



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

KIMIKA ZIENTZIEN FAKULTATEA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Kimika Zientzien Fakultatea

Kimikako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

**Analisi teknika genomiko, proteomiko eta zelularrak
harizpi itxurako ondoren andui errekonbinanteak sortu
eta aztertzeko.**

Egilea: Jon Iriarte Martinez

Zuzendaria: Oier Etxebeste Juárez
Zuzendari-kidea: Ainara Otamendi Elizalde

Donostia, 2018ko uztaila

GIPUZKOAKO CAMPUSA
CAMPUS DE GIPUZKOA
Pº. Manuel de Lardizabal, 3
20018 DONOSTIA-SAN SEBASTIAN
GIPUZKOA

Esker onak

Gradu Amaierako Lan hau burutzeko Espainiako Gobernuko Hezkuntza, Kultura eta Kirol Ministerioak emandako kolaborazio beka baten laguntza izan da, 274136881350108104668204 CSV-arekin. Nire eskerrik beroena azaldu nahi nioke Ministerioari ikerketa munduan abiarazteko emandako laguntzagatik.

Modu berean, lan honetan aipamen berezi bat merezi dute, bai Ainara Otamendi Elizalde doktoregaiak, bai Oier Etxebeste Juárez doktoreak. Lehenengoak, laborategian teknika esperimentalak burutzeko garaian emandako laguntza guztiagatik, eta bigarrenengoak, ikerketa munduari eta bizitzari buruz irakatsitako gauza guztiengatik.

AURKIBIDEA

LABURPENA/SUMMARY	1
1. SARRERA	3
1.1. <i>Aspergillus nidulans</i> onddo modelo	3
1.2. Biologia molekularreko teknikak	5
1.3. Helburuak	6
2. MATERIALAK ETA METODOAK	11
2.1. Erabilitako <i>A. nidulans</i> anduia	11
2.2. DNA konstrukzioen sorrera	11
2.2.1. PCR	12
2.2.2. Fusio-PCR	13
2.3. Transformazioa	16
2.4. DNA eta proteinen erauzketa	17
2.5. DNA analisia: Southern blot	18
2.6. Proteinen analisia: Western blot	20
2.7. Azterketa fenotipikoa	21
3. EMAITZAK	23
3.1. PCR erreakzioen produktuak	23
3.2. Transformanteen selekzioa	25
3.3. DNA analisia: DNA erauzketa eta Southern blot	26
3.4. Proteinen analisia: Western blot	29
3.5. Transformanteen azterketa fenotipikoa	31
4. EZTABAIDA	35
5. ONDORIOAK/CONCLUSIONS	37
6. BIBLIOGRAFIA	39
7. ERANSKINAK	41

LABURPENA/SUMMARY

Biologia molekularrak zelulak osatzen dituzten biomolekulak detektatzeko edota zeluletan ematen diren oinarrizko erreakzio batzuk berregiteko aukera ematen du. Gradu amaierako lan honetan biologia molekularreko oinarrizko zenbait teknika burutzen ikasi da, nagusiki hiru. Batetik, PCR edo polimerasaren kate erreakzioa, DNA molekula desberdinak kopiatu eta anplifikatu ahal izateko. Bigarrenik, luminiszentziadun zunda baten bidezko DNA-aren detekzioa (Southern blot). Eta hirugarrenik, antigorputz bidezko proteinen detekzioa edo immunodetekzioa (Western blot). Teknika eta prozedura horiek ikasteko *Aspergillus nidulans* harizpi itxurako onddoarekin egin da lan, oso erabilgarria baita ikerketa genetikoetarako. *A. nidulans* hainbat prozesu aztertzeke erabili da lan honetan, hala nola, onddoaren garapen asexuala. Idatzi honetan, ordea, gaixotasun neurodegeneratiboen ikerketarako modelo sinplifikatu bat bezala erabili daitekeen ala ez jakiteko egindako lehen azterketak aurkezten dira, zehazki, ELA (Esklerosi Lateral Amiotrofikoa) gaixotasunaren mekanismo patogenoaren ikerketarako. Horretarako, gizakion Importina- α edo TDP-43 proteina espresatzen duten onddo andui errekonbinanteak sortzeko egindako lehenengo urrats esperimentalak azaltzen dira. Horrekin batera, lanean zehar erabilitako biologia molekularreko tekniken deskribapena egiten da.

*Molecular biology gives the opportunity to detect the biomolecules that form cells or to recreate the main reactions occurring inside cells. In this end-of-bachelor project it's been learned how to use several basic molecular biology techniques, mostly three of them. First of all, PCR or Polymerase Chain Reaction, which allows the replication and amplification of different DNA molecules. Secondly, the detection of DNA by a luminescent probe, a technique known as Southern blot. And thirdly, protein detection by antibodies or immunodetection, known as Western blot. In order to learn the procedures of each technique, the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* has been used as a model, which is very useful for genetic research. During this work, *A. nidulans* has been used to study several biological processes, as for example, asexual development in fungi. Nevertheless, in this text, first studies carried out in order to reveal if *A. nidulans**

could be used as a simplified model to study neurodegenerative diseases are described. More specifically, we are interested in the study of the pathogenic mechanisms of ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) disease. To achieve this goal, first experimental steps have been performed to create recombinant fungal strains expressing human Importin- α or TDP-43 proteins, and the obtained results are described. At the same time, a detailed explanation of every molecular biology technique used during the research work is given.

1. SARRERA

Biologia molekularra gaur egun edozein gaixotasunen funtzionamendua aztertzeko eta horien aurkako sendagaiak eta terapiak diseinatzeko ezinbestekoa den ezagutza arloa bilakatu da. Horrela, biologia molekularreko eta azterketa genetikoko teknikak erabiltzen dira, adibidez, minbiziaren aurkako ikerketetan, gaixotasun neurodegeneratiboei buruzko ikerketetan, organismo patogenoei buruzko ikerketetan, etab.

Edozein ikerketa biologiko antolatzerako garaian bi faktore garrantzitsu hartu behar dira kontutan. Alde batetik, esperimentuak burutzeko erabiliko den organismo modeloa definitu behar da. Bestetik, organismo horren azterketa egiteko erabiliko diren biologia molekularreko teknikak aukeratu behar dira. Bi faktore horien arabera ikerketa lana aurrera eramateko beharko diren tresnak eta materialak zehaztu ahal izango dira.

1.1. *Aspergillus nidulans* onddo modeloa

Biologia molekularrean erabiltzen diren organismo modeloen artean harizpi itxurako onddoak oso erabilgarriak dira ikerketa genetikoetan, hainbat arrazoi direla eta [1]. Hasteko, eukariotikoak dira eta horrek esan nahi du, printzipioz, organismo konplexuetarako sistema modelo bezala erabili ahal izango lirakeela. Gainera, *Aspergillus nidulans* bezalako sistematan, haren behar nutrizional baxuak direla eta (karbono organiko iturri bat, nitratoak edo amoniakoak nitrogeno iturri bezala eta gatz ezorganikoak), kasu gehienetan kultibatzen erraza da eta esperimentuetarako biomasa nahikoa ekoizten du ordu batzuen epean. Hazkuntzan zehar diferentziazio etapa espezifikoak ditu (hifak hazkuntza begetatiboan, espora asexualak edo konidioak garapen asexualean eta organo sexualak garapen sexualean, adibidez), analisiak errazten dituena. Azkenik, mutanteak mikroorganismo haploide bezala lor daitezke. Horri esker, fenotipoa behatuz ateratako ondorioak zuzenean erlazona daitezke onddoaren genotipo edo dotazio genetikorekin. Lortutako mutante horiek selektiboki aukeratzeko modu ezberdinak daude; hala nola, hazkuntza-medio selektiboak erabiliz.

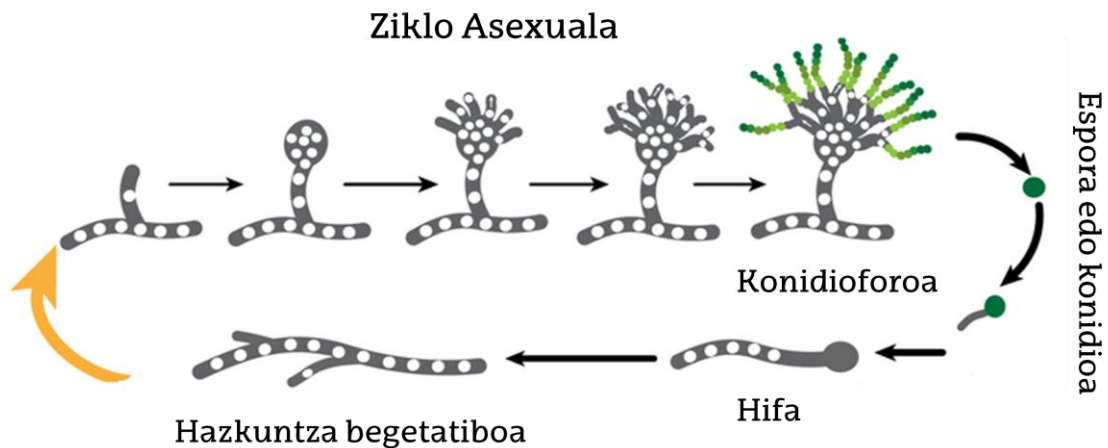
Harizpi itxurako onddoen artean *Aspergillus nidulans* da modelo erabilienetako bat. Onddo horren ikerketa genetikoa 1945. urtean abiarazi

zuen Pontecorvo izeneko ikerlariak zelulen antolaketa espazialari buruzko azterketa genetiko bat egiteko organismo egoki baten bila hasi zenean [2]. Horrela, 1953an Pontecorvo-k argitaratutako lanean, *A. nidulans*-en lehenengo deskribapen genetikoa agertu zen, geroago beste ikerketa lan batzuekin osatu zena, hala nola, Clutterbuck-ek 1974an argitaratutakoa [2]. Lan horietan hainbat andui mutante isolatu ziren, eta *A. nidulans*-en ikerketa genetikorako oinarriak ezarri ziren.

A. nidulans-en bizi zikloak ongi definitutako lau aldi edo etapa dauzka: hazkuntza begetatiboa, ziklo asexuala, ziklo sexuala eta ziklo parasexuala. Testua arintzeko ikerketarako beharrezkoak izan direnak bakarrik azalduko dira: hazkuntza begetatiboa eta ziklo asexuala.

Hazkuntza begetatiboa esporen erretzearekin hasten da (**1go irudia**). Esporak bai ziklo sexualaren, bai asexualaren produktuak dira, eta onddoaren sakabanatze-unitate bezala jokatzen dute [3]. Ingurumen baldintza egokiak aurkitzen dituztenean, esporak ernamuindu egiten dira eta hifa izeneko harizpi itxurakoegiturak osatzen dira, nukleo anitz (multinukleatuak) dituzten hainbat zelula haploidez osatuta daudenak. Hifak modu polarrean hazten dira hifaren hazkuntza apikalaren bidez [4,5], eta hazten doazen heinean adarkatzea ematen da eta hifa berriak agertu egiten dira. Sortutako adarkatze horiek elkarrekin topo egitean, hifa ezberdinen arteko interkonexioak sortu egiten dira anastomosi (hazkuntza lekuen fusio) bitartez, eta hifek sare-egitura bat osatzen dute elkarren artean. Egitura horri mizelio deritzen. Mizelioak simetria erradialeko kolonia bat osatzen du, etengabe hedatzen jarraitzen duena.

Kolonia hazten doan heinean, erdiko zonan elikagaiak agortu eta hondakin metabolikoak pilatu egiten dira. Baldintza horietan esporen produkzioa abiarazten da [3], ziklo asexualari hasiera emanez. *A. nidulans*-en kasuan, koloniaren erdigunean aire-ingurura azaleratzen diren hifa batzuen diferentziazioa ematen hasten da [4]. Diferentziazio horrek konidioforoak bilakatzen eramatean ditu, espora asexualak (konidioak) sortzen dituzten egiturak (**1go irudia**).



1go irudia. *A. nidulans*-en ziklo asexualaren irudikapena, [6]-tik modifikatua. Zikloa esporatik abiatzen da (eskuinean). Esporaren erretzea eman eta hifa hazi egiten da. Hazkuntza begetatiboan zehar adarkatzeak sortzen dira, eta hifa-adarkatze horietako batzuen diferentziazioa ematen hasten da (goian ezkerrean). Diferentziazioa amaitzean konidioforo bilakatuko dira, eta espora berriak sortuko dituzte, zikloa osatuz.

1.2. Biologia molekularreko teknikak

Esan bezala, biologia molekularreko beste atal garrantzitsua teknikak dira. Aztertzen den biomolekularen edo egituraren arabera teknika genomiko (genoma edo material genetikoaren azterketa), teknika transkriptomiko (RNA-ren azterketa), teknika proteomiko (proteinen azterketa), teknika metabolomiko (metabolitoen azterketa) edota teknika zelularrez hitz egin daiteke, esaterako.

Teknika genomikoen bidez organismo baten geneak identifikatu daitezke, gene horien sekuentziak ezagutu daitezke, haien *loci*-ak (genoman hartzen duten espazio fisikoa) zehaztu daitezke, etab. Organismoen manipulazio genetikoak ere egin daitezke, geneak isolatuz, klonatuz (kopiatuz), modifikatuz eta organismo hostalariaren genoman txertatuz. Teknika genomiko nagusien artean PCR-a (*Polymerase Chain Reaction*), transformazioa, Southern blot-a eta DNA sekuentziazioa aurkitzen dira.

Teknika proteomikoen bidez organismo batean aurkitzen diren proteinak erauzi, intereseko proteinak isolatu eta horien azterketa egin daitezke, besteak beste. Modu horretan, proteina jakin bati dagokion genearen espresio eta itzulpenari buruzko informazioa lortu daitezke. Teknika

proteomikoen artean Western blot-a edo proteinen antigorputz bidezko immunodetekzioa aurkitzen da.

Teknika zelularren bidez organismo baten zelulen hazkuntza eta garapenaren azterketa egin daiteke. Horretarako, zelulen kultiborako teknikak eta zelulen edo organismoen azterketa fenotipikoak erabiltzen dira, esaterako.

1.3. Helburuak

Gradu amaierako lan (GrAL) honen helburua oinarrizko zenbait teknika genomiko, proteomiko eta zelularrak ikastea izan da. Horretarako, *A. nidulans* onddoa eta prozesu zelular desberdinak erabili dira eredu bezala. Batetik, onddo horren garapen asexuala fosfato ioiek eragindako estres egoerapean kontrolatzen duen eta, ustez, transkripzioaren erregulatzailea den proteina baten karakterizazioan lehen urratsak eman dira. Horretarako, batetik, dagokion genearen delezio edo ezabaketa egin da genomatik, eta bestetik, genearen modifikazioa egin da sortuko den proteinari fluoreszentszia emango dion etiketa bat erantsiz. Esperimentu horiek Aina Otamendi Elizalde doktoregaiaren tesiaren barruan kokatzen dira.

Eta bigarrenik, ELA edo Esklerosi Lateral Amiotrofikoa pertsonon gaixotasunarekin harremana duten gene/proteinak espresatzen dituzten *A. nidulans*-en andui errekonbinanteak sortzea eta horien ezaugarriak aztertzea izan da beste helburua. Ulermena errazte aldera, eta lana gehiegi ez luzatzeko, GrAL honetan azken gai honi buruzko metodologia eta emaitzak erakutsiko dira. Modu honetan, ELA bezalako gaixotasun neurodegeneratibo baten oinarrian dauden mekanismo patogenikoen azterketa *A. nidulans* harizpi itxurako onddoaren biologiaren ikuspuntutik egiteko abiapuntua ezarriko litzateke, eta, bide batez, aipatutako biologia molekularreko tekniken erabileran trebatzea lortuko da.

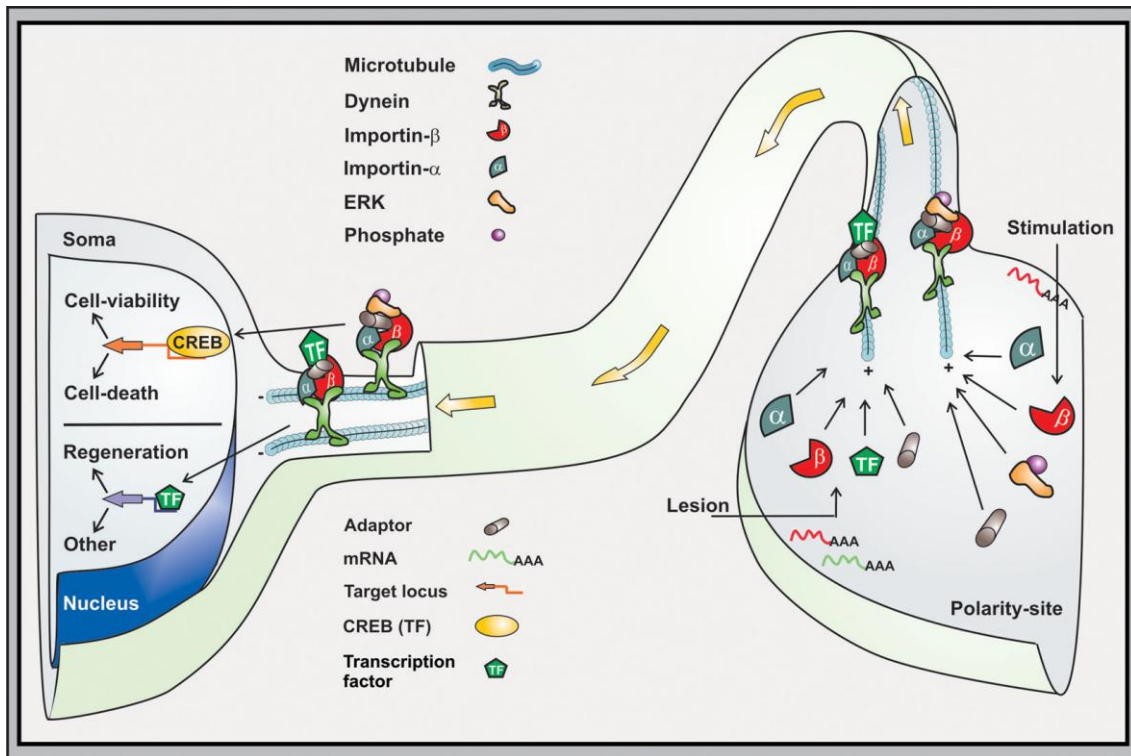
ELA bezalako gaixotasun neurodegeneratibo baten garapenaren azterketarako onddo-zeluletan oinarritutako modelo bat diseinatzea proposatzen da beraz, neuronen eta *A. nidulans* onddoaren zelulen zenbait mekanismo biologikoetan ematen diren antzekotasunak direla eta. Antzekotasun horren arrazoi nagusietako bat da, bai neuronetan, bai *A.*

nidulans onddoaren zeluletan, zelulen polarizazioa gertatzen dela. Polarizazioak adierazten du zelulen antolamendua norabidearen menpekoa dela, zelula horiek norantza jakin batean hazten direla, alegia. Neuronen kasuan, egitura polarizatua nerbio-bulkada garraiatzeko garatutako egituran aurkitzen da: gorputz mononukleatu batetik abiatzen diren axoi eta dendrita izeneko luzapenek polarizazio gune bezala jokatzen dute [7]. *A. nidulans* onddoaren kasuan, lehen esan bezala, osatzen diren hifa egiturak polarizatuak daude [5]. Polarizazioari esker neuronetako axoi eta dendritak, eta hifak, ingurunea kolonizatzen doaz eta inguruneko baldintzei buruz informazioa jasotzen dute. Informazio horri erantzun egoki bat emateko, seinale espezifiko horiek nukleora garraiatu behar dira, baina polarizazioa dela eta, hazte-gunearen eta nuklearen arteko distantzia handia izaten da. Horregatik, bai neuronetan, bai hifetan, hazkuntza edo polarizazio-leku eta nuklearen arteko seinaleen garraiorako mekanismo espezifikoak garatu dira. Mekanismo horien artean kargoen garraio makromolekularra aurkitzen da [8], kargo-molekula horiek direlarik seinale espezifikoak garraiatzen dituztenak (ikus **2. irudia**).

