *in situ*

II.a. Preparació de seccions de teixit i tractament dels portaobjectes

Amb un criostat (Bright Instruments Co.) a -20°C , s'obtenen seccions de $5\text{ }\mu\text{m}$ tallades seguint l'eix longitudinal del ronyó, que ha estat congelat prèviament en un criomotlle amb OCT. Només es recullen aquelles seccions en les que es poden apreciar els diferents compartiments renals. Dites seccions es col.loquen en portaobjectes tractats de la forma que es descriu a continuació i es guarden a -80°C fins a la seva posterior utilització.

Els portaobjectes utilitzats (Cell-Line Associates) tenen uns anells de tefló hidrofòbic, a on es col.loca la mostra i permet evitar la utilització de cobreobjectes durant la hibridació i així preservar millor la morfologia del teixit.

Abans de la seva utilització, els portaobjectes són tractats de la següent manera:

- 1- Rentar durant 30 s amb una solució de HCL 0,2 N,
- 2- Rentar durant 30 s amb H_2O destil.lada,
- 3- Rentar durant 30 s amb acetona.
- 4- Assecar a l'aire.
- 5- Submergir els portaobjectes amb una solució (*subbing solution*) que té azida sòdica 0,3 mg/mL i gelatina 1,5 mg/mL durant 5 min.
- 6- Assecar durant tota la nit.
- 7- Tractar els portaobjectes dues vegades amb poly-L-lisina homobromide (> 300.000

Mr, Sigma Chemical Co St. Louis MO, USA) (200mg/mL) 10 min cada vegada.

- 8- Rentar 1min amb H₂O tractada amb DEPC (Sigma)
- 9- Assecar durant tota la nit.
- 10- Guardar els portaobjectes a temperatura ambient en una càmara dessecant.

Totes les solucions i material de vidre utilitzat es preparen lliures de ribonucleases.

II.b. Preparació de material lliure de ribonucleases

El material, que s'ha d'utilitzar en experiments en els que es manipula RNA, es tracta de forma especial per eliminar les possibles RNAses existents.

- 1- Sumergir en NaOH 1M, durant 2 h o més, tot el material de vidre i de plàstic no estèril, per eliminar restes de RNA.
 - 2- Rentar dues vegades amb aigua bidestil.lada tractada amb dietilpirocarbonat (DEPC, Sigma) al 0,05%, per inactivar ribonucleases.
 - 3- Assecar.
 - 4- El material de vidre s'esterilitza a 200°C, o/n i el material de plàstic s'autoclava.
- Ambdós procediments inactiven el DEPC.

Tanmateix, la preparació de tampons i solucions lliures de ribonucleases es realitza amb aigua bidestil.lada tractada amb DEPC 0,05%, autoclavada dues vegades per inactivar totalment el DEPC.

II.c. Síntesi de sondes de RNA

II.c.1. Obtenció del motlle de la transcripció *in vitro*

El plàmid utilitzat per la síntesi de la sonda de RNA va ser construït amb el vector comercial pT7/T3-19 (BRL) al que se li va inserir un fragment de 360 bp del cDNA del gen del KAP en el lloc de restricció de PstI. Els plàsmids obtinguts en les dues direccions possibles d'inserció es denominen pKAP4 i pKAP3 i corresponen al sentit i a l'antisentit, respectivament (103). El protocol que se segueix per obtenir la sonda per la reacció de transcripció *in vitro* és el següent:

- 1- 10 µg del plàmid, l'insert del qual es vol transcriure, es linearitzen amb l'enzim de restricció (2U enzim/µg DNA) Kpn I. Volum de digestió = 100 µL
- 2- Fer 2 extraccions amb 1:1 fenol/cloroform-alcohol isoamílic (24:1) (v/v).
- 3- Fer 1 extracció amb 1:1 cloroform/alcohol isoamílic (v/v).
- 4- Precipitar la fase superior amb acetat sòdic 3M i 2,5 v etanol 100%.
- 5- Incubar 15 min a -80°C.
- 6- Centrifugar 15 min a 14000 rpm a 4°C.
- 7- Rentar amb etanol 70% (opcional).
- 8- Assecar el *pellet*.
- 9- Dissoldre el *pellet* en H₂O DEPC.
- 10- Congelar a -20°C.

II.c.2. Transcripció *in vitro*

- 1- Reacció de transcripció (és important que se segueixi l'ordre detallat i que la reacció es prepari a temperatura ambient):

Tampó de transcripció 5x (Life Technologies).....	final 1X
DTT 100 mM (Life Technologies).....	final 5 mM
Inhibidor Rnasas (Promega)	final 1U/ μ L
dATP 10 mM (Promega)	final 400 μ M
dCTP 10 mM (Promega)	final 400 μ M
dGTP 10 mM (Promega)	final 400 μ M
³⁵ SdUTP 10 mM (800 Ci/mmol, Amersham)	final 100 μ Ci
Plàsmid 1 μ g/ μ L	final 1 μ g
T7 RNA Polimerasa	
(50 U/ μ L, Life Technologies).....	final 1U/ μ L
H ₂ O DEPC	fins al volum final
	(50 μ L)

- 2- Contar les cpm (contes per minut) totals de 1 μ l de la barreja de la reacció.
- 3- Incubar a 37°C durant 1 h.
- 4- Determinar la radiactivitat incorporada a la sonda i la seva activitat específica per precipitació d'1 μ L de la reacció de transcripció amb àcid tricloroacètic (TCA, Sigma). Contador de centelleig WALLAC 1410 (PerkinElmer Life Sciences).

dpm incorporades*/ μ L

Càlcul de l'activitat específica: $AE = \frac{\text{dpm incorporades}}{\text{Quantitat DNA}}$

Quantitat DNA

*Les dpm incorporades s'obtenen del contacte de la radiactivitat retinguda en un filtre de fibra de vidre (Millipore) després de l'elució de la radiactivitat lliure amb TCA.

5- Per eliminar el plàsmid DNA motlle, afegir a la barreja de la reacció:

DNAsa I RNAsa free (Promega)..... final 0,1U/ μ L

Inhibidor RNAsas (Promega)..... final 1U/ μ L

6- Incubar 10 min a 37°C.

7- Fer una extracció amb 1:1 fenol/cloroform-alcohol isoamílic (24:1) i una altra amb 1:1 cloroform/alcohol isoamílic (24:1) (v/v).

8- Precipitar la fase superior 2 vegades amb:

Acetat sòdic 3M

2,5 v Etanol 100%

10 μ L de tRNA 10 μ g/ μ L (*carrier*)

Etanol 70% (opcional)

9- Incubar 15 min a -80°C.

10- Centrifugar 15 min a 14000 rpm a 4°C.

11- Hidròlisi alcalina controlada de la sonda per obtenir fragments d'aproximadament 100 nucleòtids

La fórmula que s'aplica per calcular el temps d'hidròlisi necessari per obtenir la mida desitjada de la sonda, és la següent:

(L-L')

T= Temps en minuts.

T = -----

L i L' = Longitud inicial i final en Kb.

$((0.11/\text{Kb}/\text{min})L L')$

Reacció d'hidròlisi alcalina:

Sonda..... cpm que necessitem

Tampó d'hidròlisi 10x final 1x

(NaHCO_3 40 mM / Na_2CO_3 60 mM pH 10,2)

H_2O DEPC fins al volum final (75 μL)

12- Incubar 1 h a 60°C.

13- Neutralitzar amb:

Acetat sòdic 3 M pH 6

Àcid acètic glacial 10%

Etanol absolut

tRNA (*carrier*)

14- Precipitar 15 min a -80°C.

15- Centrifugar 15 min a 14000 rpms a 4°C.

16- Assecar el *pellet*.

17- Dissoldre en la quantitat adequada de tampó d'hibridació (descriu en el següent subapartat) per utilitzar 25 μL /tall (10^6 cpm) en la hibridació *in situ*.

18- Congelar a -20°C.

II.c.3. Protocol d'Hibridació *in situ*

- 1- Atemptar durant 20 min les seccions guardades a -80°C .
- 2- Fixar amb glutaraldehyd al 4% en PBS (NaCl 1,3 M, NaH_2PO_4 0,028 M, Na_2HPO_4 0,072 M) durant 20 min.
- 3- Rentar 2 vegades amb PBS a temperatura ambient.
- 4- Deshidratar amb:
 - Etanol 30% diluït en AcONH_4 300 mM, 30 seg.
 - Etanol 50% diluït en AcONH_4 300 mM, 30 seg.
 - Etanol 70% diluït en AcONH_4 300 mM, 30 seg.
 - Etanol absolut, 30 seg.
- 5- Assecar a temperatura ambient.
- 6- Prehibridació en una càmara humidificada amb formamida desionitzada al 50% a 42°C durant 2 h amb el següent tampó:
 - Formamida desionitzada 50%,
 - SDS 0,5% (Sigma),
 - Na_2HPO_4 50 mM (Sigma),
 - Polivinilpirrolidona 0,2%,
 - Ficoll 0,2%,
 - BSA 0,2% (Sigma),
 - NaCl 0,6% (Sigma),
 - EDTA 5 mM (Sigma),
 - DNA d'esperma de salmó 0,1% (sonicat i bullit abans de ser afegit al tampó),
 - t-RNA 0,1%.

- 7- Deshidratar de la mateixa manera que en el pas 4 i 5.
- 8- Desnaturalitzar per calor (3 min a 90°C) la sonda dissolta en el tampó d'hibridació, que és el mateix que el de prehibridació.
- 9- Afegir a cada secció 25 mL de sonda, que en el nostre cas, correspon a 900.000 cpm.
- 10- Incubar a 42°C durant tota la nit en una càmera humidificada amb formamida desionitzada al 50%.
- 11- Rentar amb:

SSC 2x, 5 min a temperatura ambient

SSC 1x, 45 min a 42°C
- 12- Deshidratar de la mateixa manera que en el pas 4 i 5.
- 13- Exposar les seccions de teixit hibridades a pel·lícula autorradiogràfica (Hyperfilm, Amersham) durant 2 o 3 h a temperatura ambient.

II.c.4. Autorradiografia

Tot aquest procés es realitza completament a les fosques per evitar que es veli l'emulsió fotogràfica.

- 1- Escalfar l'emulsió fotogràfica en un bany maria a 40°C durant 15 min.
- 2- Comprobar la fluïdesa de l'emulsió evitant la formació de bombolles i mantenir-la en el bany maria.
- 3- Submergir els portaobjectes hibridats en l'emulsió fotogràfica.
- 4- Treure l'excés d'emulsió portaobjecte a portaobjecte.

