



FACULTAT  
DE CIÈNCIES  
I TECNOLOGIA

UVIC | UVIC·UCC

Treball de Fi de Grau Experimental

CANVIS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE  
LA METILTRANSFERASA *SETD6*  
ASSOCIATS A LA METILACIÓ DEL SEU  
PROMOTOR

LAURA BORRALLO SÁNCHEZ

**Grau en Biotecnologia**

Tutors de l'empresa: Dr. Ignacio Campillo Marcos i Dr. Manel Esteller

Tutora: Dra. Marta Otero Viñas

Vic, Juny de 2021

# Agraïments

Al meu tutor, Ignacio Campillo Marcos, li agraeixo la dedicació, interès i la gran ajuda que m'ha donat per portar a terme aquest treball. Per la paciència i dedicació que ha mostrat envers a mi per poder aprendre tècniques i coneixements d'àmbit científic que no es poden assimilar dins de l'aula. Moltes gràcies de tot cor per aquests tres mesos inoblidables i de gran aprenentatge.

Al meu cotutor, Manel Esteller, per donar-me aquesta gran oportunitat en poder participar dins d'aquest projecte del grup de Recerca *Cancer Epigenetics* de l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras. Gràcies per confiar en mi i donar l'oportunitat a alumnes de pràctiques en formar part del teu grup de recerca per poder aprendre i portar a terme els seus treballs.

Als meus pares i germans. Per ensenyar-me tots els valors de la vida i per fer-me ser qui sóc actualment. Per donar-me suport, guiar-me, animar-me i no deixar que em rendís mai. Sense vosaltres, tot el que he aconseguit fins avui en dia no hagués sigut possible. Us estimo molt.

Als meus amics, tant els de tota la meva vida, com els que he conegut durant aquests quatre anys de carrera. Pel seu suport, per creure en mi i recolzar-me sempre que ho he necessitat. Per aquells moments de desconexió quan eren necessaris. Gràcies per ser la meva segona família.

I finalment, a les meves companyes i amigues de pis. Per haver-me animat, fet costat, escoltat i viscut amb mi tota aquesta etapa. Per donar-nos suport entre totes durant aquests mesos de TFG. Gràcies per fer que tots els moments més difícils d'aquesta etapa universitària fossin més amens.

# Resum

**Títol:** Canvis en l'expressió gènica de la metiltransferasa SETD6 associats a la metilació del seu promotor.

**Autora:** Laura Borrallo Sánchez

**Co-Tutors:** Dr. Ignacio Campillo i Dr. Manel Esteller (Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras)

**Data:** Juny de 2021

**Paraules clau:** B-ALL, metilació, SETD6, Azacitidina

En aquest treball hem realitzat un estudi comparatiu de les diferències d'expressió gènica a nivell d'ARN missatger i a nivell proteic de dues línies cel·lulars de Leucèmia Limfocítica Aguda de tipus B (B-ALL). Una de les línies, REH, presenta metilació al promotor de la metiltransferasa *SETD6* i l'altra, RCH-ACV, no.

D'altra banda, hem tractat aquestes dues línies cel·lulars amb un agent desmetilant, *Azacitidina* (AZA) per veure si es pot recuperar l'expressió gènica de REH a nivell de transcrit i proteic.

Per poder duu a terme aquest estudi, hem analitzat l'expressió del transcrit de *SETD6* amb la tècnica de qPCR on hem observat diferències significatives en l'expressió de transcrit de RCH-ACV, la qual ha sigut major en comparació a REH. En canvi, el tractament amb AZA no ha obtingut diferències significatives de recuperació d'expressivitat de REH.

Quan a l'anàlisi d'expressió proteica de *SETD6*, l'hem realitzat amb la tècnica de Western Blot, on hem observat l'expressió proteica de RCH-ACV i l'absència d'expressió de *REH*. No obstant això, tampoc hem obtingut la recuperació d'expressió de REH amb el tractament d'AZA.

Per tant, és possible que les condicions experimentals emprades en aquest estudi per poder observar una recuperació d'expressió significativa potser no són les òptimes. Punt important a analitzar en detall en futurs projectes. Però sí que hem observat de manera significativa que la hipermetilació del promotor del gen *SETD6* té una afectació a nivell

d'expressió de transcrit i proteic, donant a concloure que la metilació és un factor important determinant de l'expressió de *SETD6*.

# Summary

**Title:** Changes in gene expression of SETD6 methyltransferase associated with the methylation of its promoter.

**Author:** Laura Borrallo Sánchez

**Supervisors:** Dr. Ignacio Campillo Marcos and Dr. Manel Esteller (Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras)

**Date:** June of 2021

**Keywords:** B-ALL, methylation, SETD6, Azacitidine

In this dissertation, we performed a comparative study of the differences in gene expression regarding messenger RNA levels and protein levels of two B-type Acute Lymphocytic Leukemia (B-ALL) cell lines. One of the lines, REH, has methylation to the *SETD6* methyltransferase promoter while the other, RCH-ACV, does not.

On another hand, we treated these two cell lines with a demethylating agent, Azacitidine (AZA) in order to see if REH gene expression can be restored at the transcript and protein level.

To be able to carry out this study, we analyzed *SETD6* transcript expression with the qPCR technique where we observed significant differences in RCH-ACV transcript expression, which has been greater in comparison to REH. To the contrary, treatment with AZA did not result in significant differences in terms of REH expressiveness recovery.

Regarding the *SETD6* protein expression assay, we performed it with the Western Blot technique, where we observed RCH-ACV protein expression and the absence of REH expression. However, we also did not achieve recovery of REH expression with AZA treatment.

Therefore, it is possible that the experimental conditions used in this study, in order to observe a significant recovery of expression, have not been optimal. Important point to analyze in detail in future projects. However, we have significantly observed that

hypomethylation of the *SETD6* gene promoter influences on transcriptional and protein expression, concluding that methylation is an important determinant of *SETD6* expression.

# Abreviatures

<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>ARN</b>	Àcid ribonucleic
<b>ARNm</b>	ARN missatger
<b>AZA</b>	<i>Azacitidina</i>
<b>B-ALL</b>	Leucèmia Limfocítica Aguda de tipus B
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid
<b>C</b>	Base nitrogenada Citosina
<b>cDNA</b>	ADN complementari
<b>Ct</b>	Cycle Threshold
<b>DNAsa</b>	Desoxiribonucleasa
<b>DNMT1</b>	ADN metiltransferasa 1
<b>DNMT3a i 3b</b>	ADN metiltransferasa 3a/b
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleòsid trifosfat
<b>FBS</b>	Sèrum Boví Fetal
<b>HRP</b>	Immunobulon HRP Substrate
<b>HSC</b>	Cèl·lules mare hematopoètiques
<b>lncARN</b>	ARN llarg no codificant
<b>Lys</b>	Aminoàcid Lisina
<b>miARN</b>	Micro ADN
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RNAsa</b>	Ribonucleasa

**RPMI**

Roswell Park Memorial Institute medium

**RT**

Retrotranscripció

**WT**

Wild Type



# Índex de continguts

<b>Resum</b> .....	<b>2</b>
<b>Summary</b> .....	<b>4</b>
<b>Abreviatures</b> .....	<b>6</b>
<b>Índex de Figures</b> .....	<b>10</b>
<b>Índex de Taules</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Introducció</b> .....	<b>13</b>
1.1 Leucèmia Limfocítica Aguda de tipus B (B-ALL).....	13
1.2 Regulació de la expressió gènica.....	15
1.2.1.1 Metilació.....	19
1.2.1.1.1 Domini SET contenenent 6 proteïnes lisina metiltransferasa (SETD6).....	20
<b>2 Hipòtesi i Objectius</b> .....	<b>22</b>
<b>3 Metodologia</b> .....	<b>23</b>
3.1 Cultius Cel·lulars.....	23
3.2 qPCR.....	25
3.2.1 Extracció del ARN.....	25
3.2.2 Retrotranscripció del ARN .....	26
3.2.3 Preparació de la placa de qPCR.....	27
<b>3.3 Western Blot</b> .....	<b>28</b>
3.3.1 Lisis per extracció de proteïnes .....	28
3.3.2 Electroforesis i transferència a la membrana.....	28
<b>4 Resultats i discussió</b> .....	<b>30</b>
4.1 La línia RCH-ACV creix més ràpid en comparació a la línia REH. ....	30
4.2 La quantitat de transcrit és major en la línia RCH-ACV en comparació a la línia REH. ....	32
4.3 La proteïna SETD6 de la línia cel·lular REH no s'expressa a nivell proteic. ....	37
<b>5 Conclusions</b> .....	<b>41</b>
5.1 Limitacions i millores a realitzar en projectes futurs.....	42
<b>6 Bibliografia</b> .....	<b>43</b>
<b>Annex A</b> .....	<b>47</b>
Protocol de quantificació cel·lular.....	47
Protocol de canvi de medi i AZA en cèl·lules que porten 48h de tractament d'AZA	49
Protocol de congelació de les cèl·lules en cultiu en forma de pellet.....	50