Neuronen eta *A. nidulans*-en hifen arteko desberdintasun funtzionalak direla eta, nukleo eta zitoplasmaren arteko komunikazioa ahalbidetzen duten kargoen kontserbazioa, orokorrean, txikia da. Hala ere, kargo edo seinale jakin horiek nukleora garraiatzeko erabiltzen diren makineria eta mekanismoetan antzekotasunak daudela deskribatu da [5]. Nukleorako garraioa mikrotubuluaren eta dineina motore molekularren menpekoa da (ikus **2. irudia**) bi kasuetan, eta, gainera, kargoak nukleora sartzea ahalbidetzen duten inportatzaile nuklearren homologoak aurkitu dira neuronen eta *A. nidulans*-en hifen artean. Inportatzaile-nuklearrak karioferina izena duen proteina familia bateko kideak dira kasu gehienetan.

ELA bezalako gaixotasun neurodegeneratiboen jatorria kargoen garraio molekularreko mekanismoan gertatzen diren akatsetan dagoela deskribatu izan da [9]. Bereziki interesgarria bilakatu da Importina- α eta Importina- β karioferinek osatutako dimeroa (ikus **2. irudia**), inportatzaile nuklearren artean nagusia eta aztertuen litzateke eta [9]. Era berean, Importina- α eta Importina- β -ren homologoak, KapA eta KapB, paper

garrantzitsua jokaten dute ere *A. nidulans* ondoan kargoen garraioan, horien gabezia hilgarria delarik [10].



2. irudia .Neurona baten polarizazio edo hazkuntza-genetik (eskubian) nukleorako (ezkerrean) kargoen garraio molekularreko mekanismoa irudikatzen duen eskema. Bertan ikus daitezke mikrotubuluak, dineinak eta Importina- α eta Importina- β karioferinek osatutako dimeroa, besteak beste, ERK eta CREB izeneko kargo-molekulak nukleora garraiatzeko. [5]-etik hartuta.

ELA gaixotasunean zentratuz, ELA kasuen ezaugarri patologiko nagusia TDP-43 (*TAR DNA-binding Protein 43*) proteinaren agregatu zitoplasmikoak dira [9]. Proteina hori neuronen nukleoetara inportatzen diren kargoen artean aurkitzen da, eta RNA lotzeko funtzioa dauka. TDP-43 proteina nagusiki nukleoan aurkitzen da. Zitoplasman sintetizatu ondoren, nukleora inportatu egiten da inportatzaile nuklearren bidez, nagusienak Importina- α eta Importina- β direlarik. Lehenengoak TDP-43 zuzenean lotu eta Importina- β -rekin lotzen du. Osatutako konplexua mintz nuklearreko poroetan zehar igaroarazi egiten da, eta behin nukleora iristean, disoziatu egiten da. Nukleoan, TDP-43 proteinak bere funtzioa betetzen du.

ELA gaixotasuna daukaten pertsonen zenbait kasutan ikerketek adierazten dute TDP-43-ren inportazio-mekanismoan arazoak egon litezkeela [11]. Ondorioz, TDP-43 proteina nukleotik kanpo agertu egiten da, eta

zitoplasman pilatu egiten da, agregatuak sortuz. Beraz, TDP-43 proteina zitoplasman pilatzea eta agregatuak sortzea eragiten duten mekanismoak identifikatzea ikerketen zeregin nagusia da momentu honetan. Horrela, ELA-ren aurkako terapiak garatzeko diana terapeutikoak identifikatu ahal izango dira.

Ikerketa berrietarako interesgarria izango litzateke Importina- α eta Importina- β karioferinen TDP-43 proteinaren garraio nukleozitoplasmatikoaren mekanismoan arreta jartzea, horren akatsak eragingo lukeelako TDP-43 proteina zitoplasman pilatzea. Baina zaila da goi mailako organismoetan Importina- α eta Importina- β -ren inguruko ikerketak burutzea. Hori dela eta, ikerketa lanetarako neurona-zelulak erabili beharrean hifak erabiltzea oso interesgarria izan daiteke, kargoen garraio mekanismoan dituzten antzekotasunak baliatuz. Gainera, *A. nidulans* modeloaren genomak DNA konstrukzioen integrazioa egin eta andui errekonbinante haploideak (transformanteak) sortzeko protokoloak estandarrik dira [12,13].

Aurreko informazioa kontutan hartuz, ikerketa hau bi zatitan banatu da. Alde batetik, KapA karioferinaren sekuentziaren ordez *Homo Sapiens*-en Importina- α -ren sekuentzia izango duten *A. nidulans* anduiak sortzeko ahalegina egin da. Bestetik, *Homo Sapiens*-en TDP-43 proteina induzitu daitekeen promotore baten bidez espresatzen duten *A. nidulans* anduiak sortzen saiatu da. Modu honetan, giza Importina- α -ren dinamikaren eta TDP-43 kargoaren kokaleku- eta dinamika-zelularren azterketa *A. nidulans*-en egin ahal izateko oinarriak finkatu ahal izango lirateke, ustez behintzat.

TDP-43-ren kasuan bi andui mota sortzen saiatu da: bata TDP-43 proteina basatia (WT, Wild-Type) sintetizatzen duena, eta bestea nukleora garraiatua izan dadin beharrezkoa den proteina zatia (NLS: nuclear localisation signal) faltan duen TDP-43-ren forma patogeniko bat [9] sintetizatzen duena.

Hasteko, andui errekonbinanteak sortzeko behar diren DNA zatien sintesia eta anplifikazioa egin da PCR teknikaren bidez. Ondoren, fragmentuetatik abiatuz eta fusio-PCR-z, DNA konstrukzioak lortu dira. DNA konstrukzioekin *A. nidulans* andui baten transformazioa egin da. Behin transformanteak hautatuta, konstrukzioen integrazio egokia baieztatu da

genoman Southern blot teknikaren bidez, eta fusio-proteinen (kimera) espresioa ematen den ala ez aztertu da Western blot teknikaren bidez. Sortutako anduien azterketa fenotipiko preliminar bat ere gauzatu da. Froga horiek guztiekin ebaluatu da isolatutako andui transformanteetan *importina- α* -ren eta *tdp-43*-ren geneen espresio egokia gertatzen ari den eta anduiak ikerketarako baliagarriak diren. Azkenik, lortutako emaitzen interpretazioa egin da.

2. MATERIALAK ETA METODOAK

2.1. Erabilitako *A. nidulans* anduia

Froga esperimentaletarako erabili den *A. nidulans* anduia MAD1425 izenekoa izan da. Bere genotipoan *pyroA4* eta *pyrG89* markadoreak ditu, eta, ondorioz, andui hori kultibatzen erabiltzen den hazkuntza-medioak karbono, nitrogeno eta gatz ezorganikoen iturriekin batera, honakoak behar ditu: Piridoxina, *pyroA4* mutazioaren ondorioz sor ezin daitekeen bitamina, eta uridina eta uraziloa, *pyrG89* mutazioaren ondorioz sor ezin ditzakeenak, eta base nitrogenatuen eta, ondorioz, azido nukleikoen sintesirako beharrezkoak direnak. Ikusiko den bezala, *pyrG89* markadore-genetikoa transformanteen selekzioa egiteko ere erabiliko da (ikus 2.3. Transformazioa atala). Karbono iturri bezala glukosa erabiltzen da normalean (%1-2), tarteka sakarosa ere (%3), eta nitrogeno iturri bezala amonio tartratoa (5 mM).

Erabili diren hazkuntza-medioen prestaketarako ikusi **1go eranskina**.

2.2. DNA konstrukzioen sorrera

Geneen insertzioa edo ordezkapena egitea helburu duten ikerketa genetikoetan errekonbinazio homologoa eragiten da maiz [14]. Aurrerago erakutsiko den bezala, *A. nidulans*-en errekonbinazio homologoa eragiteko, laborategian sintetizatutako DNA fragmentu lineala (DNA konstrukzioa) erabiltzen da. DNA konstrukzio horrek gene basatia ordezkatzuz txertatu nahi dugun intereseko genea du. Baina, errekonbinaketa homologoa gerta dadin, gure konstrukzioaren ertzetako sekuentzia ordezkatu nahi den genearen aurreko (promotorea; 5' eremua) eta atzeko (terminadorea; 3' eremua) sekuentzien berdina izan behar du. Hori baita azken finean errekonbinaketa homologoaren esanahia, DNA zati bat ekibalentea litzatekeen beste baten lekuan ordezkatzeari. Sekuentzia horrez gain, gene horretatik sortuko den proteina detektatzeko beharrezkoak izango diren etiketen sekuentziak ere gehitu behar dira konstrukzioan, genearen sekuentziaren segida bezala. Horrela, proteinak sintetizatzean, etiketa bereizgarriekin sintetizatuko dira eta teknika proteomikoen bidez detektatu ahal izango dira. GFP (Green Fluorescent Protein) bezalako proteina fluoreszenteak edo HA_{3x} (HA

akronimoa hemaglutinina izeneko proteinatik dator, haren zati baten hiru errepikapen baitira funtsean) bezalako etiketak erabiltzen dira gehienetan.

GFP etiketa daramaten hiru DNA konstrukzio sortu dira: 1) *kapA locus*-ean *H. sapiens*-en *importina- α* genea daukana, 2) *An11778 locus*-ean *tdp-43* (forma basatia, WT akronimoa erabiliko da) genea daukana, eta 3) *An11778 locus*-ean *tdp-43* (Δ NLS) genea daukana. Bestetik, HA_{3x} etiketa daramaten bi DNA konstrukzio ere sortu dira: 4) *An11778 locus*-ean *tdp-43* (WT) genea daukana, eta 5) *An11778 locus*-ean *tdp-43* (Δ NLS) genea daukana.

Sortutako DNA konstrukzio guztietan *Aspergillus fumigatus* onddoaren *pyrG* genearen kopia bat ere gehitu da, gerora azalduko den transformanteen selekzioa egin ahal izateko (ikus 2.3. Transformazioa atala).

Transformazioak egiteko erabili diren DNA konstrukzioak sortzeko momentuan, bi PCR erreakzio mota egin dira. Lehenik konstrukzioa osatzen duten zati desberdinak anplifikatu dira, bakoitza bere aldetik. Eta bigarrenik, horiek konbinatu egin dira ordena egokian, eta fusio-PCR deritzon erreakzioaren bidez fusionatu eta anplifikatu dira (ikus 3. irudia).

2.2.1. PCR

PCR erreakzioan, DNA polimerasa entzima erabiliz DNA molde jakin batetik intereseko DNA fragmentu baten anplifikazioa egin daiteke. Horretarako, intereseko DNA fragmentuaren hasiera eta bukaerako sekuentziekiko osagarriak diren oligonukleotidoak, *primer* izenekoak, sortu behar dira lehendabizi. *Primer*-en funtzioa bikoitza da: alde batetik, polimerasak DNA kate berriak sintetizateko behar dituen abiapuntuen papera betetzen dute. Bestetik, anplifikatu behar den DNA zatiaren mugak (tamaina) zehazten dizkiote polimerasari.

PCR erreakzioan, *primer*-ak DNA moldearekin anilatu edo hibridatu (lotu) egiten dira eta, orduan, DNA polimerasak intereseko sekuentziarekiko osagarria den DNA kate bat sintetizatzen du. Erreakzioa modu ziklikoan errepikatuz, adibidez 30 aldiz, intereseko DNA fragmentuaren kate-bikoitzeko 130 milioi kopia lor daitezke [15].

Primer-en diseinua egiteko DNA konstrukzioen sekuentzien modelo informatikoak egin dira software informatiko bat erabiliz (Vector NTI

Advance 11.5.4, Invitrogen, 2014). Behin diseinua eginda, enpresa espezializatuek egin dute sintesia. *Primer* guztiak edukitakoan, DNA fragmentuen PCR erreakzioak egin dira. Erabilitako baldintzak **2. eranskinean** daude.

PCR erreakzioen ondoren, lortutako produktuen agarosa gel elektroforesiak egin dira lortutako DNA produktuek esperotako tamaina dutela baieztatzeko. Agarosa gel elektroforesian pisu markadore bat eta produktu bakoitzaren alikuota bat (2-5 μ L ingurukoa) kargatu egiten da agarosa gel batean, eta potentzial elektriko bat ezartzen da gelean zehar. Ondorioz, DNA molekulak gelean zehar mugituko dira, tamainaren arabera. DNA molekulak ikusteko, gela etidio bromurotan tintatzen da, zeina DNA kate bikoitzean txertatu eta argi ultramorepean fluoreszentsia emititzen duen. DNA molekulen bandak pisu markadorearen bandekin konparatuz beraien tamaina ezagutu daiteke.

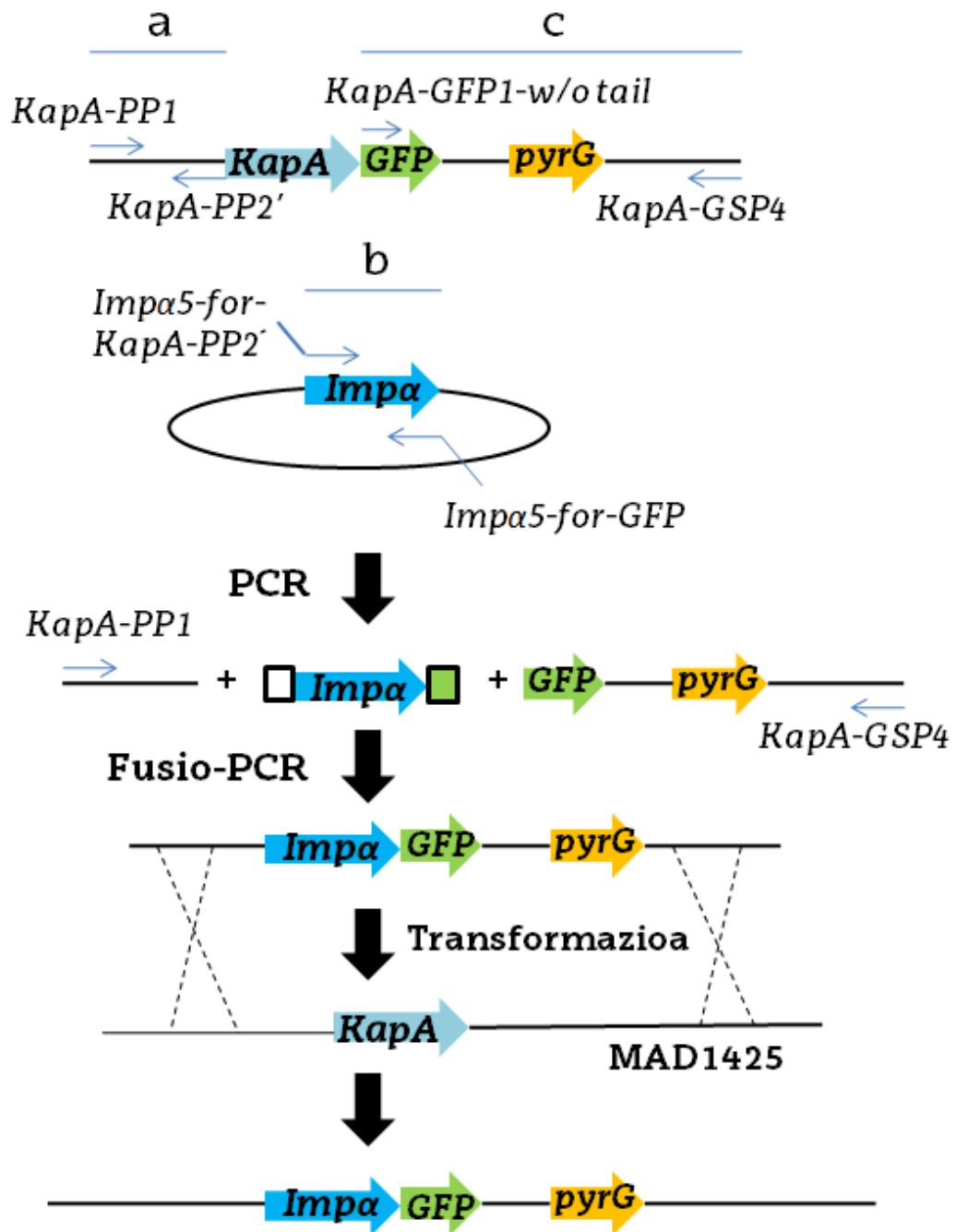
2.2.2. Fusio-PCR

Esan bezala, behin DNA fragmentuak anplifikatuta, hauek ordena egokian konbinatu eta fusionatu behar dira, transformaziorako erabiliko diren konstrukzioak ekoizteko. Fusio-PCR-a egin ahal izateko, fragmentuen anplifikazioan hauetako batzuei isats batzuk gehitu zaizkie bi ertzeetan, ondoko fragmentuekin lotzeko gaitasuna ematen dietena. Isats osagarri horiei esker DNA fragmentuak elkar hibridatu egiten dira isatsetatik eta fragmentu bakar bat bezala anplifikatu egiten dira.

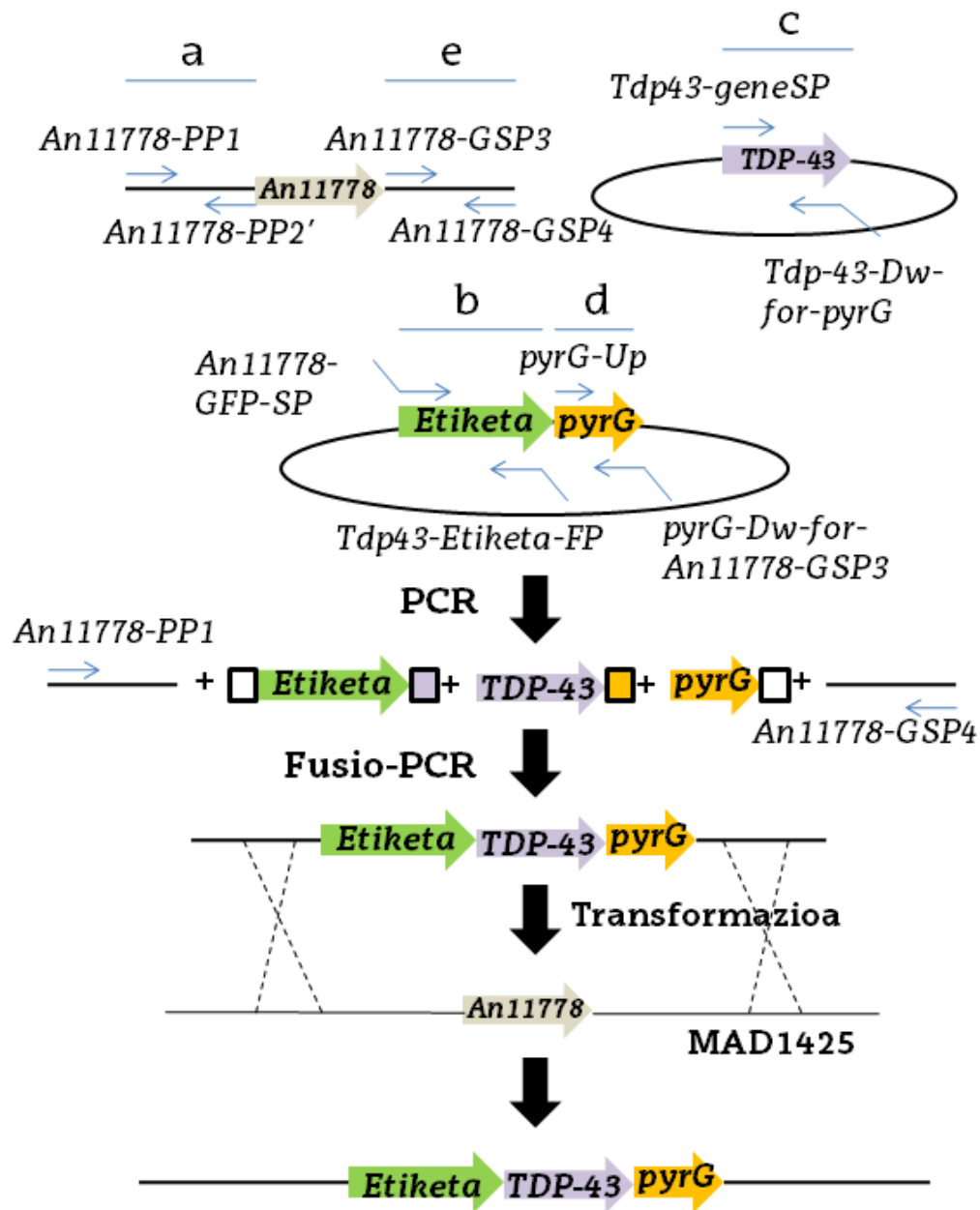
Beraz, behin fragmentu guztiak edukita, eta fragmentuen arteko elkarguneak edukita, DNA konstrukzio osoa fragmentu bat balitz bezala anplifikatu egiten da. Horretarako, DNA konstrukzioaren hasierako eta bukaerako *primer*-ak erabili behar dira; hau da, DNA konstrukzioa mugatzen duten *primer*-ak (**3. irudia**).

