

# **TREBALL DE RECERCA**

## **INFLUÈNCIA DEL SELENI SOBRE EL DNA**

**ESTUDI DELS EFECTES QUE CAUSA EL SELENI EN EL  
DNA DE CÈL·LULES DE LLEVAT**

## RESUM

El seleni és un oligoelement necessari en la dieta. Quan es troba en elevades concentracions provoca un trencament al DNA i això causa l'apoptosi cel·lular, és a dir, la mort de les cèl·lules. El seleni pot arribar a provocar la mort de l'organisme.

Aquest treball pretén estudiar els efectes perjudicials que causa el seleni en les cèl·lules de llevat i es divideix en dues parts.

La part teòrica proporciona informació sobre aquest element i sobre els elements estudiats en el llevat.

La part pràctica és un recull dels tres experiments que es van dur a terme per a determinar el dany ocasionat pel seleni.

Finalment, es va observar que el mètode que analitzava dues proteïnes era el més eficaç per determinar el dany causat. També es va concretar que segons la concentració de seleni que s'aplicava a les cèl·lules, els efectes eren més o menys perjudicials.

## **ABSTRACT**

Selenium is a necessary dietary element. When it is found in high concentrations, it causes DNA break and it leads to cellular apoptosis, in other words, the death of cells. Selenium can also cause the death of the organism. The aim of this project is to study the damaging effects which selenium causes in yeast cells, and it is divided in two parts. The theoretical part provides information of this element and of the genes and proteins which have been studied in yeast. The practical part is a collection of the three experiments which were carried out to determinate the damage that selenium caused. Finally, it was observed that the method which analysed two proteins was the most effective to determinate the damage in DNA. It was also observed that according to the concentration of selenium which was applied in cells, the effects were more or less harmful.

## PRÒLEG

L'elecció d'aquest treball no va ser fàcil. Durant uns mesos vaig estar rumiant potser la que és la part més fàcil i alhora més difícil d'un treball de recerca: escollir el tema adequat per poder-lo desenvolupar.

Tenia moltes idees, però no n'hi havia cap que em convencés per fer un bon treball. Fins i tot, quan em vaig decidir per un bon àmbit, vaig acabar veient que no tenia els recursos i, sobretot, el temps necessari per dur a terme el projecte que volia fer.

Finalment, vaig anar en busca d'ajuda a l'IRB Lleida (l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, situat a la vora de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova). Allà, de seguida em van ajudar i em van proposar de treballar durant el mes de juliol en un dels seus projectes. Això implicava anar cada matí durant tot un mes d'estiu a les seves instal·lacions i estar amb un dels seus grups de recerca. Sense pensar-m'ho dos cops, vaig acceptar.

No sabia ben bé de que tractava tot això, però el projecte que em van proposar era interessant i, com que sempre he tingut vocació per a la investigació, vaig pensar que seria una molt bona oportunitat per veure com era, en realitat, tot aquest món.

Així és com em vaig endinsar en el món del seleni i els efectes nocius que provoca. Mitjançant l'ús de cèl·lules de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) vaig estudiar, amb l'ajuda de professors i estudiants universitaris, els efectes que provoca aquest element.

Poder estar en un grup d'aquesta fundació, treballant amb ells tan sols un mes, ha estat tot un privilegi. He viscut una experiència que m'ha omplert i també m'ha ajudat a aclarir alguns conceptes sobre el meu futur.

# TAULA DE CONTINGUTS

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	6
<b>2. SELENI</b> .....	8
2.1. QUÈ ÉS? .....	8
2.1.1. Aspectes biològics del seleni.....	9
2.1.2. Algunes aplicacions.....	10
2.2. PAPER PROTECTOR .....	11
2.3. EFECTES PERJUDICIALS.....	11
2.3.1. Dany al DNA.....	13
<b>3. LLEVAT (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)</b> .....	15
3.1. <i>S. cerevisiae</i> COM A MODEL D'ESTUDI .....	15
3.1.1. Dany al DNA de <i>S. cerevisiae</i> .....	15
3.2. SOQUES UTILITZADES EN ELS EXPERIMENTS .....	16
3.2.1. Soca control .....	16
3.2.2. Soca $\Delta aft1$ .....	17
3.2.3. Soca $\Delta aft2$ .....	17
3.3. PROTEÏNES ANALITZADES.....	18
3.3.1. Sml1 .....	18
3.3.2. Histona H2.....	18
3.4. TRANSFORMACIÓ DE LES CÈL·LULES AMB UN PLASMIDI.....	19
<b>4. PART PRÀCTICA</b> .....	21
4.1. MANTENIMENT DE LES SOQUES DE LLEVAT UTILITZADES .....	22
4.2. EXTRACCIÓ I VALORACIÓ DEL DNA GENÒMIC .....	24

4.2.1. Material i metodologia .....	25
4.2.2. Resultats .....	28
<b>4.3. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT .....</b>	<b>30</b>
4.3.1. Material i metodologia .....	30
4.3.2. Gel d'acrilamida.....	31
4.3.3. Extracció de proteïnes i electroforesi.....	33
4.3.4. Transferència a membrana de nitrocel·lulosa .....	37
4.3.5. Immunodetecció .....	39
4.3.6. Resultats .....	41
<b>4.4. MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA .....</b>	<b>48</b>
4.4.1. Material i metodologia .....	48
4.4.2. Resultats .....	50
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>54</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>55</b>
<b>7. GLOSSARI.....</b>	<b>57</b>

# 1. INTRODUCCIÓ

El seleni és un microelement necessari a la dieta. Es tracta d'un oligoelement, és a dir, és un element que és necessari a concentracions molt baixes. La falta de seleni pot produir deficiències al nostre organisme. Algunes funcions que compleix el seleni són de protecció i de quimioprevenció cancerígena.

Ara bé, s'ha estudiat que, a elevades concentracions, el seleni resulta tòxic. Les seves propietats esdevenen cancerígenes i poden arribar a provocar la mort de l'organisme. El seleni provoca trencament en els filaments del DNA i, com a conseqüència, la mort de les cèl·lules.

És per això que l'objectiu principal d'aquest treball és estudiar els efectes que provoca el seleni a les cèl·lules i quins mecanismes de detecció s'utilitzen per valorar aquest dany. Però és evident que no es pot estudiar aquest fenomen amb un individu humà i, per això, el llevat serà l'objecte d'estudi en aquest projecte.

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* resulta un model d'estudi molt convenient per a aquest tipus de treballs, ja que el seleni afecta negativament de la mateixa manera a les seves cèl·lules i a les nostres. A més, és molt fàcil obtenir un gran nombre de cèl·lules de llevat en poc temps, ja que el seu cicle reproductor és molt ràpid.

Per estudiar els efectes provocats pel seleni es duran a terme tres experiments diferents. El primer consisteix en l'extracció del DNA genòmic de les cèl·lules del llevat i la valoració d'aquest en un gel d'agarosa. El segon experiment s'anomena western blot i es duu a terme mitjançant l'extracció de proteïnes i analitzant el seu nivell. L'últim experiment consisteix a observar les cèl·lules de llevat (prèviament transformades amb un plasmidi que els proporciona un gen que les fa fluorescents) en un microscopi de fluorescència, per determinar si hi ha hagut molt dany al nucli.

A partir d'aquestes tècniques es dedueix un objectiu del qual se n'extrauran unes conclusions al final. L'objectiu és estudiar el dany provocat pel seleni. Aquest objectiu condueix a una sèrie d'hipòtesis.

La primera hipòtesi és: “el seleni aplicat a diferents concentracions té un efecte més o menys perjudicial”.

La segona hipòtesi és: “la tècnica d'extracció i valoració del DNA és la més eficaç per determinar el dany que causa el seleni”.

Mitjançant les tècniques de biologia molecular esmentades abans es donarà resposta a aquestes hipòtesis.



## 2. SELENI

### 2.1. QUÈ ÉS?

El seleni (Se), de nombre atòmic 34, és un no metall que intervé en diversos processos cel·lulars, i això fa que sigui essencial per a l'organisme. És considerat un oligoelement, és a dir, és imprescindible en quantitats molt petites. Contràriament, en una concentració elevada resulta tòxic.

<b>34</b>	<b>78.96</b>
685	2.5
221	
<b>Se</b>	
[Ar]3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>4</sup>	
4.79	-2,4,6

Figura 1. Seleni

Dins la taula periòdica es troba en el setzè grup, el grup de l'oxigen o dels calcògens; i en el quart període. La seva configuració electrònica és  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^4$ .

La taula periòdica mostra els elements organitzats en grups i períodes. El seleni (Se) està destacat amb un rectangle vermell i es troba al grup 16 i al període 4. La taula inclou els elements de l'hidrogen fins al ogànet, amb les sèries de terres rares i actínides a la part inferior.

Figura 2. Seleni a la taula periòdica

El seleni es troba molt distribuït en l'escorça terrestre en la majoria de roques i sòls. També es troba en molts aliments; sobretot és molt abundant en la carn i els cereals. És un micronutrient antioxidant que ajuda a neutralitzar els radicals lliures, estimula el sistema immunitari i intervé en el funcionament de la glàndula tiroide.

El seleni és un microelement essencial en la dieta humana degut a la seva presència en diverses proteïnes, anomenades selenoproteïnes. En aquestes proteïnes el seleni s'hi incorpora de manera específica en forma de selenocisteïna. La selenocisteïna representa una forma orgànica del seleni en la natura i en els microorganismes en particular.

D'altra banda, s'ha demostrat que el seleni a concentracions elevades pot arribar a ser molt tòxic i produir dany al DNA de l'organisme, mentre que a una concentració baixa, les seves propietats són anticancerígenes.

### 2.1.1. Aspectes biològics del seleni

#### Selenoproteïnes

Les selenoproteïnes són proteïnes que incorporen en la seva cadena polipeptídica un o més residus de selenocisteïna. La selenocisteïna és un aminoàcid que trobem en molts enzims i té la mateixa estructura que la cisteïna, però el sofre se substitueix per un àtom de seleni. La cisteïna és un dels vint aminoàcids que utilitzen les cèl·lules per sintetitzar proteïnes. En el codi genètic la selenocisteïna no es codifica directament sinó que la seva codificació es duu a terme per un mecanisme especial on hi intervé un codó que normalment és aturador.

La selenocisteïna actua com a antioxidant i també com a proteïna de transport.

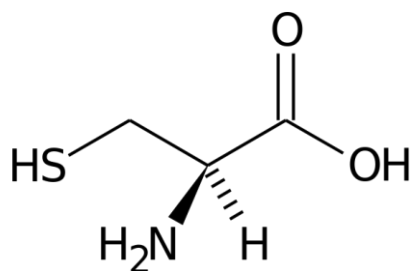


Figura 3. Cisteïna

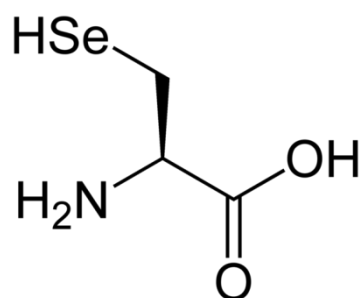


Figura 4. Selenocisteïna

Les selenoproteïnes tenen un paper molt important en algunes funcions biològiques com la defensa antioxidant, la formació d'hormones tiroïdals, la síntesi de DNA, la fertilitat i la reproducció.

En mamífers s'han identificat aproximadament trenta selenoproteïnes classificades en cinc grans grups o famílies: les glutatió peroxidases, les deionidases, la selenoproteïna-P, les tioredoxina reductases i altres selenoproteïnes que encara no han estat classificades en cap dels altres grups i que tenen funcions i localitzacions diverses.

### **Formes inorgàniques del seleni**

Les formes inorgàniques en les que podem trobar el seleni són: el seleni elemental ( $\text{Se}^0$ ), el selenur ( $\text{Se}^{-2}$ ), el selenit ( $\text{SeO}_3^{-2}$ ) i el selenat ( $\text{SeO}_4^{-2}$ ).

En el nostre cas, pels experiments s'utilitzarà la forma inorgànica del selenit, concretament el selenit de sodi ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Tot i això, ens referirem al selenit de sodi com a seleni.

De les formes inorgàniques, el seleni elemental resulta ser la menys tòxica de totes. Això és perquè és el més insoluble i, per tant, és difícilment assimilable pels organismes. Els selenits i selenats també tenen una toxicitat similar a la del seleni elemental.