Protocol d'extracció d'ARN de la mostra .....	51
Protocol de retrotranscripció de l'ARN.....	53
Protocol de preparació de la placa per qPCR .....	55
Protocol de lisis per extracció de proteïnes pel Western Blot .....	57
Protocol d'Electroforesis i transferència a la membrana.....	59

# Índex de Figures

<b>Figura 1</b> Diferències entre una cèl·lula sana i una leucèmica.....	14
<b>Figura 2</b> Estructura molecular de la cromatina (Azuara et al., 2006) .....	16
<b>Figura 3</b> Interacció de l' <i>Enhancer</i> i l' <i>Insulator</i> amb conseqüència de l'activació o inhibició del promotor (Maksimenko et al., 2006).....	18
<b>Figura 4</b> Esquema representatiu de l'amplificació de la qPCR aplicada per les nostres mostres .....	27
<b>Figura 5</b> Imatge captada del flasc de creixement de la línia cel·lular RCH-ACV en un microscopi òptic invertit a un augment de 10X.....	30
<b>Figura 6</b> Imatge captada del flasc de creixement de la línia cel·lular REH en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X.....	30
<b>Figura 7</b> Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular RCH-ACV en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X sense el tractament d'AZA (WT) a les 48h.....	31
<b>Figura 8</b> Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular RCH-ACV en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X amb el tractament d'AZA a les 48h.....	31
<b>Figura 9</b> Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular REH en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X sense el tractament d'AZA (WT) a les 48h.....	31
<b>Figura 10</b> Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular REH en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X amb el tractament d'AZA a les 48h.....	31
<b>Figura 11</b> Gràfic dels cicles transcorreguts per amplificar el cDNA de <i>SETD6</i> i de <i>GAPDH</i> .....	32
<b>Figura 12</b> Comparació de l'expressió d'ARN missatger del gen <i>SETD6</i> de les dos línies cel·lulars sense tractament.....	34

<b>Figura 13</b> Representació de la relativització de la línia cel·lular no metilada RCH-ACV amb condició de tractament amb AZA respecte al seu WT.....	35
<b>Figura 14</b> Representació de la relativització de la línia cel·lular metilada REH amb condició de tractament AZA respecte al seu WT.....	36
<b>Figura 15</b> Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna <i>SETD6</i> en la línia cel·lular no metilada RCH-ACV i en la línia cel·lular WT metilada REH.....	37
<b>Figura 16</b> Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna <i>SETD6</i> en la línia cel·lular no metilada RCH-ACV amb tractament d'AZA i sense (WT).....	38
<b>Figura 17</b> Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna <i>SETD6</i> en la línia cel·lular metilada REH amb tractament d'AZA i sense (WT).....	39

# Índex de Taules

<b>Taula 1</b> Components de la <i>Mastermix</i> utilitzada per la transcripció reversa.....	26
<b>Taula 2</b> Càlcul per trobar la concentració cel·lular a partir de la quantificació amb la Càmera de Neubauer .....	48
<b>Taula 3</b> Components de la <i>Mastermix</i> per fer RT .....	53
<b>Taula 4</b> Distribució de les mostres a la placa qPCR .....	55
<b>Taula 5</b> Dilució seriada per la recta patró de BCA .....	57
<b>Taula 6</b> Distribució de la carrega de mostres al gel d'acrilamida .....	61

# 1. Introducció

## 1.1 Leucèmia Limfocítica Aguda de tipus B (B-ALL)

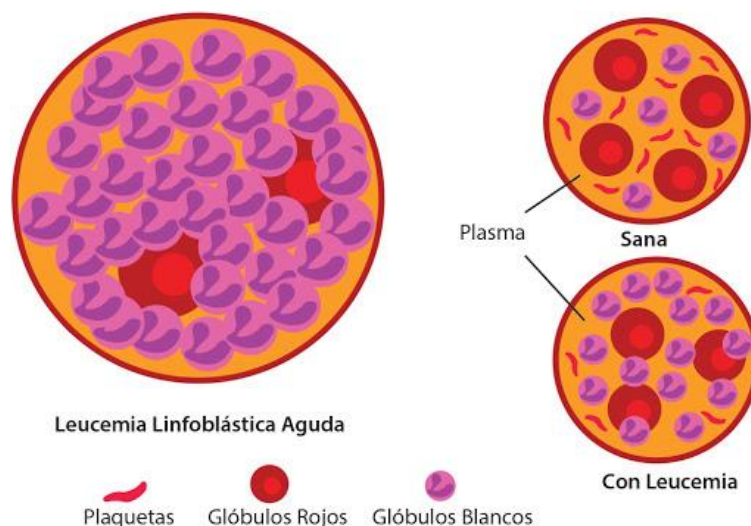
La leucèmia, en general, és un tipus de càncer que afecta a les cèl·lules sanguínies. Es basa en una hiperproliferació descontrolada de cèl·lules sanguínies no diferenciades que acaben convertint-se en cèl·lules tumorals (An et al., 2017).

Existeixen diferents tipus de leucèmia, les quals es divideixen basant-se en el seu ràpid creixement (aguda) o un creixement més lent (crònica) i de si s'inicien en cèl·lules mieloides (cèl·lules que s'acaben diferenciant a cèl·lules del sistema immune innat) o limfoides (cèl·lules que s'acaben diferenciant a cèl·lules del sistema immune adaptatiu) (Greaves, 2004).

Pel que fa a la leucèmia mieloide aguda (LMA), és un tipus de malaltia clonal heterogènia causada per la transformació maligna de cèl·lules mare hematopoètiques (HSC), més concretament els blasts, que són cèl·lules immadures amb pèrdua de capacitats de diferenciació i proliferació. Donant com a conseqüència patologies causades per infeccions com hemorràgies o infiltracions a òrgans (Estey & Döhner, 2006). La presència d'aquestes diverses alteracions genètiques que tenen les cèl·lules mieloides fa que s'alterin els mecanismes normals de diferenciació, proliferació i autorenovació cel·lular. Donant com a conseqüència una acumulació de precursors mieloides immadurs a la medul·la òssia amb una capacitat de replicació no controlada. Fent que siguin incapaços de poder-se diferenciar a cèl·lules hematopoètiques madures. D'aquesta manera, l'espai medul·lar estarà ocupat per cèl·lules tumorals immadures impeding el procés d'hematopoesis normal (Bacher et al., 2010).

Centrant-nos més en l'altre tipus de leucèmia existent, Leucèmia Limfocítica Aguda (ALL), és una malaltia heterogènia causada per una alta proliferació i acumulació de cèl·lules limfoblàstiques (limfòcits o glòbuls blancs) no diferenciades, els quals anomenem limfoblasts, a la medul·la òssia, sang de la perifèria i teixits limfàtics i no limfàtics. (Medinger et al., 2019). Consisteix en un augment anormal dels limfoblasts (cèl·lula immadura que acabarà diferenciant-se a limfòcit). Aquests limfoblasts no evolucionen a ser limfòcits madurs, els quals podem diferenciar els limfòcits T (reconeixen, responen i recorden els antígens) i els limfòcits B (protecció del cos gràcies

a la producció d'anticossos) fent que siguin incompetents a l'hora de portar a terme les seves accions immunològiques innates. Aquesta malaltia es produeix quan HSC presenta mutacions al seu genoma. L'ADN de les HSCs té gens activadors de proteïnes de proliferació a un ritme regulat i una apoptosi en un moment donat quan la cèl·lula diferenciada de la HSC ja ha fet la seva acció, cosa que no serà així amb mutacions al genoma de les HSC. Aquestes mutacions faran que les cèl·lules limfoblàstiques immadures procedents de les HSC continuïn creixent i proliferant desreguladament. Això, causa una desregulació a l'hematopoesis, a més de la formació d'aquests limfoblasts, que no arribaran a madurar per diferenciar-se a limfòcits, fent que no tinguin les funcions adequades que haurien de tenir i puguin proliferar cap a cèl·lules sanes (Tremblay et al., 2010).



**Figura 1. Diferències entre una cèl·lula sana i cèl·lula amb leucèmica.** La cèl·lula sana presenta una varietat normal de cèl·lules sanguínies mentre que la cèl·lula amb leucèmia presenta un excés de glòbuls blancs. (2. *¿Qué Es La Leucèmia Linfoblàstica Aguda?* | AEAL, n.d.)