Fusio-PCR-an erabilitako baldintzak **2. eranskinean** daude.

A) *KapA* vs *Imp α*



B) *An11778* vs *TDP-43*



3. irudia. DNA konstrukzio sorrerarako eta transformaziorako jarraitutako prozeduren eskema. Lehenik, DNA fragmentuak amplifikatu dira eta isats osagarriak gehitu zaizkie PCR bidez (goian). Ondoren, isatsekin gehitutako sekuentzia osagarriei esker, fragmentuak konbinatu eta konstrukzioa amplifikatu egin da fusio-PCR bidez (erdian). Azkenik, sortutako DNA konstrukzioak *MAD1425* anduiaren zelulak transformatzeko erabili dira, behean adierazten diren antolaketa genomikoak dituzten transformanteak lortuz. Egindako transformazioak bi multzotan bana daitezke: A) *kapA* vs *imp α* transformazioa, non *kapA* locus-ean *importina- α* , *gfp* eta *pyrG* geneak txertatu diren *kapA* genearen ordean. B) *An11778* vs *tdp-43* transformazioa, non *An11778* locus-ean *ha_{3x}* edo *gfp* etiketen DNA sekuentziak, *tdp-43* WT edo Δ NLS geneak eta *pyrG* genea txertatu diren *An11778* genearen ordean. Marra ez jarraiek errenkonbinaketa homologoarenekin prozesua adierazten dute.

2.3. Transformazioa

DNA konstrukzioa sortu ondoren, hurrengo urratsa DNA molekula organismoaren genomak, dagokion lekuan, txertatzea da; errekonbinaketa homologoa eragitea, alegia. *A. nidulans*-en kasuan, onddoa izanik, bere zelulek mintz plasmaticoaz gain pareta zelularra ere badaukate, zeinak transformazioarentzat traba bezala jokatzen duen. Horregatik, zelulak iragazkor bihurtu behar dira, nolabait esateko. Horrela, transformazioa egin baino lehen, onddoaren zelulak tratatu egin behar dira, pareta zelularrik gabeko eta protoplasto izena duten zelulak lortzeko. Protoplasto hauek dira ondoren DNA konstrukzioarekin transformatzen direnak.

Protoplastoak lortzeko, onddoaren esporea asexualak inokulatu egiten dira behar diren elikagai guztiak dituen hazkuntza-medio likidoan eta gau batez hazten uzten dira (15 ordu inguru), 30 °C-tan eta 200 rpm inguruko irabiatze abiadurarekin. Hazitako biomasaren lagin bat pareta zelularren osagaiak degradatzen dituen entzima batekin inkubatzen da, protoplastoak lortuz. Protoplastoak mikroskopioan behatuz determinatzen da noiz amaitu behar den inkubazioa entzimarekin. Pareta zelularrik ez dutenez, protoplastoak oso hauskorak dira eta momentu oro presio osmotiko handiko baldintzatan mantendu behar dira, egitura mantentzeko.

Protoplastoak lortu eta purifikatu (liseriketa nahastearen gainontzeko osagaietatik banatu) ondoren, transformazioa egin liteke, alegia, DNA konstrukzio molekularak zelula horien genomak txertatzea. Aipatu bezala, protoplastoak aldaketa osmotikoekiko oso sentikorak dira, eta ezaugarri hori baliatzen da DNA exogenoa mintz plasmaticoan zehar garraiatzeko. Polietilen glikol (PEG) bidezko transformazioa askotan erabiltzen da, transformatutako protoplastoen etekin handiak lortzen direlako [16]. Protoplastoak denbora labur batez inkubatu egiten dira PEG, bestelako *buffer*-ak, egonkortzaile osmotikoak eta DNA konstrukzioa dituen soluzio batean, eta DNA konstrukzio molekulen sarrera eta errekonbinaketa homologoa ematen dira (ikus **3. irudia**). DNA-ren errekonbinaketa ondoren azalduko diren baldintza selektiboak erabiliz eragiten da.

Errekonbinaketa eragin eta DNA konstrukzioa genomak dagokion lekuan barneratu duten transformanteen hautaketa egiteko selekzio

markadoreak eta hazkuntza-medio selektiboak erabiltzen dira. Ikerketa honetan erabilitako selekzio markadorea *pyrG* genea izan da, eta transformatutako zelulak uridina eta urazilorik ez duen hazkuntza-medio batean hazi dira. Gogoratu behar da transformatzeko erabili den *A. nidulans*-en anduiak (MAD1425) ez duela *pyrG* gene funtzionalik, eta ondorioz ezin duela bere kabuz uridina eta urazilorik ekoiztu. Bestetik, DNA konstrukzioa jaso duten zelulek, honekin batera, *pyrG*-ren kopia funtzional bat jaso dute, eta uridina eta uraziloa sortzeko gaitasuna eskuratu dute. Horrela, transformazio protokoloaren ondoren zelulak uridina eta urazilorik gabeko medio batean haziz gero, transformatutako zelulak baino ez dira haziko. Kasu horretan, uridina eta urazilorik gabeko medioa medio selektiboa dela esaten da.

Medio selektiboan hazteko gai diren zelulek kolonia berriak sortuko dituzte. Kolonia horiek transformante bezala kontsideratzen dira, baina DNA-ren analisia egin arte (Southern blot; ikus hurrengo atalak) ezin da ziurtatu DNA konstrukzioa modu egokian, osorik eta kopia bakarrean txertatu dela genomak. Kasu batzuetan, transformazio prozesuak eragindako aldaketa genetikoa fenotipo bereizgarri bat adierazten du, eta transformanteen azterketa fenotipiko baten bidez DNA konstrukzioaren integrazioari buruzko informazioa atera daiteke (ikus 2.7. Azterketa fenotipikoa atala).

A. nidulans-en protoplastoen lorpenerako eta zelulen transformaziorako jarraitu den prozedura **3. eranskinean** ikus daiteke.

2.4. DNA eta proteinen erauzketa

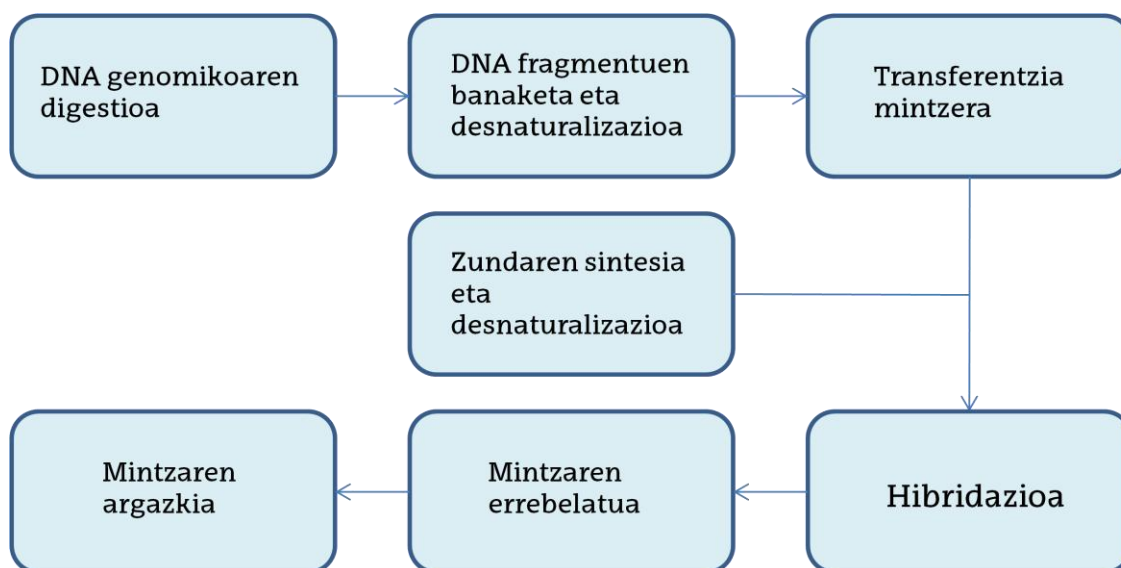
Kolonia transformanteei buruzko informazio fidagarria lortzeko, DNA eta proteinen analisi frogak burutzea beharrezkoa da. Hori dela eta, kolonia transformanteen DNA genomikoa edo proteinak zelularen gainerako osagaietatik banatzeko protokoloak garatu dira. Erauzketarako protokoloen funtsa berdina da bi kasuetan. Lehenengo, transformanteak hazten jartzen dira medio espezifiko batean, zelulen dentsitate egokia lortu arte. Ondoren, zelulak jaso eta lisatu egiten dira, beti ere ingurune egokian, zelulen barneko osagaiak disoluziora pasarazteko. Jarraian, intereseko biomolekula (DNA edo proteinak), zelulako gainerako osagaietatik banatu egiten da, osagai horiek hauspearaziz. DNA edo proteina laginak purifikatu egiten dira hauspeketaz

eta, azkenik, DNA edo proteinen disoluzioak prestatzen dira, kontzentrazio egokian eta denbora luzez degradatu gabe irauteko moduan.

DNA genomikoaren eta proteinen erauzketarako jarraitutako prozedurak **4. eranskinean** daude.

2.5. DNA analisia: Southern blot

Southern blot teknikaren bidez DNA fragmentu edo sekuentzia baten detekzioa egin daiteke. Kasu honetan, transformanteen DNA genomiko osoaren artean DNA konstrukzioaren zatiren baten detekzioa egiteko erabili da. Horrela, DNA konstrukzioa genomatikoa dagokion lekuan, osorik eta kopia bakarrean txertatu dela baieztatu daiteke. Detektatutako fragmentua DNA konstrukzioari dagokiola ziurtatzeko, jatorrizko anduiaren (parentala bezala ezagutzen dena) DNA genomikoa erabiltzen da erreferentzia bezala.



4. irudia. Southern blot-aren prozedura orokorra. Pauso bakoitzari dagozkion oinarri teorikoak testu nagusian azaltzen dira eta erabilitako disoluzioak eta prozedura zehatza 5. eranskinean.

Southern blot-aren oinarria DNA-ren nukleotido osagarrien arteko hibridazioan datza. Sekuentzia osagarria duten kate bakarreko bi DNA molekula elkartzean, hibridatu (lotu) egingo zaizkio elkarri oso modu espezifikoan, gainerako DNA molekulak alde batera utziz. Hori horrela izanda, Southern blot-ean intereseko DNA sekuentziarekiko osagarria den DNA molekula bat erabiltzen da intereseko sekuentziaren detekzioa selektibitate altuarekin egiteko. DNA molekula osagarri horiei zunda deritze, eta

luminiszentzia seinale bereizgarriren bat emitituko duen etiketa batekin markatuak egoten dira. Adibidez, etiketa fluoreszente bat edo luminiszentzia emititzen duen erreakzio bat katalizatzen duen aktibitate entzimatikoa jakin bat.

Prozedura (4. irudia) andui parentala eta transformanteetatik erauzitako DNA genomikoaren laginetatik abiatzen da. Lehenik eta behin, DNA genomikoaren digestio partziala (DNA ebaki) egiten da errestrikzio entzima jakin bat erabiliz. Errestrikzio entzimak gai dira DNA genomiko osoan nukleotido sekuentzia jakin batzuk (errestrikzio lekuak) ezagutzeko eta DNA molekula bertatik ebakitzeko.

Errestrikzio entzimaren aukeraketa egiteko, informatikoki aurrean egiten da nondik ebakiko lukeen errestrikzio entzima jakin batek DNA genomikoa, bereziki DNA konstrukzioaren zatiari dagokionean. Parentalaren DNA genomikoa DNA konstrukzioari dagokion sekuentzia ez duenez, errestrikzio entzima berdina erabiliz fragmentu ezberdinak sortuko dira andui parentalari eta andui transformanteei dagozkien laginetan. Zundarekin lotuko den fragmentuaren tamaina bat izango da parentalarentzat, eta beste bat transformanteentzat. Kalkulatu egiten da fragmentu horien tamainak zeintzuk izango diren, eta tamainen arteko diferentzia ahalik eta nabarmenena izateko errestrikzio entzima egokiena aukeratzen da.

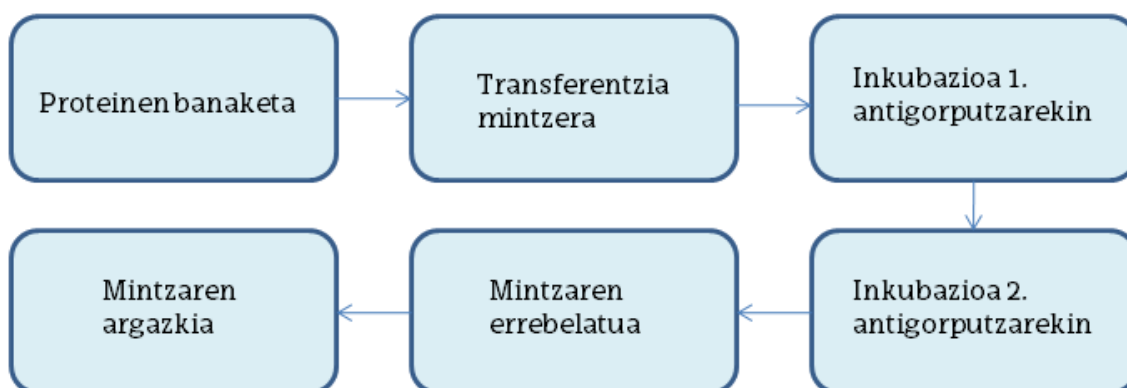
Behin errestrikzioa burututa, DNA genomikoaren lagin bakoitzean sortutako fragmentuak banatu egiten dira tamainaren arabera, agarosa gel elektroforesiaren bitartez (lagin bakoitza gelean kale edo kokapen espezifikoa izango du; alegia, banaketa hau paraleloan egiten da). Elektroforesiaren ondoren, DNA gelean ondo finkatzen da eta, jarraian, desnaturalizatu egiten da (bate bikoitzak banatu kate bakarrak lortzeko), aurrerago egin beharko den zundaren hibridazioa baimendu ahal izateko. Gelean dagoen DNA guztia nitrozelulosazko mintz batera transferitzen da eta bertan finkatu egiten da, berriro ere, UV erradiazioa erabiliz. Ondoren, aurretik prestatutako zundarekin elkartzeko, eta mintzeko DNA zundarekin hibridatzeko pausoak jarraitzen dira. Hibridazioa emateko, zunda ere desnaturalizatu egiten da, genomen laginetako bere DNA osagarriarekin hibridatu ahal izateko. Hibridazioa eman ostean, zundaren luminiszentzia erreakzioa eragiten da eta,

ondoren, mintza errebelatu egiten da, luminiszentzia duten DNA zatiak detektatuz lagin bakoitzean.

Southern blot-a egiteko erabilitako baldintzak **5. eranskinean** daude.

2.6. Proteinen analisia: Western blot

Western blot-a proteinen detekzioarako erabiltzen den tekniketako bat da. Proteina jakin baten detekzioa modu selektiboan egiteko antigorputzak erabiltzen dira normalean, antigenoekin oso modu espezifikoa lotzen dira eta. Intereseko proteinen detekzioa egiteko, normalean proteina horiei gehitutako etiketak erabiltzen dira antigeno moduan. Etiketekin modu espezifikoa lotuko den antigorputz primarioa erabiltzen da lehenik. Ondoren, antigorputz primarioekiko modu espezifikoa lotuko diren eta seinalea emango duen etiketa daramaten antigorputz sekundarioak gehitzen dira. Aurretik aipatu bezala, lan honetan bi etiketa erabili dira: GFP edo HA_{3x}.



5. irudia. Western blot-aren prozedura orokorra. Pauso bakoitzari dagozkion oinarri teorikoak testu nagusian azaltzen dira, eta erabilitako disoluzioak eta prozedura zehatza 6. eranskinean.

Prozedura orokorra (5. irudia) transformanteetatik eta andui parentalatik erauzitako proteinen laginetatik abiatzen da. Hasteko, proteinak tamainaren arabera banatu egiten dira elektroforesi bidez, akrilamidaz egindako polimero gel batean. Ondoren, immunodetekzioa egin ahal izateko, proteinak PVDF-z (*Polyvinylidene Difluoride*) eginda dagoen mintz batera transferitu egiten dira. Bertan, proteinek akrilamidazko gelean zuten posizio bera mantentzen dute, tamainaren arabera, alegia. Behin proteinak mintzera finkatu direla, mintza lehenengo antigorputzarekin inkubatu egiten da. Lotu ez diren antigorputz molekula proteinen ingurutik kentzeko

beharrezko garbiketak egiten dira, eta mintza bigarren antigorputzarekin inkubatu egiten da. Azkeneko garbiketak egiten dira eta, azkenik, erreakzio luminiszentea eragiten da. Kasu honetan, bigarren antigorputzak erreakzio entzimatico bat katalizatzeko gaitasuna du, erreakzio horren produktuak argia emititzen duelarik. Beraz, ez da berez guk aztertu nahi dugun proteina detektatzen, baina, antigorputz sekundarioa guk detektatu nahi dugun proteinaren etiketarekin (GFP edo HA_{3x}) lotuta dagoenez, zeharka berau detektatzen dugu aztertutako lagin bakoitzean. Mintzaren errebelazioa egiten da eta argazkia ateratzen da. Intereseko proteinari dagokion DNA sekuentzia ezaguna denez, aldeztatik kalkula daiteke proteinaren banda espezifikoak zein tamainatan agertuko beharko lukeen. Banda aurrean bezala agertzen bada, orduan genomaren txertatutako genearen espresioa ematen ari dela eta intereseko proteinaren sintesia gertatzen ari dela baieztatu daiteke.

Western blot-a egiteko erabiliko baldintzak **6. eranskinean** daude.

2.7. Azterketa fenotipikoa

DNA eta proteinen analisia egin ondoren ondorioztatu daiteke ea DNA konstrukzioaren integrazioa modu egokian eman den, eta, hala izatekotan, ea integratutako genearen espresioa eta itzulpena ematen ari den. Emaitzak positiboak izatekotan, baieztatu ahal izango da intereseko andui transformanteak sortu direla. Froga horiekiko informazio osagarria lortzeko, andui transformanteen itxuraren azterketa egiten da, azterketa fenotipikoa deritzona.

Andui transformanteetan aldaketa genotipiko bat eragin da, eta horrek maiz fenotipoan edo, beste modu batean esanda, organismo horren hazkuntza, ugalketa edo beste prozesuengan du islada. Horiek detektatzen saiatzen da azterketa hauetan, beti ere andui parentala eta kontrolerako beste andui batzuk erabilia. Lan honetan andui parentala eta andui transformanteen esporak inokulatu egin dira hainbat hazkuntza-mediotan, eta horien hazkuntza eta garapena aztertu, erregistratu eta konparatu egin da denboran zehar. Normalean, hazitako kolonien arteko desberdintasun fenotipikoak ikusgai izaten dira esporak inokulatu eta 48/72 orduz.