#### **2.1.2. Algunes aplicacions**

En la vida quotidiana, aquestes són unes de les aplicacions que té el seleni:

- S'utilitza en diverses aplicacions elèctriques.
- Serveix de catalitzador en reaccions de deshidrogenació.
- El selenat de sodi ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) s'utilitza en medicina com a insecticida i també en la indústria del vidre i com a additiu per a sòls pobres en seleni. S'utilitza en la decoloració de vidres tenyits per compostos de ferro.

- L'addició de seleni millora la resistència al desgast del cautxú vulcanitzat.
- L'isòtop seleni-75 és utilitzat en radiodiagnosi per visualitzar tumors malignes.

## **2.2. PAPER PROTECTOR**

Com s'ha citat abans, el seleni a concentracions molt baixes mostra unes propietats anticancerígenes. Més concretament, inhibeix el creixement cel·lular i provoca l'apoptosi de les cèl·lules tumorals. Això vol dir que quan es detecta un tumor, el seleni indueix a que aquestes cèl·lules cancerígenes entrin en un procés d'apoptosi cel·lular, és a dir, s'elimina el tumor. Aquest fenomen es presenta com a un mecanisme important de quimioprevenció cancerígena.

El seleni té un paper important en la reducció de l'expressió viral, i en la prevenció de problemes cardíacs i cardiovasculars i trastorns musculars. Regula la síntesi de proteïnes del grup hemo al fetge i ajuda a disminuir els àcids grassos, que són alguns dels fenòmens que originen les cardiopaties.

També disminueix el dany a les membranes i altres estructures de la cèl·lula i augmenta la resposta cel·lular. Augmenta l'absorció de les vitamines A, C i E i disminueix l'absorció d'arsènic (As), cadmi (Cd) i mercuri (Hg), elements tòxics.

## **2.3. EFECTES PERJUDICIALS**

El seleni és un element essencial, tot i que es necessita a unes concentracions molt baixes. No obstant, a altes concentracions és tòxic, mutagènic i cancerigen. Provoca dany al DNA i generació d'estrès oxidatiu.

### **Efectes del seleni a la salut**

Es recomana una ingesta diària de 55 a 70 µg, però varia segons l'edat de l'individu (taula 1). Si s'ingereixen més de 400 µg es pot produir selenosi, que

comprèn la pèrdua dels cabells, alteracions unguials, sudoració, trastorns gastrointestinals i depressió del sistema nerviós central.

Com ja s'ha dit, principalment obtenim el seleni a través del menjar. El seleni és necessari per prevenir les malalties causades per la falta d'aquest element.

<b>EDAT</b>	<b>µg/dia</b>
0-6 mesos	15
7-12 mesos	20
1-8 anys	30
9-13 anys	40
14 anys i més	55

**Taula 1. Consum de seleni segons l'edat**

Les persones que mengen molts cereals que creixen a prop de les indústries poden patir una major exposició al seleni a través del menjar. Quan el seleni de l'eliminació de residus perillosos acaba als pous d'aigua, també podem estar exposats al seleni a través de l'aigua. Així, les persones que viuen a prop de llocs on hi ha aquests residus poden estar més exposats a través de l'aire i del sòl.

A través de l'aire, el seleni pot provocar marejos, fatiga i irritacions de les membranes mucoses. Quan l'exposició és molt elevada hi pot haver retenció de líquids als pulmons i, fins i tot, bronquitis.

Si la ingesta de seleni varia, ja sigui per excés o per falta, es pot provocar un greu dany a l'organisme. Si es consumeix en excés, el seleni perd les propietats anticancerígenes i provoca dany al DNA de les cèl·lules.

És per això que cal ingerir la quantitat idònia de seleni ja que és un oligoelement i és necessari pel desenvolupament de l'organisme.

## **Efectes del seleni al medi ambient**

El seleni es presenta naturalment en el medi ambient. És alliberat tant a través de processos naturals com d'activitats humanes.

Baixos nivells de seleni poden acabar en sòls o aigua a través de l'erosió de les roques. Les plantes l'absorbeixen i també acabarà a l'aire absorbit en fines partícules de pols. És més probable que el seleni entri a l'aire a través de la combustió de carbó i oli, en forma de diòxid de seleni ( $\text{SeO}_2$ ). Aquesta substància serà transformada en àcid de seleni a l'aigua o a la suor.

Les substàncies a l'aire que contenen seleni són normalment descompostes en seleni i aigua bastant de pressa, de manera que no són perilloses per a la salut dels organismes.

L'agricultura pot no només incrementar el contingut de seleni a la terra; sinó que també pot augmentar les concentracions de seleni a les aigües superficials, ja que les aigües de drenatge d'irrigació porten seleni.

El comportament del seleni en el medi ambient depèn fortament de les seves interaccions amb altres components i de les condicions mediambientals en el lloc en concret i a una hora concreta.

Quan els animals absorbeixen o acumulen concentracions de seleni extremadament grans, poden experimentar una fallada reproductiva i defectes de naixement.

### **2.3.1. Dany al DNA**

En les condicions i concentracions necessàries, una de les principals propietats favorables del seleni és la reparació en la síntesi del DNA. Contràriament, els seus efectes són totalment negatius quan absorbim una concentració de seleni molt elevada.

El seleni a altes concentracions provoca un trencament del DNA. Això té com a conseqüència l'aturada del cicle cel·lular i, per tant, la cèl·lula mor. D'aquesta manera, el seleni pot arribar a produir la mort de l'organisme.

També experimenta un paper tòxic, mutagènic i cancerigen. Això dóna lloc a un fet curiós, ja que el seleni com a oligoelement, és a dir, en concentracions normals, actua com a element anticancerigen, mentre que quan augmentem la concentració, canvia del tot la seva funció respecte a aquest rol.

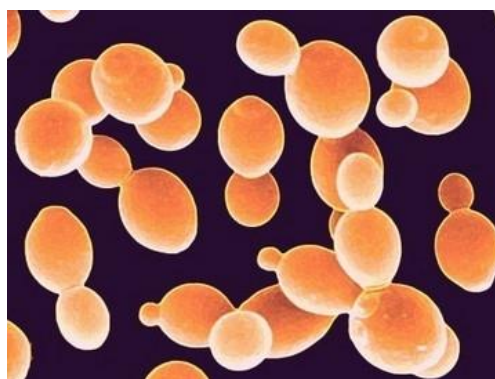
En els experiments que es van dur a terme per a la part pràctica, s'estudia el trencament del DNA genòmic de les cèl·lules de llevat (llevat de cervesa). Aquest és, doncs, l'objectiu principal del treball: estudiar l'efecte que provoca el seleni al DNA.

### 3. LLEVAT (*Saccharomyces cerevisiae*)

#### 3.1. *S. cerevisiae* COM A MODEL D'ESTUDI

*Saccharomyces cerevisiae* és un organisme que forma part del grup de llevats de gemmació. La seva reproducció és vegetativa i es duu a terme mitjançant la gemmació. S'utilitza en fermentació de begudes i aliments, com la cervesa o el pa.

*Saccharomyces cerevisiae* és un dels models eucariotes més estudiats en biologia molecular i cel·lular i resulta adequat per estudiar la toxicitat generada pel seleni, degut a la facilitat amb la que es pot cultivar i manipular genèticament. Aquesta soca no presenta selenoproteïnes, per tant, el seleni no és essencial pel seu creixement.



**Figura 5. Cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae***

Aquest llevat és un organisme adequat per estudiar la toxicitat generada pel seleni. Tot i que el seleni no és necessari pel seu creixement, ja que no presenta selenoproteïnes, sí que pateix els seus efectes tòxics i és per això que es pot utilitzar com a model per estudiar aquesta toxicitat.

En *S. cerevisiae* la forma més tòxica del seleni és el selenur, tot i que en els experiments realitzats s'hi aplica selenit, que és convertit, després de la seva incorporació a la cèl·lula, en selenur.

##### 3.1.1. Dany al DNA de *S. cerevisiae*

Tot i que el seleni no és necessari per al creixement de *S. cerevisiae*, quan se n'aplica en una quantitat elevada també li resulta tòxic, degut, entre altres efectes, a que provoca danys al DNA.



El seleni produeix un trencament en la doble cadena de DNA, que comporta una aturada del cicle cel·lular i, per tant, es provoca un retard de la mitosi i una reducció de la viabilitat.

## **3.2. SOQUES UTILITZADES EN ELS EXPERIMENTS**

En els experiments que es van realitzar per a la part pràctica es van utilitzar tres soques diferents de *S. cerevisiae*.

Una d'elles era la soca salvatge, que és anomenada soca control. Les altres dues eren mutants i a cadascuna d'elles se li havia extret un gen (*aft1* en una i *aft2* en l'altra).

### **3.2.1. Soca control**

Wild type és el nom que s'assigna a la soca salvatge, és a dir, a aquella que no ha sofert cap tipus de mutació en el seu genoma. En els experiments era anomenada wild type, però aquesta denominació fa referència a la soca control, de la qual no se n'ha extret cap gen (com a diferència de les altres dues).

El seu genotip és:

W303-1A

MATa his3 ura3 leu2 ade2 trp1

Això significa que aquesta soca és auxòtrofa per als aminoàcids histidina (his), uracil (ura), leucina (leu), adenina (ade) i triptòfan (trp).

### 3.2.2. Soca $\Delta$ aft1

La soca  $\Delta$ aft1 és un dels mutants que es van utilitzar.

Aft1 és un gen que regula l'homeòstasi del ferro i activa el transport d'aquest.

El símbol " $\Delta$ " significa que es va extreure el gen. Per tant, això vol dir que aquesta soca estava mutada i li faltava aquest gen.

El seu genotip és:

MML348

MATa URA (W303 background) leu2 his3 trp1 ade2

Això significa que aquesta soca és auxòtrofa per als aminoàcids leucina (leu), histidina (his), triptòfan (trp) i adenina (ade).

### 3.2.3. Soca $\Delta$ aft2

La soca  $\Delta$ aft2 és un altre dels mutants que es van utilitzar.

Aft2 és un activador transcripcional, és a dir, activa els gens involucrats en l'ús de ferro intracel·lular i els gens implicats en l'homeòstasi del ferro i la resistència a l'estrès oxidatiu. Aft2 té un gen paràleg, aft1, i sorgeix en la duplicació del genoma.

El símbol " $\Delta$ " significa que es va extreure el gen. Per tant, això vol dir que aquesta soca estava mutada i li faltava aquest gen.

El seu genotip és :

MML1086

MATa his3 ura3 leu2 ade2 trp1

Això significa que aquesta soga és auxòtrofa per als aminoàcids histidina (his), uracil (ura), leucina (leu), adenina (ade) i triptòfan (trp).

### **3.3. PROTEÏNES ANALITZADES**

En un dels experiments que s'explicaran a la part pràctica es van analitzar dues proteïnes extretes de les cèl·lules del llevat: la proteïna sml1 i una histona.

#### **3.3.1. Sml1**

Sml1 és una proteïna del llevat que inhibeix l'activitat enzimàtica.

En presència de seleni i, per tant, quan es produeix dany al DNA, la proteïna sml1 es degrada. És a dir, això significa que els seus nivells són nuls. Intervé en l'organització mitocondrial.

#### **3.3.2. Histona H2**

Una histona és una proteïna que s'associa al DNA en el seu empaquetament. Juntament amb el DNA formen la cromatina. El seu pes molecular és baix.

De vegades, les histones pateixen un procés de fosforilació, que és el que estudiarem per comprovar l'efecte del seleni al DNA.

La fosforilació és l'addició d'un grup fosfat o no fosfat molecular criogenitzat inorgànic a qualsevol altra molècula.

El mecanisme de fosforilació d'aquesta histona és una modificació en aquesta mateixa proteïna, i es produeix quan es veu afectada, en aquest cas, pel seleni. És a dir, la histona es modifica i per tant, es poden analitzar els seus nivells, ja que d'alguna manera, actua com a marcadora d'aquest dany al DNA.

### 3.4. TRANSFORMACIÓ DE LES CÈL·LULES AMB UN PLASMIDI

En l'últim experiment que es va realitzar, és van analitzar unes fotografies fetes amb l'ajuda d'un microscopi de fluorescència.

Aquestes fotografies eren de cèl·lules dels diferents cultius de llevat que havien estat transformades amb una proteïna que proporcionava fluorescència, pròpia de les meduses.

Aquesta proteïna s'anomena YFP (yellow fluorescent protein) i es va introduir a les cèl·lules mitjançant un plasmidi.



**Figura 6. Medusa amb la YFP (yellow fluorescent protein)**

Un plasmidi és una molècula de DNA circular de doble cadena que pot existir i replicar-se independentment del cromosoma o estar integrat en el mateix. S'hereta de forma estable, però no és necessari pel creixement ni per la reproducció de la cèl·lula hoste.