La Leucèmia Limfocítica Aguda de tipus B (B-ALL) és un tipus de leucèmia atípica de creixement ràpid que s'origina a les formes immadures dels limfòcits i que afecta normalment a menors de 20 anys d'edat (58,8% dels casos són del rang d'aquesta edat) (Katz et al., 2015). Com s'ha explicat anteriorment, aquesta malaltia s'origina a la medul·la òssia (en concret, a la zona de l'os on es porta a terme l'hematopoesis). En aquest subtipus de leucèmia, concretament afecta als limfòcits B, fent que perdin la

capacitat de maduració i impedit portant a terme la seva funció immunològica. Aquesta conseqüència acabarà afectant als altres tipus cel·lulars sanguinis, provocant una disminució d'ells i causant patologies greus (Gowda & Dovat, 2013).

## 1.2 Regulació de la expressió gènica

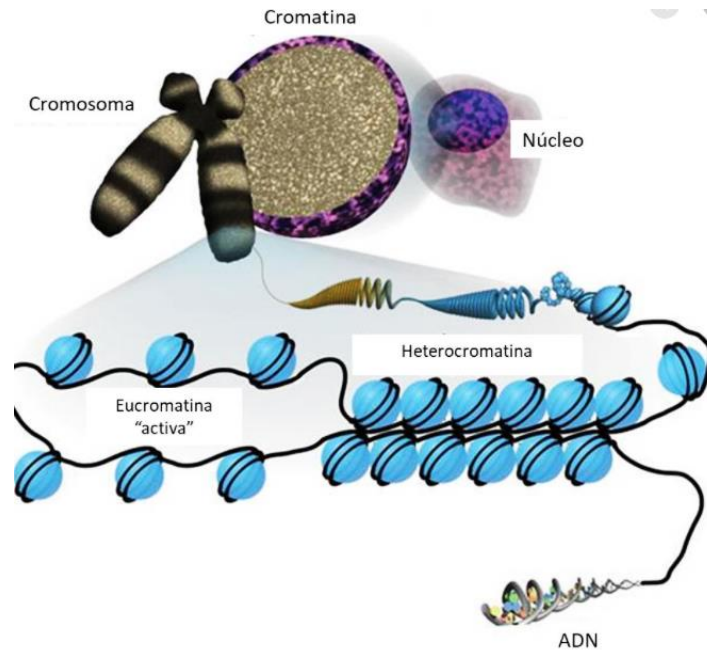
Al nostre genoma tenim un sistema de regulació gènica el qual, consisteix en un procés d'activació i desactivació dels gens que formen part d'aquest. Aquest mecanisme ens assegura que els gens apropiats s'expressin en el moment adequat i acabin donant un producte funcional. Aquest conjunt de gens expressats i inhibits són els que acaben determinant el conjunt d'ARN i proteïnes que contenen les cèl·lules, fent que es puguin diferenciar els diferents tipus cel·lulars o les diferents funcions dels elements del genoma. Cada tipus tindrà una regulació diferent, i d'aquesta manera es podran diferenciar. Es porta a terme a partir de diferents mecanismes en els quals intervenen elements reguladors com els promotors, silenciadors, *insulators*, *enhancers*, factors de transcripció, factors epigenètics, etc. (16.4 Regulación de Genes de Transcripción Eucariota - Biología / OpenStax, n.d.). En aquest procés de regulació també hi intervenen els potenciadors, que són regions distants de l'ADN que es poden moure per interactuar amb el promotor del gen. Aquests serien els *insulators* i *enhancers* (Reményi et al., 2004). Si el promotor no s'activa, el gen no pot ser transcrit, de manera que no s'obtindrà una molècula funcional d'aquest gen.

Els patrons d'expressió gènica vénen determinats per la informació intramolecular i extramolecular del genoma. Alguns gens, els quals anomenem *Housekeeping Genes*, s'expressen en gairebé totes les cèl·lules, de manera que necessiten una xarxa reguladora que els mantingui actius (Eisenberg & Levanon, 2013).

En el cas de les cèl·lules eucariotes, aquests patrons impliquen moltes regulacions a diferents nivells de control del genoma.

La cromatina és la forma en la qual s'organitza l'ADN amb les histones. L'accessibilitat d'aquesta, és on entra la regulació epigenètica, la qual parlarem més endavant. Quan la cromatina està en forma d'heterocromatina (condensada), impedeix que sigui accessible per poder passar al pas de transcripció. O bé, pot estar en forma d'eucromatina (relaxada) permetent el pas de transcripció (Li & Zhu, 2015).





**Figura 2. Estructura molecular de la cromatina.** Forma física quan es troba activada (eucromatina) i forma física quan es troba inactiva (heterocromatina (Azuara et al., 2006).

De manera que, un altre enfocament important a tenir present és la transcripció. Consisteix en el pas de ADN a ARN. Aquest pas és un punt regulador clau per molts gens, atès que, les proteïnes anomenades factors de transcripció, s'uneixen a seqüències específiques de l'ADN o pròximes a un gen i activen o reprimeixen la transcripció a ARN. Seguidament també s'enfoquen amb el processament de l'ARN, ja que, és quan es porta a terme el tall i unió i l'addició de les cues poly(A) a les molècules d'ARN, i aquestes poden ser regulades. Es poden produir diferents tipus d'ARNm del mateix ancestre pre-ARNm pel procés anomenat entroncament alternatiu (obtenció de diferents molècules d'ARN compostes de diferents exons, que són regions del gen que no se separen de l'ARN madur i per tant, són els que contenen la informació per poder produir la proteïna codificada per aquell gen) (Grabowski & Black, 2001). L'estabilitat d'aquest ARN també està molt regulada pel fet que, durant el transcurs d'aquesta molècula de ARNm al citosol, està afectada per diferents ARN reguladors anomenats miARN. Aquests s'uneixen a l'ARNm impedit que s'acabi traduïnt a proteïna.

I finalment, el pas de traducció, que consisteix en el pas d'ARN a proteïna el qual també està altament regulat, ja que, la traducció d'aquest ARNm pot augmentar o inhibir-se per proteïnes reguladores com ja s'ha explicat anteriorment amb els miARN. Per tant, l'activitat d'una proteïna està sotmesa a moltes modificacions per ser regulades i d'aquesta manera, afectar a la seva activitat i comportament. (Stamm et al., 2012). Així doncs, depenent de quin gen ens enfoquem, s'expressarà o no en funció de l'ambient en el que es troba. D'aquesta manera, es poden diferenciar les diferents cèl·lules i proteïnes que tenim al nostre cos, per la regulació no només de l'ADN, sinó també de l'ARN, les histones o altres proteïnes.

Moltes patologies estan associades a mutacions que es poden produir a diferents nivells d'aquesta regulació gènica. Ja sigui a nivell molecular, fent que hi hagi una afecció a l'estructura química dels gens (a les bases nitrogenades de l'ADN), a nivell cromosòmic, afectant a l'estructura del gen, o a nivell genòmic, afectant al conjunt del genoma. Una mutació que afecti l'estructura física de la cromatina pot alterar el patró d'expressió gènica i per aquest motiu, cada cop s'està estudiant més les diferents regulacions del nostre cos, atès que s'ha vist que moltes patologies tenen una gran relació amb aquest ambient (Sudmant et al., 2015).

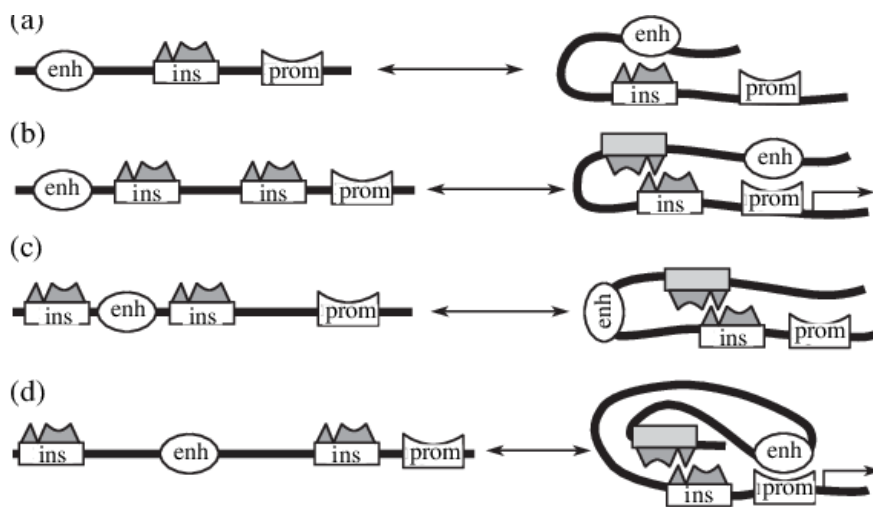
### **1.2.1 Epigenètica**

L'epigenètica consisteix en canvis hereditaris del fenotip sense alterar la seqüència de l'ADN (genotip) (Nebbio et al., 2018). Aquestes modificacions de les molècules que regulen la funció, localització i l'estabilitat dels elements diana dels gens estan aplicades a la modificació de les histones i de l'ADN.