3. EMAITZAK

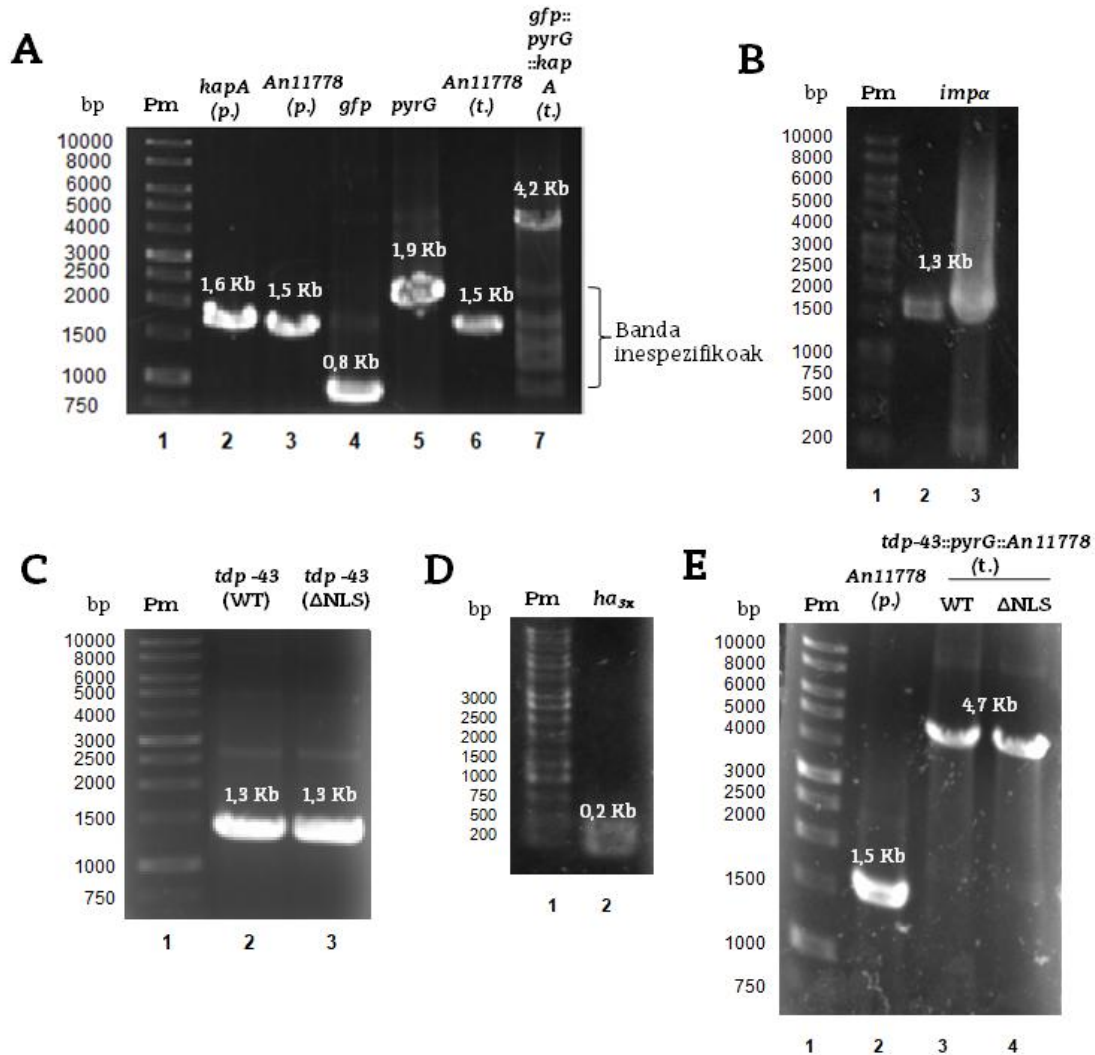
3.1. PCR erreakzioen produktuak

PCR erreakzioak egin ondoren, produktuen alikuota bat hartu (normalean 2-5 μ L inguru) eta agarosa gel elektroforesi bat egin zaie. Gelak errebelatu eta argazkiak atera dira fragmentuen bandak atera beharko luketen tamainan agertzen diren baieztatzeko. Modu honetan baieztatu daiteke PCR erreakzioa ongi eman dela eta PCR produktua hurrengo esperimientuetarako erabili daitekeela. Elektroforesiaren argazkitik PCR produktuaren kontzentrazioa eta purutasuna ere ikusi daitezke.

Honako DNA konstrukzioak ekoizteko fragmentuak anplifikatu dira PCR bidez (**6. irudia**):

- *imp α ::gfp::pyrG* konstrukzioa (7.4 Kb). Horretarako hiru fragmentu anplifikatu eta ondoren fusionatu dira (**3. irudia**). **a)** *kapA* genearen promotorea, 1,6 Kb-ko tamaina daukana; **b)** *H. sapiens*-en *importina- α* genea, cDNA libreria batetik anplifikatua, 1,3 Kb-ko tamaina duena; eta **c)** *gfp::pyrG* eta *kapA* genearen terminadorea fragmentua, 4,2 Kb-ko tamaina daukana (azken hau aurretik sortua zegoen *kapA::gfp::pyrG* andui baten DNA genomikotik anplifikatu da).
- *gfp::tdp-43::pyrG* eta *ha_{3x}::tdp-43::pyrG* konstrukzioak (7.0 eta 6.3 Kb hurrenez hurren). Konstrukzio hori *An11778 locus*-ean integratu nahi zen. Importina- α proteinarekin gertatzen den ez bezala, TDP-43 proteina etiketatzeak GFP edo HA_{3x} derrigorrean bere hasieran (N-terminal ertza) jartzea eskatzen du, bukaeran jartzeak (C-terminal ertza) proteinaren funtzioa inhibitu egiten baitu [9,17]. Ondorioz, bost fragmento anplifikatu dira PCR bidez (**3. irudia**). **a)** *An11778* genearen promotorea, 1,5 Kb-ko tamaina daukana; **b)** *gfp* edo *ha_{3x}*-i dagozkion fragmentuak, 0,8 eta 0,2 Kb-ko tamaina dutenak, hurrenez hurren. **c)** *tdp-43* genea, bere WT edo Δ NLS bertsioetan, plasmido egokietatik anplifikatu direnak; **d)** *pyrG* fragmentua, 1,9 Kb-ko tamaina daukana; eta **e)** *An11778* genearen terminadorea, 1,5 Kb-ko tamaina daukana.

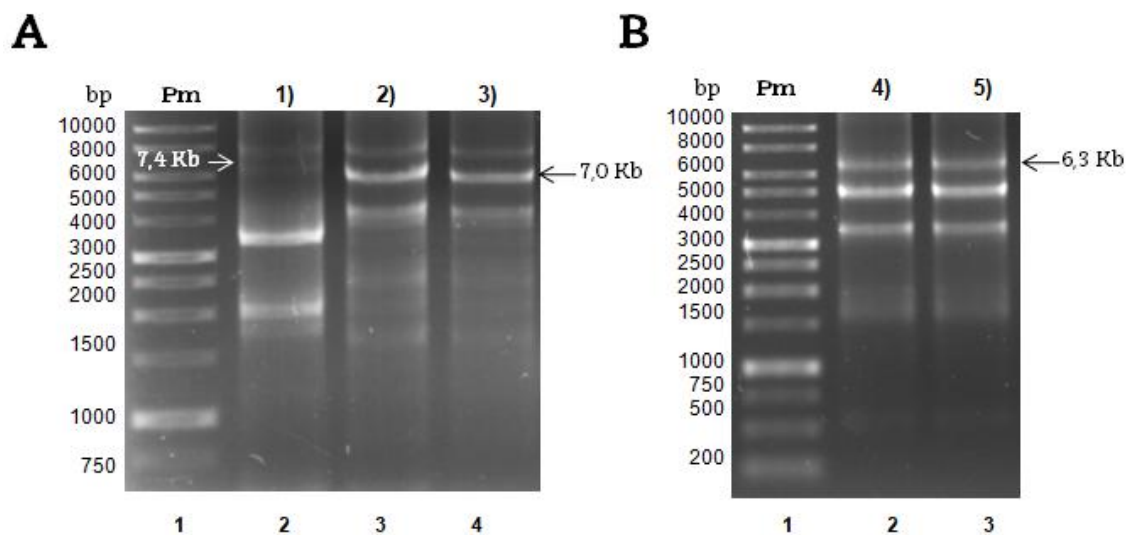
Alternatiboki, *tdp-43::pyrG::An11778* genearen terminadorea duten konstrukzioak ere anplifikatu dira, 4,7 Kb-ko tamaina daukatenak, aurretik sortutako *gfp::tdp-43::pyrG* anduien DNA genomikotik abiatuta. Zati horiek, gerora, *An11778*-ren promotorearekin eta *ha_{3x}*-ekin fusionatu dira.



6. irudia. Argazkien ezker aldean pisu markadorearen banden tamaina adierazten da, base-pare unitatetan. Argazkien azpian kaleen zenbakiak adierazten dira, eta gainean kale bakoitzean dagoen lagina zein den. A, B eta C argazkietan *impα::gfp::pyrG* eta *gfp::tdp-43::pyrG* konstrukzioak egiteko fragmentuen PCR erreakzioko produktuak ageri dira. D eta E argazkietan *ha_{3x}::tdp-43::pyrG* konstrukzioa egiteko falta diren fragmentuen PCR erreakzioko produktuak ageri dira. E argazkiaren 2. kalean agortutako eta berriro anplifikatutako fragmentu baten banda ikusten da.

Argazkietan ikusi daitekeen moduan, lortutako produktuen tamainak fragmentuentzat esperotako tamainekin bat egiten dute. Horrek adierazten

du fragmentuen sintesia egokia izan dela. **A)** argazkian, 7. kalean, 1.c fragmentuaren bandarekin batera banda inespezifiko batzuk ageri dira. PCR erreakzioan zehar anplifikatutako beste sekuentzia batzuetako DNA molekulak dira. Dena den, intereseko DNA fragmentuarekin konparatuta, kontzentrazio txikiagoan daude eta horregatik arazorik suposatzen ez dutela onartu da. Behin anplifikatuak, fragmentuak modu egokian konbinatu egin dira fusio-PCR erreakzioetan, transformaziorako DNA konstrukzioak ekoizteko (**7. irudia**).



7. irudia. Argazkien ezker aldean pisu markadorearen banden tamaina adierazten da, base-pare unitateetan. Argazkien azpian kaleen zenbakiak adierazten dira, eta argazkien gainean kale bakoitzean zein konstrukzio aztertzen den. **A)** 1) *impα::gfp::pyrG* konstrukzioaren banda, 2) *gfp::tdp-43(WT)::pyrG* konstrukzioaren banda, eta 3) *gfp::tdp-43(ΔNLS)::pyrG* konstrukzioaren banda. **B)** 4) *ha_{3x}::tdp-43(WT)::pyrG* eta 5) *ha_{3x}::tdp-43(ΔNLS)::pyrG* konstrukzioaren bandak.

Fusio-PCR produktuen irudiak aztertzeke konplexuagoak dira. DNA fragmentuak elkarrekin lotu eta produktu inespezifiko ugari ematen baitute, horietako bat (geziekin markatutakoak) intereseko DNA konstrukzioa delarik. Hala ere, irudi guztietan intereseko DNA konstrukzioen bandak ikusi daitezke. Konstrukzioak ontzat eman eta transformaziorako erabili dira.

3.2. Transformanteen selekzioa

DNA konstrukzioekin transformazioak egin ondoren, kolonia transformante potentzialen hautaketa egin da. Transformazio bakoitzeko

ustezko kolonia transformante kopuru mugatu bat aukeratu eta zenbakitu egin da, ondoren DNA eta proteinen analisiak egiteko. Hauek izan dira hautatutako transformanteak:

- Imp α ::GFP transformanteak: T1, T3, T4, T6 eta T7.
- GFP::TDP-43 (WT) transformanteak: T2, T4 eta T5.
- GFP::TDP-43 (Δ NLS) transformanteak: T1, T2 eta T3.
- HA::TDP-43 (WT) transformanteak: T10, T16, T21, T39 eta T45.
- HA::TDP-43 (Δ NLS) transformanteak: T25, T28, T49, T52 eta T58.

3.3. DNA analisia: DNA erauzketa eta Southern blot

DNA konstrukzioen integrazioa genomak modu egokian eman den edo ez determinatzeko transformante bakoitzaren DNA genomikoa erauzi da (**4. eranskina**, 1go irudia) eta Southern blot bidez aztertu da.

Southern blot-ean konparatu egiten da aztertu nahi den eremu genomikoaren konfigurazioa andui parentalean eta andui transformanteetan. Errestrikzio entzima bera erabiliz lagin parental eta errekonbinanteetan, DNA genomikoaren errestrikzioa (mozketa) leku ezberdinetatik emango da batean eta besteetan, eta ondorioz, zundarekin lotuko den fragmentuaren tamainak desberdinak izango dira ere. Ikerketa honetan ondorengo errestrikzio entzimak erabili dira:

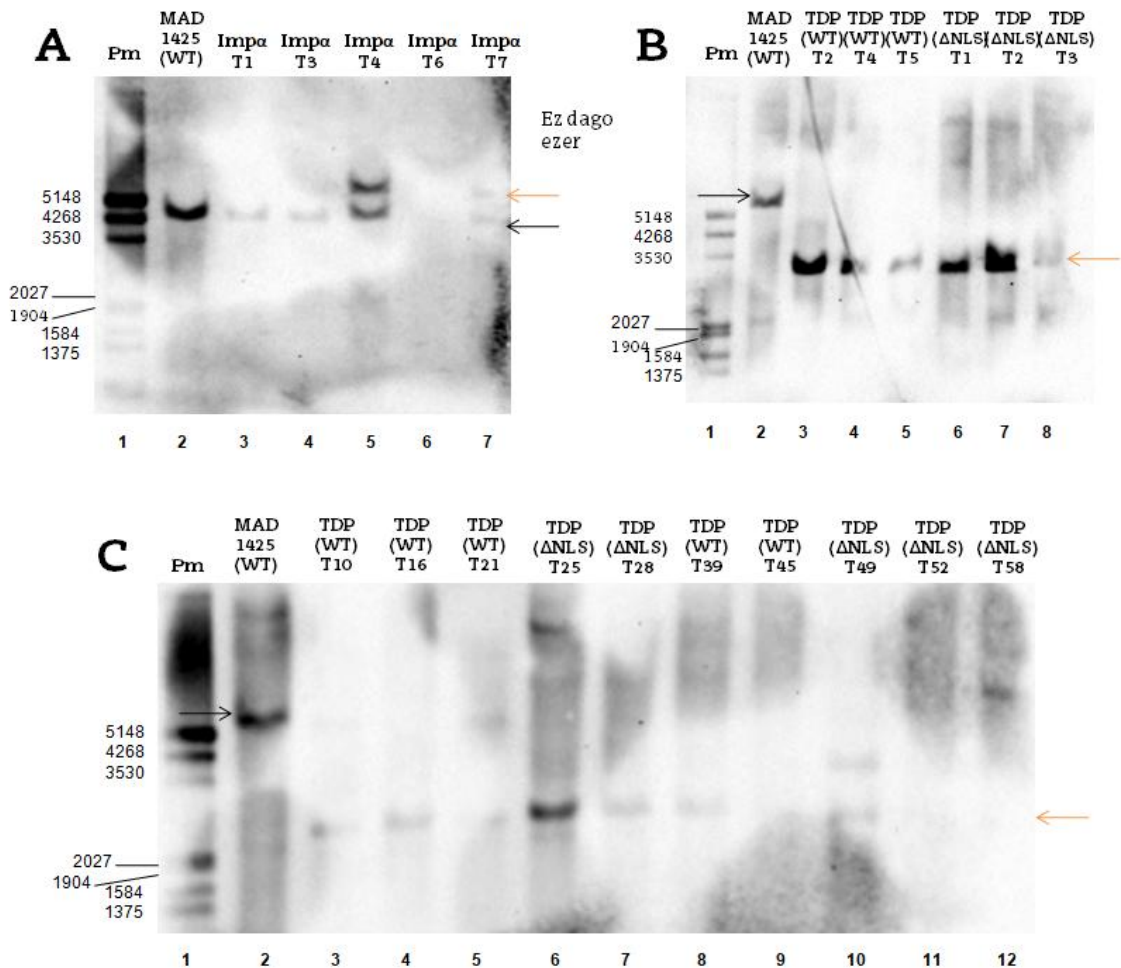
- KapA vs Imp α transformazioaren kasuan Sal I errestrikzio entzima aukeratu da (**8A. irudia**). Aukeratu den zunda KapA PP1-PP2 fragmentua izan da, hau da, *kapA* genearen promotoreari dagokion fragmentua. Baldintza horietan, detektatu beharreko fragmentuen tamainak dira: 4,2 Kb parentalarentzat, eta 5,3 Kb transformanteentzat.
- An11778 vs GFP::TDP-43 transformazioaren kasuan EcoRI errestrikzio entzima aukeratu da (**8B irudia**). Aukeratu den zunda An11778 PP1-PP2 izan da, hau da, *An11778* genearen promotoreari dagokion DNA fragmentua. Baldintza horietan, detektatu beharreko fragmentuen tamainak dira: 5,2 Kb parentalarentzat, eta 3,1 Kb transformanteentzat.

- An11778 vs HA::TDP-43 transformazioaren kasuan aurreko baldintza berdinak aukeratu dira (**8C. irudia**). Kasu honetan, detektatu beharreko fragmentuen tamainak dira: 5,2 Kb parentalarentzat, eta 2,3 Kb transformanteentzat.

Lortutako emaitzak **8. irudian** agertzen dira. A argazkiaren kasuan, parentalaren banda 4,2 Kb inguruan azaltzen da eta ontzat hartu da. Transformanteei dagokionez, T6-ren kasuan ez da bandarik detektatu DNA genomikoaren erauzketan ez delako DNA lortu (ikus **4. eranskina**, 1go irudia). Gainerako kasuan, guztietan parentalaren bandaren altuera berean banda bat ageri da. Banda horretaz aparte, T4 eta T7 transformanteen kasuan beste banda bat ageri da, 5,3 Kb-ko fragmentuak (transformanteena) seinalea eman beharko lukeen tokian.

Parentalaren banda bakarrik agertzen duten transformanteen kasuan argi dago DNA konstrukzioaren integrazioa ez dela ongi eman, eta ez direla bilatutako konfigurazio genomikoa duten transformanteak lortu. T4 eta T7 transformanteen kasuan bi bandak (andui parentalari eta andui transformanteei legokiena) batera detektatu izanak iradokitzen du ustezko T4 eta T7 anduiak heterokariotikoak direla eta bi poblazio genetikoak, *kapA*-duna eta *importina- α* -dunak, dituztela. Emaitza hauek, eta gerora erakutsiko diren analisi fenotipikoek, iradokitzen dute *A. nidulans kapA* genea *H. sapiens*-en *importina- α* genearekin ordezkatzeari ez dela bideragarria, eta ondorioz, beste estrategiaren bat erabili beharko litzatekeela burutu nahi den azterketa aurrera eraman ahal izateko (ikus 3.6. Eztabaida).

1.1. atalean aipatu den bezala, anastomosisia gertatu egiten da bi hifa espazioan elkartu egiten direnean, eta anastomosiaren ondorioz hifen arteko interkonexioa ematen da. Bi hifak genetikoki berdinak direnean (kolonia berekoak direlako edo genetikoki berdina den beste kolonia batekoa delako), mizelioa homokariotikoa izaten jarraituko du; hau da, nukleo mota bakarra izango dute bere zelulek. Aldiz, genetikoki ezberdinak diren bi hifen arteko anastomosiaren ondorioz, bi dotazio genetiko desberdin elkartu daitezke zelula berdinean. Horrek mizelio heterokariotikoaren sorrera ekarri dezake [18].



8.irudia. Erauzitako DNA genomiko laginak Southern blot bidez aztertzean lortutako emaitzak. Argazkien ezkerrean pisu markadorearen banden tamaina adierazten da, base-pare unitateetan. Argazkien azpian kaleen zenbakiak adierazten dira, eta argazkien gainean kale bakoitzean zein transformanteren DNA genomikoa aztertu den. Gezi beltzez markatuta daude andui parentalariko dagozkion bandak eta gezi laranja markatuta andui transformanteei dagozkienak. A) *Impα::GFP* transformanteak parentalarikiko konparatuta. B) *GFP::TDP-43 (WT)* eta *GFP::TDP-43 (ΔNLS)* transformanteak parentalarikiko konparatuta. C) *HA::TDP-43 (WT)* eta *HA::TDP-43 (ΔNLS)* transformanteak parentalarikiko konparatuta.