Generalment els plasmidis aporten gens funcionals que no es troben en el cromosoma i solen ser els responsables de les resistències a antibiòtics.

Així, es va extreure el gen que codificava la proteïna fluorescent de les meduses i es va introduir en el genoma de les cèl·lules de llevat. Però aquesta proteïna extreta es va unir a una altra proteïna, anomenada Rad-53. Aquesta proteïna té la capacitat d'unir-se als filaments trencats de DNA. Per tant, es formava una proteïna híbrida (Rad-53 + YFP) que podia unir-se al DNA gràcies a Rad-53 i, per tant, es podien veure fluorescents aquells llocs on el DNA hagués estat danyat.

La proteïna YFP (yellow fluorescent protein) és una proteïna mutant derivada de la GFP (green fluorescent protein) que es troba en algunes meduses.

Mitjançant un microscopi de fluorescència, podem veure els punts on aquesta proteïna híbrida s'ha ajuntat, que serà on hi hagi hagut trencament. D'aquesta manera, podrem determinar el dany que ha causat el seleni al DNA.

## 4. PART PRÀCTICA

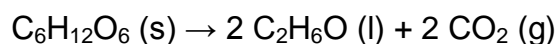
L'objectiu de la part pràctica és donar resposta a les hipòtesis plantejades a l'inici del treball. Primer, cal determinar si el seleni afecta de la mateixa manera al DNA quan està en una concentració més o menys elevada. Després, es pretén determinar si l'experiment d'extracció i valoració del DNA genòmic és el més eficaç per determinar la presència de dany al DNA.

Per poder obtenir els resultats, es van dur a terme tres mètodes diferents que s'utilitzen en biologia molecular. Es tracta de tècniques bàsiques en aquest àmbit, emprades habitualment, que també serveixen per a altres experiments.

Abans de realitzar cada experiment, s'ha d'afegir el seleni al cultiu de llevat. Amb la finalitat d'aconseguir un creixement més ràpid de les cèl·lules de llevat, aquest es cultiva en un medi anomenat YPD. El medi YPD conté un 2% de glucosa, un 2% de peptona i un 1% d'extracte de llevat; dissolts en aigua destil·lada.

Quan s'inoculen les cèl·lules de llevat amb aquest medi, hi ha un període de latència al qual segueix una fase de creixement exponencial. En aquesta fase es produeix una fermentació de la glucosa. Durant aquest període de creixement ràpid és quan haurem d'afegir el seleni als cultius.

Aquesta fermentació es produeix segons la reacció química següent:

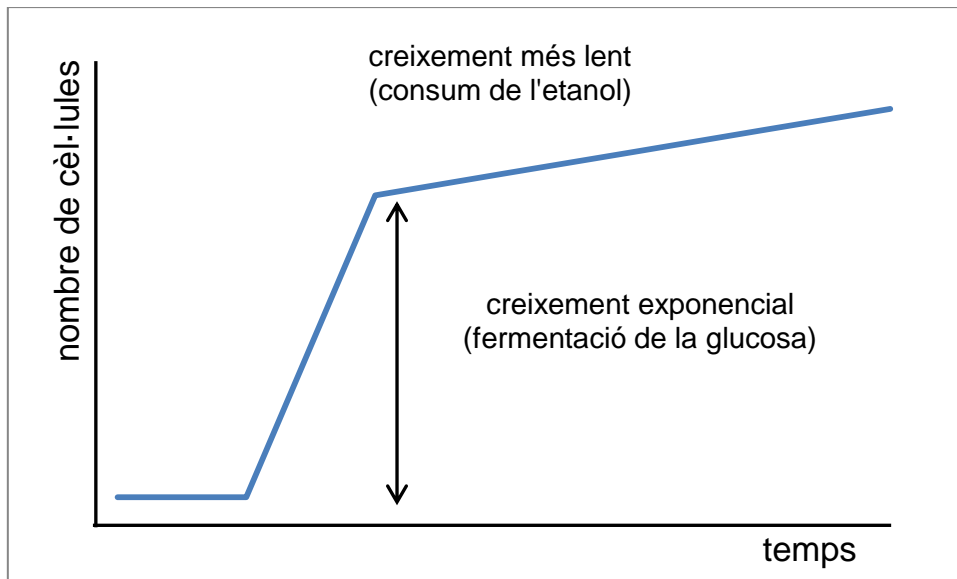


Aquesta reacció estableix que per cada mol de glucosa (sòlid) fermentada, s'obtenen dos mols d'etanol (líquid) i dos mols de diòxid de carboni (gas).

Quan s'ha fermentat tota la glucosa, les cèl·lules de llevat consumeixen l'etanol que s'ha obtingut en el procés de fermentació. A partir d'aquest moment, les cèl·lules ja no es divideixen tan ràpid com abans, sinó que ho fan més

lentament. Els nostres experiments es fan sempre en condicions de creixement exponencial amb cèl·lules tractades amb el seleni.

No és, però, fins al cap d'aproximadament unes 6 hores quan el seleni comença a mostrar els seus efectes. És per això que no es podrà realitzar cap experiment fins que hagi passat aquest temps.



**Figura 7. Gràfic del creixement del llevat**

Quan el seleni actua produeix dany al DNA, concretament provoca un retard en la mitosi, com s'ha esmentat abans. Per tant, en aquest moment, la reproducció es parará i podrem iniciar els experiments pertinents.

#### **4.1. MANTENIMENT DE LES SOQUES DE LLEVAT UTILITZADES**

Les soques de llevat amb les que es treballarà es troben guardades a la nevera amb medi de cultiu sobre les que prèviament es van fer créixer. Cada tipus de soca (control,  $\Delta aft1$  i  $\Delta aft2$ ) està aïllada de les altres en una placa de Petri. Si volem aconseguir més soques, hem de ressemar en unes noves plaques.

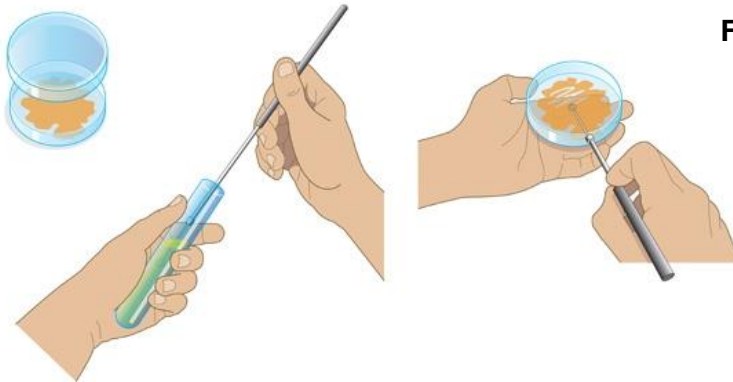


**Figura 8. Placa de Petri**

El procés per ressebrar s'ha de dur a terme a la vora del bec de bunsen; ha de ser un procés estèril, evitant que cap altre microorganisme, diferent del que inoculem, pugui créixer a la placa.

En el nostre cas, per ressebrar agafarem les tres plaques de Petri de la nevera amb els tipus de soques corresponents i els col·locarem a la vora del bec de bunsen. També necessitarem tres noves plaques de petri, on ressebrarem de nou. Tant les plaques de la nevera com les que hem agafat han d'estar marcades amb el tipus de soca que sigui.

Per fer-ho s'utilitza una nansa de sembra (esterilitzada prèviament) i agafarem una petita quantitat de cèl·lules que traslladarem a la nova placa de petri. Deixarem aquesta mostra a la placa amb la nansa en descrivint un moviment de zig-zag com es mostra en la figura 6. Farem el mateix amb les altres dues colònies.



**Figura 9. Moviment de zig-zag**



**Figura 10. Nansa de sembra**



Després de sembrar, les plaques s'incuben en una estufa a 30°C fins l'aparició de noves colònies (entre 24 i 48 hores). Després es guarden a la nevera i a partir d'elles es preparen els cultius líquids per fer els experiments.

## **4.2. EXTRACCIÓ I VALORACIÓ DEL DNA GENÒMIC**

Aquest va ser el primer mètode que es va utilitzar per intentar detectar la presència de dany al DNA de les cèl·lules de llevat després de ser tractades amb seleni. Per realitzar aquest experiment, primer havíem d'extreure el DNA i, seguidament, valorar-lo en un gel d'agarosa que també s'havia de preparar.

La valoració en el gel es fa mitjançant una electroforesi, que fa que les partícules carregades negativament es moguin cap al pol positiu. Així, el DNA genòmic (amb càrrega negativa) es mouria cap al pol positiu, i es podria observar visualment si aquest DNA es manté íntegre o apareix fragmentat com a conseqüència del tractament amb seleni.

Com que el DNA genòmic té un elevat pes molecular, no es pot observar visualment com corre pel gel.

Aquest experiment es va realitzar dues vegades, i en cap dels dos es va poder veure el dany. És per això que uns dies més tard, es va recórrer a un altre mètode: el mètode Western Blot.

Tot seguit, s'explicarà el material i els procediments que es van utilitzar i realitzar en l'extracció i la valoració del DNA genòmic, juntament amb la preparació del gel d'agarosa per poder dur a terme l'electroforesi. També es resumiran els resultats obtinguts en l'experiment.

#### 4.2.1. Material i metodologia

##### Material

###### Cultius de llevat

- Soca control tractada amb seleni
- Soca control sense seleni
- Soca  $\Delta aft1$  tractada amb seleni
- Soca  $\Delta aft1$  sense seleni
- Soca  $\Delta aft2$  tractada amb seleni
- Soca  $\Delta aft2$  sense seleni

Solucions (hi ha algunes solucions que estan formades per diversos components, tal com s'indica)

- TNST
  - 2% Tritón X-100
  - 1% SDS
  - 0,1 M NaCl
  - 1 mM EDTA
  - 10 Mm Tris – HCl pH 8
- NaOAc 0,3 M pH 8
- FC
  - Fenol – Cloroform – isoamílic (25:24:1)
  - 0,1% 8 – hidroxiquinolina
- Etanol (100% i 70%)
- TE
  - 0,5 ml Tris – HCl 2 M pH 8
  - 0,2 ml EDTA 0,5 M pH 8
  - 99,3 ml H<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>O (aigua destil·lada, també anomenada milli-Q)
- RNAsa
- LB
- Agar

###### Material de laboratori

- Pipetes
- Pipetejador
- Eppendorfs
- Gradeta
- Centrifugadora
- Vòrtex
- Speed-vac
- Glass beads (boletes de vidre)
- Tubs de plàstic

### **Metodologia**

Segons el protocol establert, els cultius han d'estar en medi líquid o sòlid fins que arribin en una fase estacionària de creixement. En el nostre cas, es troben en medi YPD (líquid), explicat anteriorment.

Tots els tubs i eppendorfs es marcaran amb un retolador permanent per identificar el tipus de soca que hi ha.

- Agafarem 10 ml del cultiu en medi YPD de cada tipus, pipetejant amb la pipeta i amb l'ajuda d'un pipetejador, i els deixarem en tres tubs de plàstic diferents (un per a cada tipus de soca). Col·locarem els tubs a la centrifugadora a una velocitat de 4000 rpm (revolucions per minut) durant uns 4 minuts. Quan hagi passat aquest temps, veurem que a la part inferior del tub han sedimentat les cèl·lules (d'aquest sediment en direm sempre "pellet"). Tirem el líquid (sobrenedant) i hi afegim 10 ml d'aigua a cada tub per rentar les cèl·lules. Repetim la centrifugació, de manera que tornarem a tenir les cèl·lules sedimentades i l'aigua com a sobrenedant. Tirem l'aigua.
- Resuspenem el pellet de cada tub i el traspassem a tres eppendorfs, marcats prèviament amb el nom corresponent de cada soca.
- Tornem a centrifugar, aquest cop a 12000 rpm durant 7 segons, perquè les cèl·lules sedimentin bé.