Pel que fa a les modificacions covalents de les histones, són un dels mecanismes reguladors que modulen l'estructura de la cromatina, fent que estigui més o menys accessible als factors que han d'intervenir per poder transcriure, replicar, recombinar i reparar l'ADN de les cèl·lules (Wang et al., 2016). Aquestes funcions són bàsiques pel cicle cel·lular, creixement cel·lular i la apoptosi.

I per altra banda, les modificacions que es produeixen a l'ADN, on sobretot afecten al promotor dels gens, que és la regió de l'ADN que promou l'inici de la transcripció d'una determinada zona d'ADN. Pot estar directament afectat el promotor o altres elements que

formen part d'aquesta iniciació de transcripció, com són els *enhancers*. Aquests, són regions de l'ADN distants al promotor que fan augmentar els nivells de transcripció d'un gen a partir de la unió amb factors de transcripció (proteïnes). Uns altres mediadors són els *insulators* o CTCFs. Són complexos d'ADN i proteïnes no funcionals, però dianes de proteïnes específiques que s'encarreguen d'impedir la comunicació entre l'*enhancer* i el promotor, fent de barrera entre regions actives i inactives. O els factors de transcripció, que són proteïnes que s'uneixen a certes regions de l'ADN promovent o inhibint la transcripció gènica.



**Figura 3. Interacció de l'enhancer i l'insulator amb conseqüència de l'activació o inhibició del promotor.** (a) L'insulator es troba entre l'enhancer i el promotor d'un gen. El contacte inestable entre ells dos poden evitar que l'enhancer s'aproximi al promotor i no activant-lo. (b) Veiem dos insulators entre l'enhancer i el promotor del gen. L'aïllament es neutralitza perquè hi ha contacte estable entre els insulators, facilitant la proximitat entre l'enhancer i el promotor. (c) Dos insulators envolten de prop l'enhancer d'un gen. Aquests dos insulators interactuen entre ells i l'enhancer es troba dins del bucle resultant, no podent activar el promotor, que es troba llunyà del bucle i per tant, lluny del enhancer. (d) Dos insulators envolten l'enhancer d'un gen i estan separats entre ells per una seqüència llarga. Com a la c, podem veure l'enhancer dins del bucle resultant de la interacció dels dos insulators, però aquest cop, a mesura que s'augmenta la interacció entre els insulators, més pròxim es troben l'enhancer del promotor, donant com a resultat una neutralització de la interacció dels insulators i una activació del promotor. (Maksimenko et al., 2006).

### 1.2.1.1 Metilació

La metilació pot produir-se tant a les histones com a l'ADN. Consisteix en l'addició de grups metil ( $\text{CH}_3$ ) provocant, en general, un silenciament gènic. Quan es metilen les histones, la conseqüència que porta és una condensació de la cromatina, fent que els nucleosomes estiguin més pròximes entre ells i la cromatina quedi en forma d'heterocromatina (forma relaxada de la cromatina) i per tant, hi hagi una inactivació transcripcional, un silenciament (Huang et al., 2014). Aquest silenciament pot donar a una repressió d'expressió, o pel contrari, una activació, pel fet que una zona estigui silenciada pot donar com a conseqüència l'activació i expressió d'una altra. Per aquest motiu, tenim metilacions que produeixen la repressió d'expressió o l'activació. La metilació a l'ADN, a part d'alterar les regions del promotor i les seqüències repetides d'ADN, també està associat amb la regulació dels ARN no codificats, que vénen a ser els micro ARNs (miARN), long non-coding ARN (lncARN), etc. Els quals estan involucrats amb rols importants de supressió tumoral. Depenent de quin residu de la histona metili i quin tipus d'histona, ja que, cal aclarir que tenim diferents grups d'histones que són: H1, H2A i H2B, H3 i H4, es produirà una repressió d'expressió gènica o no.

Endinsant-nos més molecularment, la metilació afecta als residus de les citosines (base nitrogenada que forma part de la seqüència d'ADN i ARN) dins de les seqüències CpG que hi ha a l'ADN. Aquestes seqüències s'anomenen Illes CpG i són regions proximals al promotor riques en citosines (Kulis & Esteller, 2010). Aquest procés és reversible i hereditari i hi intervenen diferents molècules encarregades de metilar, que són diferents per les histones i per l'ADN. Un rol molt important és el de l'ADN metiltransferasa 1 (DNMT1). És una proteïna encarregada de mantenir el patró de metilació. Quan es produeix la replicació, els grups metil surten de la zona d'on estan actuant perquè l'ADN polimerasa hi pugui accedir i sintetitzar els gens que estan silenciats. Un cop ja s'ha replicat l'ADN, s'han de tornar a inserir aquests patrons de metilació previs, i aquesta proteïna és l'encarregada de mantenir aquest patró en aquelles zones que sempre s'han de trobar en forma d'heterocromatina. Unes altres proteïnes importants a mencionar i de la mateixa família són les DNMT3a i 3b, que són les encarregades de generar la metilació *de novo*. La cèl·lula original no estava metilada, o no tenia regions metilades i per influències ambientals, aquestes proteïnes metilen zones que no ho estaven.

Aquests patrons de metilació a l'ADN i a les histones poden tornar-se aberrants i les cèl·lules poden arribar a adquirir fenotips malignes durant el procés. Aquesta metilació aberrant s'origina a causa de la pèrdua o guany de diferents proteïnes o enzims involucrats en el procés de metilació, normalment obtinguts per mutacions somàtiques clonals o factors exògens (Blecua et al., 2020). Per tant, aquesta modificació a les histones i l'ADN és un mecanisme molt important per la regulació gènica.

### **1.2.1.1.1 Domini SET contenenent 6 proteïnes lisina metiltransferasa (SETD6)**

Com ja he mencionat anteriorment, un dels enzims que catalitzen aquestes modificacions post-traduccionals són les metiltransferases, i en aquest treball experimental ens centrem en una d'elles, *SETD6*.

*SETD6* és una metiltransferasa que codifica el gen *SETD6* i que es localitza al nucli cel·lular. Aquest enzim és capaç de metilar diferents substrats, com la subunitat RelA del factor nuclear kappa B (NF-kB) a la lisina (Lys) 310, comportant una modificació de la histona mitjançant l'addició d'un o més grups metil a un residu de Lys. Aquest factor es troba a la majoria de les cèl·lules animals i s'encarrega de controlar la transcripció de l'ADN que codifiquen proteïnes involucrades amb respostes immunitàries i de creixement cel·lular (Baldwin, 1996). Per tant provoca una regulació negativa a l'activitat del factor de transcripció NF-kB fent que s'aturi qualsevol procés d'aquest factor. *SETD6* és necessari pel manteniment de l'autorenovació de les cèl·lules mare embrionàries.

En estudis previs s'ha observat que *SETD6* monometila la Lys 7 d'una variant de la histona H2A (*H2AZ*), fent que sigui un factor de senyalització essencial de la cromatina i, a mesura que augmenta aquesta metilació també augmenta la diferenciació de les cèl·lules mare embrionàries.

L'esgotament de *SETD6* en diferents sistemes cel·lulars dificulta significativament l'activació dels gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, via important per la formació òssia i manteniment de l'homeòstasi esquelètica. (Vershinin et al., 2016). S'ha vist que en certs càncers, l'expressió de *SETD6* s'amplifica fins a un 10%, i és necessari per la proliferació cel·lular, tant en cèl·lules normals com canceroses (Binda, 2020).

Així doncs, a partir d'aquí, veiem que *SETD6* té un paper molt important, perquè tal com s'ha explicat anteriorment, és una metiltransferasa, fet que provoca modificacions tant a l'ADN com a les histones. Donant com a resultat un silenciament d'expressió gènica, fent que si s'altera la seva acció normal provoqui fenotips malignes.