- 5- Assecar a temperatura ambient durant 1 o 2 h.
- 6- Col·locar els portaobjectes en una càmera dessecant opaca a 4°C.
- 7- Deixar el temps d'exposició adequat, que en el nostre cas són 10 o 12 dies, segons el senyal obtingut en la pel·lícula autorradiogràfica.
- 8- Revelar els portaobjectes:

Revelador, 2 min.

Rentar amb aigua bidestil·lada, 30 seg.

Fixador, 5 min.

Rentar amb aigua corrent abundant, 20 min.

Assecar a l'aire.

- 9- Deshidratar amb:

Etanol 30% diluït en AcONH_4 300 mM, 30 seg.

Etanol 50% diluït en AcONH_4 300 mM, 30 seg.

Etanol 70% diluït en AcONH_4 300 mM, 30 seg.

Etanol absolut, 30 seg.

- 10- Assecar a l'aire.

- 11- Submergir els portaobjectes 2 vegades amb Xilè.

- 12- Montar els portaobjectes amb DPX (Agar, Essex England)

- 13- Mirar al microscopi òptic.

Preparació de l'emulsió fotogràfica:

Autoradiography emulsion kodak type NTB2, referència 1654433, es va preparar seguint les instruccions del fabricant.

Preparació del revelador i fixador:

El revelador i el fixador que es van utilitzar són especials per experiments d'hibridació *in situ* i són de la casa Kodak, referències 1464700 i 1971720, respectivament. Van ser preparats seguint les instruccions del fabricant.

III. Cultiu cel.lular

III.a. Línies cel.lulars

Les cèl.lules **PKSV-PCT** i **PKSV-PR** van ser cedides amablement pel Dr. Alain Vandewalle.

Les cèl.lules **CV-1** procedeixen de l'ATCC (*American Type Culture collection, Manassas, VA*).

III.b. Medis de cultiu

Les cèl.lules PKSV-PCT i PKSV-PR es van cultivar a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂, amb el següent medi de cultiu:

- Ham's f12 i DMEM (1:1 v/v) (Life Technologies),
- Selenat sòdic 30 nM (Sigma),
- Transferrina 5 mg/mL (Sigma),
- Glutamina 2 mM (Biological Industries),

- Dexametasona 50 nM (Sigma),
- Triiodotironina 1 nM (Sigma),
- Factor de creixement epidèrmic 10 mM (Sigma),
- HEPES 20 mM pH 7.4 (Life Technologies),
- Insulina 0,2 μ M (Sigma),
- D-glucosa 20 mM (Sigma),
- sèrum boví fetal 2% (Biological Industries).

Les cèl.lules CV-1 es van cultivar a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂, amb el següent medi de cultiu:

- DMEM ric en glucosa (Biological Industries),
- Penicilina-Estreptomicina 1% (Biological Industries),
- Aminoàcids no essencials 1% (Biological Industries),
- Piruvat sòdic 1% (Biological Industries),
- Sèrum boví fetal 10% (Biological Industries).

III.c. Deplecció d'hormones esteroïdals i tiroïdals del sèrum boví fetal

Per preparar sèrum boví fetal (FCS) depleccionat d'hormones esteroïdals es segueix el següent protocol:

- 1- 50 mg de Norit A (Serva) per cada mL de sèrum a tractar.
- 2- Incubar amb agitació orbital durant 30 minuts a temperatura ambient.

- 3- Centrifugar a 12000 rpm durant 10 minuts per eliminar el carbó actiu.
- 4- Esterilitzar amb un filtre de 0,22 mm.
- 5- Conservar a -20°C .

Per depleccionar el FCS d'hormona tiroïdal (TH):

- 1- 50 mg de resina AG 1-X8 (200-400 mesh) BioRad per cada mL de sèrum.
- 2- Rentar la resina 4 vegades amb aigua bidestil.lada.
- 3- Afegir el FCS.
- 4- Incubar amb agitació orbital durant 4 o 5 hores a temperatura ambient.
- 5- Centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts.
- 6- Decantar el FCS.
- 7- Incubar amb agitació orbital el FCS amb una nova resina (repetir els passos 1 i 2) durant 15 o 18 hores.
- 8- Centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts.
- 9- Esterilitzar amb un filtre de 0,22 mm.
- 10- Conservar a -20°C .

III.d. Hormones

Pels tractaments hormonals dels cultius cel.lulars es van utilitzar:

- 5α -androstan-17 β -ol-3-ona (DHT, Sigma) reconstituïda en etanol 95%.
- 3,3',5 triiodo-L-thironina (T3, Sigma) reconstituïda en KOH 10 mM.

- Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I, Sigma) reconstituït en àcid acètic 0,1 M. Aliquotar i guardar a -70°C . Diluir amb PBS contenint BSA al 0,1% a la concentració desitjada i, filtrar la solució de treball amb un filtre de $0,2\ \mu\text{m}$, prebloquejat amb BSA al 0,1%

III.e. Tripsinització

Quan les cèl.lules crescudes, sobre una suport de plàstic, arriben a un 80-90% de confluència, han de ser tripsinitzades per poder-les sembrar en una altra placa de cultiu i mantenir el cultiu en creixement. S'utilitza la tripsina perquè dit enzim trenca les unions entre cèl.lules per degradació de les proteïnes de la membrana cel.lular. És a dir, és útil per desunir les cèl.lules però un temps massa llarg d'incubació pot produir la mort de les cèl.lules. El protocol de tripsinització utilitzat és el següent:

- 1- Rentar les cèl.lules amb PBS 1X, 2 vegades.
- 2- Incubar les cèl.lules amb tripsina (la quantitat utilitzada depèn del tamany de la placa ($2,5\ \text{mL/T-25 cm}^2$)), 5 o 10 min a 37°C , en l'incubador de cultius.
- 3- Neutralitzar la tripsina amb el mateix volum de medi de cultiu.
- 4- Centrifugar 5 min a 1000 rpm a 4°C .
- 5- Resuspendre el pellet amb un volum de medi adequat.
- 6- Sembrar una part de les cèl.lules en una nova placa de cultiu (densitat $1 \cdot 10^5$ cèl.lules/ T-25 cm^2).

III.f. Contatge de cèl.lules

Per conèixer la quantitat de cèl.lules inicial que es sembra en una placa de cultiu, hem de contar les cèl.lules després d'haver-les tripsinitzat i abans de sembrar-les en una nova placa de cultiu. El protocol és el següent:

- 1- Agafar una alíquota de les cèl.lules tripsinitzades que estan resuspeses en medi de cultiu i fer una dilució a la meitat amb blau de tripà.
- 2- Omplir la càmera de Neubauer, contar les cèl.lules dels diferents camps i aplicar la següent fórmula:

$$\text{*Cèl.lules/mL} = \text{N}^{\circ} \text{ promig de cèl.lules/N}^{\circ} \text{ quadres} \times \text{Factor de dilució} \times 10^4$$

* Cada quadre de la càmera amb un cobreobjecte representa un volum total de 10^{-4} cm^3 i un cm^3 és aproximadament equivalent a 1 mL, de manera que la concentració de cèl.lules per mL és la descrita en la fórmula. El factor de dilució representa el volum de blau de tripà (Sigma) que hem utilitzat per contar la viabilitat cel.lular, ja que les cèl.lules vives no es tenyeixen amb certs colorants mentre que les mortes sí. Les cèl.lules tenyides (inviabls) no es conten en el número de cèl.lules/quadre.

- 3- Agafar el volum necessari per sembrar la quantitat desitjada.

III.g. Congelació

El protocol de congelació que s'ha utilitzat per les cèl.lules PKSV-PCT, PKSV-PR i

CV-1, és el següent:

- 1- Tripsinització del cultiu cel.lular.
- 2- Contatge.
- 3- Afegir 900 mL de les cèl.lules resuspeses en el medi de cultiu a una concentració de 550 a 1100 cèl.lules/ μ L (500.000 a 1.000.000 cèl.lules) a un criotub previament refredat a 4°C amb 100 μ L DMSO (Dimetilsulfòxid, Sigma) també refredat a 4°C i que per tant està en estat sòlid.
- 4- Barrejar immediatament i permetre que el DMSO es liqui i es barregi amb la suspensió de cèl.lules.
- 5- Congelar ràpidament a -20°C perquè el DMSO que és el criopreservador és tòxic per les cèl.lules a una temperatura superior a -20°C.
- 6- Passar les cèl.lules de -20°C a -80°C.
- 7- Conservar les cèl.lules en nitrogen líquid.

III.h. Descongelació

El protocol de descongelació és el descrit a continuació:

- 1- Descongelar, en un bany a 37°C, però no totalment, les cèl.lules conservades en nitrogen líquid.
- 2- Afegir, gota a gota, 1 mL de medi de cultiu fred al criotub que conté les cèl.lules.
- 3- Resuspendre els 2 mL del criotub i afegir-los a 8 mL de medi de cultiu fred.
- 4- Centrifugar 5 min a 1000 rpm a 4°C.

- 5- Resuspendre el pellet amb un volum de medi adequat.
- 6- Sembrar les cèl.lules en una placa de cultiu.
- 7- Incubar a 37°C en una atmòsfera humida al 5% de CO₂.

III.i. Clonació per dilució al límit

Degut a l'heterogeneïtat fenotípica de les cèl.lules PKSV-PCT i PKSV-PR, es van clonar per dilució al límit, que consisteix en:

- 1- Tripsinització del cultiu cel.lular.
- 2- Contatge.
- 3- Fer dilucions seriades de la suspensió de cèl.lules, de manera que es sembrin en cada pouet d'una placa de cultiu de 96 pous:

100 cèl.lules/pou per 24 pous

10 cèl.lules/pou per 24 pous

1 cèl.lula/pou per 24 pous

0,1 cèl.lula/pou per 24 pous

- 4- Fer el seguiment diari, mitjançant el microscopi òptic, del creixement dels cultius, per tal de poder identificar quins d'aquests cultius procedeixen d'una única cèl.lula i, per tant, són clons.
- 5- Créixer, consecutivament, els clons en plaques de 35 mm de diàmetre, 60 mm de diàmetre, de 25 cm² i de 75 cm².
- 6- Seleccionar els clons en funció de la seva capacitat de formar *domes*, resultat de la seva capacitat de

diferenciar.