- Resuspenem el pellet obtingut (és a dir, afegim les solucions i barregem amb la pipeta, amb molt de compte) en 200 µl de TNST, 200 µl de FC i uns 200 µl de les boletes de vidre (glass beads). Aquestes boletes serveixen per trencar la paret de les cèl·lules. El trencament s'assoleix agitant en un vòrtex a màxima velocitat. Queden dues fases, una blanca i una transparent; tirem el sobrenedant, que és la fase transparent.
- Afegim 200 µl de TE i barregem bé.
- Centrifuguem i després quedarà una fase blanca i una transparent. Recollim 400 µl de la fase transparent i hi afegim 1 ml d'etanol.
- Centrifuguem a 12000 rpm durant 5 minuts i tirem el sobrenedant, quedant-nos amb el pellet.
- Resuspenem en 500 µl de TE i 3 µl de RNAsa, i ho incubem 5 minuts a 37°C. La RNAsa serveix per eliminar tots els RNA que hi ha a la cèl·lula.
- Afegim 50 µl de NaOAc 0,3 M pH 8 i 500 µl de FC.
- Centrifuguem a una velocitat de 12000 rpm durant 5 minuts. Aquesta vegada ens quedarem amb 400 µl de cada eppendorf i els passarem a uns altres eppendorfs nous, descartant el pellet.
- Afegim 1 ml d'etanol al 100%, barregem i centrifuguem a 12000 rpm durant 5 minuts. Tirem el sobrenedant.
- Netegem el pellet que ha quedat amb 1 ml d'etanol al 70%, centrifuguem a 12000 rpm durant 5 minuts i tirem el sobrenedant.
- Assequem el pellet al speed-vac durant 10 minuts. Aquesta màquina absorbeix tot el líquid.
- Resuspenem l'eppendorf amb el control amb 25 µl d'aigua, el  $\Delta$ aft1 amb 20 µl d'aigua i el  $\Delta$ aft2 amb 25 µl d'aigua. Posem a incubar els eppendorfs a 65°C durant 5 minuts.
- Carregarem 10 µl al gel. Aquests estaran compostos per 2 µl del DNA que hem extret, 2 µl de LB i 6 µl d'aigua.

A continuació, haurem de preparar el gel:

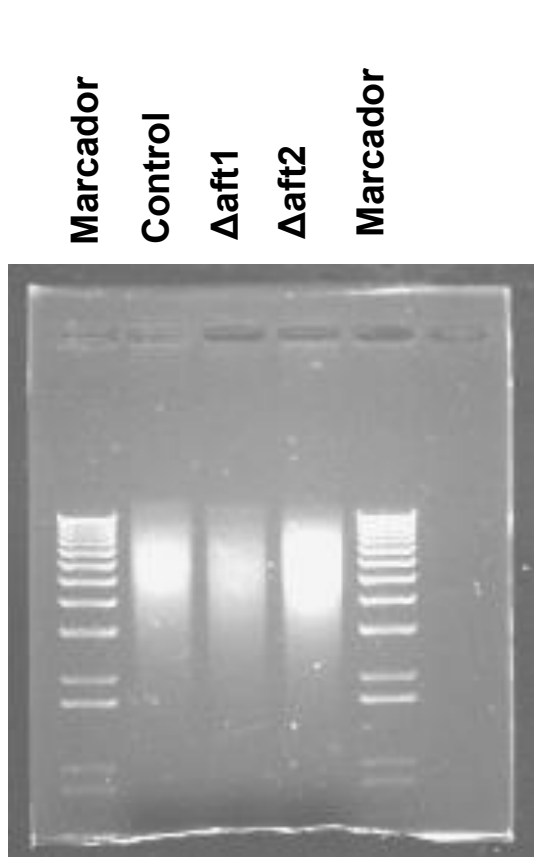
- Pesem 0,8 g d'agarosa i els afegim en 100 ml d'aigua. Ho escalfem al microones durant, aproximadament, un minut i mig perquè l'agarosa es dissolgui del tot.

- Quan l'agar s'hagi dissolt, abocarem la barreja en un suport de plàstic que fa de motlle i deixarem reposar uns 30 minuts perquè se solidifiqui i quedi el gel ben format. Al motlle hi col·locarem una mena de pinta perquè al gel hi quedin pous, on hi carregarem el DNA genòmic.
- Després d'aquest temps, traurem el gel del motlle, retirarem la pinta, carregarem la mostra i iniciarem l'electroforesi.
- El gel que hem tret del motlle, el col·locarem en un suport especial per fer l'electroforesi, que conté el tampó d'electroforesi.
- Dins dels pous que ha deixat la pinta hi dipositarem 10 µl de cada DNA. També dipositarem en alguns pous marcadors, que són altres DNA que ens serviran de referència.
  - En el primer experiment, realitzat el 19 de juny, l'ordre va ser el següent: marcador – control –  $\Delta aft1$  –  $\Delta aft2$  – marcador.
  - En el segon experiment, realitzat el 23 de juny, l'ordre era aquest: marcador – control –  $\Delta aft1$  –  $\Delta aft2$  – control (sense Se) –  $\Delta aft1$  (sense Se). En aquest experiment, vam afegir dues mostres que no contenien seleni per poder observar la diferència.
- Quan ja hem carregat els 10 µl als pous corresponents, iniciem l'electroforesi, que durarà una hora aproximadament. Quan hagi acabat, podrem veure com cada DNA ha corregut pel seu carril.

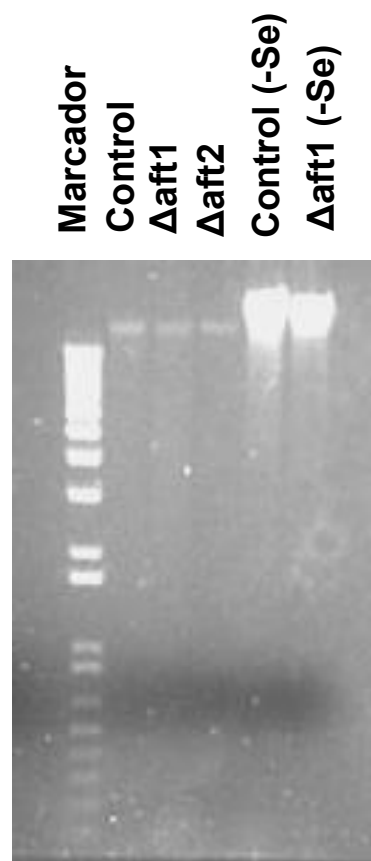
#### **4.2.2. Resultats**

Com ja s'ha esmentat abans, el DNA genòmic té un elevat pes molecular, i això fa que quan es carrega en el gel per dur a terme l'electroforesi, no es pugui observar visualment com el DNA corre pel gel.

A continuació, s'exposen les fotografies obtingudes en ambdós experiments. Damunt de cada pou, s'indica quin DNA s'hi ha carregat.



**Figura 11. Resultats del dia 19/06/14**



**Figura 12. Resultats del dia 23/06/14**

Com es pot observar en les dues fotografies, no es veuen diferències entre el DNA procedent de la soca control i el que prové dels mutants, però sabem que està afectat degut a la presència de seleni. Això demostra que aquest no és un mètode efectiu per detectar el dany en el DNA genòmic.

Si es pogués observar visualment, veuríem com el DNA afectat pel seleni corre més ràpid perquè està trencat.

Aquest experiment es va realitzar dues vegades, i en cap dels dos es va poder veure el dany. La tècnica no va resultar adequada i, per tant, es va recórrer a altres mètodes. El següent que es va utilitzar va ser el mètode Western Blot.

### **4.3. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT**

Com que el mètode d'extracció i valoració del DNA no va resultar eficaç, es va recórrer a una altra tècnica. Es van analitzar unes proteïnes mitjançant la tècnica de western blot.

La tècnica de western blot consisteix a separar una barreja de proteïnes mitjançant una electroforesi en un gel d'acrilamida. Quan s'ha realitzat l'electroforesi, les proteïnes es transfereixen des del gel a una membrana de PVDF i, a continuació, es fa la immunodetecció amb anticossos específics que reconeixen les proteïnes que volem analitzar.

Primer, s'havia d'extreure proteïna de les cèl·lules afectades amb el seleni i, tot seguit, l'electroforesi, la transferència a paper de PVDF i, a continuació, es procedia a la immunodetecció: la detecció de les proteïnes d'interès mitjançant anticossos específics per les mateixes. Això servia per comprovar en quin nivell es trobaven les proteïnes que volíem analitzar.

Es van analitzar els efectes del seleni en dues proteïnes: una altra anomenada sml1 i una histona, que s'associa al DNA.

Amb presència de seleni, els nivells de la proteïna sml1 baixaven. Pel que fa a la histona, aquesta es fosforilava si hi havia seleni. Quan no s'hi aplicava seleni, els nivells de fosforilació eren nuls.

Tot seguit, s'explicarà el material necessari que es va utilitzar i els procediments que es van seguir, tant per l'extracció de proteïna com per la immunodetecció.

#### **4.3.1. Material i metodologia**

Com ja s'ha explicat abans, la tècnica de western blot consta de diferents passos. Primer s'ha de preparar el gel d'acrilamida, després es realitza

l'extracció de proteïnes de les cèl·lules, que es col·loquen al gel i es comença l'electroforesi. Quan l'electroforesi acaba, es fa la transferència a les membranes de PVDF i es comença la immunodetecció.

A continuació, s'explicarà el material i els procediments que es faran servir per cada pas.

#### **4.3.2. Gel d'acrilamida**

El primer que s'ha de fer és preparar el gel d'acrilamida. En realitat, es preparen dos gels diferents. Un d'ells és un gel separador i l'altre és empaquetador. A més a més, prepararem dos gels de cada tipus, perquè hem d'analitzar dues proteïnes diferents: una histona i la proteïna sm11.

#### **Material**

Es necessitarà un suport especial per dipositar les substàncies que formaran els gels.

##### Gel separador (per a dos gels)

- 920 µl aigua
- 4110 µl acrilamida 40%
- 2280 µl bis-acrilamida 2%
- 2500 µl Tris pH 8,8
- 100 µl SDS 10%
- 50 µl PA (persulfat amònic)
- 10 µl TEMED
- Isopropanol (es dipositarà, quan s'hagin acabat d'afegir les altres substàncies, damunt d'aquestes lleugerament)

##### Gel empaquetador (per a dos gels)

- 3250 µl aigua



- 750 µl acrilamida 40%
- 400 µl bis-acrilamida 2%
- 1500 µl Tris
- 60 µl SDS 10%
- 40 µl PA (persulfat amònic) 10%
- 10 µl TEMED

### Material de laboratori

- Suport pels gels
- Pipetes

### **Metodologia**

El primer que farem serà muntar el suport. Quan ja estigui muntat, anirem afegint per ordre les diferents substàncies.

Quan ja tenim els gels, s'han de deixar reposar perquè solidifiquin. Com en l'extracció del DNA genòmic, també hi col·locarem una pinta per deixar uns petits pous on dipositarem la proteïna obtinguda.

En el primer experiment, la preparació dels gels no va sortir bé i el dia següent es va haver de repetir per poder realitzar la tècnica.



**Figura 13. Suport pel gel**



**Figura 14. Suport pel gel**

En aquestes dues fotografies es mostren els components del suport on aniran els gels.

En la fotografia següent es mostra el suport muntat per poder afegir les substàncies que formaran el gel.

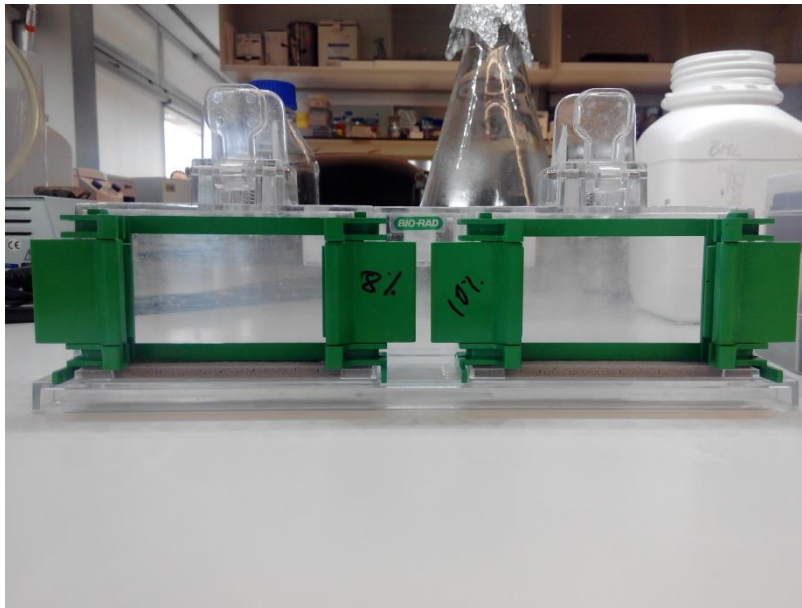


Figura 15. Suport pel gel muntat

#### 4.3.3. Extracció de proteïnes i electroforesi

Mentre el gel solidifica, o prèviament, haurem d'extreure les proteïnes que volem analitzar de les cèl·lules del llevat. Després d'haver-les extret, les col·locarem en els pous del gel i iniciarem l'electroforesi.