En estudis previs bioinformàtics del grup de recerca, van veure que el promotor d'aquesta metiltransferasa d'histones i proteïnes no associades a la cromatina s'hipermetila en diverses línies cel·lulars tumorals i en alguns tipus de càncer, provocant un silenciament transcripcional. Per poder validar aquestes dades hem utilitzat línies cel·lulars tumorals de B-ALL, ja que, algunes estan metilades i d'altres, no. Per aquest motiu, hem escollit un model de cada pel nostre estudi. La línia cel·lular REH que té metilat el promotor, ha sigut un dels dos candidats per l'anàlisi del nostre estudi. L'altre candidat ha sigut la línia no metilada RCH-ACV. A partir d'aquí hem volgut veure com afecta la metilació del promotor de *SETD6* a nivell de missatger (ARN) i a nivell proteic. A més hem decidit utilitzar un agent desmetilant, *Azacitidina*. Aquest agent el que fa és actuar com a anàleg de la citosina (C), incorporant-se a l'ADN o ARN i activant o inhibint gens encarregats de la formació de noves molècules d'ADN (Čihák, 1974). El que fa és substituir la C per una *Azacitidina* (substitueix un carboni de la citosina per un nitrogen), i d'aquesta manera inhibeix la metilació de l'ADN (*AZACITIDINA VIDAZA? (Celgene)*, n.d.). Aquest mecanisme s'ha vist reflectit en estudis previs, on han pogut observar que aquest anàleg a la pirimidina (bases nitrogenades C i T) (Siddiqui & Scott, 2005) causa efectes citotòxics directes a les línies cel·lulars hematopoètiques que tenen una taxa de proliferació anormal fent que hi hagi una bona resposta a les cèl·lules alterades (Sullivan et al., 2005). Per aquest motiu, hem volgut comprovar per una part, si l'expressió del gen *SETD6* a les dues línies cel·lulars és diferent significativament, pel fet que una presenta metilacions i l'altra no (Stresemann & Lyko, 2008). I per altra part, hem volgut estudiar si el tractament amb AZA promou la desmetilació del promotor donant com a resultat la recuperació de l'expressió de *SETD6* a nivell d'ARN i de proteïna.

## 2 Hipòtesi i Objectius

La metilació és un factor important en l'expressió gènica. Si està negativament regulat pot tenir conseqüències danyoses per les cèl·lules. Per poder validar això hem analitzat experimentalment les diferències d'expressió del gen *SETD6* en una línia cel·lular metilada i en una no metilada de B-ALL. Per analitzar la nostra hipòtesi, els objectius d'aquest treball experimental han sigut els següents:

- Demostrar que l'expressió gènica de *SETD6* és dependent de la metilació del seu promotor. La línia metilada REH no ha d'expressar *SETD6* i la línia no metilada RCH-ACV ha d'expressar *SETD6*.
- Mirar si el tractament amb l'agent desmetilant *Azacitidina* (AZA) fa possible recuperar l'expressió de *SETD6* a la línia cel·lular inicialment metilada (REH).

## 3 Metodologia

### 3.1 Cultius Cel·lulars

Com s'ha mencionat anteriorment, hem treballat amb dues línies cel·lulars de B-ALL cultivades en suspensió. Una té el promotor del gen *SETD6* metilat (REH) i una altra on el promotor del gen *SETD6* no està metilat (RCH-ACV). Primerament hem cultivat aquestes cèl·lules en flascs de cultiu amb medi RPMI 1640 1X suplementat amb sèrum boví fetal (FBS), que conté tots els nutrients i factors de creixement necessaris per mantenir les cèl·lules en cultiu. A majors, li hem afegit una barreja d'antibiòtics de Streptomycina i Penicilina a 100X per prevenir la possible contaminació. El volum total de medi i cèl·lules ha sigut de 20 mL (volum que hem assignat, ja que s'adequava a les nostres necessitats).

Posteriorment hem realitzat una quantificació cel·lular amb la Càmera de Neubauer per poder partir amb el mateix número de cèl·lules de cada línia cel·lular en cada experiment. Per poder quantificar primerament hem extret tot el volum de cèl·lules amb el medi i les disgreguem i a partir d'aquí, hem fet una dilució 1:2 i hem passat el volum indicat a un *ependorf* on li hem afegit el colorant Blau de Tripà. Aquest colorant només és capaç de penetrar dins les cèl·lules mortes perquè tenen la membrana danyada i per tant hem pogut diferenciar les cèl·lules vives de les mortes (aquestes presenten coloració blavosa) i realitzar la quantificació cel·lular amb la Càmera de Neubauer.

A partir de la quantificació i els càlculs fets, hem volgut sembrar de  $2 \cdot 10^6$  cèl·lules en dos flascs de volum més petit per poder separar les cèl·lules tractades amb AZA i les no tractades (WT) de cada línia cel·lular, obtenint un total de quatre flascs. Als dos flascs de les línies cel·lulars, on hem volgut posar el tractament, li hem afegit una concentració  $1 \mu\text{M}$  d'AZA (concentració inicial era de  $1\text{mM}$  i l'hem diluït 1/1000). A part d'aquests quatre flascs, hem deixat un flasc amb volum major per cada línia cel·lular en creixement i manteniment de la línia, on hem anat mirant la seva confluència freqüentment perquè no arribi al 100%, atès que és negatiu pel creixement cel·lular una confluència tan alta i s'ha anat diluint per poder mantenir-les en un bon creixement. (*Vegeu Annex A del protocol*).



Un cop hem afegit l'AZA als dos flascs, hem canviat el medi i l'AZA d'aquests flascs a les 48h i a les 72h (fi del tractament), ja que, l'AZA el que fa és incorporar-se a la citosina fent que hi hagi una estabilització a partir d'un enllaç covalent entre els àtoms del carboni 6 de l'anell de la C i l'enzim, fent que es bloquegi la funció de l'ADN metiltransferasa, i donant com a conseqüència, la pèrdua de la metilació durant la replicació de les cèl·lules (Sullivan et al., 2005). Si no canviem aquest medi amb el tractament no ens assegurem que totes les cèl·lules adquireixin el tractament, ja que, quan es repliquen les cèl·lules, aquestes noves no tenen el tractament, perquè durant la replicació, la metilació desapareix i després tornar a incorporar-se gràcies a la DNMT1 i per tant, aquestes cèl·lules noves no tindran l'exposició al tractament d'AZA i per això a les 48h (temps calculat de replicació de les línies cel·lulars) se li ha tornat a afegir perquè el tractament actui també a les noves cèl·lules replicades. A més, l'AZA en estat líquid és molt més inestable en comparació a estat pols i per tant, a mesura que es van replicant les cèl·lules, aquelles noves no tindran el tractament d'AZA incorporat i no podrem confirmar el tractament. El tractament finalitza a les 72h, que és quan s'espera que totes les cèl·lules (tant les replicades com les inicials) han introduït el tractament d'AZA i aquest ha pogut actuar.

Per realitzar aquest canvi de medi i AZA a les 48h el que hem fet és concentrar totes les cèl·lules fent una centrifugació i hem tret el sobrenedant (que conté el medi i AZA) i li hem afegit 10 µL d'AZA (que equival a una concentració de 1 µM) i 10 mL de medi. Un cop havien passat les 72h, hem congelat les cèl·lules tractades i les no tractades (WT) de les dues línies cel·lulars en forma de pellets a congeladors de -80°C per poder realitzar a posteriori els experiments desitjats amb elles.

Per poder guardar-les en forma de pellet el que hem fet ha sigut centrifugar les cèl·lules per poder-les concentrar i descartar el sobrenedant, que conté el medi i el tractament, en el cas de les cèl·lules tractades, i després hem fet un rentat amb PBS a un pH de 7.2 a 1X per poder extreure les restes de medi i tractament que podien quedar. Seguidament les hem centrifugat per poder extreure el sobrenedant de PBS i finalment, les hem congelat a congeladors de -80°C. (*Vegeu Annex A del protocol*).

Per poder analitzar bé l'experiment, hem realitzat triplicats biològics d'aquestes mostres, de tal manera que hem de repetir aquest procediment a partir dels dos flascs de manteniment i creixement cel·lular de les dues línies cel·lulars dues vegades més,

obtenint al final tres replicats biològics de la mateixa mostra per veure si els resultats varien o no i per poder veure si són reproduïbles.

## 3.2 qPCR

Per poder observar la diferència d'expressió a nivell d'ARNm, una tècnica adequada per analitzar-ho és la qPCR. Consisteix en una PCR a temps real, la qual, a mesura que es va avançant els cicles, es va detectant les molècules que es van produint. Cosa que en el nostre cas, veiem l'amplificació del cDNA del gen *SETD6* de la línia metilada REH i de la línia no metilada RCH-ACV. Ens interessa saber a quin cicle s'ha començat a amplificar el cDNA ja que ens informa de la quantitat de cDNA, que tenim de cada línia cel·lular i també de la diferència amb el tractament (AZA) i sense el tractament (WT).