B eta C argazkien kasuan, bai parentalariko bandak eta baita transformante gehienena ere dagozkien lekuan ikusten dira (5.2 Kb parentalariko kasuan, eta 3.1 Kb edo 2.3 Kb *GFP* edo *HA_{3x}*-dun transformanteen kasuan, B eta C paneletan, hurrenez hurren). Transformanteen bandak espero zen tamainan detektatu direnez, DNA konstrukzio hauek, kasu gehienetan, genomatik dagozkien lekuan txertatu direla ondorioztatu da. Banda nagusiez gain, beste banda inespezifiko batzuk ere ageri dira, andui parentalariko ere azaltzen direnak. Horregatik, arbuiatu egin dira.

3.4. Proteinen analisisia: Western blot

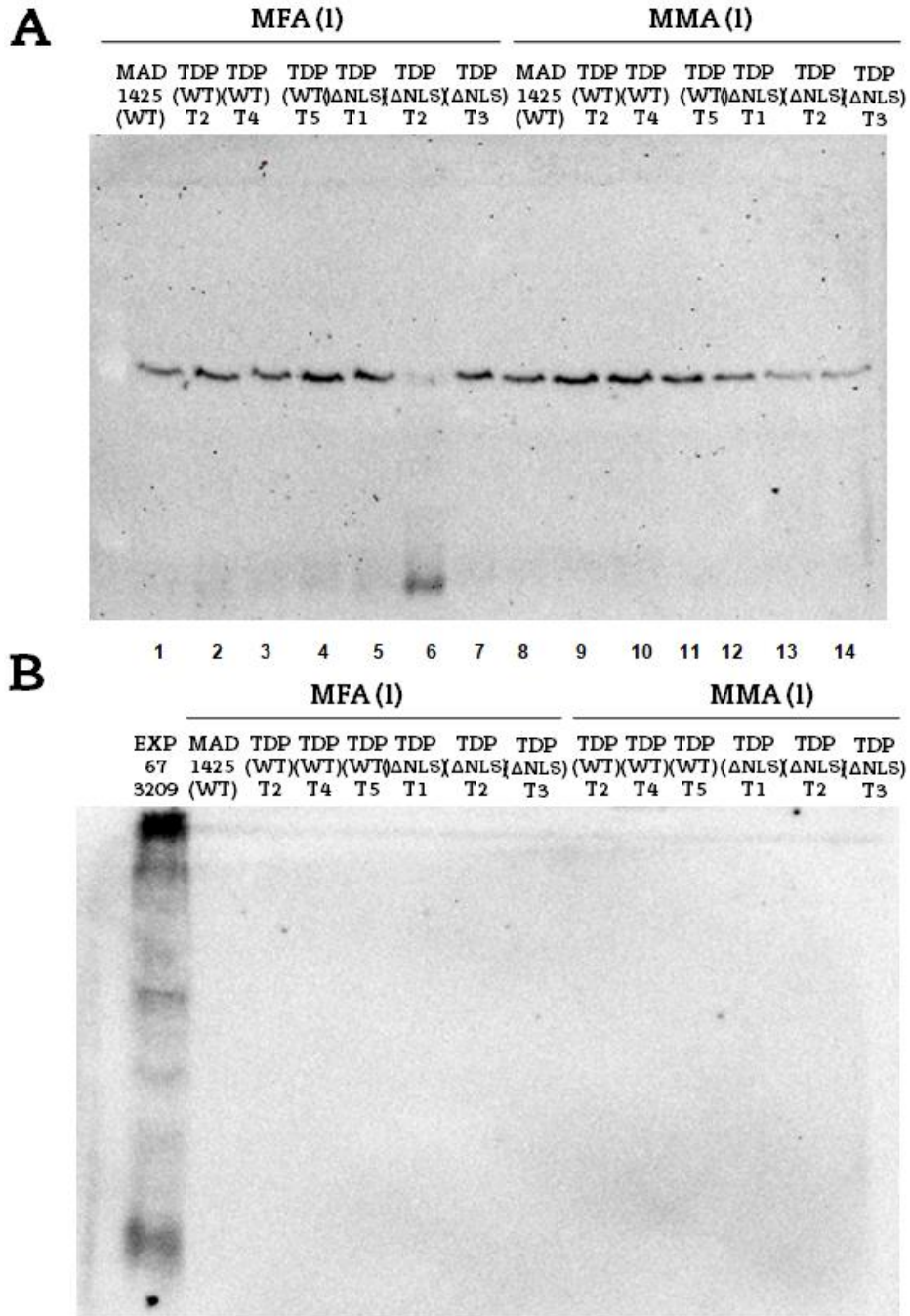
GFP::TDP-43 (WT/ Δ NLS) transformanteen proteinen erauzketa egin da, eta proteina lagin horiekin Western blot esperimentuak egin dira. GFP::TDP-43 kimeraren detekzioa egiteko, bai anti-GFP, bai anti-TDP-43 antigorputzak erabili dira lehenengo antigorputz bezala. Proteinak erauzteko anduien kultiborako hazkuntza-medio ezberdinak ere probatu dira: MFA (I) eta MMA (I). Printzipioz, MFA medioak proteinen sintesia areagotzen du, sakarosa izanda, *An11778 locus*-ean dagoen genearen (TDP-43 transformanteen kasuan) espresioa eragiten duelako [19] (ikus 3.5. Transformanteen azterketa fenotipikoa atala). Lortutako emaitzak **9. irudian** ageri dira.

Lehenengo antigorputz bezala anti-TDP-43 antigorputza erabiltzean banda baten seinalea detektatu da lagin guztietan (**9A. irudia**). Dena den, ikusten den moduan, andui parentalaren kasuan ere banda berdina agertzen da, eta bertan ez da TDP-43 proteinaren sintesirako konstrukzioaren integrazioa eman. Beraz, banda horrek adierazten digu anti-TDP-43 antigorputzak proteina inespezifiko bat lotzen duela, eta, ondorioz, ezin daiteke esan andui transformanteen kasuan detektatutako proteina GFP::TDP-43 kimera denik.

Anti-GFP antigorputza erabiltzean, kontrol positibo moduan anti-GFP antigorputzarekin detektatzen diren proteinak dituen proteina lagin bat gehitu da (EXP67 3209 anduiaren proteina lagina, Martzel Antsoegi Ursola doktoregaiak utzitakoa). Ikus daitekeen moduan (**9B. irudia**), kasu honetan, kontrol positiboaren bandak baino ez dira detektatu. Horrek adierazten du gainerako laginetan, printzipioz, GFP::TDP-43 kimeraren sintesia ez dela gertatzen. Hau aurreko anti-TDP-43 erabiltzean izandako emaitzarekin bat dator.

Emaitza horiek kontutan izanda, ondorioztatu da, dagokien DNA konstrukzioak genomatik integratu arren, GFP::TDP-43 kimeraren sintesia ez dela gertatzen. Horren arrazoiak ugariak izan daitezke. Alde batetik, kontutan hartu behar da proteinari etiketa bat jartzen ari zaiola. Azken finean, proteinak etiketatzerakoan haien tamaina handitzen da, eta horrek arazo bat suposa dezake proteina horren sintesi edo egonkortasunerako. Bestetik, gerta daiteke GFP::TDP-43 kimerak eragin kaltegarriak izatea *A. nidulans*-entzat, eta,

ondorioz, zelulek nolabait kimeraren sintesia inhibitzea. GFP-ri lotutako arazo bat gertatzen ari den ala ez jakiteko, HA_{3x} etiketadun (askoz ere txikiagoa) HA_{3x}::TDP-43 kimerak detektatzen saiatu beharko litzateke. Aurreko atalean erakutsi bezala, andui horiek sortuak daude baina, idazlana aurkezteko epean ez da aukerarik eduki beraien immunodetekzio bidezko analisia egiteko.



9. irudia. Western blot frogetan lortutako emaitzak. Kale bakoitzaren gainean adierazten da zein anduiren proteina lagina aztertu den bertan. A) lehenengo antigorputz bezala anti-TDP-43 erabiltzean lortutako argazkia. B) lehenengo antigorputz bezala anti-GFP erabiltzean lortutako argazkia.

3.5. Transformanteen azterketa fenotipikoa

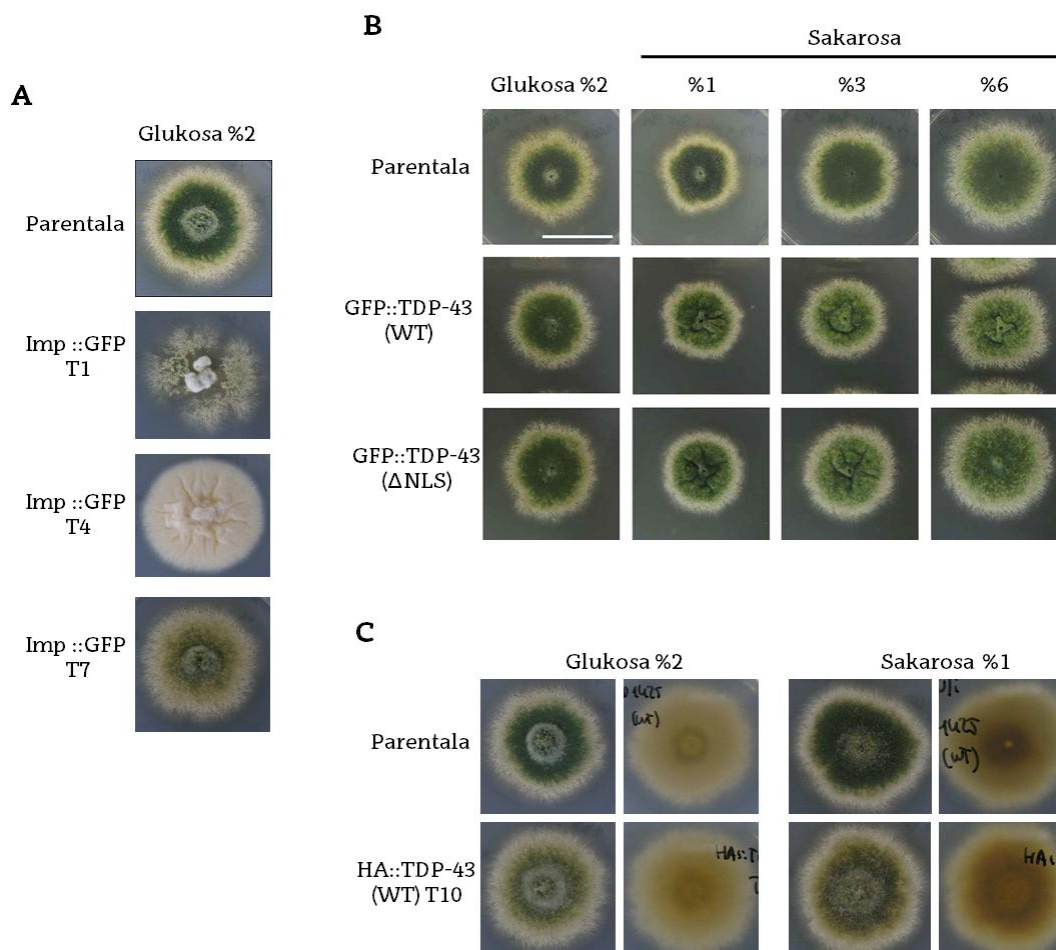
Azterketa fenotipikoa egiteko transformante adierazgarrienak beharrezko elikagaiak dituzten hazkuntza-medio desberdinetan inokulatu eta kultibatu dira. Fenotipoa (hazkuntza eta garapena) inokulazioa egin eta 72 ordotara aztertu da. Erreferentzia moduan andui parentala erabili da.

Aurretik ezaguna zen *A. nidulans*-en *kapA* genearen delezioa letala dela [20], eta, beraz, transformanteak lortzeak suposatu beharko luke, printzipioz, giza homologoen espresioa eta sintesia egiten duten anduiak bideragarriak direla. Ostera, Southern blot-ak dio lortutako transformanteetan DNA konstrukzioaren integrazioa ez dela zuzen eman, eta fenotipoaren (glukosadun medio batean hazi dira) azterketak honen alde egiten du.

Inokulaziotik 72 ordotara ateratako argazkiak **10. irudian** erakusten dira. Importina- α transformanteek hiru fenotipo desberdin erakutsi dituzte, horietako bat nagusitzen delarik. Fenotipo nagusian mizelioaren hazkuntza irregularra da eta ongi garatzeko arazoak ditu. Fenotipo hori heterokarioien fenotipo bereizgarria da, eta T1 transformantean ikusi daiteke (**10A. irudia**). Beste bi fenotipoetan mizelioaren hazkuntza normala da, baina arazoak dituzte konidiatzeko. Izan ere, ez dute esporen bereizgarri den kolore berdea garatu edo guztiz garatu. T4 transformantearen kasuan zuzenean ez da esporarik agertu, eta T7-ren kasuan konidiazioa andui parentalean baino urriagoa dela ikus daiteke (kuantifikatu ez den arren).

Tdp-43 genearen kasuan, kontutan hartu behar da, lehenik, ez dela ezagutzen *H. sapiens*-en *tdp-43* genearen ezaugarriak dituen generik *A. nidulans*-en. Ondorioz, errekonbinaketa diseinatzeko orduan, konstrukzioa *An11778* genearen *locus*-ean integratzea erabaki da. *An11778* genearen espresioa induzitu egiten da medioan sakarosa dagoenean, eta erreprimitu egiten da sakarosarik ez dagoenean [19]. Horrela, *tdp-43* genea *An11778* genearen promotorearekin elkartzean, genearen espresioa induzitu daiteke medioan sakarosa gehituz. Beraz, *An11778* genearen delezioak fenotiporik ematen ez duen arren, andui transformanteak sakarosa duen medioan haztean fenotipo bereizgarririk azalduz gero, TDP-43 proteinaren sintesiarekin erlazionatu ahal izango litzateke. TDP-43-ren transformanteak, horrela, karbono iturri bezala glukosa (%2; medio ez induktorea) edo sakarosa,

%1-6 bitarteko kontzentrazioetan (medio induktorea), dituzten medioetan hazi dira.



10.irudia. Transformanteen karakterizazio fenotipikoa hazkuntza medio estandar solidoan. Irudiak 37 °Ctan egindako 72 ordutako kultiboaren ondoren egin dira. A) Importina- α transformanteak. B) GFP::TDP-43 transformanteak (WT eta Δ NLS mutanteak). C) HA_{3x}::TDP-43 transformanteak. Eskala barra = 1 cm.

GFP::TDP-43 transformanteek ez dute fenotipo bereizgarrikerik erakutsi andui parentalarekin konparatzerakoan (10B. irudia). Sakarosa duen medioa erabili arren, parentalaren fenotipo berdina adierazi dute. Emaiza hauek Western blot esperimentuan lortutako emaitzak babesten dituzte, alegia, kimera ez dela espresatzen.

Azkenik, HA_{3x}::TDP-43 transformanteen artean fenotipo adierazgarri bat agertu da (10C. irudia), zeinetan koloniaren hazkuntza parentalaren antzeko moduan ematen den, baina konidiazioa mugatuta agertzen den. Horregatik, esporen kolore berde karakteristikoa ikusi beharrenean kolore berde-horixka ikusten da. Desberdintasuna ere antzeman daiteke mizelioaren

azpiko aldea behatzerakoan, batez ere sakarosa duen medioan (**10C irudia**, eskuineko argazkiak).

4. EZTABAIDA

Lortutako emaitzen arabera, Importina- α -ren transformanteak ez dira bilatzen ziren transformanteak. Batzuen kasuan (T1 eta T3), DNA konstrukzioaren integrazioa ez delako ongi eman, eta besteen kasuan (T4 eta T7), transformanteek dagokien bandarekin batera parentalaren banda ere ematen dutelako. Azterketa fenotipikoa kontutan hartuz, argi dago *kapA* locus-ean errekonbinazio homologoa egitean lortzen diren transformante gehienak ez direla bideragarriak. Parentalarekin konparatuta, transformanteek arazoak dituzte garatzeko, eta, kasurik hoberenean, parentalaren locus-a mantendu behar izan dute modu egokian hazi ahal izateko.

T4 eta T7 transformanteak heterokarioiak (edo diploideak) badira, hauek behintzat ondo hazten dira eta beharbada Imp α ::GFP kimera espresatzen dute. Beraz, komeniko litzateke T4 eta T7 transformanteen proteina laginekin Western blot esperimentua egitea giza Importina- α proteinaren espresioa ematen ari den jakiteko. Kimera detektatuko balitz, honen lokalizazioa azter liteke zelulan fluoreszentsia mikroskopia bidez, eta bidea irekiko lioke *H. sapiens*-en Importina- α *A. nidulans*-en aztertzeo aukerari. Proteina espresatzen ez bada, transformazio berri bat diseinatu beharko litzateke. *KapA* locus-ean integratzean arazoak daudela ikusita, induzitu daitekeen promotore baten bidez espresatzen den beste gene baten locus-a bilatu beharko litzateke bertan errekonbinazio homologoa emateko, beti ere *kapA* genea bere lekuan mantenduta. Adibidez, *An11778* locus-ean errekonbina liteke kimera. Era honetako anduiei merodiploide deritze eta TDP-43-ren kimerak lortu diren era berean lor litezke.

GFP::TDP-43 transformazioan lortu diren transformanteak ere baztertu behar dira, DNA konstrukzioa modu egokian integratu dela dirudien arren, proteinaren espresioa ez delako ematen. Hori dela eta, GFP etiketa HA etiketarekin ordezkatzeko erabakia hartu da, eta diseinu berri horrekin transformazioa errepikatu.

HA::TDP-43 transformanteekin DNA-ren integrazioa leku egokian eman da eta fenotipoan ere desberdintasunak deskribatu dira andui parentalarekiko. Immunodetekzio esperimentoak emango du anduien

egokitasunaren berri. Western blot-aren emaitzak positiboak izatekotan, transformanteak *H. sapiens*-en TDP-43 proteina espresatzen duten andui bezala kontsideratuko lirateke. Kasu horretan, azterketarekin aurrera jarraitu ahal izango litzateke baina, kimera zelula barruan fluoreszentsia mikroskopia bidez detektatu ahal izateko beste estrategia bat bilatu beharko litzateke, GFP amino ertzean kokatzeak funtzionaltasuna ukatzen baitio TDP-43-ri. Estrategia osagarriak beharrezkoak lirateke, beraz.

Etorkizunera begira eta froga esperimentalek bideragarria izan litekeela erakustekotan, azken helburua *H. sapiens*-en bai Importina- α , bai TDP-43 proteinak espresatzen dituen andui bat lortzea izan liteke. Horrela, Importina- α -k TDP-43 lotu eta ezagutzen duen aztertzekeko modelo bat lortuko litzateke.

5. ONDORIOAK/CONCLUSIONS

1. Lan honetan biologia molekularreko oinarritzko prozedurak burutu dira *A. nidulans* onddoa erreferentzia sistema bezala erabiliz. Emaitzen arabera, prozedurak modu egokian burutu direla ondorioztatzen da, baina bilatzen ziren anduiak edo lortu nahi ziren proteinen espresioak ez dira lortu.

In this work, basic molecular biology procedures have been conducted using A. nidulans as a reference system. Based on the obtained results, it's been concluded that procedures have been conducted correctly, but expected strains or desired proteins expressions haven't been achieved.

2. *H. sapiens*-en *importina-α* genea *A. nidulans*-en *kapA*-rekin ordezkatzeko ez da bideragarria, eta beste estrategia posible batzuk aztertu behar dira; hala nola, bai *KapA* eta *H. sapiens*-en *Importina-α* espresatzen dituzten heterokarioiak edo merodiploideak sortzea.

A. nidulans kapA replacement with H. sapiens importin-α gene is not viable, and alternative strategies should be studied, as, for example, creating heterokaryon or merodiploid strains expressing both KapA and H. sapiens Importin-α.

3. GFP::*TDP-43* kimera ez da espresatzen sortu diren anduietan. Honen arrazoiak ez dira ezagutzen baina, izan liteke GFP-ren tamainak espresioa inhibitzea.