IV. Soques bacterianes

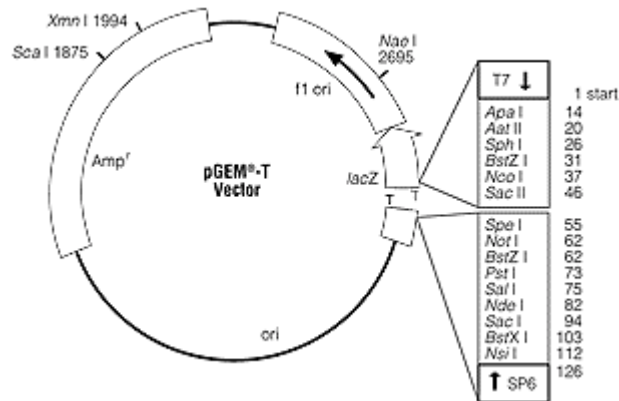
Nom	Genotip	Característiques
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r_{k-} , r_{k+}) <i>relA1 supE44</i> $\Delta(lac-proAB)$ [F' <i>traD36 proAB⁺ lacI^q</i> Z Δ M15]. (Yanisch-Perron, 1985).	Soca deficient en recombinases utilitzada per el creixement i la clonació de plàsmids. Presenta una elevada eficiència de transformació i permet realitzar l' <i>screening</i> blau/blanc en presència d'IPTG i d'X-gal.
Epicurian Coli XL1-Blue Supercompetents cells	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> Z Δ M15 TN10 (Tet ^r) ^c	Soca deficient en recombinases utilitzada per la clonació de dsDNA <i>nicked</i> circular. Presenta una elevada eficiència de transformació.

Taula 1. Soques bacterianes d'*Escherichia Coli*.

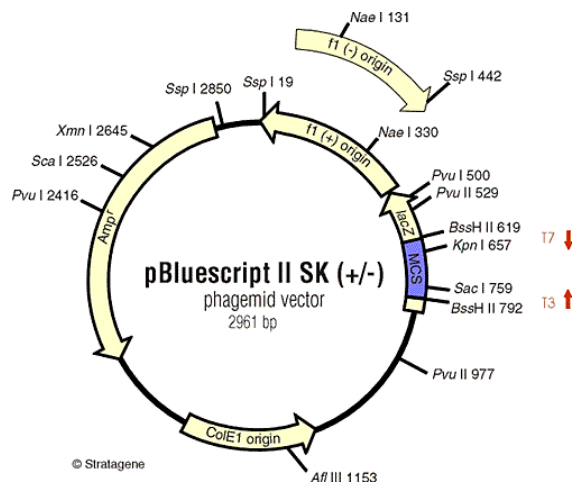
V. Vectors

Alguns dels vectors més rellevants per aquest treball són els descrits a continuació:

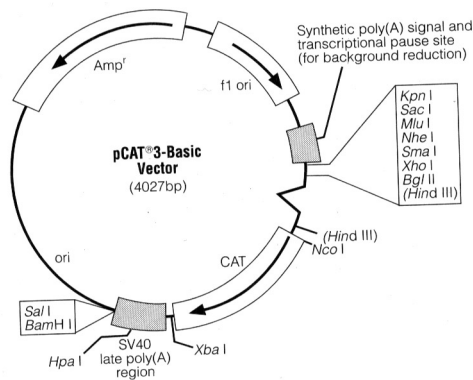
pGEMT: Plàsmid que permet el clonatge de productes de PCR, ja que conté extrems timidina protuberants. Selecció: amp i X-gal. (Promega).



pBluescript II SK: Vector de clonatge. Selecció: amp i X-gal. (Promega).

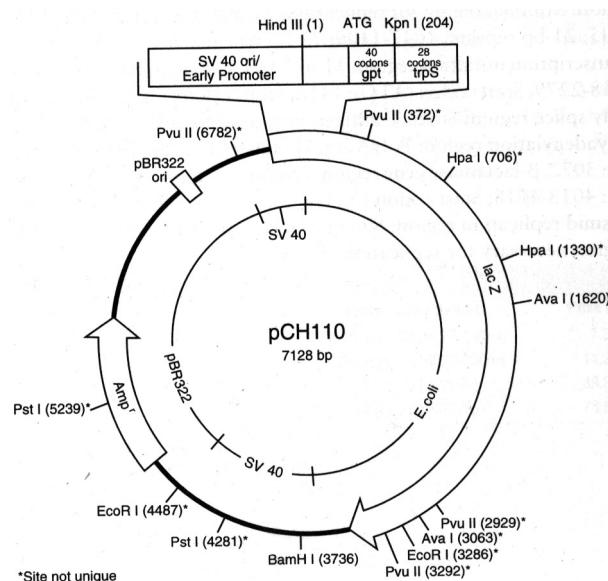


pCAT-Basic: Plàsmid que permet la clonació de fragments de promotor fusionats amb la seqüència codificant de l'enzim cloramfenicol acetil transferasa, els nivells del qual indicaran la capacitat de transactivació del fragment de DNA clonat, en experiments de transfecció transitòria. (Promega). En aquest treball, ha sigut utilitzat com a control androgènic perquè contenia un fragment de 1430 bp del gen del pepsinogen C humà (). Aquesta construcció va ser cedida amablement pel Dr. López Otín.

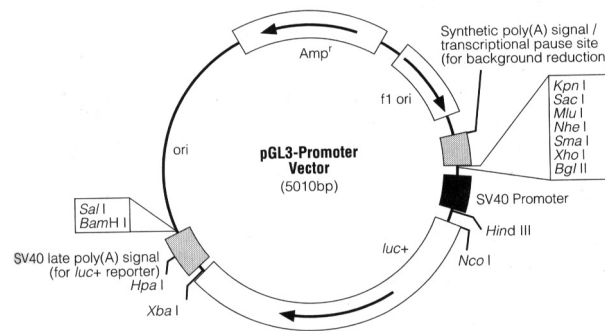


pPLCAT: Plàsmid que permet la clonació de fragments de promotor fusionats amb la seqüència codificant de l'enzim cloramfenicol acetil transferasa. Plàsmid utilitzat, en aquest treball, per assjar els fragments de -224, -638 i -1542 bp del promotor del gen del KAP. Aquestes tres construccions van ser cedides pel Dr. J. F. Catterall. La utilització d'aquests plàsmids implica la realització d'assaigs enzimàtics radiactius.

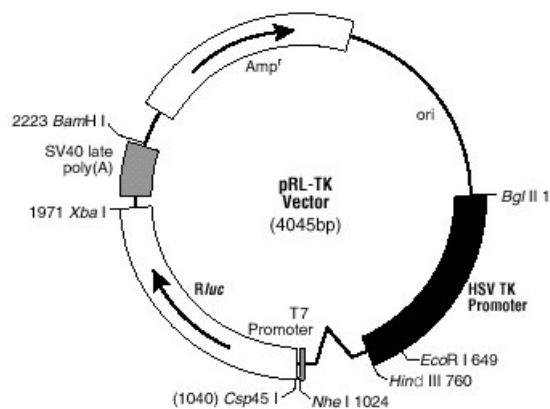
pCH110: Plàsmid amb la seqüència codificant de l'enzim b-galactosidasa, utilitzat com a control de l'eficiència de transfecció. Utilitzat, en aquest treball per normalitzar l'activitat CAT. (Amersham Pharmacia Biotech).



pGL3-Basic: Plàsmid que permet la clonació de fragments de pomotor fusionats amb la seqüència codificant de l'enzim luciferasa, els nivells del qual, detectats per colorimetria, indicaran la capacitat de transactivació del fragment de DNA clonat, en experiments de transfecció transitòria. (Promega).



pRL-TK: Plàsmid amb la seqüència codificant de l'enzim renilla luciferasa, utilitzat com a control de l'eficiència de transfecció. Utilitzat, en aquest treball per normalitzar l'activitat luciferasa. (Promega).



VI. Clonatge de DNA

VI.a. Preparació del vector i de l'insert

Tant els fragments de DNA a clonar com el vector es van digerir, quan va ser possible, amb els enzims de restricció adequats per tal de generar extrems compatibles.

En el cas que s'hagi utilitzat un únic enzim caldrà defosforilar en 5' el vector per prevenir la recircularització del mateix durant la lligació. El protocol de defosforilació utilitzat va ser el següent:

1- Comprovar que s'hagi assolit la digestió completa del plàsmid.

2- Reacció de defosforilació:

10x Tampó de fosfatasa alcalina..... 10 µL

Vector digerit..... 10 µg

Fosfatasa alcalina (1 U/µL)..... 0,02 U/µL

H₂O..... fins al volum final (100 µL)

3- Incubar a 37 °C durant 60 min.

4- Inactivar la fosfatasa amb 10 µL d'EGTA 200 mM.

5- Escalfar a 65 °C 10 min.

El vector defosforilat i l'insert de DNA (veure, també, l'apartat de clonatge de productes de PCR) es poden purificar mitjançant una electroforesi preparativa i el *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen). Un cop purificats el vector i l'insert es va estimar la seva

concentració en un gel d'agarosa, comparant la intensitat de les bandes problema amb les d'un marcador amb bandes amb massa coneguda.

Quan els extrems entre el vector i l'insert no són cohesius cal transformar-los de protuberants a roms. Si els extrems que sobresurten són els 5', es poden omplir fins a fer-los roms, mitjançant una reacció de *fill-in* amb el fragment *Klenow* de la DNA polimerasa I d'*E.coli*. La reacció es pot realitzar a continuació de la digestió enzimàtica, abans de la purificació. El protocol utilitzat va ser el següent:

1- Reacció de fill-in d'extrems sobresortints en 5':

DNA.....	0,1-1 µg
dNTPs 0,5 mM (Promega)	25 µM
Klenow (Boehringer Mannheim).....	2 U
H ₂ O.....	fins al volum final (20 µL)

2- Incubar 30 min a 37°C.

3- Aturar la reacció escalfant 10 min a 75°C.

VI.b. Clonatge de productes de PCR

Per clonar els productes de PCR es va utilitzar el *pGEM®-T Vector Systems* (Promega), que aprofita el fet que certes polimerases termostables com la *Taq* o la *Tfl* sovint afegeixen una única deoxiadenosina en els extrems en els extrems 3' dels productes amplificats (activitat "extandasa"). El vector subministrat en el kit ja bé linearitzat, i conté una timidina

terminal a cada extrem 3', de manera que els extrems de l'insert i del vector són compatibles i s'incrementa l'eficiència de la lligació.

Preparació de l'insert:

Si el fragment a clonar provenia d'una PCR amb múltiples bandes, es va retallar la banda desitjada i es va purificar segons el protocol descrit en l'apartat de purificació de DNA a partir de gels.

Si el producte de PCR a clonar era una banda única es purificava directament, sense passar per un gel d'agarosa, utilitzant el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

VI.c. Reacció de lligació

1- Reacció de lligació:

DNA plasmídic digerit.....	100 ng
DNA de l'insert.....	*
Tampó 10x.....	1 µL
T4 DNA ligase (Promega).....	1 U
H ₂ O.....	fins al volum final (10 µL)

2- Incubar:

- 16 h a 15 °C, si els extrems són protuberants o roms.
- o/n a 4°C, si és producte de PCR.