#### Material

##### Cultius de llevat

- Soca control tractada amb seleni
- Soca control sense seleni
- Soca  $\Delta aft1$  tractada amb seleni
- Soca  $\Delta aft1$  sense seleni

- Soca  $\Delta aft2$  tractada amb seleni
- Soca  $\Delta aft2$  sense seleni

### Solucions

- Aigua
- Urea 5M
- 1x SR (2% SDS + 0,125M Tris-HCl pH 6,5)

### Material de laboratori

- Pipetes
- Pipetejador
- Centrifugadora
- Eppendorf
- Congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$
- Glass beads (boletes de vidre)
- Vòrtex
- Agulla
- Tubs de plàstic

### **Metodologia**

Per fer l'extracció de proteïnes es va seguir un protocol que ja s'havia establert.

Tots els tubs i eppendorfs es marcaran amb un retolador permanent per identificar el tipus de soca que hi ha.

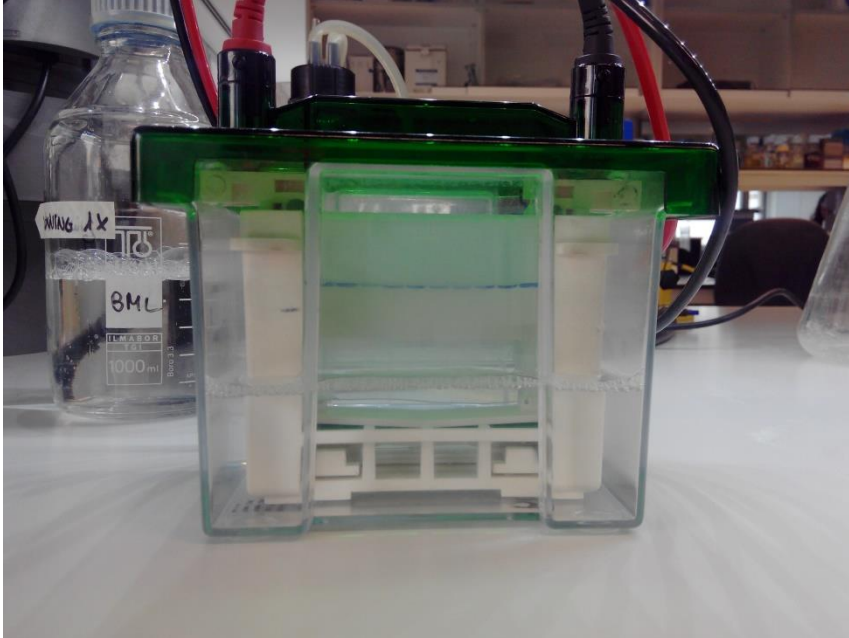
- Agafarem 15 ml del cultiu en medi YPD de cada tipus, pipetejant amb la pipeta i amb l'ajuda d'un pipetejador, i els deixarem en tres tubs de plàstic diferents (un per a cada tipus de soca). Col·locarem els tubs a la centrifugadora a una velocitat de 5000 rpm (revolucions per minut) durant uns 5 minuts. Quan hagi passat aquest temps, el pellet haurà sedimentat. Tirem el líquid (sobrenedant) i repetim la centrifugació, però aquest cop hi afegim 20 ml d'aigua a cada tub. Quan han passat els 5 minuts a la

centrifugadora, tornarem a tenir les cèl·lules sedimentades i l'aigua com a sobrenedant. Tirem l'aigua.

- Passarem el pellet que ens hagi quedat a un eppendorf i hi afegirem 1 ml d'aigua.
- Col·loquem els eppendorfs a la centrifugadora i centrifuguem a una velocitat de 5000 rpm durant 5 minuts. Quan hagi acabat, tirem el sobrenedant i ens quedem, de nou, amb el pellet.
- Afegim 1 ml d'aigua als eppendorfs i tornem a centrifugar a 5000 rpm, però només durant 5 segons. Realitzem el mateix procediment que abans i retirem el sobrenedant.
- Congelem el pellet durant 30 minuts al congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Afegim 15  $\mu\text{l}$  d'urea 5M.
- Incubem els eppendorfs durant 3 minuts a  $90^{\circ}\text{C}$ .
- Afegim una cullerada de boles de vidre als eppendorfs (glass beads, per trencar la paret de les cèl·lules).
- Igual que en l'extracció del DNA genòmic, amb ajuda del vòrtex, facilitem que es trenquin les membranes.
- Afegim 50  $\mu\text{l}$  de 1xSR i ho passem 30 segons pel vòrtex.
- Incubem els eppendorfs durant 2 minuts a  $90^{\circ}\text{C}$ .
- Amb ajuda d'una agulla, que prèviament escalfarem una mica, foradem amb molt de compte els eppendorfs per sota, de manera vertical. D'aquesta manera, agafarem el sobrenedant sense les perles de vidre en eppendorfs nous.
- Tot seguit, centrifuguem els nous eppendorfs a 5000 rpm durant 2 minuts.
- Tornem a centrifugar, aquest cop a 12000 rpm durant 5 minuts.
- Finalment, traiem 50  $\mu\text{l}$  del sobrenedant, valorem la concentració de proteïna en cada mostra i carreguem la mateixa quantitat de cada mostra al gel.

Com bé s'ha dit anteriorment, els gels que es van preparar, es col·loquen en un suport especial per iniciar l'electroforesi. Aquest suport es col·loca en una altra mena de suport, on hi afegirem una solució amortidora.

Les solucions amortidores, també anomenades dissolucions tampó, fan que el pH durant un anàlisi, en aquest cas de proteïnes, es mantingui constant i no variï.

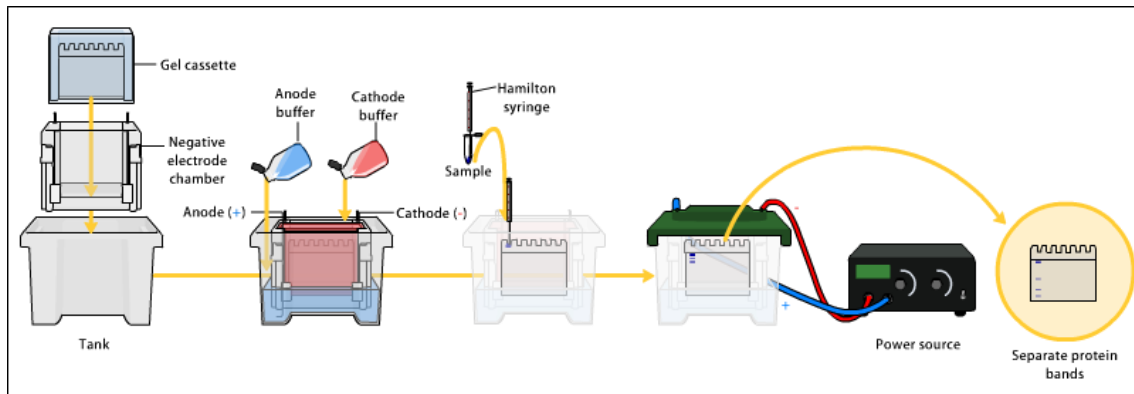


**Figura 16. Electroforesi**

Com es veu en la imatge, hem dipositat els dos gels, en els seus suports, dins d'aquest altre suport, omplert amb la solució amortidora.

Quan tot estigui preparat, iniciem l'electroforesi a un amperatge constant de 25 mA per gel, és a dir, 50 mA, ja que tenim dos gels.

En la fotografia s'observen, dins del suport, unes línies de color blau. Aquestes línies són les extraccions de proteïnes dipositades en els pous del gel. A mesura que avança l'electroforesi, veurem com les proteïnes van baixant. Això significa que les proteïnes, amb càrrega negativa, es mouran cap a l'ànode.



**Figura 17. Procés de l'electroforesi**

Aquest dibuix mostra el procés sencer de com es prepara el suport per l'electroforesi i com es realitza el mètode. L'electroforesi acaba en una hora, aproximadament.

#### 4.3.4. Transferència a membrana de nitrocel·lulosa

En aquest procés, se separa el gel amb les proteïnes del suport i es col·loca damunt d'una membrana de nitrocel·lulosa per transferir les proteïnes a aquesta membrana i que, després, se'n pugui fer la immunodetecció per analitzar el nivell d'aquestes proteïnes.

Aquesta transferència es pot dur a terme per difusió simple, amb una transferència al buit o amb una electrotransferència. En el nostre cas, utilitzarem l'electrotransferència, que es produeix mitjançant corrent elèctric. L'electrotransferència és la tècnica més utilitzada ja que es pot dur a terme a una alta velocitat i es transfereix un percentatge molt elevat de proteïna.

#### Material

- Gels amb les proteïnes
- Dues membranes de PVDF (una per a cada gel)
- Paper de filtre
- Caixes petites de plàstic (per col·locar les membranes)

- Metanol
- H<sub>2</sub>O
- Tampó de transferència (glicina 0,039M, Tris 0,048M, SDS 0,0375%, metanol 20%)

### **Metodologia**

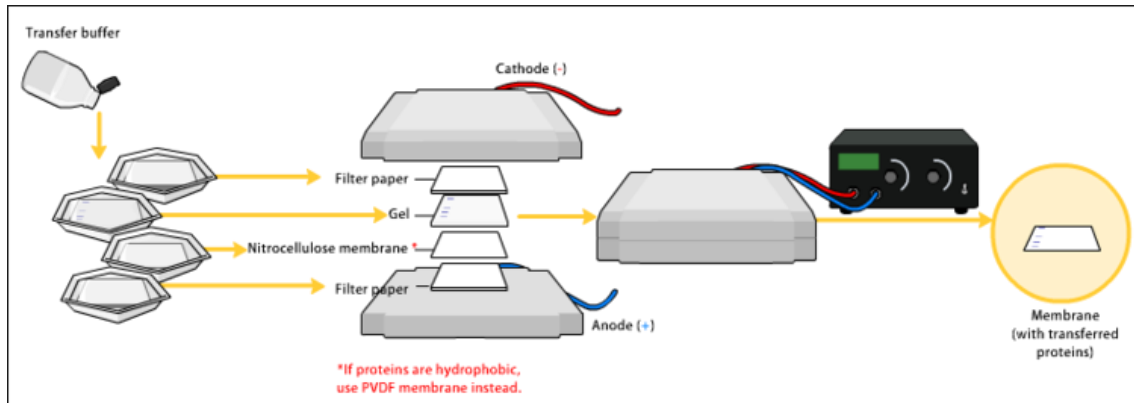
Primer de tot, amb un llapis fi, marcarem les dues membranes de nitrocel·lulosa per no confondre-les. En una de les cantonades superiors hi escriurem un 1 o un 2 en petit, segons la membrana.

Col·locarem cada membrana en remull dins d'una caixeta de plàstic on hi afegirem una mica de metanol, durant uns dos minuts. Passat aquest temps, farem el mateix però aquesta vegada amb aigua, per rentar bé el metanol. Tirem l'aigua i hi afegim el tampó de transferència durant 5 minuts i, quan passi el temps, també l'aboquem.

Afegim aquestes solucions per rentar bé les membranes.

A continuació, agafem un tros de paper de filtre, una mica més gran que la mida de la membrana (la membrana és igual que el gel), i el col·loquem damunt del suport per on passarà el corrent. Aquest suport actua d'ànode.

Damunt del paper col·locarem una de les membranes que teníem en les caixetes. Amb molt de compte, retirem un dels gels del suport i mirant que no se'ns trenqui el col·loquem damunt de la membrana. A sobre del gel hi tornarem a posar un tros de paper de filtre, de la mateixa mida que el primer. Quan tinguem ben muntat aquesta mena de "sandvitx" agafem la tapa del suport, que és el càtode, i ho tapem. El muntatge ha de ser com el d'aquest dibuix.



**Figura 18. Procés de la transferència a la membrana de PVDF**

Aplicarem un corrent de 25 mA i deixarem que passi un temps d'una hora. Repetirem exactament el mateix procés amb l'altre gel.

Quan hagi acabat la transferència extraurem les membrana d'entre els papers de filtre i les guardarem en les caixetes de plàstic. Els gels ja no serveixen, per tant, els podem llençar.

#### 4.3.5. Immunodetecció

Com que la membrana de PVDF necessita unir-se a les proteïnes de forma inespecífica, s'han de bloquejar els llocs d'unió que han quedat lliures després de la transferència. Si no ho fem, l'anticòs que utilitzem es pot unir a aquests llocs buits i això dificultarà la distinció del complex antígen-anticòs que es formi amb les proteïnes que es vulguin detectar.