### 3.2.1 Extracció del ARN

Per poder realitzar aquesta tècnica, el primer pas que hem fet és extreure l'ARN de les dues línies cel·lulars que tenim congelades al congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Per poder fer aquesta extracció hem utilitzat un kit de la marca comercial *Promega Corporation* anomenat *Maxwell RSC Simply RNA tissue*. Com hem tingut mostres tractades amb AZA i mostres sense, la quantitat d'aigua que li hem afegit a la mostra per poder eluir l'ARN ha sigut diferent, a causa que les mostres sense tractament han tingut més quantitat cel·lular i per això hem posat aproximadament  $50\ \mu\text{L}$  per les mostres WT i  $30\ \mu\text{L}$  per les mostres tractades amb AZA. Com el que hem volgut obtenir ha sigut ARN, no hem volgut obtenir cap molècula d'ADN que interfereixi en els nostres resultats. I per aquest motiu, li hem afegit als tubs del kit la DNasa, que és l'enzim que s'encarrega de degradar les molècules d'ADN per tal de no tenir al final de l'extracció cap molècula d'ADN. L'únic pas que hem realitzat manualment, atès que la màquina d'extracció d'ARN del kit no ho fa, és la lisis de la mostra, la qual hem fet amb un *Homogenization Buffer*. Un cop hem fet l'extracció de l'ARN, hem realitzat una quantificació de cada mostra per saber la concentració que hem obtingut en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , emprat amb l'equipament *Nanodrop*. El *Nanodrop* és un espectrofotòmetre d'UV visible que mesura l'absorbància de les mostres d'ARN a  $260\ \text{nm}$ . L'hem utilitzat per quantificar i valorar la puresa de l'ARN obtingut de l'extracció cel·lular. És necessari saber la concentració i la puresa de les diferents mostres d'ARN a analitzar per realitzar la retrotranscripció a posteriori i tenir un

equivalent de les concentracions de cada mostra perquè no interfereixi en els resultats finals. Com l'ARN és molt inestable, hem guardat les mostres en congeladors de -80°C per la seva màxima conservació fins a fer la retrotranscripció. (Vegeu Annex A del protocol).

### 3.2.2 Retrotranscripció del ARN

Per poder fer la retrotranscripció, hem partit de les concentracions d'ARN que hem obtingut a partir del *Nanodrop*. Hem volgut tenir una concentració de 1µg/µL o 2µg/µL per cada mostra a analitzar, i depenent de la concentració d'ARN que ens hagi sortit a partir del *Nanodrop*, hem fet la dilució corresponent amb aigua destil·lada per acabar obtenint aquesta concentració en totes les mostres de les dues línies cel·lulars. En aquest pas el que es vol fer és passar l'ARN a cDNA ja que, amb la qPCR s'utilitza ADN polimerasa i per tant, aquesta no podrà llegir les cadenes d'ARN. Així doncs, per poder passar aquest ARN a ADN hem utilitzat uns primers (oligoDT) per poder hibridar amb la cua poly(A) dels ARNm i posteriorment, hem deixat a 65°C durant 5 minuts per tal que aquests oligoDT es puguin hibridar bé a l'ARN. A part dels primers, es necessiten més elements perquè la RT es pugui donar. Els que hem utilitzat han sigut:

**Taula 2.** Components de la Mastermix utilitzada per la transcripció reversa.

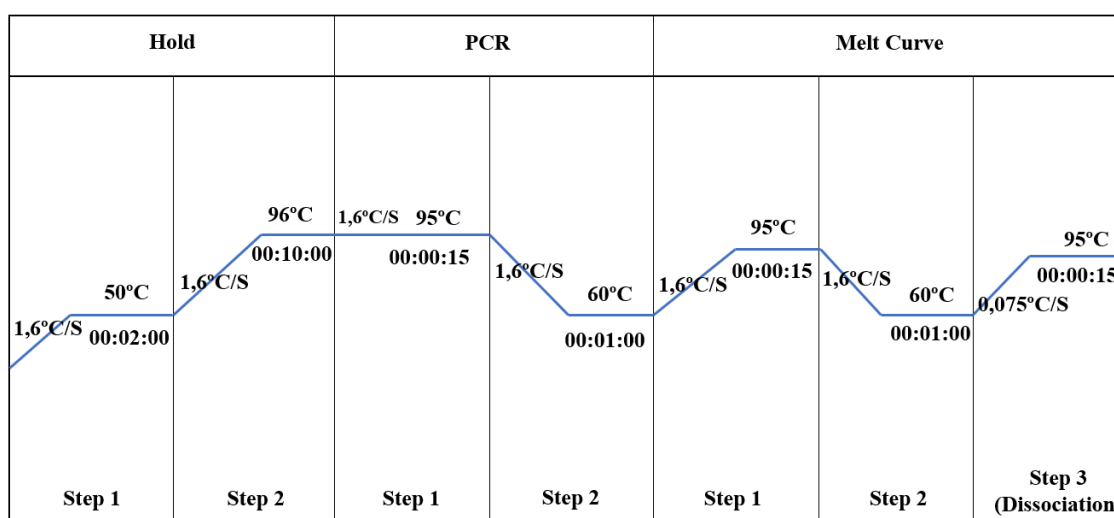
Buffer	Per eluir millor el producte d'interès
Ribolock (inhibidor de RNAsa)	Inhibir les RNAses que degraden les molècules d'ARN
10 mM de dNTPs	Nucleòtids per poder generar la cadena complementaria d'ADN (cDNA)
Revert Aid	Retrotranscriptasa específica

Un cop hem obtingut el nostre ARN, li hem afegit la solució de *Mastermix*, obtenint un volum final de 20µL. Seguidament ho hem posat al termociclador perquè realitzés el

procés de RT. Com ara ja hem obtingut les mostres en forma de cDNA i són més estables, les hem guardat a -20°C. (Vegeu Annex A del protocol).

### 3.2.3 Preparació de la placa de qPCR

A l'hora de fer una qPCR, hem de tenir un gen control que s'expressi sempre, és a dir, un *Housekeeping Gene*, on en el nostre cas hem decidit agafar el gen *GAPDH*. Per tant, a part de posar triplicats tècnics i biològics de cada mostra, també hem hagut de posar triplicats tècnics i biològics per *GAPDH*. Per cada pou on anirà la mostra, hem acabat obtenint un volum final de 10 µL, on 5 µL eren de la mostra diluïda i els altres 5 µL eren de la mix (*SYBR mix* i els primers corresponents pel gen de *SETD6* i per *GAPDH*). Com la concentració de la mostra ha sigut de 2 µg /µL o 1 µg /µL, hem diluït les diferents mostres de manera que hem acabat carregant 5 ng de cDNA per fer la quantificació. A part, hem posat un volum final de 5 µL de *Master Mix*, on, 4,7 µL han sigut de *SYBR mix* (compost de polimerasa, magnesi, *Buffer*, dNTPs i *SYBR Green*) i 0,3 µL dels parells de primers. Hem realitzat els càlculs corresponents de les quantitats que hem hagut de preparar de *Master Mix* per tots els pous i de la dilució corresponent a cada mostra en un *Excel*. Posteriorment d'haver preparat la placa de qPCR, l'hem posat a l'amplificador perquè realitzés un total de 40 cicles i hem analitzat els resultats, els quals s'explicaran més endavant. (Vegeu Annex A del protocol).



**Figura 4.** Esquema representatiu de l'amplificació de la qPCR aplicada per les nostres mostres. L'equip s'ha programat per portar a terme un total de 40 cicles i treballant a un volum final de mostra de 10 µL. S'observa les diferents temperatures aplicades per portar a terme l'amplificació en el temps requerit per poder fer un total de 40 cicles.

### 3.3 Western Blot

També hem volgut analitzar els nivells d'expressió proteica en les dues línies cel·lulars a través de la tècnica de Western Blot. Hme utilitzat aquesta tècnica per identificar l'expressió proteica del gen *SETD6* en la línia cel·lular metilada REH i en la no metilada RCH-ACV.