*Hem utilitzat la relació molar vector:insert de 3:1 calculada amb la fórmula següent:

$\frac{\text{ng de vector} \times \text{mida de l'insert (en Kb)}}{\text{mida del vector (en Kb)}} \times \frac{1}{3} = \text{ng d'insert}$

mida del vector (en Kb) 3

VI.d. Electro-transformació amb elevada eficiència d'E.coli

VI.d.1. Preparació de bacteris competents

El protocol d'obtenció de bacteris competents es va realitzar en base al mètode de transformació emprat, seguint-se les instruccions detallades en el manual de l'aparell d'electroporació (veure el següent apartat). La soca d'E.coli que s'ha fet servir és la JM109, que permet transformar eficientment amb una varietat de mètodes.

El protocol d'obtenció de cèl·lules competents utilitzat va ser el següent:

- 1- Creïxer en una placa d'LB sense antibiòtic, un *streak* de la soca d'E.coli JM109 a 37°C o/n.
- 2- Inocular un minicultiu líquid de 3mL d'LB amb una colònia aïllada. Creïxer o/n.
- 3- Amb 1mL del cultiu fresc inocular un elernmeyer gran amb 500 mL d'LB. Incubar-lo a 37°C amb agitació (225 rpm) fins que el cultiu assoleixi una densitat A₅₉₅ ~0.7-0.8 (fase exponencial).
- 4- Deixar el cultiu en gel durant 15 min.
- 5- Centrifugar a 3500 rpm durant 15 min a 4°C. Decantar el sobrenedant.
- 6- Resuspendre el *pellet* bacterià en 500 mL d'H₂O freda (4 °C) estèril. Centrifugar de nou com en el pas n°5.

- 7- Decantar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 250 mL d'H₂O freda autoclavada. Centrifugar com en el pas nº5
- 8- Resuspendre els bacteris en 10 mL de glicerol al 10% fred i centrifugar com al punt 5.
- 9- Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en un volum de 1-2 mL de glicerol 10% fred. Repartir els bacteris resuspesos en alíquotes de 40µL i congelar-les ràpidament en un bany de cetona/neu carbònica. Conservar les cèl·lules competents a -80°C.

VI.d.2. Electroporació

Per transformar els bacteris i obtenir una elevada eficiència de transformació, s'ha utilitzat l'aparell Bio-Rad *Gene Pulser*TM de Bio-Rad amb cubetes d'electroporació de 0,2 cm (Bio-Rad) i el següent protocol:

- 1- Es descongela en gel una alíquota de cèl·lules competents, mantenir fredes les cubetes d'electroporació i el suport de les cubetes.
- 2- Afegir a la suspensió de bacteris 1-3 µL del DNA que es desitja transformar (~50 ng). Es barreja suaument. Mantenir en gel durant 1 min.
- 3- Condicions de l'electroporador:

Resistència	200 Ω
Capacitància	25 µF
Voltatge	2,5 kV
- 4- Transferir els bacteris amb el DNA a la cubeta refredada en gel.
- 5- Situar la cubeta en el suport i introduir-los a la cambra d'electroporació fins que contacti amb els electrodes.
- 6- Realitzar el pols amb els paràmetres seleccionats.
- 7- Afegir a la cubeta 1 mL de medi LB, recuperar tot el volum i incubar amb agitació a 37°C durant

45 min.

- 8- Sembrar una alíquota de 100 µL en plaques de medi selectiu, per tal d'identificar els transformants.

VII. Purificació i extracció d'àcids nucleics

S'han utilitzat diversos mètodes de purificació d'àcids nucleics, depenent de l'origen dels mateixos i de les seves característiques. Alguns d'aquests mètodes es basen en kits comercials i, en aquests casos, es va seguir el protocol indicat pel fabricant. Els mètodes utilitzats en aquesta tesi són:

VII.a. Extracció de RNA de teixit i de cèl.lules

El mètode emprat per a l'extracció d'ARN total de teixit ha estat el de l'AGPC ("Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform") (125) amb algunes modificacions. Tant el material com els reactius utilitzats eren lliures de ribonucleases. El teixit de partida ha estat en tots els casos ronyó de ratolí. També s'ha extret RNA a partir de cèl.lules PKSV-PCT, PKSV-PR i CV-1 i, en aquests casos, el protocol es començava en el pas 2 i amb la modificació de rascar amb solució D les cèl.lules crescudes en una placa de cultiu. El protocol utilitzat emprat és el següent:

- 1- Mantenir les mostres en neu carbònica.
- 2- Homogenar cada ronyó en 4 mL de solució D / Rascar una placa de 60 mm de diàmetre amb 250 mL de solució D.

- 3- Passar l'homogenat a tub Corex® de vidre lliure de ribonucleases i afegir:
- 400 µL d'Acetat sòdic 2M pH 4,0. Barrejar per inversió.
 - 4 mL de Fenol-H₂O(DEPC). Barrejar per inversió.
 - 800 µL de cloroform-alcohol isoamílic. Agitar amb força.
- 4- Deixar reposar en gel 15 min.
- 5- Centrifugar 30 min a 10000 rpm a 4 °C.
- 6- Recuperar la fase aquosa.
- 7- Afegir 5,5 mL d'isopropanol 100% fred (-20°C) i agitar amb força.
- 8- Incubar a -20 °C durant més de 2 hores.
- 9- Centrifugar 20 min a 10000 rpm a 4°C.
- 10- Decantar el sobrenedant d'immediat i resuspendre en 700 µL de solució D.
- 11- Afegir 700 µL d'isopropanol 100% fred i agitar amb força.
- 12- Incubar a -20 °C durant 60 min com a mínim.
- 13- Microfugar 15 min a 13000 rpm a 4 °C.
- 14- Decantar el sobrenedant d'immediat i rentar el *pellet* amb etanol 70% fred.
- 15- Microfugar 15 min a 13000 rpm a 4 °C.
- 16- Decantar el sobrenedant i assecar el *pellet*.
- 17- Resuspendre en H₂O i valorar la concentració a l'espectrofotòmetre (Gene Quant II, Amersham Pharmacia-Biotech).

Solució D:

Tiocianat de guanidina 4 M

Citrat sòdic 25 mM pH 7,0

Sarcosil 0,5 %

Afegir 720 µL de β-mercaptoetanol per cada 100 mL abans d'utilitzar.

VII.b. Purificació de DNA plasmídic a petita escala (Miniprep)

Per l'obtenció de plàsmid a partir d'un minicultiu bacterià, es va utilitzar el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguint el protocol estàndard subministrat amb el kit, només es va modificar el volum de resuspensió portant a 50 µL finals (el protocol original indica 100 µL). Es van processar volums de 3-5 mL de cultiu, segons el rendiment final desitjat, i es van obtenir d'entre 15-20 µg de DNA de plàsmids d'alt nombre de còpies. La puresa del DNA obtinguda mitjançant aquest mètode és suficient per què pugui ser directament utilitzat en reaccions de seqüenciació automàtica fluorescent o en digestions enzimàtiques.

VII.c. Purificació de DNA plasmídic a gran escala (Maxiprep)

Es va utilitzar el *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) per tal de preparar grans quantitats de plàsmid (fins a 1 mg). El DNA plasmídic obtingut d'aquesta manera és d'una qualitat excel·lent, apte per a la gran majoria d'aplicacions; transfecció, seqüenciació, digestió, etc.

VII.d. Digestió del DNA

Totes les digestions es van realitzar amb enzims de restricció de la casa Boehringer Mannheim a una concentració d'aproximadament 2 U/µg de DNA. Les temperatures utilitzades han estat les indicades pel proveïdor i els temps de digestió han variat entre 2 i 18 hores.

VII.e. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

El material d'electroforesi utilitzat han estat cubetes de la casa Ecogen i Bio-Rad.

VII.e.1. Electroforesi analítica

Per tal de visualitzar tant els productes de purificació d'àcids nucleics, com de PCR, com els resultats de les digestions, es va utilitzar l'electroforesi en gels d'agarosa-TAE (1x) amb percentatges d'agarosa que han oscil·lat entre 0,7% i 2,5% (w/v), segons si interessava resoldre fragments d'elevat o de baix pes molecular respectivament, i amb voltatges d'entre 70 i 115 V. El bromur d'etidi s'incorporava en els gels a una concentració final de 0,5 µg/mL.

VII.e.2. Electroforesi preparativa

A diferència de l'anterior, aquesta electroforesi es va utilitzar per recuperar fragments de DNA de tamany diferent digerits amb enzims de restricció. Per aquesta raó, es va utilitzar una agarosa de gran puresa (*Molecular biology grade agarose*, Promega), pous i volums de càrrega més grans, els gels es van córrer amb voltatges inferiors, i per tant, més lentament.

VII.f. Obtenció de DNA a partir de gels d'agarosa

En una electroforesi preparativa, un cop separats els fragments de DNA, es retalla

amb un bisturí estèril, sota il·luminació ultraviolada de baixa energia per visualitzar el DNA, la banda o les bandes que interressi recuperar. Es pesa la banda d'agarosa escindida i es procedeix a purificar-ne el DNA, amb el *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen). Aquest kit està basat en la utilització de columnetes amb una membrana de sílica-gel, on el DNA pot adsorvir-se en presència de sals caotrópiques, que el reté unit durant els rentats per eliminar les impureses, fins al pas final d'elució.

Es van seguir les instruccions del subministrador però l'elució normalment es feia en 30 µL enlloc de 50, per tal d'obtenir una major concentració.

VII.g. Purificació de productes de RT-PCR o PCR

Sovint és necessària la purificació dels productes de PCR. En aquells casos en que el producte amplificat era únic, es va utilitzar el kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) segons les instruccions del fabricant. Per altra banda, quan el producte d'amplificació no era únic es va purificar a partir de gel d'agarosa seguint les indicacions especificades a l'apartat anterior.

VIII. RT-PCR semiquantitativa

La reacció en cadena de la polimerasa ens permet obtenir grans quantitats de DNA a partir d'un àcid nucleic motlle, alhora que fa possible la introducció de modificacions específiques, com ara dianes de restricció als extrems del DNA i mutagènesi dirigida, entre moltes altres.