En el nostre cas, incubarem les membranes amb una solució de proteïnes, de llet en pols. Les proteïnes de la llet s'uniran als llocs de la membrana que no estiguin ocupats per les proteïnes transferides des del gel. Aquest procés és conegut amb el nom de bloqueig, i és el pas previ a realitzar la immunodetecció, que ens permetrà aïllar les dues proteïnes que volem analitzar; la histona fosforilada i la proteïna sm11.



## Material

- TBST (1000 ml) (s'omplen dos recipients iguals)
  - 10 ml Tris – HCl 2M pH 8
  - 50 ml NaCl 2,5M
  - 1 ml Tween 20
  - H<sub>2</sub>O fins omplir el recipient del tot (és a dir, 939 ml)
- TAMPÓ B (50 ml) (s'omplen dos recipients iguals)
  - 2,5 g llet en pols desnatada
  - 50 ml TBST
- TAMPÓ I (100 ml) (s'omplen dos recipients iguals)
  - 5 ml tampó B
  - TBST fins omplir el recipient del tot (és a dir, 95 ml)
- Anticòs primari: anticòs de conill contra la forma fosforilada de la histona
- Anticòs secundari: anticòs de conill contra sm1

## Metodologia

Per dur a terme la immunodetecció es va seguir una metodologia establerta en una sèrie de procediments:

- Bloquejar la membrana en 40 ml de tampó B durant tota la nit a 4°C.
- Rentar una vegada durant 15 minuts i dues vegades durant 5 minuts amb 70 ml de TBST.
- Incubar amb l'anticòs primari en tampó I durant 1 hora en agitació suau.
- Rentar una vegada durant 15 minuts i una altra durant 5 minuts en 70 ml de TBST.
- Rentar durant 10 minuts en tampó I.
- Incubar durant 30 minuts en 25 ml de tampó I amb l'anticòs secundari.
- Rentar una vegada durant 15 minuts, dues vegades durant 10 minuts i tres vegades durant 5 minuts amb 70 ml de TBST.
- Sobre paper de transparència, preparar 1 ml de barreja UltraSignal (500 ml de cada solució) i col·locar la membrana de manera que la cara que conté les proteïnes estigui en contacte amb la solució. Incubar durant 5 minuts.

- Eliminar l'excés de líquid i col·locar la membrana entre dos transparències.

Finalment, quan hem acabat el procés d'immunodetecció, es tenyeixen les membranes amb el colorant Coomassie Blue R-250.

#### 4.3.6. Resultats

L'experiment de western blot es va dur a terme dues vegades. La primera vegada es va aplicar el seleni amb una concentració 4 mM (0,004 mols/L). Per comprovar els efectes del seleni segons la concentració, es va tornar a fer l'experiment aplicant dues concentracions diferents, 1 mM i 4 mM.

Les dues proteïnes que es van analitzar presentaven diferents reaccions respecte al seleni. La proteïna sml1 desapareixia en presència de seleni i, en canvi, la histona es fosforilava. El procés de fosforilació consisteix en l'addició d'un grup fosfat a un residu de serina de la proteïna (en aquest cas la histona). A continuació s'exposen les fotografies dels resultats obtinguts els dos dies que es va fer l'experiment.

#### Resultats del dia 04/07/14

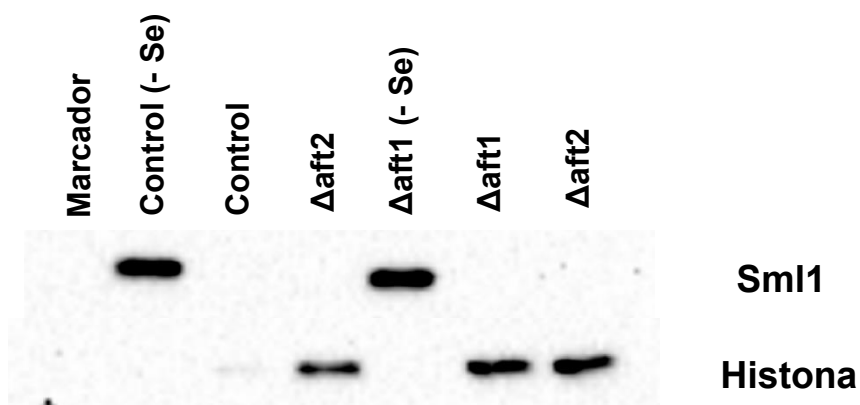


Figura 19. Resultats del dia 04/07/14

Aquest dia només es va aplicar el seleni de concentració 4 mM. La simbologia “- Se” fa referència als cultius on no es va aplicar seleni. Els noms que no porten res escrit al darrere són els que sí que es va aplicar seleni. També es va dipositar en un pou del gel un marcador.

S’observa que hi ha dos tipus de cada cultiu (un amb seleni i l’altre sense) excepte del  $\Delta aft2$ . Això és perquè en el moment de l’extracció de proteïnes no es va poder obtenir suficient proteïna d’aquesta soca sense seleni i, per tant, no es van poder analitzar els nivells. En canvi, d’aquest cultiu amb seleni es va poder extreure molta proteïna i es va analitzar dues vegades en el mateix gel.

En la franja de la proteïna sml1, els cultius que no havien estat afectats amb seleni conserven tots els nivells de proteïna. Es veu clarament (en la soca control (- Se) i en  $\Delta aft2$  (- Se)) la petita franja de proteïnes de color fosc. Això vol dir que els nivells de sml1 no s’han alterat. És coherent, ja que aquests cultius no han estat tractats.

Si ens fixem en els cultius als que hem aplicat seleni (també de la franja de la proteïna sml1), en cap dels quatre pous hi apareix restes de la proteïna. També és una dada coherent. La presència de seleni en els cultius fa que sml1 desaparegui. Per tant, el nivell d’aquesta proteïna és nul quan hi apliquem seleni de concentració 4mM.

Pel que fa referència a la histona, els cultius que no havien estat tractats amb seleni no presenten cap marcatge en la banda corresponent a la proteïna. Cal recordar que la histona pateix un procés de fosforilació si apareix dany en el DNA, que és el que el seleni provoca. Com que no hi ha presència de seleni, no hi ha cap dany i, per tant, la proteïna no es fosforila i no és reconeguda per l’anticòs.

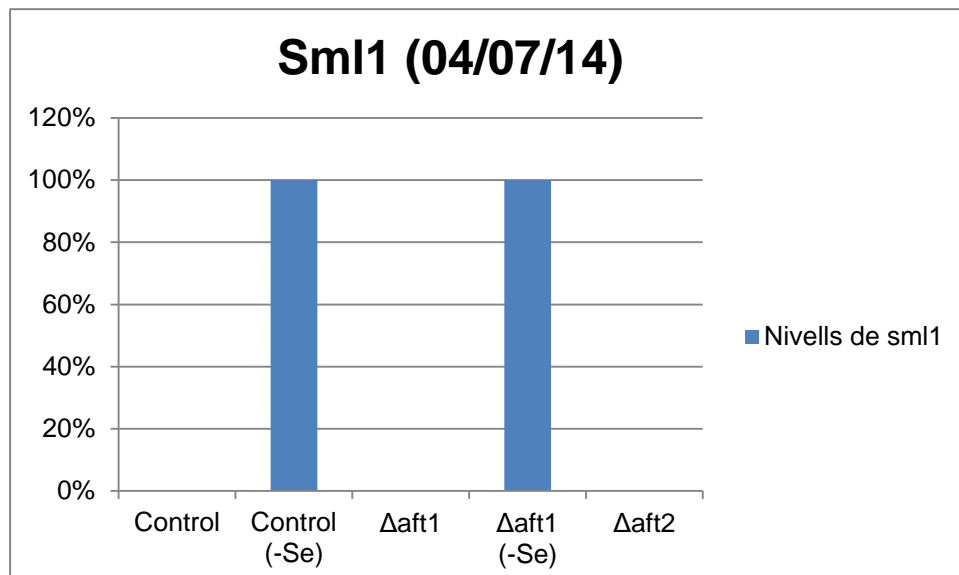
En els cultius on hi vam aplicar seleni sí que s’observa fosforilació de la histona. Com a conseqüència, es poden veure les bandes de color. En els cultius  $\Delta aft1$  i  $\Delta aft2$  amb seleni 4 mM hi ha un nivell de fosforilació més elevat. Això es veu clarament ja que els pous d’aquests cultius són d’un color més fosc

i indiquen un nivell més gran de fosforilació. En canvi, en el cultiu salvatge (control) no es detecta fosforilació.

A partir d'aquesta imatge del dia 4 de juliol, podem deduir que el seleni sí que afecta clarament als cultius i que mitjançant aquest mètode podem detectar millor el dany que provoca al DNA, ja que la histona està associada a aquest. També s'observa que en el cultiu que no ha estat mutat (soca control), quan apliquem seleni la proteïna sml1 desapareix però la histona no es fosforila tant com als cultius mutats ( $\Delta aft1$  i  $\Delta aft2$ ).

En els següents gràfics es mostren visualment els nivells de la proteïna sml1 i els nivells de fosforilació de la histona.

No es poden quantificar els nivells d'aquestes proteïnes, i per això s'han donat uns percentatges de 0%, 25% i 100% segons si estaven més o menys degradades en el cas de sml1 i més o menys fosforilades en el cas de la histona.



**Figura 20. Gràfic dels nivells de sml1 (04/07/14)**

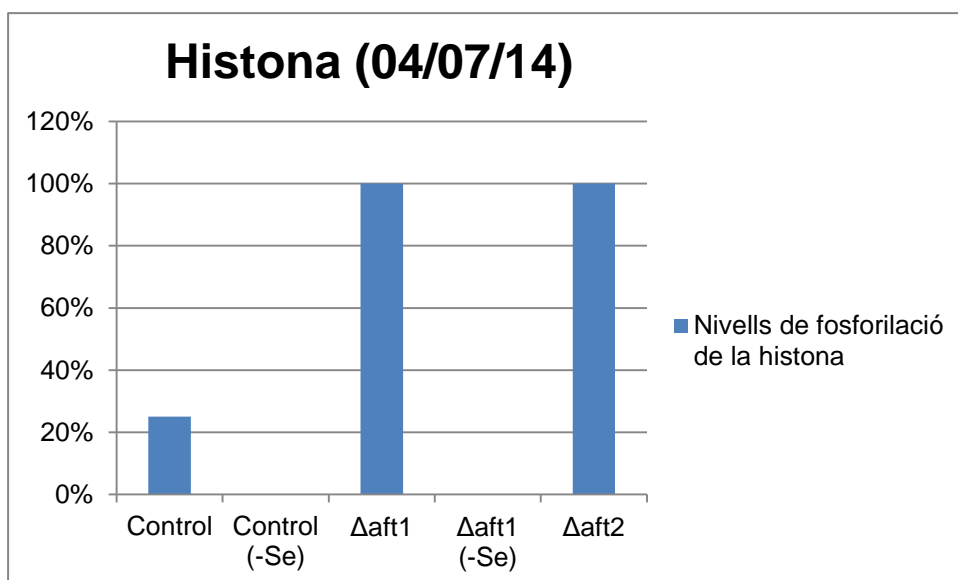


Figura 21. Gràfic dels nivells de fosforilació de la histona (04/07/14)

#### Resultats del dia 08/07/14

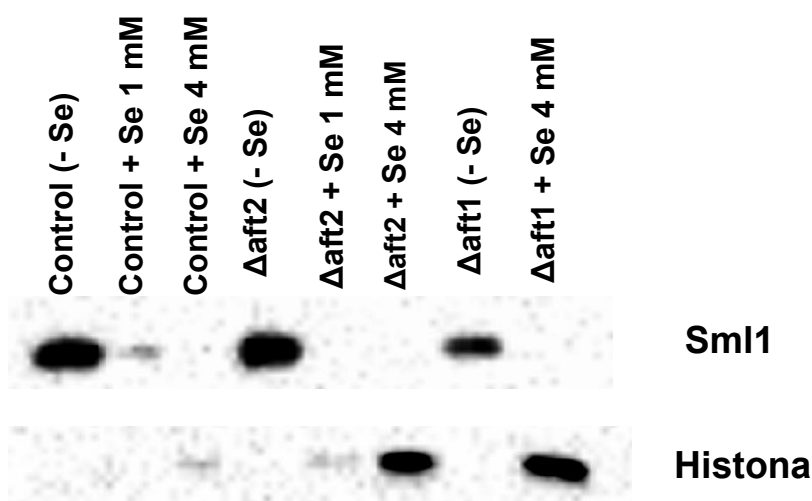


Figura 22. Resultats del dia 08/07/14

Es va decidir repetir l'experiment de Western blot un segon dia, per assegurar les dades obtingudes. A més, en comptes d'analitzar només els cultius tractats amb seleni 4 mM i sense seleni, es van analitzar aquests dos i la soca control i Δaft2 amb seleni de concentració 1 mM, per comprovar si l'efecte del seleni variava segons la concentració.