#### 3.3.1 Lisis per extracció de proteïnes

Per poder fer un Western Blot, necessitem analitzar les proteïnes de la mostra i per tant, hem realitzat una lisis de les mostres de les dues línies cel·lulars amb tractament (AZA) i sense tractament (WT) per poder-les extreure. Per poder fer aquesta lisi, l'hem fet amb un *Buffer* anomenat *RIPA*, el qual li hem afegit inhibidors de proteases per tal que no degradin les proteïnes extretes de la mostra. Per poder saber la concentració precisa de proteïna que hem obtingut a cada mostra, hem realitzat una recta patró amb el kit *Pierce BCA Protein Assay*. El principi d'aquest assaig de BCA el que fa és combinar la reducció de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  per proteïnes en un medi alcalí a partir d'una coloració molt sensible amb el catió  $\text{Cu}^{1+}$  a partir del BCA. Hem realitzat una dilució seriada amb aigua destil·lada per poder fer la recta patró amb BCA i hem posat tres blancs per fer l'anàlisi, que s'han utilitzat per calcular la mitja d'ells i restar-ho a la resta de punts, atès que és la mesura basal que obtenim de l'espectrofotòmetre (no tenim proteïnes a la mostra). Per poder mesurar bé l'absorbància de cada mostra també hem diluït les mostres a 1:10 (dilució que hem escollit aplicar). Finalment hem deixat la placa amb les mostres tractades amb BCA 30 minuts a 37°C perquè pugui reaccionar bé les mostres amb el BCA i ho hem posat en un espectrofotòmetre perquè mesurés l'absorbància de cada mostra. Amb aquestes dades hem realitzat els càlculs posteriors per poder saber quanta quantitat de mostra carregar al gel d'electroforesis. (Vegeu Annex A dels protocols).

#### 3.3.2 Electroforesis i transferència a la membrana

Primerament hem realitzat una electroforesi per poder separar les diferents proteïnes de les mostres per pes molecular (kDa). Hem fet l'electroforesi en un gel del 10%, ja que, la nostra proteïna d'interès *SETD6* té un pes molecular de 53 kDa i la proteïna control que

hem utilitzat, *Lamin B*, té un pes molecular de 67 kDa. Un cop realitzada l'electroforesi per la separació proteica per gradient de pes molecular de les diferents proteïnes de les mostres, hem realitzat la transferència de les proteïnes del gel d'acrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa, on hem fet la reacció de les proteïnes amb els seus anticossos. En el nostre cas hem utilitzat anticossos monoclonals de ratolí pel que fa a l'anticòs del gen *SETD6*. Pel gen control *Lamin B*, l'anticòs monoclonal que hem aplicat és de conill. Per evitar que l'excés d'anticòs primari i secundari interferís en la unió amb la nostra proteïna diana i que no s'unís a altres llocs inespecífics presents de la membrana, el que hem fet és realitzar tres rentats de 10 minuts aproximadament amb PBS pH 7.2 + Tween.

Aquest anticòs secundari té conjugat un enzim que reacciona quan se li afegeix el seu substrat, anomenat *HRP*, donant com a resultat una senyal quimioluminescent, la qual ha sigut detectada a partir d'un revelador i és on hem vist els resultats de l'expressió proteica del nostre gen *SETD6*. (Vegeu Annex A dels protocols).

## 4 Resultats i discussió

### 4.1 La línia RCH-ACV creix més ràpid en comparació a la línia REH.

Tal com s'ha explicat a l'apartat de Metodologia, hem cultivat les dues línies cel·lulars RCH-ACV (línia no metilada) i REH (línia metilada) en dos flascs de creixement per poder mantenir el creixement cel·lular de cada línia i per fer els triplicats biològics (per tant, per poder veure també si les cèl·lules són reproduïbles) on a posteriori les hem utilitzat per fer els experiments amb qPCR i Western Blot.

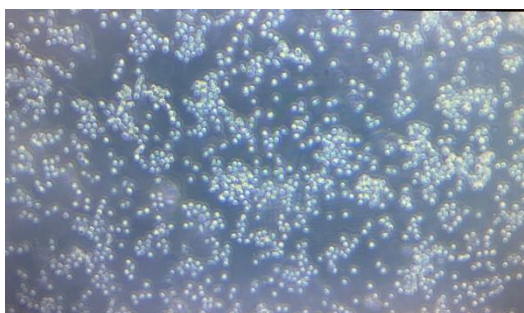


Figura 5. Imatge captada del flasc de creixement de la línia cel·lular *RCH-ACV* en un microscopi òptic invertit a un augment de 10X.

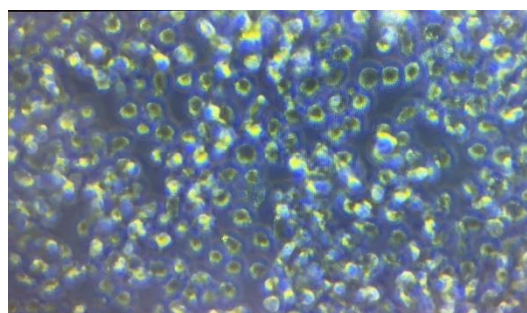
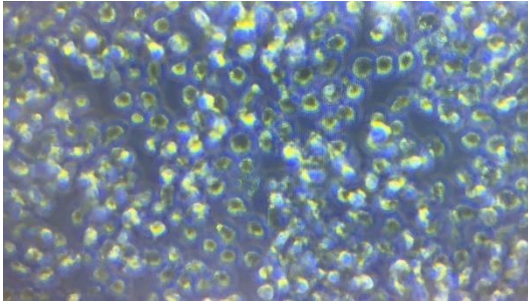


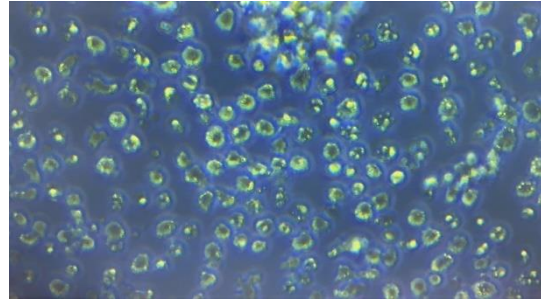
Figura 6. Imatge captada del flasc de creixement de la línia cel·lular *REH* en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X.

Com podem veure a la Figura 5 i a la Figura 6, la línia cel·lular RCH-ACV té una confluència major que la REH després del mateix temps en cultiu. Com la taxa de duplicació de la línia RCH-ACV és relativament menor que la de REH, per poder mantenir aquest creixement cel·lular en un bon ambient per les cèl·lules, hem fet una dilució d'elles perquè la confluència no arribés mai al 100%, on hem aplicat una dilució major a la línia cel·lular RCH-ACV en comparació a la REH, per tal d'obtenir una confluència igualada aproximadament en els dos flascs de creixement cel·lular.

Així doncs, hem pogut comprovar, a partir de l'observació al microscopi del cultiu d'aquestes dues línies cel·lulars, que RCH-ACV ha crescut amb més rapidesa en comparació a REH.

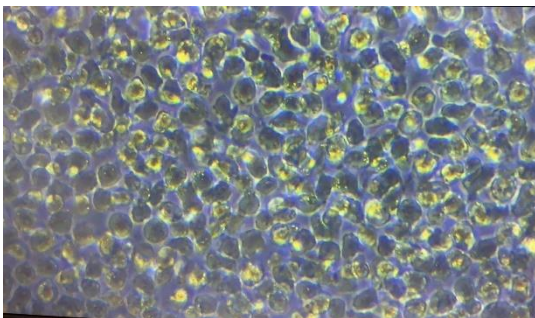


**Figura 7.** Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular *RCH-ACV* en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X sense el tractament d'AZA (WT) a les 48h.

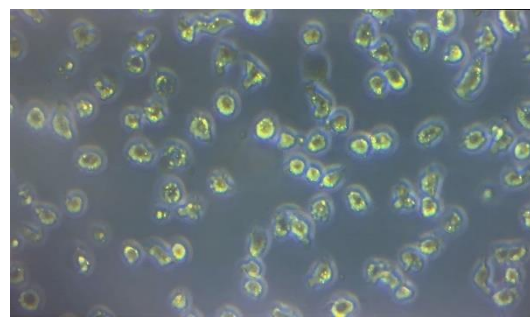


**Figura 8.** Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular *RCH-ACV* en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X amb el tractament d'AZA a les 48h.

Com podem veure a la Figura 7 i a la Figura 8, el tractament d'AZA no ha afectat al creixement cel·lular de la línia *RCH-ACV*, atès que és una línia amb el promotor no metilat i per tant, no té cap afectació a la seva replicació i proliferació, donat que es dona a terme de manera normal. És el resultat que s'ha esperat obtenir, ja que, comparant amb estudis previs (Müller & Florek, 2010), el tractament no ha d'actuar a la línia cel·lular no metilada *RCH-ACV*, ja que, aquesta no presenta cap metilació al promotor del gen *SETD6*. Per aquest motiu, hem pogut veure a partir del microscopi, que no hi ha diferències de creixement cel·lular pel que fa a la línia cel·lular *RCH-ACV* amb tractament d'AZA i sense (WT).



**Figura 9.** Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular *REH* en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X sense el tractament d'AZA (WT) a les 48h.



**Figura 10.** Imatge captada del flasc amb la línia cel·lular *REH* en un microscopi òptic invertit a un augment de 40X amb el tractament d'AZA a les 48h.