Les condicions d'amplificació (126) depenen en gran part del fragment de DNA que es vol amplificar, així com de les característiques intrínseques dels oligonucleòtids d'elecció. Es va utilitzar la metodologia de la RT-PCR semiquantitativa per determinar aproximadament la quantitat inicial de RNA dels gens d'interès respecte la d'un gen control intern, que és el de la Ciclofilina A (Cyp A). La utilització de dit control permet normalitzar els valors d'amplificació per la qualitat, quantitat del RNA utilitzat i per l'eficiència de la reacció de RT-PCR en cada una de les mostres amplificades. Les dues reaccions són independents, per tal d'evitar competicions i interferències en el procés d'amplificació.

El procediment de la RT-PCR semiquantitativa consisteix en la construcció d'una recta patró, els valors de la qual són els valors relatius obtinguts de l'amplificació per RT-PCR de quantitats decreixents de DNA plasmídic amb el cDNA dels gens d'interès. En la mateixa reacció s'amplifiquen els RNAs extrets de ronyons o cèl·lules i el valor relatiu de dita amplificació respecte el de Cyp A, interpolat a les seves respectives rectes patró, indica el contingut de mRNA del gen d'interès de la mostra estudiada.

VIII.a. Plàsmids

Els plàsmids que es van utilitzar per fer les rectes patrons són els següents:

Nom	cDNA	Característiques
pGEM [®] -T-KAP	cDNA complet de KAP	Selecció: amp i X-gal
pGEM [®] -T-Cyp A	cDNA parcial de Cyp A	Selecció: amp i X-gal
pMSV-mC/EBP	cDNA complet de C/EBP α murina	Vector d'expressió eucariota Selecció: amp
pMSV-LAP	cDNA complet de C/EBP β murina	Vector d'expressió eucariota Selecció: amp i X-gal

Taula 2. Plàsmids utilitzats per les rectes patró de KAP, Cyp A, C/EBP α i C/EBP β .

VIII.b. Oligonucleòtids

Tots els oligonucleòtids han estat dissenyats escollint-se les parelles que presentaven unes condicions d'amplificació òptimes segons el programa *OLIGO®-4.02 Primer Analysis Software*. Els oligonucleòtids van ser sintetitzats per Boehringer Mannheim.

Nom	Seqüència	Tm	Característiques
KUP2HYB	5'-GCATGATGCTTTTCAAGG-3'	51,4	RT-PCR KAP
KLOW2HYB	5'-TCAGGAAGTAGGGGAGACTGG-3'	61,8	RT-PCR KAP
β -actina Up	5'-GTGGGCCGCTCTAGGACACAA-3'	68,0	RT-PCR β -actina
β -actina Low	5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'	70,0	RT-PCR β -actina
*Cyp Up	5'-ATGGTCAACCCACCGTG-3'	58,2	RT-PCR Cyp A
*Cyp Low	5'-CAGATGGGGTAGGGACG-3'	57,6	RT-PCR Cyp A
mC/EBP Up	5'-TGGACAAGAACAGCAACGAG-3'	60,0	RT-PCR C/EBP α
mC/EBP Low	5'-GACTCCCTCATCTTAGACGCA-3'	64,0	RT-PCR C/EBP α
C/EBP α Up	5'-TGGCTCTAAGATGAGGGAGT-3'	57,3	RT-PCR C/EBP α
C/EBP α Low	5'-GATTAGGAGCCCTCCACCTC-3'	61,4	RT-PCR C/EBP α
RT749 Low	5'-TTGTCCACCGTCTTCTTG-3'	53,7	RT C/EBP β
be Up	5'-CAACTTCTACTACGAGCCCGACTG-3'	54,0	PCR C/EBP β
be Low	5'-GCGAAGAGGTCGGAGAGGAAGT-3'	64,0	PCR C/EBP β
AP2 Up	5'-GTCCAAGTCCAACAGCAATG-3'	57,3	RT-PCR AP2
AP2 Low	5'-CTCCCTCCATTCTTAGACTTCG-3'	60,3	RT-PCR AP2
**K650Luc Up	5'-GGTACCCATGTTCTTGACCCCATG-3'	53,4	Diana Kpn I
**K650Luc Low	5'-AGATCTGGGCTTTTATACATCCTGTACCCTCTC-3'	57,6	Diana Bgl II

Taula 3. Oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació de KAP, Cyp A, fragment del cDNA de C/EBP α clonat en pMSV-mC/EBP, C/EBP α , C/EBP β i AP-2. * Oligonucleòtids utilitzats també per la clonació d'un fragment de Cyp A en pGEM®-T. **Oligonucleòtids utilitzats per clonar un fragment del promotor del KAP.

VIII.c. Condicions d'amplificació:

VIII.c.1. Transcripció reversa (RT)

La primera cadena de cDNA s'obté a partir del mRNA per extensió amb oligo(dT) o amb un oligonucleòtid 3' específic. Reacció explicada en l'apartat RT-PCR semiquantitativa en dos passos.

VIII.c.2. PCR

Són molts els paràmetres a contemplar en el disseny d'una reacció de PCR. L'optimització de la mateixa passa per variar tant les concentracions dels reactius, com les temperatures i els temps d'amplificació. A continuació s'indiquen unes condicions estàndard aplicables, com a punt de partida previ a l'optimització, als productes amplificats.

Barreja de reacció:

Concentració final

Tampó de PCR* 1x

MgCl₂ 1,5 mM

dNTPs (Promega) 200 µM *De diferents cases comercials

Oligonucleòtid 5' 1 µM

Oligonucleòtid 3' 1 µM

Taq polimerasa* 0,04 U/µL

H₂O Fins al volum final

Condicions d'amplificació:

94 o 95 °C, 3 min

93 o 94 °C (entre 15 seg i 1 min)

~T_m (oligonucleòtids) - 5 °C (entre 15 seg i 1 min) } x 25-30

72 °C (entre 30 seg i 3 min)

72 °C, 5 min

4 °C, ∞

VIII.d. RT-PCR semiquantitativa en un sol pas

Utilitzant una barreja de polimerases (transcriptasa reversa + Taq DNA polimerasa) i unes condicions d'amplificació determinades, és possible realitzar la síntesi del cDNA i la PCR en un únic tub utilitzant oligonucleòtids específics. A tal efecte s'ha utilitzat el kit comercial *SuperScript™ One-Step™ RT-PCR System* de Life Technologies. Les reaccions d'amplificació es van dissenyar segons les indicacions de la casa subministradora.

Es va utilitzar el termociclador PCT-100™ Programable Thermal Controller (MJ Reseach) i els següents programes d'amplificació:

1- Síntesi del cDNA (RT) i predesnaturalització:

48°C, 30 min.

94°C, 2 min.

2- PCR

94°C, 30 seg.

56°C, 30 seg. x 25 cicles per KAP i Cyp A

72°C, 1 min. x 30 cicles per C/EBP α

72°C, 5 min.

4°C, ∞

Els plàsmids que es van utilitzar en quantitats decreixents per obtenir les rectes patró, també van ser amplificats en les mateixes condicions i en la mateixa reacció de RT-PCR que les mostres analitzades.

VIII.e. RT-PCR semiquantitativa en dos passos

Per l'amplificació de C/EBP β va ser necessari fer la RT-PCR en dos passos i en condicions desnaturalitzants, ja que el cDNA de C/EBP β és ric en GC.

Les condicions que es van utilitzar per la RT van ser les descrites a continuació:

1- Barrejar:

Concentració final

RNA total 2,5 μ g

RT749 Low..... 0,25 μ M

DMSO (Sigma) 5%

H₂O DEPC..... Fins al volum final (12 μ L)

- 2- Escalfar a 70°C, 10 min.
- 3- Refredar a 4°C
- 4- Un pols de microcentrífuga
- 5- Afegir:

	Concentració final	
First Strand Buffer 5x *	1x	
DTT 0,1 M *	10 mM	* Life Technologies
dNTPs 10 mM (Promega)	0,5 mM	

- 6- Incubar a 48°C, 2 min.

- 7- Afegir:

1 µL SUPERSRIPT™ II (Rnase H⁺ Reverse Transcriptasa, 200U/µl) *

- 8- Incubar a 48°C, 50 min.

- 9- Escalfar a 70°C, 15 min.

Les condicions de la PCR van ser:

Reacció de PCR

	Concentració final
Tampó de PCR 10x (Qiagen)	1x
Q-Solution 5x (Qiagen)	1x
dNTPs 10 mM (Promega)	0,2 mM
be Up 10 µM	0,5 µM
be Low 10 µM	0,5 µM
HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)	2,5 U
H ₂ O	Fins al volum final (100 µL)

Programa d'amplificació

Realitzat en el termociclador PCT-100™ Programable Thermal Controller.

95°C, 15 min.

94°C, 1 min.

56°C, 30 seg. } x 30 cicles

72°C, 1 min.

72°C, 10 min.

4°C, ∞

Els plàsmids que es van utilitzar per obtenir les rectes patró, també van ser amplificats en les mateixes condicions i en la mateixa reacció de PCR que les mostres analitzades.

IX. Seqüenciació automàtica

Les reaccions de seqüència es van fer utilitzant el *ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Cycle Ready Reaction Kit*† (Perkin Elmer), basat en el mètode de terminació de cadena pels dideoxinucleòtids (127). Per la seqüenciació dels plàsmids es va seguir el següent protocol:

1- Reacció:

Concentració final

Plàsmid (≥ 100 ng/ μ L)..... 900 ng

Oligonucleòtid (5 pmol/ μ L) * 0,25 pmol/ μ L

dRhodamine kit† 4 μ L

H₂O..... fins al volum final (20 µL)

*Oligonucleòtid	Seqüència	Tm	Característiques
RV3	5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCC-3'	56,0	**pGL3-Basic vector
GL2	5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC-3'	62,0	**pGL3-Basic vector

Taula 4. Oligonucleòtids utilitzats en la seqüenciació dels inserts clonats en el vector *reporter* pGL3-Basic**, descrit en l'apartat Vectors d'aquesta secció. Amb RV3 es sintetitza la cadena *sense* i amb GL2 es sintetitza la cadena *antisense*.

2- Agitar amb un *vortex*.

3- Un pols de microcentrífuga.

4- Condicions d'amplificació:

94° C, 3 min.

96° C, 10 seg.

*55° C, 5 seg. } x 25 cicles *T° *annealing* per RV3/GL2

60° C, 4 min.

4° C, ∞

5- Per a la precipitació, afegir:

Clorur de Magnesi 0,4 mM final

58,4 µL Etanol 95%

16 µL H₂O

6- Incubar 10 min a temperatura ambient.

7- Centrifugar a 13000 rpm a temperatura ambient, 15 min.

8- Rentar el *pellet* amb etanol 70%.

9- Assecar.

10- Guardar *el pellet* sec a 4°C.