*GFP::*TDP-43* chimeric protein is not being expressed in the created strains. Reasons after this event are still unknown, but one hypothesis may be that GFP's size inhibits expression.*

4. Egindako frogen arabera, arrazoiak daude HA_{3x}::*TDP-43* kimera espresatzen duten transformanteak lortu direla pentsatzeko, baina hori ziurtatzeko Western blot esperimentua egitea falta da. Western blot

esperimentuko emaitzek kimera espresatzen dela baieztatzekotan, kimera fluoreszentsia mikroskopia bidez detektatu ahal izateko estrategia bat bilatu beharko da.

According to the realised tests, there are reasons to think that transformants expressing the HA_{3x}::TDP-43 chimeric protein have been created. In order to confirm this, doing a Western blot experiment is still necessary. In the case that results obtained from Western blot confirm the chimeric protein's expression, then, an strategy for detecting the chimeric protein by fluorescence microscope should be studied.

6. BIBLIOGRAFIA

1. M. Wedde, M. Jacobs, U. Stahl. "Fungi: important organisms in history and today", *Molecular fungal biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1999, 1-20.
2. J. Clutterbuck. "Aspergillus nidulans", *Handbook of genetics, volume 1: bacteria, bacteriophages and fungi*. New York: Springer Science+Business Media, 1974, 447-510.
3. G. Robson. "Hyphal cell biology", *Molecular fungal biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1999, 164-184.
4. T. H. Adams, J. K. Wieser. "Asexual sporulation: conidiation", *Molecular fungal biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1999, 185-208.
5. O. Etxebeste, E. A. Espeso. "Neurons show the path: tip-to-nucleus communication in filamentous fungal development and pathogenesis", *FEMS Microbiol. Rev.* 2016, 21, 610-624.
6. O. S. Bayram *et al.* "LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity", *PLoS Genet.* 2010, 6, e1001226.
7. F. López-Muñoz, J. Boya, C. Alamo. "Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramón y Cajal", *Brain Res. Bull.* 2006, 70, 391-405.
8. N. Panayotis, A. Karpova, M. R. Kreutz, M. Fainzilber. "Macromolecular transport in synapse to nucleus communication ", *Trends Neurosci.* 2015, 38, 108-116.
9. S. Boeynaems, E. Bogaert, P. Van Damme, L. Van Den Bosch. "Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTLD", *Acta Neuropathol.* 2016, 132, 159-173.
10. O. Etxebeste *et al.* "Cytoplasmic dynamics of the general nuclear import machinery in apically growing syncytial cells", *PLoS One.* 2013, 8, e85076.

11. . A. L. Nishimura *et al.* "Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration", *Brain*. 2010, 133, 1763-1771.
12. . L. Yang *et al.* "Rapid Production of Gene Replacement Constructs and Generation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in *Aspergillus nidulans*", *Eukaryot. Cell*. 2004, 3, 1359-1362.
13. R. B. Todd, M. A. Davis, M. J. Hynes. "Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction", *Nat. Protoc.* 2007, 2, 811-821.
14. T. Nayak, E. Szewczyk, B. Oakley. "A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*", *Genetics Soc. America*. 2006, 172, 1557-1566.
15. T. A. Brown. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. Wiley-Blackwell, 2010.
16. T. Kuwano, C. Shirataki, Y. Itoh. "Comparison between polyethylene glycol- and polyethylenimine-mediated transformation of *Aspergillus nidulans*", *Current Genetics*. 2008, 54, 95-103.
17. M. J. Winton *et al.* "Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation", *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 13302-13309.
18. G. Pontecorvo, J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. McDonald, A. W. Bufton. "The Genetics of *Aspergillus nidulans*", *Adv. Genet.*, 1953, 5, 141-238.
19. M. H. González. "Tráfico a través del aparato de Golgi y extensión apical en *Aspergillus nidulans*", 2018, UCM-an aurkeztutako doktoretza tesia.
20. A. Markina-Iñarrairaegui *et al.* "Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*", *Mol. Biol. Cell*. 2011, 22, 3874-3886.

7. ERANSKINAK

1go Eranskina. Hazkuntza-medioen eta disoluzioen prestaketa

- Glukosa %20, 1L:
 - ❖ Glukosa: 200 g
 - ❖ dH₂O (ur distilatua): 1000 mL-arte (lehenengo 700 mL gehitu, nahastu eta ondoren enrasatu)
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
- Amonio tartratoa (NH₄T), 200 mL (9.2 g / 100 mL):
 - ❖ NH₄T: 18.4 g
 - ❖ dH₂O: 200 mL-arte
 - ❖ Irabiatu
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
- Gatz + traza elementuen disoluzioa, 1L:
 - ❖ KCl: 26 g
 - ❖ MgSO₄·7H₂O: 26 g
 - ❖ KH₂PO₄: 76 g
 - ❖ Traza elementuen disoluzioa: 50 mL
 - ❖ dH₂O: 1 L-arte
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
- Traza elementuen disoluzioa, 1 L:
 - ❖ ZnSO₄·7H₂O: 22 g
 - ❖ H₃BO₃: 11 g
 - ❖ MnCl₂·4H₂O: 5 g
 - ❖ FeSO₄·7H₂O: 5 g
 - ❖ CoCl₂·6H₂O: 1,6 g
 - ❖ CuSO₄·5H₂O: 1,6 g
 - ❖ (NH₄)₆MoO₂₄·4H₂O: 1,1 g
 - ❖ Na₄EDTA: 50 g
 - ❖ dH₂O: 1 L-arte
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
- MMA (Medio Mínimo Aspergillus), 400 mL:
 - ❖ Gatz + traza elementuen disoluzioa: 8 mL
 - ❖ Agar: 6 g
 - ❖ dH₂O: 360 mL arte
 - ❖ pH: 6.8
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - ❖ Glukosa %20 disoluzioaren 40 mL eta amonio tartrato disoluzioaren 4 mL gehitu medioa erabili aurretik
- MCA (Medio Completo Aspergillus), 400 mL:
 - ❖ Gatz + traza elementuen disoluzioa: 8 mL
 - ❖ Agar: 6 g

- ❖ dH₂O: 360 mL arte
 - ❖ Legami-erazkina: 2 g
 - ❖ pH: 6.8
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - ❖ Glukosa %20 disoluzioaren 40 mL eta amonio tartrato disoluzioaren 4 mL gehitu medioa erabili aurretik
- MMR (Medio Mínimo de Regeneración) 400 mL:
 - ❖ Gatz + traza elementuen disoluzioa: 8 mL
 - ❖ Sacarosa: 136.8 g
 - ❖ Agar: 6 g
 - ❖ dH₂O: 360 mL arte
 - ❖ pH: 6.8
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - ❖ Glukosa %20 disoluzioaren 40 mL eta amonio tartrato disoluzioaren 4 mL gehitu medioa erabili aurretik
- MMR– TOP, 400 mL:
 - ❖ Gatz + traza elementuen disoluzioa: 8 mL
 - ❖ Sacarosa: 136.8 g
 - ❖ Agar: 2.4 g
 - ❖ dH₂O: 360 mL-arte
 - ❖ pH: 6.8
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - ❖ Glukosa %20 disoluzioaren 40 mL eta amonio tartrato disoluzioaren 4 mL gehitu medioa erabili aurretik
- MMA (likidoa), 1L:
 - ❖ Gatz + traza elementuen disoluzioa: 20 mL
 - ❖ dH₂O: 900 mL arte
 - ❖ pH: 6.8
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - ❖ Glukosa %20 disoluzioaren 100 mL eta amonio tartrato disoluzioaren 10 mL gehitu medioa erabili aurretik
- MCA (likidoa), 1L:
 - ❖ Gatz + traza elementuen disoluzioa: 20 mL
 - ❖ Legami-erazkina: 5 g
 - ❖ dH₂O: 900 mL arte
 - ❖ pH: 6.8
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - ❖ Glukosa %20 disoluzioaren 100 mL eta amonio tartrato disoluzioaren 10 mL gehitu medioa erabili aurretik
- MFA (Medio de fermentación Aspergillus), 1L:
 - ❖ CSL (*Corn Steep Liquor*): 25 g

- ❖ Gatz + traza elementuen disoluzioa: 20 mL
 - ❖ dH₂O: 900 mL arte. 20 minutuz ondo nahastu eta filtratu
 - ❖ pH: 6.8
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - ❖ Sakarosa %30 disoluzioaren 100 mL eta amonio tartrato disoluzioaren 10 mL gehitu medioa erabili aurretik
- Piridoxina (pyro) %0,1, 100 mL:
 - ❖ Piridoxina: 0,01 g
 - ❖ dH₂O: 100 mL arte
 - ❖ Esterilizatu autoklabean
 - Sakarosa %30, 200 mL:
 - ❖ Sakarosa: 60 g
 - ❖ dH₂O: 200 mL arte
 - ❖ Esterilizatu autoklabean

2. Eranskina. PCR eta fusio-PCR baldintzak

PCR

Lehenengo, software informatikoa erabiliz (Vector NTI Advance 11.5.4, Invitrogen, 2014) DNA konstrukzioen diseinua egin da. *A. nidulans*-en geneen promotore eta terminadoreen sekuentziak lortzeko *Aspergillus Genome Database* datu-basetik hartu da informazioa. Giza geneen sekuentziak Gil-Bea doktoreak (Biodonostia) eta bere taldeak lortu ditu. Azkenik, *gfp* eta *pyrG* geneen sekuentziak UVP/EHU-ko Biokimika II laborategiko datu-basetik lortu dira. Hona hemen DNA konstrukzio bakoitzerako anplifikatu diren fragmentuen zerrenda eta bakoitzaren tamaina, kilobasetan adierazita:

- ***impα::gfp::pyrG (7,4 Kb)***: a) *kapA* genearen promotorea (1,6 Kb), b) *Impα* cDNA (1,6 Kb), eta c) *gfp::pyrG::kapA* genearen terminadorea (4,2 Kb).
- ***gfp::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG (7,0 Kb)***: a) *An11778* genearen promotorea (1,5 Kb), b) *gfp* (0,8 Kb), c) *tdp-43* cDNA (WT edo ΔNLS) (1,3 Kb), d) *pyrG* (1,9 Kb), eta e) *An11778* genearen terminadorea (1,5 Kb).
- ***ha_{3x}::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG (6,3 Kb)***: bi diseinu egin dira:
 - ❖ 5 zatitan: a) *An11778* genearen promotorea (1,5 Kb), b) *ha_{3x}* (0,2 Kb), c) *tdp-43* cDNA (WT edo ΔNLS) (1,3 Kb), d) *pyrG* (1,9 Kb), eta e) *An11778* genearen terminadorea (1,5 Kb).

- ❖ 3 zatitan: a) *An11778* genearen promotorea (1,5 Kb), b) *ha_{3x}* (0,2 Kb), c) *tdp-43* cDNA (WT edo Δ NLS)::*pyrG*::*An11778* genearen terminadorea (4,7 Kb).

Fragmentu guztien sekuentziak lortu eta DNA konstrukzioen diseinu informatikoa egin ondoren, PCR erreakzioetan erabili beharreko *primer*-en sekuentziak zehaztu dira. Fusio-PCR-an fragmentuak elkartu ahal izateko, *primer*-ei beharrezko *linker*-en sekuentziak gehitu zaizkie.

1go taula. Oligonukleotidoen izenak eta sekuentziak. Parentesi artean *linker*-ei dagozkien nukleotidoak adierazten dira.

Oligonukleotidoak	Sekuentzia 5'-3'
<i>impα::gfp::pyrG</i>	
KapA-PP1	CAA TAG GCT TCT CTT CGA GCT AGC AAC TGC
KapA-PP2'	GGT TGC TGA GGT GAG GGA ACA AAA ACA AAA CC
Impα5-for-KapAPP2'	(GT TCC CTC ACC TCA GCA ACC) + ATG ACC ACC CCA GGA AAA GAG AAC TTT CG
Impα5-for-GFP	(CC AGC GCC TGC ACC AGC TCC) + AAG CTG GAA ACC TTC CAT AGG AGC
KapA-GFP1-w/o tail	GGA GCT GGT GCA GGC GCT GG
KapA-GSP4	ACA CAG ACT AAG TCC GAT GAG AGG ATT GGC
<i>gfp::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG</i>	
An11778-PP1	CCA GCA GTA GCT CAA GCA TCA GTA TTG TGC
An11778-PP2	CAT TTT GGT GAT GTC GCT GAC CGC
An11778-GFP-SP	(GCG GTC AGC GAC ATC ACC AAA ATG) + GGA GCT GGT GCA GGC GCT GG
Tdp43-GFP-FP	(G CTC ATC GTT CTC ATC TTC GGT TAC CCG AAT ATA TTC AGA) + TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG TGT AAT CCC
Tdp43-geneSP	TCT GAA TAT ATT CGG GTA ACC GAA GAT GAG AAC GAT GAG C
Tdp43-Dw-for-pyrG	(AGA GCA TTG TTT GAG GCG ACC GGT) + CTA CAT TCC CCA GCC AGA AGA CTT AGA ATC CAT GC
pyrG-Up	ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT
pyrG-Dw-for-An11778-GSP3	(GCC AAA CAA CAA AAC ATC TAG CTA GAT CCT TCA) + GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG
An11778-GSP3	TGA AGG ATC TAG CTA GAT GTT TTG TTG TTT GGC

An11778-GSP4	GCG GCG GAT AAG TGA GAC AAT ACG C
<i>ha_{3x}::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG</i>	
An11778-PP1	CCA GCA GTA GCT CAA GCA TCA GTA TTG TGC
An11778-PP2	CAT TTT GGT GAT GTC GCT GAC CGC
An11778-GFP-SP	(GCG GTC AGC GAC ATC ACC AAA ATG) + GGA GCT GGT GCA GGC GCT GG
Tdp43-HA-FP	(G CTC ATC GTT CTC ATC TTC GGT TAC CCG AAT ATA TTC AGA) + CTG AGC AGC GTA ATC TGG AAG GTC ATA TGG
Tdp43-geneSP	TCT GAA TAT ATT CGG GTA ACC GAA GAT GAG AAC GAT GAG C
Tdp43-Dw-for-pyrG	(AGA GCA TTG TTT GAG GCG ACC GGT) + CTA CAT TCC CCA GCC AGA AGA CTT AGA ATC CAT GC
pyrG-Up	ACC GGT CGC CTC AAA CAA TGC TCT
pyrG-Dw-for- An11778-GSP3	(GCC AAA CAA CAA AAC ATC TAG CTA GAT CCT TCA) + GTC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CG
An11778-GSP3	TGA AGG ATC TAG CTA GAT GTT TTG TTG TTT GGC
An11778-GSP4	GCG GCG GAT AAG TGA GAC AAT ACG C

PCR erreakzioak egiteko ondorengo osagaiak nahastu dira 250 μ L-ko hodietan: fragmentu bakoitzari dagokion DNA moldea, oligonukleotido edo primer-ak 10 μ M-eko kontzentrazioan, desoxinukleotidoak, polimerasaren buffer-a eta polimerasa. Polimerasa bezala *PrimeSTAR* (PS) *DNA polymerase* (Takara) edo *Expand Long Template polymerase* (Roche) erabili dira. 50 μ L-ko PCR nahasteak erabili dira, 2. taulan azaltzen diren moduan prestatuta.

2. taula. PCR nahasteetan erabilitako osagaiak eta horien bolumenak.

Osagaiak	Bolumena (μ L)
DNA moldea	1
Hasierako oligonukleotidoa	1,5
Bukaerako oligonukleotidoa	1,5
Desoxinukleotidoak (dNTP)	4
Polimerasa buffera (PS <i>buffer</i>) 5x	10
Polimerasa	0,3
Mili-Q ura	31,7

Guztira	50
---------	----

Erabili diren DNA molde guztiak DNA genomikoak edo anplifikatu beharreko sekuentzia duten plasmidoak izan dira, bat izan ezik. *Importina- α* -ren kasuan, abiapuntua cDNA libreria bat izan da. Bertan, intereseko sekuentzia plasmido batean aurkitzen da, baina beste sekuentzia batzuk dituzten hainbat plasmidorekin batera nahastuta. Ondorioz, intereseko plasmidoaren presentzia ziurtatzeko, DNA molde kantitate altuagoa gehitu da nahastera (3. taula).

3. taula. *Imp α* cDNA-ren PCR erreakzioaren osagaiak.

Osagaiak	Bolumena (μ L)
DNA moldea (cDNA libreria)	15
<i>Impα5-for-KapAPP2'</i>	1,5
<i>Impα5-for-GFP</i>	1,5
Desoxinukleotidoak (dNTP)	4
Polimerasa buffera (PS buffer) 5x	10
Polimerasa	0,3
Mili-Q ura	17,7
Guztira	50

PCR erreakzioak egiterakoan tenperatura eta zikloen programazioa egin behar da termozikladorean. Erabiltzen diren *primer*-en tamainaren eta anplifikatu nahi dugun DNA fragmentuaren tamainaren arabera, PCR erreakzioan erabili beharreko tenperatura baldintza egokiak alda daitezke. PCR erreakzioa hainbat txandatan egin dira, eta txanda bakoitzean erabilitako baldintzak ezberdinak izan dira:

- Lehenengo txandan *imp α ::gfp::pyrG* konstrukzioaren a) eta c) fragmentuak, eta *gfp::tdp-43(WT/ Δ NLS)::pyrG* konstrukzioaren a), b), d) eta e) fragmentuak sintetizatu dira. PCR zikloen baldintzak honakoak izan dira: 98°C 2 min. Ondoren, 98°C 10 s, 55°C 30 s, eta 68°C 5 min, zikloa 25 aldiz errepikatuz. Bukatzeko 68°C 7 min eta 4°C-tan mantendu da produktua termozikladoretik jaso arte.

- Bigarren txandan *impα::gfp::pyrG* konstrukzioaren b) fragmentua, eta *gfp::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG* konstrukzioaren c) fragmentua (WT eta ΔNLS) sintetizatu dira. Kasu honetan erabilitako PCR zikloen baldintzak aldatu dira, eta honakoak izan dira: 98°C 2 min. Ondoren, 98°C 10 s, 65°C 7 s, eta 72°C 2 min eta 15 s, zikloa 10 aldiz errepikatuz. Ziklo bakoitzean 65°C-ko tenperatura 1°C jaisteko programatu da, 10. zikloan tenperatura 55°C-koa izatea lortzeko. 10 ziklo horiek amaitzean 98°C 10 s, 55°C 7 s, eta 72°C 2 min 30 s-ko 17 ziklo programatu dira. Azkenik, 72°C 7 min eta 4°C-tan mantendu produktua termozikladoretik jaso arte.
- Hirugarren txanda batean An11778 *ha_{3x}::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG* konstrukzioaren b) fragmentua, eta 3 zatitan egindako diseinuaren c) fragmentua (WT eta ΔNLS) sintetizatu dira. Erabilitako PCR zikloen baldintzak honakoak izan dira: 98°C 2 min. Ondoren, 98°C 10 s, 65°C 7 s, eta 72°C 5 min, zikloa 9 aldiz errepikatuz. Ziklo bakoitzean 65°C-ko tenperatura 1°C jaisteko programatu da. 9 ziklo horiek amaitzean 98°C 10 s, 55°C 7 s, eta 72°C 5 min-ko 16 ziklo programatu dira. Azkenik, 72°C 7 min eta 4°C-tan mantendu produktua termozikladoretik jaso arte.

PCR txanden ondoren, lortutako produktuen agarosa gel elektroforesia burutu da erreakzioa ongi joan dela ziurtatzeko eta lortutako fragmentuak egokiak direla baieztatzeko. Fragmentuak egokiak direla baieztatu ondoren, purifikatu egin dira.

Fusio-PCR

Fragmentu guztiak lortu direla ziurtatu ondoren, DNA konstrukzioen sintesiak egin dira. Horretarako, PCR arruntean erabilitako erreaktibo guztiak nahastu behar dira, baina oraingoan, DNA molde bakarraren ordez, DNA konstrukzioa osatuko duten fragmentuak gehitzen dira. *Primer* bezala DNA konstrukzio osoaren hasierako eta bukaerako oligonukleotidoak gehitzen dira.