La simbologia “- Se” fa referència als cultius on no es va aplicar seleni. Els altres noms indiquen la concentració de seleni que es va aplicar.

Es va poder extreure proteïna de cada cultiu sense seleni, amb seleni 1 mM i amb seleni 4 mM; excepte de la soca  $\Delta aft1$ , que no es va poder obtenir proteïna del cultiu amb seleni 1 mM.

Primer, ens fixarem amb la proteïna sml1. Els nivells d'aquesta proteïna en els cultius que no van ser tractats amb seleni es mantenen constants. S'observa molt clarament una gran taca fosca en el pou d'aquests cultius (els que estan marcats amb “- Se”). La taca es correspon amb la quantitat de proteïna sml1 present a la mostra. És coherent ja que no han estat exposats al dany del seleni.

Els cultius que van ser tractats amb seleni van resultar afectats de manera diferent, ja que es van aplicar dues concentracions de seleni diferents i no van causar el mateix dany.

Els resultats dels cultius amb seleni 1 mM només es van poder extreure de les soques control i  $\Delta aft2$ , ja que de  $\Delta aft1$  no es va poder extreure proteïna suficient. En els cultius que sí que es van poder analitzar, s'observa que el seleni 1 mM no afecta tant a la soca control com ho fa amb el mutant  $\Delta aft2$ . La proteïna sml1 no desapareix del tot al cultiu salvatge afectat pel seleni 1 mM. Mentre que al cultiu  $\Delta aft2$  desapareix del tot.

Els cultius que van ser tractats amb seleni 4 mM van reaccionar tots de la mateixa manera. En els tres cultius (control,  $\Delta aft1$  i  $\Delta aft2$ ) la proteïna sml1 queda totalment degradada. Aquesta dosi tan alta de seleni no ens permet veure diferències d'afectació entre la soca control i la mutada.

En la banda de la histona, els cultius no tractats amb seleni no mostren cap signe de fosforilació de la histona, ja que no es provoca dany al DNA.

Dels cultius on es va afegir seleni 1 mM (control i  $\Delta aft2$ ) observem que en  $\Delta aft2$  hi ha una petita fosforilació, que indica que hi ha hagut dany; mentre que a la soca wild type no s'hi veu cap signe de fosforilació. En el cultiu  $\Delta aft2$  es veu una petita taca una mica fosca, tot i que no molt. Això indica que, en aquesta concentració, el seleni no ha afectat gairebé al cultiu sense mutar (control).

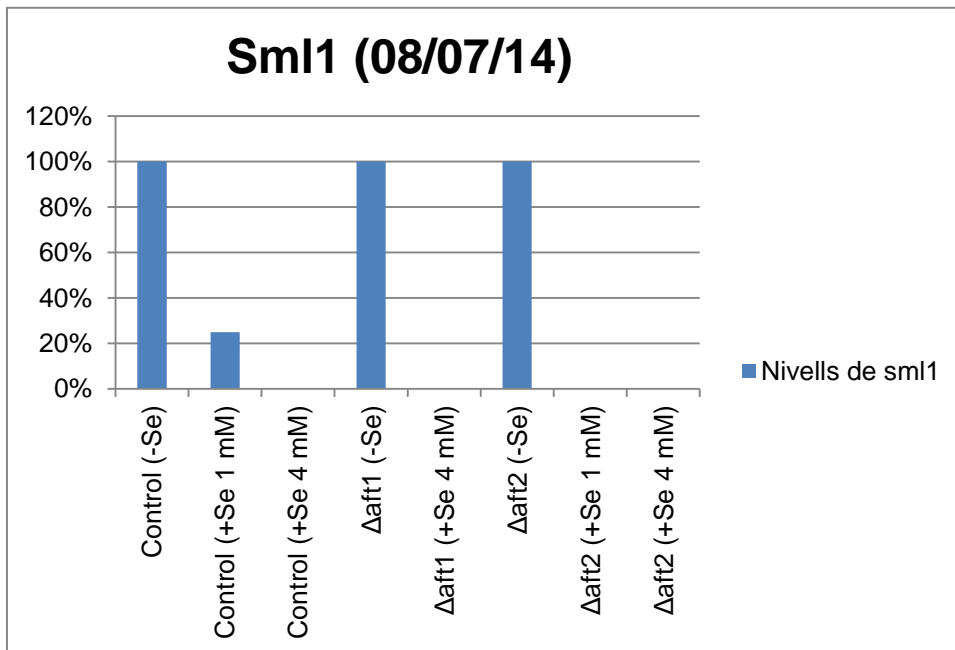
També es veuen diferències entre les soques mutades i la salvatge quan hi apliquem el seleni 4 mM. En els mutants  $\Delta aft1$  i  $\Delta aft2$  el seleni provoca més dany, ja que el nivell de fosforilació és més alt en aquests cultius. En canvi, en el cultiu control la histona també es fosforila, però molt poc i gairebé no es nota.

D'aquesta manera, amb l'experiment del dia 8 de juliol, podem afirmar que el dany que provoca el seleni varia segons la concentració en que es troba aquest element químic. És a dir, si la concentració és més baixa, no produeix tant dany com a altes concentracions. També es pot deduir que les soques mutants estan més afectades pel seleni, ja que presenten un nivell de fosforilació més alt que la soca salvatge, tant en seleni 1 mM com a concentració 4 mM.

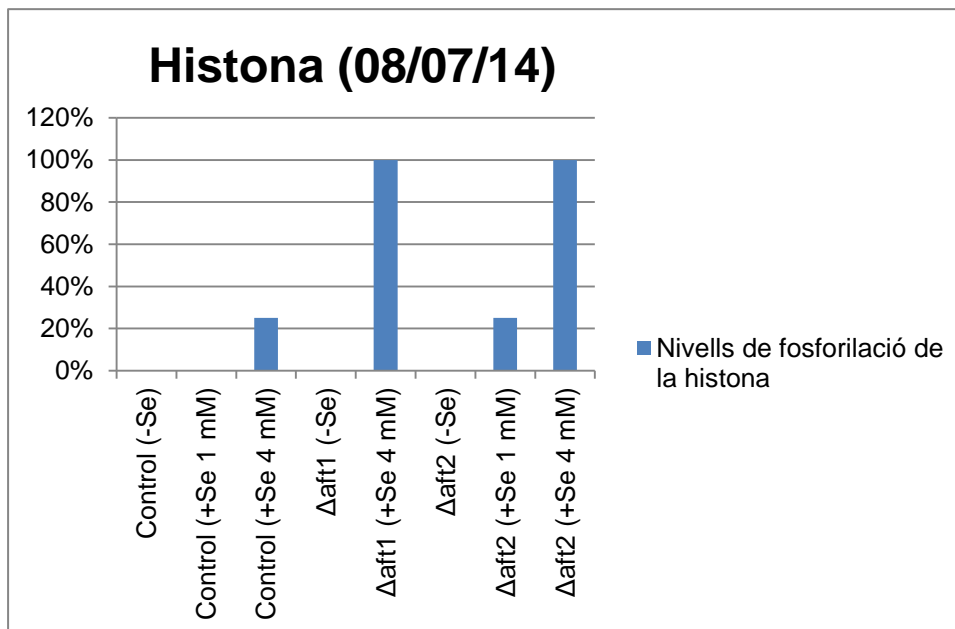
Finalment, cal dir que l'experiment western blot va ser un èxit, ja que va permetre detectar visualment el dany que el seleni provoca a les cèl·lules del llevat, tot i que no s'estudiés directament el DNA; sinó que es va fa a partir de les dues proteïnes seleccionades, la proteïna sml1 i la histona.

En els següents gràfics es mostren visualment els nivells de la proteïna sml1 i els nivells de fosforilació de la histona.

No es poden quantificar els nivells d'aquestes proteïnes, i per això s'han donat uns percentatges de 0%, 25% i 100% segons si estaven més o menys degradades en el cas de sml1 i més o menys fosforilades en el cas de la histona.



**Figura 23. Gràfic dels nivells de sml1 (08/07/14)**



**Figura 24. Gràfic dels nivells de fosforilació de la histona (08/07/14)**



## 4.4. MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

El tercer mètode que es va dur a terme va ser la microscòpia de fluorescència. Amb l'ajuda d'un microscopi de fluorescència, transformarem les cèl·lules dels cultius amb un plasmidi. Aquests plasmidis contenen la informació d'un gen per a una proteïna que és pròpia de les meduses.

Aquesta proteïna s'anomena YFP (yellow fluorescent protein) i, com bé indica el seu nom, és la que proporciona la fluorescència a éssers vius com les meduses.

Quan es produeix dany al DNA, aquesta proteïna s'uneix als extrems per on s'ha trencat el DNA i gràcies al microscopi de fluorescència podem detectar els "foci", és a dir, els llocs de les cèl·lules on s'ha produït el dany.

Les cèl·lules que es van fotografiar des del microscopi eren dels tres tipus (wild type,  $\Delta aft1$  i  $\Delta aft2$ ). Els tres analitzats amb seleni i sense seleni.

### 4.4.1. Material i metodologia

#### Material

##### Cultius de llevat

- Soca control tractada amb seleni
- Soca control sense seleni
- Soca  $\Delta aft1$  tractada amb seleni
- Soca  $\Delta aft1$  sense seleni
- Soca  $\Delta aft2$  tractada amb seleni
- Soca  $\Delta aft2$  sense seleni
  
- Microscopi de fluorescència

## Metodologia

En el microscopi de fluorescència els objectes són il·luminats per rajos d'una determinada longitud d'ona. La imatge que s'observa és el resultat de la radiació electromagnètica emesa per les molècules que han absorbit l'excitació primària i que han emès una llum amb major longitud d'ona.

És a dir, les cèl·lules transformades amb el plasmidi que contenia la proteïna híbrida (Rad-53 + YFP) eren excitades amb una llum des del microscopi i aquestes emetien la llum fluorescent.



**Figura 25. Microscopi de fluorescència**

Les imatges que s'analitzaven al microscopi es connectaven a un ordinador i des d'allà es feien fotografies que s'emmagatzemaven per després fer el recompte de cèl·lules afectades. Primer es feia una foto de les cèl·lules sense aplicar la fluorescència i, després, d'aquell mateix grup de cèl·lules es feia una fotografia aplicant-hi la fluorescència des del microscopi. D'aquesta manera es podia veure la llum fluorescent que emetia la proteïna YFP quan s'unia als fragments trencats de DNA per mitjà de la proteïna Rad-53.

Posteriorment, mitjançant el programa informàtic ImageJ es va fer un recompte de les cèl·lules i dels "focis", és a dir, els punts fluorescents que tenien.

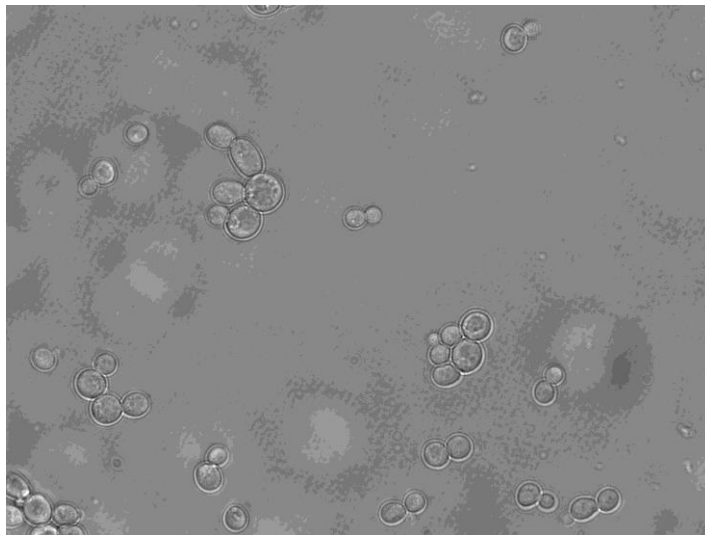
A continuació, s'explicarà com es va fer el recompte amb l'ajuda del programa ImageJ i també es proporcionaran unes fotografies i taules amb els percentatges de cada soca que es va estudiar al microscopi.