Les reaccions de seqüència precipitades es van donar al servei intern de seqüenciació del centre, que disposa d'un aparell de seqüenciació *ABI PRISMTM 310 Genetic Analyser* (Perkin Elmer). El seqüenciador transcriu les seqüències en forma d'histograma de 4 colors (vermell = Timina, negre = Guanina, blau = Citosina, verd = Adenina), que posteriorment ha de ser analitzat.

X. Extracció de proteïna

X.a. Separació de la fracció nuclear a partir de:

X.a.1. Extracció de proteïna de teixit

- 1- Mantenir les mostres en neu carbònica.
- 2- Homogenar el teixit congelat en el Potter (Biotech) amb un volum de tampó A que depèn de la quantitat del teixit (10 mg/mL).

Tampó A:

	Concentració final
Tris-HCl pH 6,8	20 mM
MgCl ₂	3 mM
NaCl	50 mM
Sacarosa	300 mM

Tritó X-100	1%
-------------	----

Afegir els inhibidors de proteases abans d'utilitzar:	Aprotinina	1×10^{-3} mg/mL
	Leupeptina	1×10^{-3} mg/mL
	PMSF	2mM
	Na_3OV_4	1mM

3- Centrifugar a 13000 rpm a 4°C, 15 min.

4- Amb el sobrenedant, constituït pel citoplasme i les membranes, es segueix el següent protocol (128):

4.1- Escalfar a 70°C durant 5 min.

4.2- Centrifugar a 14000 rpm a 4°C, 20 min.

4.3- Congelar el sobrenadant a -80°C.

5- El *pellet*, en el que hi ha els nuclis i les proteïnes del citoesquelet, es tracta de la següent manera:

5.1- Solubilitzar el *pellet* en la quantitat de tampó B necessària per dissoldre la fracció nuclear (aproximadament 1/10 volum tampó A).

Tampó B:

	Concentració final
Tris-HCl pH 7,5	25 mM
EGTA	1 mM
EDTA	2 mM
SDS	1%

Afegir els inhibidors de proteases abans d'utilitzar:	Aprotinina	1×10^{-3} mg/mL
---	------------	--------------------------

Leupeptina 1×10^{-3} mg/mL

PMSF 2mM

Na_3VO_4 1mM

5.2- Sunicar l'extracte en una cubeta amb gel fins que desapareixi la turbidesa, evitant la formació d'escuma.

5.3- Centrifugar a 13000 rpm a 4°C, 15 min.

5.4- Congelar el sobrenadant a -80°C.

X.a.2. Extracció de proteïna de cèl.lules

Per l'extracció de proteïna de cèl.lules es va utilitzar el mateix protocol que per teixit, només es diferencien en els primers passos, que són:

- 1- Rentar el cultiu cel.lular, crescut en una placa de cultiu, amb PBS fred 3 vegades.
- 2- Rascar les cèl.lules amb un *scraper* estèril amb un volum de tampó A que depèn del tamany de la placa de cultiu i de l'estat de creixement cel.lular, és a dir, del nombre de cèl.lules. (1 mL tampó A/placa 10 cm de diàmetre). Recollir i passar a un tub eppendorf.
- 3- Homogenar els extractes per agitació orbital a 4°C, durant 30-60 min.
- 4- Continuar en el pas 3 del protocol descrit pels extractes proteics de teixit.

X.b. Mètode de Bradford

El mètode de Bradford (129) es va utilitzar per determinar la quantitat de proteïna dels extractes proteics. En aquest mètode, els enllaços peptídics de les proteïnes reaccionen

amb la solució àcida del colorant (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) per donar lloc a un producte acolorit que presenta un màxim d'absorbància a 595 nm. La intensitat del color format és proporcional al nombre d'enllaços peptídics que reaccionen i per tant al nombre de molècules de proteïna presents en la mostra. Es va utilitzar el kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) i el protocol per fer l'assaig en una placa d'Elisa de 96 pous, que consisteix en:

- 1- Fer una recta patró amb quantitats conegudes de BSA (Bio-Rad), entre 0 i 1,37 mg/mL BSA diluïda en el mateix tampó en el que s'han solubilitzat els extractes proteics (tampó A pels extractes citoplasmàtics i tampó B pels nuclears).
- 2- Col·locar 5 µL de la recta patró i dels extractes proteics (generalment diluïts) per pou.
- 3- Afegir 25 µL de la solució A' ($A' = 20 \mu\text{L}/1000 \mu\text{L A}$)
- 4- Afegir 200 µL del colorant (B) i barrejar.
- 5- Incubar 15 min a temperatura ambient.
- 6- Llegir a 690 nm en un espectofotòmetre Anthos htII (IZASA) abans de 45 min.
- 7- Extrapolar el valor d'absorbància de les mostres als de la recta patró i per regressió lineal calcular la concentració de proteïna en mg/mL multiplicada pel factor de dilució.

XI. Western Blot

Les proteïnes es separen electroforèticament i es transfereixen a un suport sòlid de nitrocel·lulosa o PVDF, que s'hibrida amb anticossos que reconeixen específicament l'antigen de la proteïna unida a la membrana.

XI.a. Electroforesi i transferència de proteïnes:

El protocol que es va utilitzar és el següent:

- 1- Preparar la mostra barrejant 50 µg d'extracte proteic amb tampó de càrrega (*Laemmli Buffer*) 1x a un volum final de càrrega de 12 µL.
- 2- Bullir durant 5 min i refredar en gel.
- 3- Separar electroforèticament, a amparatge constant (40 mA), les mostres en un gel discontinu d'acrilamida al 12,5% i SDS, durant 1 h aproximadament.

Tampó d'electroforesi:

	Concentració final
Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1 %

- 4- Preparar l'electrotransferència:

4.1- Tallar la membrana de nitrocel.lulosa (Bio-Rad) del mateix tamany que el gel sense la part d'*stacking* que s'elimina.

4.2- Hidratar la membrana.

4.3- Muntar l'aparell de transferència (Fer el procés en humit amb tampó de transferència):

- a) Pol negatiu del suport de transferència
- b) 2 papers Watmann
- c) Gel
- d) Membrana

- e) 2 papers Watmann
- f) Pol positiu del suport de transferència

5- Col·locar l'aparell de transferència en la cubeta d'electroforesi amb el tampó de transferència 1x fred.

Tampó de transferència:

	Concentració final
Tris base	50 mM
Glicina	386 mM
SDS	0,1 %
Metanol	20 %

6- Transferir a 400 mA durant 1 h i 30 min, amb agitació del tampó.

7- Desmuntar la transferència i:

7.1- Tenyir el gel per comprobar l'eficiència de la transferència:

- a) Agitar el gel amb blau de coomassie (Coomassie Brilliant Blue R250 0,025 %, metanol 40 %, àcid acètic 7 %).
- b) Destenyir amb solució de destinció (metanol 40 %, àcid acètic 7 %)
- c) Assecar al buit amb temperatura (80°C) durant 45 min.

7.2- La membrana continua el procés de Western blot.

XI.b. Immunodetecció de la proteïna:

1- Bloquejar la membrana a la que se li han transferit les proteïnes amb tampó TBST (Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 130 mM, i Tween 20 0,1 %) al 4% BSA, o/n a 4°C o durant 3 h a temperatura

ambient.

2- Incubar amb l'anticòs primari* diluït a 0,2 µg/mL amb tampó TBST al 0,4% BSA.

3- Rentar amb:

 TBST, 15 min

 TBST, 5 min. Repetir-ho 2 vegades més.

4- Incubar amb l'anticòs secundari (DAKO) diluït 1:6000 amb tampó TBST al 0,4% BSA.

5- Rentar amb:

 TBST, 15 min

 TBST, 5 min. Repetir-ho una vegada més.

 TBS, 5 min

6- Detecció quimioluminiscent amb el kit *ECL+* d'Amersham-Pharmacia-Biotech. Incubació amb el substrat com s'indica en el protocol del proveïdor, exposició a un *hyperfilm* i revelar. Generalment, es fan diferents exposicions de diferents temps.

*Els anticossos primaris utilitzats van ser els anticossos policlonals de conill; anti C/EBPα (14AA) i anti C/EBPβ (C-19) de Santa Cruz Biotechnologies. Aquests anticossos reaccionen, respectivament, amb p42C/EBPα i amb C/EBPβ de ratolí, rata i humana, i no presenten reactivitat creuada amb altres membres de la família C/EBP. Cada Western blot té el seu control negatiu, que consisteix en el bloqueig de l'anticòs per incubació amb 5 vegades en excés del pèptid que reconeix, i les hibridacions positives mostrades són de bandes específiques, ja que la hibridació amb l'anticòs primari sempre s'ha realitzat amb el bloqueig previ per un pèptid inespecífic. Els pèptids de bloqueig utilitzats van ser; C/EBPα blocking peptide (ref, sc-61 P), C/EBPβ blocking peptide (ref, sc-150 P) i gp130 (M-20) blocking peptide (ref, sc-656 P), de Santa Cruz Biotechnologies.

XII. Assaig de retardament en gel (EMSA)

El grup del Dr. J. F. Catterall (Center for Biomedical Research. The Rockefeller University. New York. USA.) va produir i purificar l'AR utilitzat per l'assaig de retardament en gel de la seqüència GGTACAggaTGTATA (putatiu ARE) del promotor del gen del KAP, segons la metodologia descrita per Xie *et al* (130).

Per determinar si l'AR era capaç d'interaccionar amb la seqüència GGTACAggaTGTATA, es va incubar el rAR recombinant, procedent de cèl.lules de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), amb dita seqüència i com a controls es van utilitzar la seqüència ARE del gen de la tirosina aminotransferasa de rata (TAT) (130) i la seqüència GRE present en la regió promotora proximal del gen de la β -glucuronidasa (G91) i una seqüència (G93) present en la novena seqüència intrònica del mateix gen de la β -glucuronidasa, que sembla ser la responsable de la inducció per andrògens que mostra aquest gen (131). Cada una de les seqüències, marcades amb $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ i incubades en presència o absència del rAR, van ser resoltes en un gel de poliacrilamida al 4%. L'autorradiografia del gel va permetre observar si la seqüència de DNA de doble cadena assajada, quedava retardada respecte a la mateixa seqüència sense prèvia incubació amb la proteïna i, per tant, determinar si la interacció entre DNA i proteïna s'havia produït. Paral.lelament, es van realitzar els experiments de competició amb oligonucleòtid fred, per demostrar l'especificitat de la banda retardada. Aquests experiments també van ser realitzats en el laboratori del Dr. J. F. Catterall (132).