Lehenengo txanda batean *impa::gfp::pyrG* konstrukzioaren eta *gfp::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG* konstrukzioaren fusioak egin dira. **4. taulan** agertzen dira bakoitza egiteko PCR nahastean gehitutako osagaiak.

4. taula. Fusio-PCR nahasteetan erabilitako osagaiak eta horien bolumenak.

<i>impa::gfp::pyrG</i>	
Osagaiak	Bolumena (μL)
a) <i>KapA</i> promotorea	1
b) <i>Impα</i>	2
c) <i>gfp::pyrG::KapA</i> terminadorea	1
<i>KapA</i> -PP1	1,5
<i>KapA</i> -GSP4	1,5
Desoxinukleotidoak (dNTP)	4
Polimerasa buffera (PS <i>buffer</i>) 5x	10
Polimerasa	0,3
Mili-Q ura	28,7
Guztira	50

<i>gfp::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG</i>	
Osagaiak	Bolumena (μL)
a) <i>An11778</i> promotorea	1
b) <i>gfp</i>	1
c) <i>tdp-43</i> (WT)/(ΔNLS)	1
d) <i>pyrG</i>	1
e) <i>An11778</i> terminadorea	1
<i>An11778</i> -PP1	1,5
<i>An11778</i> -GSP4	1,5
Desoxinukleotidoak (dNTP)	4
Polimerasa buffera (PS <i>buffer</i>) 5x	10
Polimerasa	0,3
Mili-Q ura	27,7
Guztira	50

Erabilitako PCR zikloen baldintzak honakoak izan dira: 98°C 2 min. Ondoren, 98°C 10 s, 65°C 7 s, eta 72°C 9 min, zikloa 10 aldiz errepikatuz. Ziklo bakoitzean 65°C-ko tenperatura 1°C jaisteko programatu da. 10 ziklo horiek amaitzean 98°C 10 s, 55°C 7 s, eta 72°C 9 min eta 30 s-ko 15 ziklo programatu dira. Azkenik, 72°C 7 min eta 4°C-tan mantendu produktua termozikladoretik jaso arte.

Bigarren txanda batean *ha_{3x}::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG* konstrukzioaren fusioak egin dira. 5 fragmenturekin eta 3 fragmenturekin probatu dira fusioak. **5. taulan** agertzen dira bakoitza egiteko PCR nahastean gehitutako osagaiak.

5. taula. *ha_{3x}::tdp-43(WT/ΔNLS)::pyrG* konstrukzioaren fusio-PCR nahasteetan erabilitako osagaiak eta horien bolumenak.

3 zatitan	
Osagaiak	Bolumena (μL)
a) <i>An11778</i> promotorea	0,75
b) <i>ha_{3x}</i>	0,75
c) <i>tdp-43</i> cDNA (WT)/(ΔNLS):: <i>pyrG</i> :: <i>An11778</i> terminadorea	0,75
<i>An11778</i> -PP1	1,5
<i>An11778</i> -GSP4	1,5
Desoxinukleotidoak (dNTP)	4
Polimerasa buffera (PS buffer) 5x	10
Polimerasa	0,5
Mil-Q ura	30,25
Guztira	50

5 zatitan	
Osagaiak	Bolumena (μL)
a) <i>An11778</i> promotorea	0,75
b) <i>ha_{3x}</i>	0,75
c) <i>tdp-43</i> (WT)/(ΔNLS)	0,75
d) <i>pyrG</i>	0,75
e) <i>An11778</i> terminadorea	0,75
<i>An11778</i> -PP1	1,5
<i>An11778</i> -GSP4	1,5
Desoxinukleotidoak (dNTP)	4
Polimerasa buffera (PS buffer) 5x	10
Polimerasa	0,5
Mil-Q ura	28,75
Guztira	50

Erabilitako PCR zikloen baldintzak honakoak izan dira: 98°C 2 min. Ondoren, 98°C 10 s, 65°C 7 s, eta 72°C 7 min 30 s, zikloa 10 aldiz errepikatuz. Ziklo bakoitzean 65°C-ko temperatura 1°C jaisteko programatu da. 10 ziklo horiek amaitzean 98°C 10 s, 55°C 7 s, eta 72°C 8 min-ko 18 ziklo programatu dira. Azkenik, 72°C 7 min eta 4°C-tan mantendu produktua termozikladoretik jaso arte.

Lortutako produktuen agarosa gel elektroforesia burutu da erreakzioa ongi joan dela ziurtatzeko eta konstrukzioak egokiak direla baieztatzeko. Konstrukzioen tamainak egokiak direla baieztatu ondoren, purifikatu egin dira.

3. Eranskina. Transformazio protokoloa: A. nidulans-en protoplastoen lorpena eta transformazioa.

6. taula. Transformazio protokoloan erabilitako disoluzioak.

Disoluzioak	Prestaketa
Tween %0,02 (100 mL)	20 mg Tween 20 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
Sakarosa 1,2 M (100 mL)	41,08 g sakarosa 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu eta autoklabean esterilizatu.
KCl 0,6 M (100 mL)	4,47 g KCl 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu eta autoklabean esterilizatu.
KCl 0,6 M + CaCl ₂ 50 mM (100 mL)	4,47 g KCl 0,74 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu eta autoklabean esterilizatu.
KCl 1,1 M + Azido zitriko 0,1 M (100 mL)	8,2 g KCl 2,1 g azido zitriko monohidratatua 50 mL ur distilatu gehitu, pH-a 5,5-era doitu (KOH 1,1 M erabiliz), eta 100 mL arte enrasatu ur distilatuarekin. Filtrazioz esterilizatu 0,45 µm-ko filtroarekin eta 4°C-tan gorde.
Protoplasting disoluzioa (16 mL)	2,048 g Vinotaste (Novozymes) 16 mL KCl + Azido zitriko Erabili baino 30 minutu lehenago prestatu eta 4°C-tan gorde.
TrisHCl 1 M (200 mL) pH=7,5	24,22 g Trizma Ur distilatua gehitu, pH-a 7,5-era doitu HCl erabiliz eta 200 mL arte enrasatu ur distilatuarekin.
CaCl ₂ 1 M (200 mL)	22,98 g CaCl ₂ 200 mL arte enrasatu ur distilatuarekin.
7 disoluzioa (50 mL) Sorbitol (1 M) TrisHCl (0,01 M) CaCl ₂ (0,01 M)	9,11 g sorbitol 0,5 mL TrisHCl (1 M, pH=7,5) 0,5 mL CaCl ₂ (1M) 50 mL arte enrasatu ur distilatuarekin eta autoklabean esterilizatu.
8 disoluzioa (50 mL) PEG (%60 P/B) TrisHCl (0,01 M) CaCl ₂ (0,01 M)	30,0 g PEG (polietilenglikol) 0,5 mL TrisHCl (1 M, pH=7,5) 0,5 mL CaCl ₂ (1 M) 5 mL ur distilatu gehitu, urtu PEG mikrouhinean eta 50 mL enrasatu ur distilatuarekin. Autoklabean esterilizatu.

Ikerketa honetan egin diren transformazioak hurrengo urratsak jarraituz egin dira:

- 1) Prestatu 150 mL MCA (l) + auxotrofiak. Andui parentalaren esporak inokulatu Tween 20 mL-tan, esporen bereizgarri den kolore berde iluna daukan arte. Ondo bortexeatu eta nahastu prestatutako MCA (l)-rekin 500 mL-ko matraxe batean. Inkubatu 14 orduz 30°C-tan eta agitazioarekin (150 rpm).
- 2) Filtratu mizelioa miracloth paper esterilarekin . Garbiketak egin MCA (l)-rekin eta mizelioa ondo lehortu. Mizelioa jaso 50 mL-tako polipropileno hodietan, 1,25 g mizelio asko jota.
- 3) Mizelioei 16 mL Protoplasting disoluzio gehitu eta berresekitu. Falcon hodi bakoitzeko gehitu 16 mL MCA (l) + elikagaiak + auxotrofiak 100 mL-ko erlenmeyer batean. Pasa aurreko hodietako nahastea erlenmeyer matraxera eta ondo irabiatu.
- 4) Nahastea agitazioarekin (150 rpm) inkubatu 30°C-tan 90-120 minutuz. 90 minutu pasa ondoren nahastearen alikuotak jaso protoplastoak mikroskopioan behatzeko. Protoplastoen dentsitatea egokia denean, digestioa amaitutzat eman.
- 5) Jarritako digestio bakoitzeko prestatu 50 mL-tako 2 polipropileno hodi 16 mL sakarosa 1,2 M-ekin. Gehitu bakoitzean protoplasto disoluzioaren (32 mL) 16 mL oso mantso, banda oso definituak sortuz. Zentrifugatu 10 minutuz (1800 g, 4°C).
- 6) Jaso interfasetik protoplastoen banda 50 mL-tako hodi berrietan. Gehitu KCl 0,6 M bolumen berdinean eta nahastu. Zentrifugatu 10 minutuz (1800 g, 4°C).
- 7) Dekantatu eta prezipitatua berresekitu KCl 0,6 M-en 2 mL-tan. Banatu 1,5 mL-ko 2 hodietan, bakoitzean 1 mL. Zentrifugatu 3 minutuz (2400 g, giro tenperatura).
- 8) Sobrenadantea kendu eta prezipitatua berresekitu KCl 0,6 M-en 1 mL-tan. Zentrifugatu 3 minutuz (2400 g, giro tenperatura).
- 9) 8. urratsa errepikatu. Sobrenadantea kendu eta prezipitatua berresekitu KCl 0,6 M + CaCl₂ 50 mM-en 0,5 mL-tan. Bi 1,5 mL-tako hodietako produktuak elkartu 1,5 mL-ko hodi berri batean. Zentrifugatu 3 minutuz (2400 g, giro tenperatura).

10) Sobrenadantea kendu eta prezipitatu berresekitu KCl 0,6 M + CaCl₂ 50 mM-en 1 mL-tan. Protoplastoak ongi berresekitu.

11) Protoplastoak DNA konstrukzioekin nahastu. Horretarako, nahastu 50 mL-tako polipropilenoazko hodi batean protoplasto disoluzioko 100 µL, eta DNA (gehienez 10 µL). Irabiatu, *Vortex* bidez 6-8 aldiz abiadura maximoan segundo batez. DNA-rik gabeko 50 mL-tako polipropilenoazko hodi bat ere prestatu, protoplastoen erregenerazio kontrolerako.

12) Gehitu 8 disoluzioaren 50 µL. Irabiatu, *Vortex* bidez, 4-5 aldiz abiadura maximoan segundo batez. Inkubatu 50 mL-tako polipropilenoazko hodiak 25 minutuz izotzetan.

13) Gehitu 8 disoluzioaren 1 mL, berresekitu, eta jarraian gehitu 7 disoluzioa 5 mL osatu arte. Azkenik, gehitu MMR-TOP medioaren 20 mL osatu arte eta nahastea beharrezko petri plaketan banatu. Transformazio bakoitzeko (protoplastoak + DNA konstrukzioa) plaka hauek behar dira gutxienez:

- 2 petri plaka medio selektiboarekin: transformanteak bakarrik haziko dira.

- Petri plaka bat auxotrofia guztiekin, protoplastoen erregenerazio kontrola izateko.

Hortaz aparte, DNA konstrukziorik gabeko 50 mL-ko polipropilenoazko hodiarentzat ere bi petri plaka behar dira: medio selektiboa daukana, kontrol negatiboa izango dena eta kontaminazioak detektatzeko balio duena; eta auxotrofia guztiak dituen medioa daukana, protoplastoen erregenerazio kontrolerako.

14) Plaka guztiak 37°C-tan inkubatu 3 egunez.

Transformazioaren ostean transformanteen selekzioa dator. Lortutako transformante guztietatik fenotipo egokia daukatenak jaso egiten dira. Horretarako, transformanteetatik esporak jaso eta plaka berrietan inokulatu egiten dira, medio selektiboan. Transformanteen esporak jaso eta plaketan hazten den bakoitzean transformanteen purifikazioa egiten ari dela esaten da. Komeni da transformanteak bi aldiz purifikatzea erauzketa protokoloetarako

erabili aurretik. Agertzen den fenotipo berezi bakoitzeko hiru transformante jasotzea ere komeni da.

4. Eranskina. DNA eta proteinen erauzketa.

DNA genomikoaren erauzketa

7. taula. DNA genomikoaren erauzketarako erabilitako disoluzioak.

Disoluzioak	Prestaketa
Tween %0,02 (100 mL)	20 mg Tween 20 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
EDTA 0,5 M (100 mL)	18,61 g EDTA 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
Sakarosa 1 M (500 mL)	171,15 g sakarosa 500 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
TrisHCl 1 M (100 mL) pH=8	12,12 g Trizma pH-a HCl-rekin doitu 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
SDS %10 (100 mL)	10 g SDS (Sodio Dodezil Sulfatoa) 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
NaAc 3 M (100 mL) pH=6	24,61 g NaAc 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
Fenol/SEVAG	25 mL fenol (F. Organikoa) 24 mL kloroformo 1 mL alkohol isoamiliko 4°C-tan gorde.
EtOH %80 (50 mL)	40 mL EtOH 50 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
TSE disoluzioa (100 mL) TrisHCl pH=8 (0,025 M) Sakarosa (0,25 M) EDTA (0,02 M)	25 mL sakarosa 1 M 2,5 mL TrisHCl (1 M, pH=8) 4 mL EDTA (0,5 M) 100 mL arte enrasatu ur distilatuarekin.

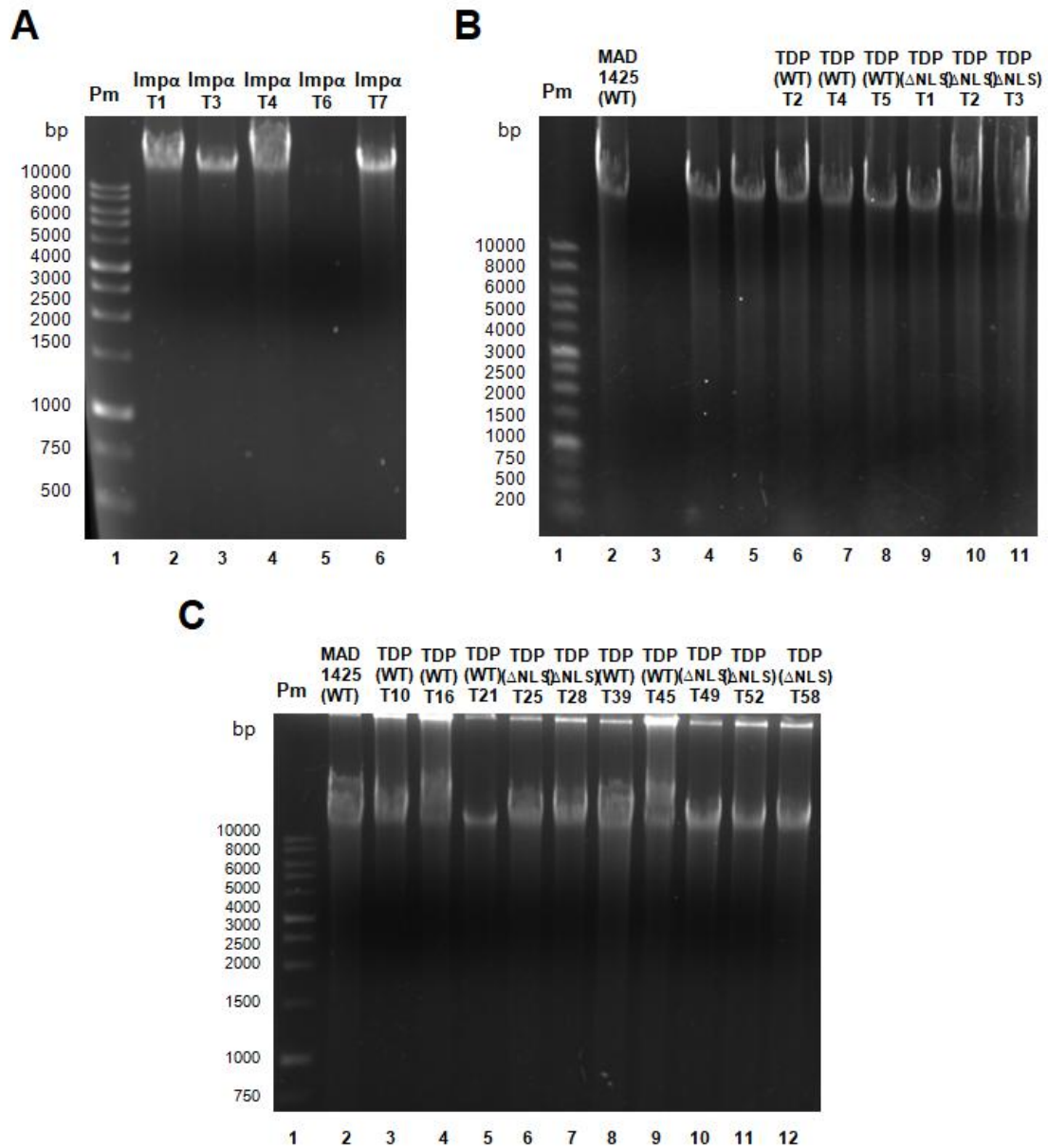
DNA erauzketarako, aldeztu aurretik erabiliko diren transformanteak petri plaketan hazi dira. Plaka horietatik jasotako esporekin egin da DNA erauzketa. DNA erauzketa egiteko hurrengo urratsak jarraitu dira:

- 1) Jaso esporak plaketatik eta inokulatu Tween 2 mL-tan.
- 2) Espora suspentsioa MMA (l) + elikagaiak + auxotrofiak medioaren 20 mL-tan isuri, 250 mL-ko matraze batean. Inkubatu 16 orduz 37°C-tan eta agitazioarekin (220 rpm).
- 3) 16 orduz inkubatu ondoren filtratu mizelioa miracloth paper bidez eta ondo prentsatu. Jaso 200 mg inguru 2 mL-ko hodietan. Estali parafilma erabiliz.

- 4) Parafilma zulatu eta hodiak liofilizatorera eraman. Mizelioak liofilizatu 6 orduz gutxienez.
- 5) Metalezko bolatxo bat gehitu hodietan eta liofilizatutako mizelioa txikitu *Mini-beadbeater* lagin homogenizatzailearen bidez astinduz.
- 6) Mizelio hautsari TSE disoluzioaren 1 mL gehitu eta ondo berresekitu. Ondoren, gehitu 100 μ L SDS %10. Inkubatu termoblock-ean 65°C-tara 15 minutuz.
- 7) Lisatutako mizelioaren disoluzioa 2 mL-ko hodi berri batera pasa, eta metalezko bolatxoa berreskuratu.
- 8) Fenol/SEVAG 1 mL-rekin (fase organikoa, behekoa) disoluzioa fenolizatu, 5-10 minutuz eskuz astinduz.
- 9) 5 minutuz zentrifugatu, abiadura maximoan eta giro tenperaturan. Fase organikoa eta ur-fasea banatuko dira. Jaso ur-fasea (goikoa) eta pasa 2 mL-ko hodi batera.
- 10) Errepikatu 8. eta 9. urratsak. Ondoren, gehitu NaAc 0,1 bolumen eta isopropanol 0,6 bolumen hodian jasotako bolumenarekiko. Inbertsioz nahastu, eta utzi 15 minutuz pausagunean. DNA hauspeakin txuri moduan agertuko da.
- 11) Zentrifugatu 5 minutuz abiadura maximoan eta giro tenperaturan. Sobrenadantea kendu eta prezipitatua 1 mL EtOH %80-rekin garbitu. Zentrifugatu berriro 5 minutuz eta prezipitatua lehortu.
- 12) Prezipitatua berresekitu 300 μ L Mili-Q H₂O-tan. Ondo nahastu ahalik eta gehien disolbatzeko. 2 μ L RNA-sa (5 mg/mL) gehitu, eta 37°C-tan inkubatu 30-60 minututan zehar.
- 13) Gehitu NaAc 0,1 bol. eta isopropanol 0,6 bol. aurreko urratsean dagoen bolumenarekiko. Mikropipeta punta hori batekin disoluzioa nahastu, eta sortutako DNA hauspeakina jaso EtOH %80 500 μ L dituen 2 mL-ko eppendorf batean.
- 14) Zentrifugatu 5 minutuz giro tenperaturan abiadura maximoan. Huts ponpa erabiliz prezipitatua lehortu, eta 200 μ L Mili-Q H₂O-tan birdisolbatu.