#### 4.4.2. Resultats

En aquest apartat, es mostrarà una fotografia de cada cultiu analitzat al microscopi. Primer els cultius que no van ser tractats amb seleni i després els que sí que van estar tractats amb seleni.

La primera imatge de cada parella correspon a les cèl·lules del cultiu triades per fer la fotografia, i la imatge de sota és la realitzada amb el microscopi de fluorescència.

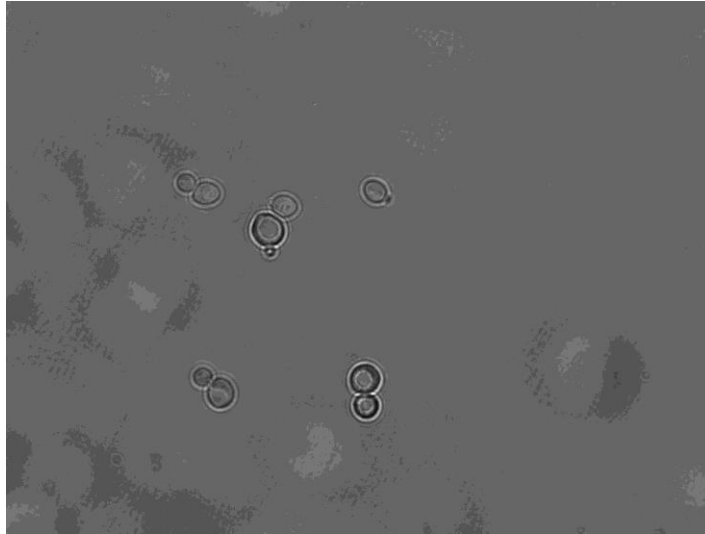
#### Cultius sense seleni



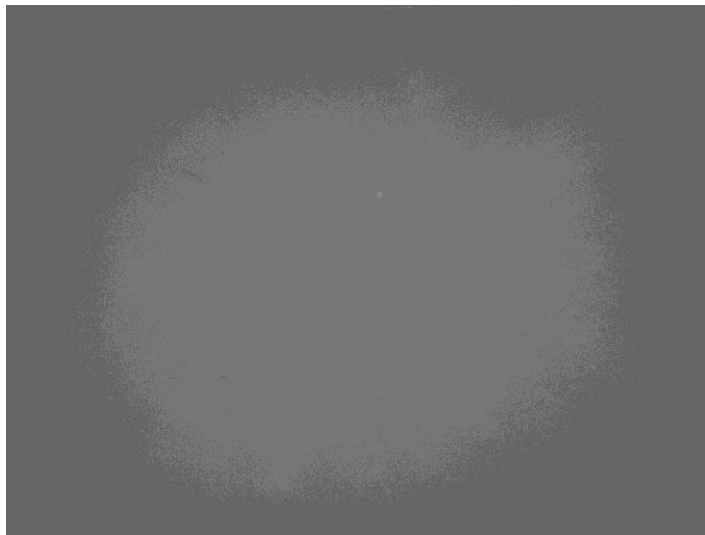
**Figura 26. Cèl·lules de la soca control (sense Se)**



**Figura 27. Cèl·lules de la soca control al microscopi de fluorescència (sense Se)**



**Figura 28. Cèl·lules de la soca  $\Delta aft2$  (sense Se)**



**Figura 29. Cèl·lules de la soca  $\Delta aft2$  al microscopi de fluorescència (sense Se)**

En aquestes fotografies no es veu cap punt fluorescent, per tant, no hi ha cap trencament en el DNA.

El percentatge de cèl·lules afectades és del 0%.

## Cultius amb seleni

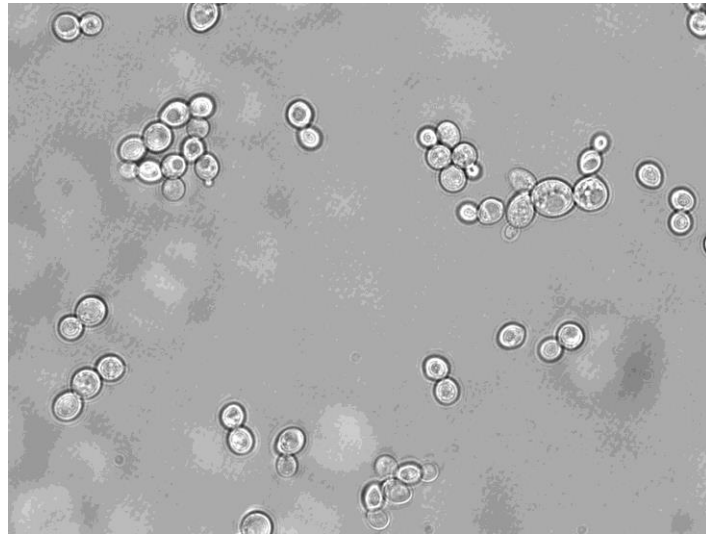


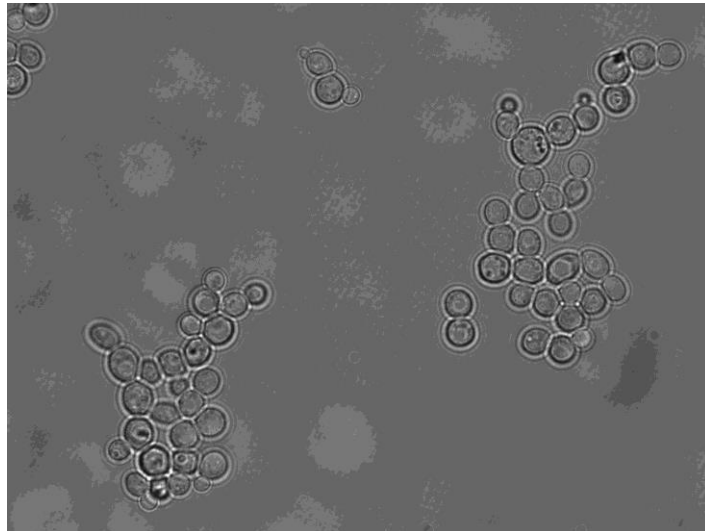
Figura 30. Cèl·lules de la soca control (amb Se 3 mM)



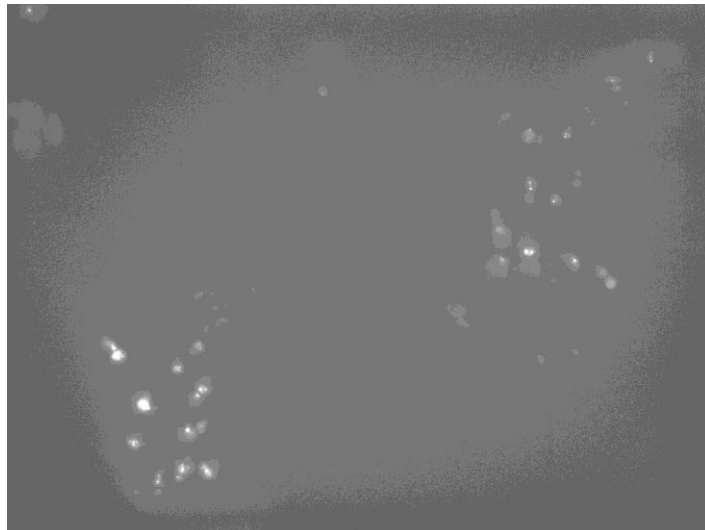
Figura 31. Cèl·lules de la soca control al microscopi de fluorescència (amb Se 3 mM)

Nombre total de cèl·lules	Nombre de cèl·lules danyades	Percentatge de cèl·lules danyades
277	37	13,55%

Taula 2. Cèl·lules de la soca control amb seleni 3mM



**Figura 32. Cèl·lules de la soca  $\Delta aft2$  (amb Se 3 mM)**



**Figura 33. Cèl·lules de la soca  $\Delta aft2$  al microscopi de fluorescència (amb Se 3 mM)**

<b>Nombre total de cèl·lules</b>	<b>Nombre de cèl·lules danyades</b>	<b>Percentatge de cèl·lules danyades</b>
251	85	33,86%

**Taula 3. Cèl·lules de la soca  $\Delta aft2$  amb seleni 3mM**

## 5. CONCLUSIONS

Després d'haver realitzat els tres experiments es va arribar a una sèrie de conclusions que responien a les hipòtesis plantejades a la introducció.

1. La primera hipòtesi era que el seleni aplicat a diferents concentracions tenia un efecte més o menys perjudicial. Aquesta hipòtesi es verifica amb l'experiment de western blot (extracció i anàlisi de la proteïna sml1 i la histona). Els resultats verifiquen que el seleni de concentració 4 mM té un efecte més nociu que el seleni de concentració 1 mM, tot i que en les dues concentracions es produeix toxicitat.

Les proteïnes es veuen afectades tant amb seleni 1 mM com amb seleni 4 mM, però el seleni de major concentració es mostra més perjudicial amb les dues proteïnes.

2. La segona hipòtesi era que el mètode d'extracció i valoració del DNA era el més eficaç per determinar el dany que causa el seleni.

A diferència de la primera, aquesta hipòtesi queda refutada, ja que la tècnica més eficaç és la de western blot; amb l'extracció i l'anàlisi de la proteïna sml1 i la histona.

El mètode d'extracció i valoració del DNA no va ser eficaç perquè el DNA del llevat té un pes molecular molt elevat, i això fa que no es pugui veure el trencament d'aquest en el gel.

Per tant, extraient aquestes conclusions, podem afirmar que els efectes del seleni són més perjudicials si s'aplica en una concentració més elevada i que la tècnica de western blot és la més eficaç per analitzar els efectes que provoca.

A part de les conclusions basades en les hipòtesis, també s'ha vist que per determinar els resultats d'un experiment cal dur-lo a terme més d'una vegada, realitzant còpies, ja que és així com es treballa en un laboratori.

## 6. BIBLIOGRAFIA

### Planes web

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Seleni>

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Selenoprote%C3%AFna>

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Ciste%C3%AFna>

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Selenociste%C3%AFna>

[http://ca.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces\\_cerevisiae](http://ca.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)

<http://www.yeastgenome.org/>

[http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni\\_02/56/cap309.htm](http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/56/cap309.htm)

<http://microbiologia.escorialvic.org/?p=214>

[http://ca.wikipedia.org/wiki/Electroforesi\\_en\\_gel](http://ca.wikipedia.org/wiki/Electroforesi_en_gel)

[http://es.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](http://es.wikipedia.org/wiki/Western_blot)

<https://www.wikigenes.org/e/gene/e/854945.html>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002414.htm>

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/se.htm>

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v8n2/selenio.html>

<http://bioinfo2.ugr.es/presentaciones/EvolMol/Modificaci%F3nHistonas.pdf>



## Llibres

B. Alberts (1998). *Introducción a la biología celular*.

## Tesis

Pérez Sampietro, Maria (2014). *Mecanismos implicats en la senyalització i la defensa front l'estrès per selenit en Saccharomyces cerevisiae*. Universitat de Lleida, Lleida.

## 7. GLOSSARI

**Apoptosi:** mort de les cèl·lules.

**Auxotròfia:** capacitat de certs organismes d'elaborar vitamines mitjançant transformacions metabòliques a partir de factors previtamínics prèviament obtinguts del medi.

**Cisteïna:** és un dels vint aminoàcids que utilitzen les cèl·lules per elaborar proteïnes.

**Codó:** triplet de nucleòtids de DNA.

**Fosforilació:** modificació que sofreix una molècula per l'addició d'un o més grups fosfat.

**Genotip:** informació genètica total d'un organisme o constitució genètica d'un organisme.

**Gens paràlegs:** gens presents a l'interior del mateix genoma i que codifiquen productes diferents, però que provenen d'un únic gen ancestral.

**Homeòstasi:** tendència a mantenir l'equilibri i l'estabilitat interns en els diferents sistemes biològics.

**Inoculació:** en biologia és ubicar alguna cosa que creixerà i es reproduirà, i comunament es fa servir aquest terme respecte a la introducció de sèrum sanguini, d'una vacuna o una substància antígen dins del cos d'un humà o d'un animal, especialment per a produir immunitat a una malaltia específica.

**Oligoelement:** element químic que es troba en els éssers vius en proporcions indiciaires, el qual, però, és indispensable per a les funcions vitals.

**PVDF:** polifluorur de vinilidè.

**Selenocisteïna:** aminoàcid que té la mateixa estructura que la cisteïna, però en comptes de sofre, té seleni.

**Soca:** població genèticament uniforme d'organismes.