Condicions de l'assaig de retardament en gel:

1- Reacció d'interacció:

- 5 µg de rAR soluble en buffer d'hibridació (basat en Hepes, poly(dI-dC), Nonidet P-40).
- 0,5 ng d'oligonucleòtid marcat de doble cadena.

2- Incubació a 22°C, 20 min.

3- Degut a la diferent mobilitat dels complexos de DNA-proteïna respecte a la de la sonda lliure, aquests van ser separats en un gel de poliacrilamida al 4%, corregut amb buffer d'electroforesi Tris-Borat en presència de 0,1% de Nonidet P-40.

Oligonucleòtids:

KAP: gggaga**GGTACAgga**TGTATAaaag

TAT: ctctgc**TGTACAgga**TGTGCTagcgact

G91: cgacctgga**AGAGTCaca**TGTTCTcgagagaa

G93: cgagtcaag**AGTACT**tg**TGTTCT**tacagag

* La seqüència de l'element de resposta a andrògens està indicada en negreta.

XIII. Mutagènesi dirigida

XIII.a. Protocol

Per deleccionar seqüències específiques del promotor del KAP es va utilitzar el *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). El mètode emprat permet

mutar (canviar, delecionar, inserir) específicament el nucleòtid o nucleòtids d'interès de la seqüència estudiada, clonada en qualsevol plàsmid de doble cadena, és a dir, no és necessari subclonar-la en vectors basats en el bacteriòfag M13 i la utilització de ssDNA.

El procediment bàsic consisteix en el vector dsDNA *supercoiled* amb l'insert d'interès i dos *primers* sintètics que tenen la mutació desitjada. Els primers, complementaris a les cadenes oposades del vector, són prolongats durant la PCR amb *PfuTurbo DNA Polymerase* (Stratagene), que presenta una gran fidelitat. El producte obtingut és un plàsmid mutat amb talls esglaonats, el qual és tractat amb Dpn I, endonucleasa (seqüència diana: 5'-Gm6ATC-3') que digereix el DNA metilat i, per tant, el DNA parental, que prové d'*Escherichia Coli*. Així doncs, mitjançant la digestió amb Dpn I es selecciona el DNA sintetitzat i que té la mutació, el qual, posteriorment, és transformat en *Epicurian Coli*® *XL1-Blue supercompetent cells* (Stratagene).

El protocol utilitzat per delecionar d'entre 6 a 10 nt per ronda de mutació va ser el que es detalla a continuació:

- 1- Preparar la següent reacció d'amplificació:

	Concentració final
Tampó de PCR 10x *	1x
dsDNA	50 ng
Oligonucleòtid mutat Up	125 ng
Oligonucleòtid mutat Low	125 ng

dNTPs 10 mM (Promega) 200 μ M

PfuTurbo DNA polymerase * 2,5 U

H₂O..... fins a un volum de 50 μ L

* Stratagene

2- Condicions d'amplificació (Termociclador PCT-100™ Programable Thermal Controller):

95°C, 30 seg.

95°C, 30 seg.

55°C, 1 min. } x 18 cicles

68°C, 2 min/kb plàsmid

4°C, ∞

- 3- Afegir 1 μ L Dpn I (10 U/ μ L, Boehringer Mannheim), barrejar bé, un pols de centrífuga i digerir a 37°C, o/n.
- 4- Transformar per calor d'entre 1 a 4 μ L del DNA tractat a 50 μ L o 100 μ L d'*Epicurian Coli® XL1-Blue supercompetent cells* (Stratagene).

Les condicions de transformació són:

- a) Deixar descongelar les cèl.lules en gel.
- b) Ràpidament, barrejar el DNA amb les cèl.lules i incubar en gel durant 30 min.
- c) Escalfar a 42°C durant 45 seg i deixar en gel 2 min.
- d) Afegir 0,5 mL de medi NZY⁺ broth preescalfat a 42°C i incubar a 37°C amb agitació de 225-250 rpm durant 1 h.
- e) Sembrar tot el volum de la transformació en plaques LB-agar amb l'antibiòtic

adequat pel plàsmid.

- f) Incubar les plaques a 37°C per un període superior a 16 h.

XIII.b. Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids van ser dissenyats seguint els paràmetres esmentats en el protocol i mitjançant el programa *OLIGO®-4.02 Primer Analysis Software*. Els oligonucleòtids van ser sintetitzats per Boehringer Mannheim.

Requeriments que havien de complir els oligonucleòtids:

- a) Ambdós oligonucleòtids mutagènics han de tenir la mutació desitjada i hibridar amb la mateixa seqüència en les cadenes oposades del plàsmid.
- b) Els oligonucleòtids han de tenir una longitud d'entre 25 a 45 bases i la temperatura de fusió (T_m) ha de ser més gran o igual a 78°C, segons la fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - (\text{núm bases mutades/ núm bases oligonucleòtid} \times 100) *$$

* Si s'utilitza aquesta fórmula, la majoria dels oligonucleòtids enumerats tenen una T_m inferior a la indicada.

- c) La mutació (deleció o inserció) hauria de trobar-se en una posició intermitja de la longitud de l'oligonucleòtid, és a dir, amb 10-15 bases de seqüència correcta

flanquejants.

- d) Els oligonucleòtids han de tenir un mínim contingut de GC del 40 % i haurien d'acabar amb G o C.
- e) Els oligonucleòtids no han de ser 5' fosforilats i han de ser de gran puresa.
- f) Els oligonucleòtids han de mantenir-se en excés.

Els oligonucleòtids sintètics utilitzats per mutagenitzar selectivament la seqüència del promotor del KAP van ser els detallats en aquesta taula:

Nom	Seqüència	Tm
(457-448) Up	5'-CTGGCACTTCTAGATAGTTCTG♦GAGCAGTTCTTCACTGTTCTCC-3'	>75
(457-448) Low	5'-GGAGAACAGTGAAGAACTGCTC♦CAGAACTATCTAGAAGTGCCAG-3'	>75
(429-420) Up	5'-CAATGAGCAGTTCTTCACTGTT♦CTGCCAGGATGAGGACTC-3'	>75
(429-420) Low	5'-GAGTCCTCATCCTGGCAG♦AACAGTGAAGAACTGCTCATTG-3'	>75
(110-101) Up	5'-CTTTAATAGTTCATAAAGGTC♦CCCTCCCCGCCCCCTTTTTTTTC-3'	73,2
(110-101) Low	5'-GAAAAAAAAGGGGGCGGGGAGGG♦GACCTTTATGAACTATTAAAG-3'	73,2
(66-57) Up	5'-CTCCAGCCAACCA♦CCTTCAGGGAGAGGGTACAGGATGTATAAAAG-3'*	>75
(66-57) Low	5'-CTTTTATACATCCTGTACCCTCTCCCTGAAGG♦TGGTTGGCTGGAG-3'*	>75
ARE (39-25) Up	5'-CCTTCAGGGAGAG♦GGATGTATAAAAGCC-3'	66,6
ARE (39-25) Low	5'-GGCTTTTATACATCC♦CTCTCCCTGAAGG-3'	66,6

Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats en la deleció dels nucleòtids especificats entre parèntesi en el nom de l'oligonucleòtid. ♦; indica la posició en la que es trobaria la seqüència delecionada. Els buits primers oligonucleòtids mutagènics delecionen seqüències de 10 nt, que en el promotor del gen de KAP es troben en les posicions indicades i que poden ser caixes C/EBP. * Com es pot apreciar en aquests oligonucleòtids, no sempre es pot complir l'apartat d). L'últim oligonucleòtid representa la seqüència del putatiu ARE mutat (consisteix en la deleció de sis nucleòtids del putatiu ARE identificat en el promotor de KAP).

XIV. Transfecció transitòria

XIV.a. Plàsmids

Els plàsmids que es van utilitzar en assaigs de transfecció transitòria van ser els següents:

a) Plàsmids *reporter* del promotor de KAP:

Nom	Promotor	Reporter
K224	Fragment de 224 bp del promotor del KAP	CAT*
K638	Fragment de 638 bp del promotor del KAP	CAT
K1542	Fragment de 1542 bp del promotor del KAP	CAT
K224L	Fragment de 224 bp del promotor del KAP	LUC*
K224L (ARE 39-25)	224 bp KAP deleció nt 39-25	LUC
K224L (66-56)	224 bp KAP deleció nt 66-56	LUC
K224L (110-101)	224 bp KAP deleció nt 110-101	LUC
K638L	Fragment de 638 bp del promotor del KAP	LUC
K638L (66-56)	638 bp KAP deleció nt 66-56	LUC
K638L (110-101)	638 bp KAP deleció nt 110-101	LUC
K638L (429-420)	638 bp KAP deleció nt 429-420	LUC
K638L (457-448)	638 bp KAP deleció nt 457-448	LUC
K638L (457-448, 429-420)	638 bp KAP deleció nt 457-448 i 429-420	LUC
K638L (457-448, 429-420, 110-101)	638 bp KAP deleció nt 457-448 i 429-420 i 110-101	LUC
K638L (457-448, 429-420, 66-56)	638 bp KAP deleció nt 457-448 i 429-420 i 66-56	LUC
K638L (457-448, 429-420, ARE 39-25)	638 bp KAP deleció nt 457-448 i 429-420 i ARE 39-25	LUC

Taula 6. Plàsmids utilitzats pels assaigs funcionals del promotor del KAP. CAT* : cDNA de l'enzim cloroemfenicol acetil transferasa com a *reporter* en el vector pPLCAT; LUC* : cDNA de l'enzim luciferasa com a *reporter* en el pGL3-Basic vector.

b) Controls positius:

Nom	Promotor	Reporter
pCAT1430	Fragment de 1430 bp del promotor del pepsinogen C	CAT
SaltK	TRE	CAT

Taula 7. Plàsmids utilitzats com a controls del tractament amb DHT i de T_3 , respectivament, ja que el promotor inserit en pCAT1430 (133) és induïble per DHT i el del SaltK (134) per T_3 .

c) Controls negatius:

Nom	Promotor	Reporter
pPLCAT	Vector <i>reporter</i> sense el promotor del KAP	CAT
pCAT-Basic vector	Vector <i>reporter</i> sense el promotor del pepsinogen C	CAT
pGL3-Basic vector	Vector <i>reporter</i> sense el promotor del KAP	LUC

Taula 8. Plàsmids reporter en els que es van clonar, respectivament, els diferents fragments del promotor de KAP (pPLCAT), el fragment del promotor del pepsinogen C (pCAT-Basic vector) i es va fer la mutagènesi dirigida dels fragments de KAP (pGL3-Basic vector).

d) Vectors d'expressió:

Nom	cDNA	Plàsmid
pSVAR0	cDNA complet del receptor d'androgens humà	PBR328
TR β	cDNA complet del receptor β d'hormona tiroïdal	pGS5
RXR α	cDNA complet del receptor α d'àcid 9-cis-retinoic	PGS5
IGFR-I	cDNA complet del receptor d'IGF-I	pBPV
pMSV-mC/EBP	cDNA complet de C/EBP α murina	pMSV
pMSV-LAP	cDNA complet de C/EBP β murina	PBluescript
hAP2 α	cDNA complet d'AP2 α humà	pCMVX-PL1

Taula 9. Plàsmids utilitzats per la sobreexpressió de la proteïna, el cDNA de la qual tenen clonat, en assaigs funcionals del promotor de KAP.

e) Plàsmids control de l'eficiència de transfecció:

Nom	cDNA	Per la normalització de l'assaig:
PCH110	cDNA complet de la β -galactosidasa	CAT
pRL-TK	cDNA complet de la <i>Renilla</i> luciferasa	LUC

Taula 10. Plàsmids cotransfectats amb els *reporter* per normalitzar l'activitat CAT i luciferasa.