15) DNA genomikoaren erauzketa prozesuaren egiaztapena egiteko kargatu 2 μ L-ko alikuota bat agarosa gel elektroforesian. Modu honetan, DNA genomiko disoluzioaren kontzentrazioa ere ikusiko da.

Ondorengo irudian egindako DNA genomikoen erauzketen agarosa gel elektroforesien argazkiak azaltzen dira:



1go irudia. DNA genomikoen disoluzioen alikuoten elektroforesi argazkiak. A) *Impα* transformanteen DNA genomikoak. 5. kalean ez da bandarik ikusten, beraz, T6-ren DNA genomikorik ez dago. B) Parentalaren eta GFP::*TDP-43* transformanteen DNA genomikoak (3, 4 eta 5 kaleetan interesekoak ez diren beste transformante batzuen DNA genomikoak daude). C) Parentalaren eta HA_{3x}::*TDP-43* transformanteen DNA genomikoak.

Argazki horiei esker jakin da, adibidez, Impα T6-ren kasuan ez dagoela DNA genomikorik disoluzioan. Gainerako transformanteen kasuan, argazkiei esker DNA genomikoaren kontzentrazio erlatiboaren estimazioa egin ahal izan da. Horretarako, kontutan hartu dira DNA genomikoen banden intentsitatea, eta banden luzapena (zenbat eta gehiago luzatu bidean zehar, orduan eta DNA gehiago). A argazkian T1 eta T4-ren DNA kontzentrazio altuan dago (2 eta 4 kaleak, hurrenez hurren), eta T3 eta T7-ren DNA kontzentrazio baxuagoan dago (3 eta 6 kaleak). B argazkian intereseko lagin guztien DNA kontzentrazioa altua da, bereziki parentalaren eta T2 eta T3-ren kasuetan (2, 10 eta 11 kaleak, hurrenez hurren). C argazkian aipagarria da T21-en kasuan DNA-ren kontzentrazioa baxua dela (5 kalea).

Proteinen erauzketa: lisi alkalinoa

8. taula. Lisi alkalinatorako beharrezkoak diren disoluzioen prestaketa.

Disoluzioak	Prestaketa
Tween %0,02 (100 mL)	20 mg Tween 20 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
Lisi Buffer (15 mL) NaOH (0,2 M) β-merkaptotanol (%0,2)	300 μL NaOH 10 M 30 μL β-merkaptotanol 15 mL arte Mili-Q H ₂ O-rekin enrasatu.
Tris Base 1 M (50 mL)	6,06 g Trizma 50 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
TR (Tampón de ruptura) (9 mL)	1,5 mL TrisHCl (0,5 M, pH=6,8) 1,8 mL SDS %10 0,45 mL β-merkaptotanol 3,24 g urea 9 mL arte Mili-Q H ₂ O-rekin enrasatu Bromofenol urdina gehitu.

Proteinen erauzketa egiteko prozeduraren hasierako urratsak DNA erauzketa egiteko jarraitzen direnen ia berdinak dira, mizelio liofilizatua lortu arte. Dena den, desberdintasun batzuk badaude:

- Esporak MMA (l)-an hazi beharrean, MFA (l)- an hazten dira. Medio honetan karbono iturri bezala glukosa erabili beharrean, sakarosa erabiltzen da. Medioa erabiltzerakoan sakarosa %30 erabiltzen da medioaren sakarosa kontzentrazioa %3-koa izateko. Medio honek proteinen sintesia areagotzen du.

- DNA-rekin gertatzen den ez bezala, proteinen kasuan tenperatura baxuak mantentzea oso garrantzitsua da proteinen degradazioa moteltzeko. Hori dela eta, mizelioak 2 mL-ko hodietan jaso bezain laster nitrogeno likidotan sartu egiten dira. Gainera, prozesu osoan zehar laginak izotzetan mantendu egiten dira ahalik eta gehien.

Liofilizatutako mizelioa lortu ondoren (DNA erauzketako 1)-4) urratsak), hurrengo urratsak jarraitu dira:

- 1) Mizelioa txikitu metalezko bolatxo bat gehituz eta *Mini-beadbeater* lagin homogenizatzailea erabiliz. 7 segundoko agitazioak, 2 aldiz lagin bakoitzeko.
- 2) Metalezko bolatxoa kendu 2 mL-ko hoditik. Mizelio hautsetik hartu mini espatularekin koilarakada bat eta pasa 2 mL-ko beste hodi batera. 6-7 mg mizelio izango dira.
- 3) Berresekitu mizelio hautsa lisis buffer-aren 1 mL-tan, bortexa eta pipetarekin gogor irabiatuz 1,5 minutuz.
- 4) Proteinen hauspeaketa eragiteko, gehitu azido trikloroazetikoa (*trichloroacetic acid*, TCA) %7,5-era. Ondo nahastu eta izotzetan inkubatu 10 minutuz. 6-7 mg mizelio ez egotekotan, TCA gutxiago gehitu.
- 5) Zentrifugatu 5 minutuz 4°C-tan eta 14000 rpm-tan. Sobrenadantea kendu eta prezipitatu lehortu. TCA guztia ondo kentzeko, berriro zentrifugatu eta lehortu.
- 6) Prezipitatuaren gainean gehitu Tris Base 100 µL, eta 200 µL TR, eta ondo nahastu.
- 7) Momentuan erabili behar bada, proteina lagina 30 segunduz irabiatu, 3 minutuz inkubatu 90°C-tan eta minutu batez zentrifugatu. Lagina izoztu behar bada, 30 segunduz irabiatu eta minutu batez zentrifugatu.

5. Eranskina. Southern blot esperimentuaren prozedura

10. taula. Southern blot esperimenturako beharrezkoak diren disoluzioen prestaketa.

Disoluzioak	Prestaketa
EDTA 0,2 M (200 mL) pH=8	14,88 g EDTA Gehitu ur distilatua eta pH-a NaOH-rekin doitu. 200 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
Desnaturalizazio soluzioa (2 L)	175,32 g NaCl 40 g NaOH 2 L arte ur distilatuarekin enrasatu.
Neutralizazio soluzioa (2 L)	121,18 g Trizma 350,60 g NaCl pH-a doitu 7,5-era HCl erabiliz 2 L arte ur distilatuarekin enrasatu.
SSC 20x (1 L)	175,3 g NaCl 88,22 g sodio zitrato Disolbatu dena 800 mL ur distilatutan, eta pH-a 7-ra doitu HCl erabiliz. 1 L arte ur distilatuarekin enrasatu.
SSC 2x (250 mL)	25 mL SSC 20x 250 mL arte osatu ur distilatuarekin.
SDS %20 (500 mL)	100 g SDS 500 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
EDTA 0,5 M (100 mL) pH=8	18,61 g EDTA ur distilatuan disolbatu pH-a doitu NaOH erabiliz 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
Church buffer (50 mL)	0,5 g BSA (<i>Bovine Serum Albumine</i>) ur distilatuan disolbatu 100 µL EDTA 0,5 M, pH=8 17,5 mL SDS %20 25 mL ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$) 1 M, pH=7 50 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$) 1 M (500 mL) pH=7	89,0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60,0 g NaH_2PO_4 Ur distilatuan disolbatu eta pH-a doitu 500 mL arte distilatuarekin enrasatu.
2xSSC-N + %0,1 SDS (200 mL)	20 mL SSC 20x 200 mL arte ur distilatua gehitu 1 mL SDS %20 gehitu.
0,5xSSC-N + %0,1 SDS (200 mL)	5 mL SSC 20x 200 mL arte ur distilatua gehitu 1 mL SDS %20 gehitu.
Washing buffer (500 mL)	5,8 g azido maleiko 4,38 g NaCl Ur distilatuan disolbatu. pH-a 7,5 lortzeko NaOH solidoa erabili 1,5 mL Tween 20 500 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.

Azido maleiko buffer-a (1 L)	11,6 g azido maleiko 8,77 g NaCl Ur distilatuan disolbatu. pH-a 7,5 lortzeko NaOH solidoa erabili 1 L arte ur distilatuarekin enrasatu.
Blockin solution (40 mL)	4 mL Blockin solution 10x (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche) 40 mL arte osatu azido maleiko buffer-arekin.
Antibody soluzioa (20 mL)	2 μ L Anti-Digoxigenin-AP Conjugate antigorputz (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche) 20 mL Blocking solution.
Detection buffer (100 mL)	1,21 g Tris-HCl 0,58 g NaCl Ur distilatuan disolbatu eta pH-a 9,5-era doitu 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.

Southern blot esperimentuaren prozedura luzea da eta hainbat egunetan zehar banatzen da. Prozedurarekin hasi aurretik, DNA genomikoaren digestioa egiteko zein errestrikzio entzima erabiliko den erabaki behar da, eta sortuko dituen fragmentuen tamainak aurrez aurre dira.

Prozedurari dagokionez, egun bakoitzean hurrengo urratsak jarraitu dira:

1. Eguna

1) DNA genomikoen liseriketa egin errestrikzio entzima jakinekin. Entzima bakoitzak bere buffer-a behar du. Nahastu DNA genomikoa (15, 20 edo 25 μ L, DNA-ren kontzentrazioaren arabera), entzima (1 μ L), eta osatu 40 μ L arte buffer-arekin. 37°C-tan inkubatzen utzi gau osoan zehar.

2) Zundaren prestaketa. Zunda egiteko erabiliko den DNA fragmentuaren 16 μ L hartu eta pasa 1,5 mL-ko eppendorf batera. Berotu termoblock-ean 10 minutuz 95°C-tara desnaturalizatzeko. 5 minutu utzi izotzetan. Gehitu 4 μ L DIG-High Prime (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche). Zentrifugatu eta 37°C-tan inkubatzen utzi gau osoan zehar.

2. Eguna

- 1) Digestioari agarosa gel elektroforesia egin behar zaio. Elektroforesia egin digestioa guztiz gehituz gelaren puzutxo bakoitzean. Pisu markadoretik (DNA Molecular Weight Marker III, Digoxigenin-labeled, Roche) 3 μ l ipini.
- 2) Zundaren erreakzioa inaktibatu, zundari 2 μ l EDTA (0.2 M, pH = 8) gehituz eta berotuz 10', 65°C-tan. Izozkailuan gorde.
- 3) DNA digestioaren transferentzia egin behar da, gelatik mintzera. Hasteko, gela UV-rekin irradiatu 10 minutuz.
- 4) Gela ontzi batera pasa eta 45 minutuz desnaturalizazio soluzioan utzi, agitazio mantsoarekin.
- 5) 2 aldiz utzi neutralizazio soluzioan 30' (aurretik ur pixka batekin garbi daiteke), agitazio mantsoarekin.
- 6) Homogeneizatu gela SSC 2x transferentziarako muntaia prestatzen den bitartean.
- 7) Gelaren tamainako mintza moztu eta homogeneizatu. Pixka bat busti ur distilatuan eta pasa SSC 2x-ra. Whatman papera moztu.
- 8) Transferentzia muntaia egin:
 - Kristalezko kubeta batean SSC 20x jarri (2 behatz). SSC20x birziklatua erabil daiteke.
 - Kristal baten gainean Whatman handienak jarri zubi moduan. Ertzak SSC 20x-etan bustita gelditu behar dira. Whatman guztia SSC 20x-ekin busti Pasteur pipeta erabiliz.
 - Gela ipini puzutxoak beherantz daudela (Whatmanaren aldera). Burbuilak kendu.
 - Parafilm zatiak ipini gelaren inguruan.
 - Mintza jarri gelaren eta burbuilak kendu.
 - Whatman txiki bat SSC 2x-tan busti eta mintzaren gainean ipini. Burbuilak kendu.
 - Beste bi Whatman paperak gainean ipini eta burbuilak kendu.

- Paperezko serbilletak jarri eta gainean kristala ipini.
- Pisua jarri (500 g).

Gau osoan zehar utzi giro tenperaturan pisua jarrita goian.

3. Eguna

- 1) Mintza SSC 2x-n garbitu. Lehortu iragaz paperaren gainean.
- 2) 2' eduki Gel-BOC-ean UV esposiziopean → 2 pultso 120 mJ-takoak.
- 3) Prehibridazioa eta hibridazioa. Hibridazio hodi bat hartu eta mintza ipini paretari pegatuta. DNA duen aldea barrurantz gelditu behar da.
- 4) Mintzari Church Buffer-a gehitu (25 mL). 2,5 orduz utzi mintza 42°C-tan, agitazio leunarekin hibridazio labean.
- 5) 2,5 ordu pasa baino 5 minutu lehenago, zundatik 5 µL jarri eppendorf batean. Termoblock-ean 95°C-tan berotu desnaturalizatzeko.
- 6) Atera hibridazio hodia labetik. Gehitu zunda desnaturalizatua mintzari eta hibridazio labean utzi 42°C-tan agitazio leunarekin gau osoan zehar.

4. Eguna

- 1) Atera hodiak, eta bertako disoluzioa gorde.
- 2) 2xSSC-N + %0.1 SDS erabiliz garbitu giro tenperaturan 30 mL gehituz. 5 minutuko 2 garbiketa.
- 3) 0.5xSSC-N + %0.1 SDS-N erabiliz garbitu, 65-68°C-tan 40 mL gehituz aldi bakoitzean. 15 minutuko 2 garbiketa.
- 4) 5 minutu Washing Buffer-ean eduki, 30-40 mL gehituz giro tenperaturan.
- 5) 30 minutu, 40 mL Blocking soluzioan eduki giro tenperaturan.
- 6) 30 minutu, 20 mL Antibody soluzioan eduki giro tenperaturan.
- 7) 30 mL Washing Buffer gehituz 15 minutuko 2 garbiketa egin.
- 8) 5 minutu eduki Detection buffer-aren 20 mL-tan, giro tenperaturan.

9) Mintza hoditik atera eta bi plastikoren artean jarri. Gehitu 1 ml CSPD (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche) DNA dagoen mintzaren aurpegian. 5 minutuz inkubatu 15-25°C-tan.

10) Lehortu iragaz paperean. Inkubatu mintza 10 minutuz 37°C-tan. Azkenik, argazkia atera.

6. Eranskina. Western blot esperimentuaren prozedura

11. taula. Western blot esperimentuan erabili beharreko disoluzioen prestaketa.

Disoluzioak	Prestaketa
SDS-PAGE 10x (1 L) Tris Base 250 mM Glizina 1,92 M SDS %1	30,2 g Trizma 144 g Glizina Gehitu ur distilatua disolbatzeko. Ondoren, gehitu 10 g SDS eta nahastu 1 L arte ur distilatuarekin enrasatu.
SDS-PAGE 1x (1 L)	100 mL SDS-PAGE 10x 1 L arte ur distilatuarekin osatu.
TrisHCl 1 M (100 mL) pH=8,8	12,12 g Trizma pH-a HCl-rekin doitu 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
SDS %10 (100 mL)	10 g SDS (Sodio Dodezil Sulfatoa) 100 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) 10x (1 L)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ Gehitu ur distilatua 800 mL arte, eta doitu pH-a 7,4-ra 1 L arte ur distilatuarekin enrasatu eta autoklabatu.
PBS 1x (400 mL)	40 mL PBS 10x 400 mL arte ur distilatuarekin enrasatu.
PBS-Tween (1 L)	100 mL PBS 10x 500 µL Tween %0,02 1 L arte ur distilatuarekin osatu.
Blocking solution (15 mL)	15 mL PBS 1x 0,75 g esne hautsa (Central Lechera Asturiana, 1 Kg).

Western blot esperimentuaren prozeduraren lehenengo zatia proteinak banatzeko gelen prestaketan datza. DNA-ren kasuan agarosazko gelak erabiltzen dira, baina proteinen banaketarako akrilamidazko gelak egiten dira. Gelak prestatzeko muntaia berezia da, eta hurrengo urratsak jarraitzen dira:

1) Gela prestatzeko muntaia egin. Gel bakoitza bi kristalen artean mugatutako espazioan sortzen da. Ura gehitu eta utzi 5-10min geldirik ura galtzen ez duela ziurtatzeko. Ura kendu eta ondo lehortu bi kristalen arteko aldea iragaz paper zatiak erabiliz.

2) Gela prestatu. Normalean %10eko akrilamidazko gelak egiten dira. TEMED gehitu bezain laster nahastea polimerizatzen hasiko da. Nahastea (12. taula) 50 mL-ko polipropilenoazko hodi batean prestatu.

12. taula. Akrilamidazko gelak prestatzeko nahastearen osagaiak.

%10ko gela	10mL
%30 akrilamida	3,3
1M TrisHCl pH=8,8	3,8
%10 SDS	0,1
mqH₂O	2,7
PSA %10	0,1
TEMED	4µL

3) Gehitu nahastea muntaira. Ondoren gehitu 2-propanola goraino. Modu honetan gela zuzen gelditzen da. Utzi polimerizatzen.

4) Stacking *buffer*-a (13. taula) gehitu goraino eta orraziak ipini. Polimerizatzen utzi.

13. taula. Stacking *buffer*-a prestatzeko nahastearen osagaiak.

Stacking	3mL
%30 akrilamida	0,5
0,5M TrisHCl pH=6,8	0,76
%10 SDS	0,03
mqH₂O	1,68
PSA %10	0,03
TEMED	3µL

5) Behin gelak prest daudela, kristalak proteinak banatzeko kubetan sartu. Orraziak kendu eta kubeta SDS-PAGE 1x-ekin bete.

Gelak eta banaketa muntaia prest daudenean, hurrengo urratsak jarraitzen dira:

1) Proteina laginak kargatu aurretik: laginak irabiatu, *Vortex* bidez, 95°C-tan 3-5 minutuz inkubatu eta zentrifugatu minutu batez abiadura maximoan.

- 2) Laginak kargatu, normalean 15-20 μL inguru. Pisu molekularreko markadoretik 5-10 μL jarri.
- 3) Elektroforesia martxan jarri. Frontea geletik ateratzen denean edo oso beheran dagoenean gelditu (~35min).
- 4) Proteinen transferentzia egin geletik mintzera. Horretarako Transblot Transfer Pack bat erabiltzen da (Transblot Turbo Transfer Pack, Midi format 0,2 μm PVDF, 170-4157, BioRad). Transferentzia muntaia prestatu eta Transblot tresnaren bidez transferentzia egin.

Behin proteinak mintzera finkatu direla, mintza hainbat disoluzioarekin tratatu eta garbitu egiten da, beti agitazioarekin.

- 1) Mintza 10 minutuz inkubatu PBS 1x-ean.
- 2) Inkubatu mintza Blocking solution-ean 1h eta 40min.
- 3) Garbitu mintza PBS-Tween-ean. 10 minutuko garbiketa bat eta 5 minutuko bi garbiketa egin.
- 4) Lehenengo antigorputzean inkubatu mintza 1h giro tenperaturan edota 4°C-tan gau osoan zehar. Anti-GFP eta anti-TDP-43 erabili dira lehenengo antigorputz bezala, western blot ezberdinetan.
- 5) Garbitu mintza PBS-Tween-ean, 10 minutuko hiru garbiketa eginez.
- 6) Bigarren antigorputzean inkubatu mintza 1h giro tenperaturan. Anti-mouse erabili da bigarren antigorputz bezala lehenengo antigorputz bezala anti-GFP erabili denean, eta anti-rabbit lehenengo antigorputz bezala anti-TDP-43 erabili denean. Bigarren antigorputza peroxidasa entzimarekin konjugatuta dago.
- 7) Garbitu mintza PBS-Tween-ean, 10 minutuko hiru garbiketa eginez.
- 8) Garbitu mintza PBS 1x-ean, 10 minutuko garbiketa baten bidez.

Azkenik, mintzaren errebelatze prozesua egiten da. Errebelatzaile bezala ECL (*Enhanced Chemiluminescent*) erabili da (Clarity Western ECL Substrate, 170-5061, 250mL, BioRad). Errebelatzailea mintzaren gainean zabaltzen eta minutu batez uzten da. Ondoren, argazkia atera daiteke.