XIV.b. Protocol de transfecció transitòria

S'utilitza el mètode de transfecció per liposomes i, concretament, el producte *LIPOFECTAMINE Reagent* (Life Technologies), que és una barreja liposòmica 3:1 del lípid policatiònic 2,3 – dioleyloxy – N - [2(sperminecarboxamido)ethyl] - N,N – dimethyl – 1 - propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) i el lípid neutre dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE). S'utilitza per transfectar cèl.lules eucariotes.

En primer lloc, cal trobar les condicions òptimes de transfecció de les cèl.lules en què es treballa, ja que el reactiu lipofectamina és tòxic per les cèl.lules i per obtenir l'eficiència de transfecció més alta possible, cal optimitzar la reacció disminuint la toxicitat.

El protocol optimitzat per les cèl.lules PKSV-PCT, PKSV-PR i CV-1, va ser el següent:

- 1- Sembrar les cèl.lules en la placa de cultiu adequada per l'experiment de transfecció proposat, segons es descriu a continuació:

Tamany de la placa (Diàmetre)	Quantitat de cèl.lules inicial	Línia cel.lular	DNA total (µg)	Lipofectamina (µL)
35 mm	150000	PCT, PR, CV-1	1-2	5 µL/µg DNA
60 mm	250000	PCT, PR, CV-1	3-6	5 µL/µg DNA

Taula 11. Condicions de l'assaig de transfecció transitòria I.

- 2- Incubar, a 37°C en una atmòsfera humida al 5 % de CO₂, els cultius amb medi sense antibiòtic durant 48 hores (després de la tripsinització), punt en el que assoleixen l'estat de confluència (80-90 %) adequat per ser transfectats.
- 3- Preparar les condicions de transfecció segons els plàsmids utilitzats:

Tamany de la placa (Diàmetre)	Promotor inserit en el plàsmid <i>reporter</i>	Plàsmid <i>reporter</i> DNA (µg)	Plàsmid control de l'eficiència de la transfecció * DNA (µg)	Lipofectamina (µL)
35 mm	pGL3-Basic	1	0,02	5 µL/µg DNA
60 mm	pPLCAT	2	2	5 µL/µg DNA

Taula 12. Condicions de l'assaig de transfecció transitòria II. * El plàsmid control de l'eficiència de la transfecció per l'assaig luciferasa (pGL3-Basic) és el pRL-TK i el de l'assaig CAT és el pCH110.

- 4- Preparar un tub amb el DNA necessari i un tub amb la lipofectamina que li correspon a la quantitat de DNA. El DNA i la lipofectamina es dilueixen amb *OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium* (Life Technologies), però també es podria utilitzar medi de cultiu sense sèrum. El volum final de medi depèn del tamany de placa de cultiu utilitzada i està indicat pel fabricant.
- 5- Barrejar les dues solucions i incubar 20 min perquè es formi el complex DNA-lípid.
- 6- Durant el temps d'incubació del pas 5, rentar les cèl.lules amb *OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium*.
- 7- Afegir, a la barreja DNA-lípid, la quantitat d' *OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium* necessari per les condicions utilitzades (tamany placa,...), segons s'explica en el protocol del proveïdor del

LIPOFECTAMINE Reagent.

- 8- Incubar les cèl.lules amb el complex DNA-lípid durant 5 h a 37°C a una atmósfera humida al 5 % CO₂.
- 9- Rentar les cèl.lules amb PBS 1x, 2 vegades.
- 10- Incubar amb medi de cultiu complet, o/n.
- 11- Si es segueix l'experiment amb un tractament hormonal, és necessari:
 - 11.1- Incubar les cèl.lules, durant 24 h, amb medi amb FCS depleccionat d'hormones (veure apartat 2 de Materials).
 - 11.2- Tractar les cèl.lules amb una quantitat determinada d'hormona o hormones en el medi amb el FCS depleccionat de dita hormona o hormones, durant 48 h.
- 12- Preparació dels extractes cel.lulars.

XIV.c. Assaig CAT

XIV.c.1. Preparació dels extractes cel.lulars

- 1- Rentar les cèl.lules amb PBS 1x fred, 2 vegades.
- 2- Incubar 5 min amb 0,5 mL de Harvesting-buffer fred (Tris-HCl 40 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM i EDTA 1 mM), per una placa de 60 mm de diàmetre.
- 3- Rascar les cèl.lules de la placa amb un scraper estèril.
- 4- Centrifugar a 14000 rpm a 4°C, 15 min.
- 5- Resuspendre el pellet en 50 µL de Tris-HCl 0,25 M pH 7,8 fred.
- 6- Lisar les cèl.lules fent tres cicles de congelació i descongelació: 5 min en neu

carbònica/etanol i 5 min a 37°C.

7- Centrifugar a 14000 rpm a 4°C, 5 min.

8- Recollir el sobrenedant i congelar ràpidament en neu carbònica/etanol.

9- Guardar a -20°C per la seva posterior utilització en els assaigs d'activitat β -galactosidasa (β -gal) i cloramfenicol acetil transferasa (CAT).

XIV.c.2. Reacció β -galactosidasa

1- Colorimetria

1- Preparar la següent reacció:

Extracte cel.lular 5-30 μ L

Solució de magnesi 100x * 3 μ L

ONPG (2-nitrophenyl- β -galactopyranoside, Sigma) ** 66 μ L

Tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 7,5 fins a 300 μ L

* Solució de magnesi: MgCl_2 0,1 M

β -mercaptoetanol 4,5 M

** ONPG: ONPG 4 mg/mL

Tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 7,5

2- Incubar entre 30 min i 2 h a 37°C fins que apareix color groc.

3- Aturar la reacció amb 0,5 mL de Na_2CO_3 1M.

- ## 2- Fluorimetria
- Per determinar l'activitat β -galactosidasa dels extractes de les cèl·lules CV-1, es va utilitzar un substrat fluorescent degut a la baixa eficiència de transfecció obtinguda, la qual no podia ser detectada amb la reacció colorimètrica. El protocol utilitzat va ser el següent (135):

(Bradford) dels extractes cel·lulars. Només cal una de les dues determinacions. Fent una regla de tres inversa, es pot determinar la quantitat d'extracte que s'ha d'agafar per conèixer l'activitat de la mostra, corregida per l'eficiència de la transfecció o quantitat de cèl·lules de cada placa individual. El protocol que es va utilitzar és el següent (136):

- 1- Afegir, a la quantitat d'extracte cel·lular normalitzada, el volum necessari de Tris-HCl 0,25 M pH 7,8 fins arribar al volum final de 50 µL.
- 2- Incubar 10 min a 65°C per inactivar les acetilasas.
- 3- Afegir, 80 µL de la barreja:

Tris-HCl 1 M pH 7,5.....59 µL

¹⁴C-cloramfenicol (25 µCi/mL, Amersham) 1 µL

Acetil-CoA 3,5 mg/mL.20 µL

- 4- Incubar a 37°C 1 h i si el temps de reacció ha de ser més llarg, afegir 10 µL d'Acetil-CoA cada 90 min, perquè el substrat no sigui limitant.
- 5- Aturar la reacció amb 1 mL d'acetat d'etil (MERCK).
- 6- Centrifugar 5 min a temperatura ambient.
- 7- Recollir 900 µL de la fase superior i evaporar amb nitrogen gas.
- 8- Redissoldre el precipitat en 20 µL d'acetat d'etil i aplicar sobre una placa de cromatografia de capa fina (TLC, Sigma).
- 9- Col·locar la TLC en una càmera saturada amb cloroform:metanol (95:5) durant 1 h.
- 10- Assecar la TLC.
- 11- Exposar la TLC a una pantalla (ref. BAS-MP2025P) que és llegida per un aparell Fujifilm BAS-1800 Bio-imaging Analyzer, utilitzant el programa Image Reader i quantificada amb el

programa MacBAS.

XIV.d. Assaig luciferasa

XIV.d.1. Preparació dels extractes cel.lulars

- 1- Rentar les cèl.lules amb PBS 1x, 2 vegades.
- 2- Rascar les cèl.lules, mitjançant un scraper estèril, amb 250 µL de tampó PLB 1x (Promega) per placa de 35 mm de diàmetre (el volum necessari varia amb el tamany de la placa, especificat en el protocol del proveïdor).
- 3- Recollir en un tub eppendorf i agitar amb un vortex.
- 4- Lisar les cèl.lules fent 3 cicles de congelació i descongelació: 5 min en neu carbònica/etanol i 5 min a 37°C.
- 5- Centrifugar a 14000 rpm a 4°C, 30 seg.
- 6- Recollir el sobrenadant i congelar a -80°C.

XIV.d.2. Reacció dual luciferasa

Per determinar l'activitat luciferasa dels extractes cel.lulars es va utilitzar el *Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit* (Promega). Aquest kit subministra el substrat de la luciferasa i de la *Renilla* luciferasa (indicador de l'eficiència de la transfecció), i el reactiu que atura la reacció de la última luciferasa nombrada, de manera que s'obté l'activitat total (activitat

d'ambdues luciferases) i l'activitat del *reporter* (luciferasa). Aquestes lectures s'obtenen de l'aparell *Luminoskan RS reader* (Labsystems), que previament s'ha programat de la manera especificada pel protocol de l'assaig i que s'ha ajustat als volums d'una placa d'elisa, aquests són; 20 µL d'extracte, 50 µL LAR II (*Luciferase Assay Reagent II*), i 50 µL *Stop & Glo® Reagent*. Finalment, l'activitat luciferasa es calcula dividint l'activitat del *reporter* per l'activitat total.