Pel que fa a la Figura 9, podem veure la línia cel·lular *REH* sense tractament d'AZA. Aparentment sembla que hi hagi més confluència cel·lular en comparació a la Figura 6. Però això és causat a l'incorrecte sacseig del flasc i també, que s'ha captat la imatge d'una

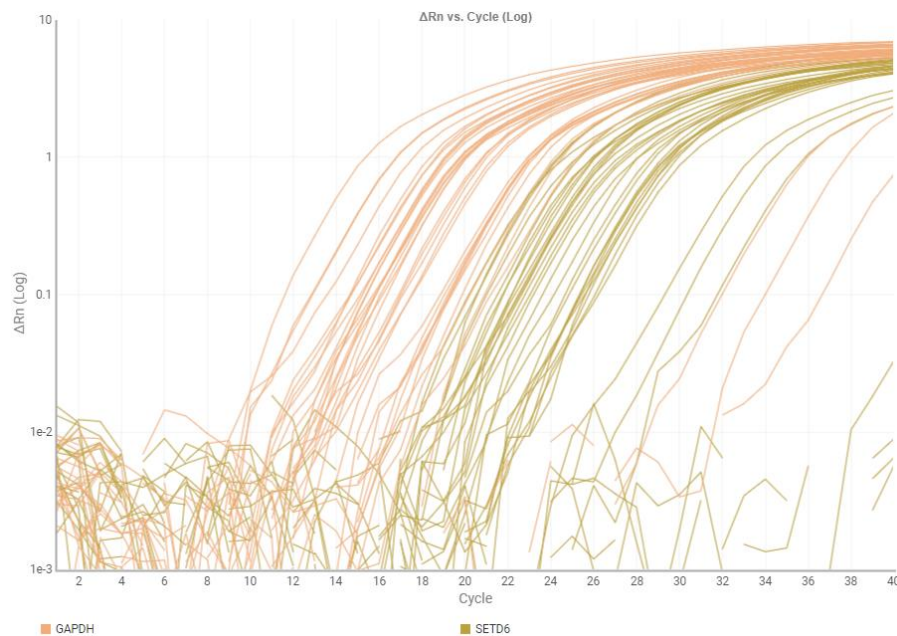


zona on les cèl·lules estaven molt juntes entre elles físicament. En canvi, a la Figura 10, sembla haver-hi aparentment menys confluència cel·lular en comparació a la Figura 9. No ens ha sortit així, ja que, no hem apreciat diferències significatives quant a creixement cel·lular de REH amb AZA i WT. És el que hem esperat obtenir, atès que, tal i com s'ha pogut observar a la Figura 5 i Figura 6, la diferència de creixement cel·lular és significativa quan a RCH-ACV en comparació amb REH, i això es continua mantenint tot i afegir les condicions de tractament amb AZA a les dues línies cel·lulars.

Així doncs, a partir de les diferents figures mostrades, hem pogut veure com el creixement cel·lular de la línia RCH-ACV és major que REH.

## 4.2 La quantitat de transcrit és major en la línia RCH-ACV en comparació a la línia REH.

Un cop hem realitzat l'amplificació a partir de la qPCR, hem utilitzat el programa *Termofisher Scientific* per poder analitzar els resultats obtinguts. A la figura 11 es mostra els resultats obtinguts.



**Figura 11.** Gràfic dels cicles transcorreguts per amplificar el cDNA de *SETD6* i de *GAPDH*. Quantitat mesurada a partir del logaritme del ARN. En color taronja es veu l'amplificació del gen control *GAPDH* a 10 cicles i en color marró es veu l'amplificació del gen d'interès *SETD6* entre 18 i 20 cicles.

Es pot observar que la quantitat de cicles requerida per amplificar el cDNA del gen *SETD6*, indicat en color marró, ha sigut entre 18 i 20 cicles aproximadament i del gen *GAPDH*, indicat en color taronja, de 10 cicles aproximadament. Aquesta gràfica ens mostra que l'amplificació i quantificació s'ha produït degudament, ja que, hem pogut veure que en general, l'amplificació de les mostres del gen *GAPDH* s'ha produït al voltant de 10 cicles i de les mostres del gen *SETD6*, entre els 18 i 20 cicles. És el resultat que s'ha esperat obtenir, perquè tal com s'ha observat en estudis anteriors, la diferència de transcrit causada per la metilació al promotor del gen, provoca una diferència d'expressió de transcrit de la línia metilada en comparació a la no metilada (Yildirim-Buharalioglu et al., 2017).

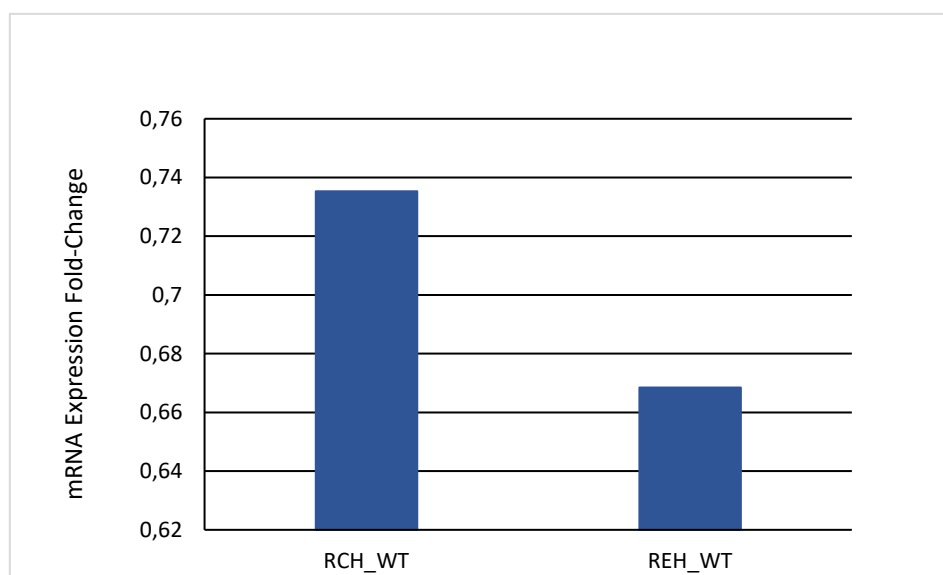
Per tal de poder analitzar de manera més detallada les diferències d'expressió a nivell d'ARN missatger de la línia RCH-ACV i REH, tant en diferències d'expressió per la presència de metilació al promotor de REH, com en la possible recuperació d'expressió d'aquesta mateixa línia a partir del tractament amb AZA, hem realitzat una sèrie de càlculs on comparem el Cycle threshold (Ct), que fa referència al nombre de cicles necessaris per poder amplificar el cDNA per poder assolir un nivell detectable, amb el Ct delta, ja que, ens ha permès que cada objectiu obtingut a la quantificació es quantifiqui de manera individual sense necessitat de patrons de referència. Els càlculs que hem realitzat han sigut els següents:

- **dCt:** Hem fet la mitja dels Ct dels triplicats biològics de cada mostra (per obtenir un sol valor per cada tipus de mostra) i hem calculat la diferència entre el gen d'interès (*SETD6*) amb el gen control (*GAPDH*) de cada mostra diferent de les dues línies cel·lulars.
- **ddCt:** Hem calculat la mitja total dels dCt dels WT del gen *SETD6* obtinguts en el càlcul anterior i hem comparat la diferència de cada dCt respecte a la mitja total dels WT de *SETD6*.
- **$2^{(-ddCt)}$ :** Apliquem la fórmula per poder veure l'increment d'expressió del gen diana (*SETD6*) en comparació al WT. Hem obtingut valors d'expressió directament proporcionals a la quantitat absoluta de transcrit, fent que a més de comparar quantes vegades de més s'expressa *SETD6* respecte al seu control, podem conèixer si el gen *SETD6* de la línia cel·lular RCH-ACV s'expressa més o menys respecte al gen *SETD6* de la línia cel·lular REH per una banda, i si es recupera l'expressió del transcrit a partir del tractament amb AZA en REH.

Els valors del Ct del gen diana (*SETD6*) s'han corregit amb un control endogen *GAPDH* per poder eliminar les possibles variacions degudes a errors de pipeteig, degradació parcial de l'ARN o les diferències d'eficiència de la retrotranscripció a cDNA.

A partir d'aquí, per poder representar i observar de manera visual els canvis d'expressió d'ARN missatger d'un tipus cel·lular i de l'altre, hem relativitzat els WT de les dues línies cel·lulars per poder veure el canvi d'expressió entre elles.

Per poder relativitzar el que hem fet és fer la mitja de la fórmula  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  dels replicats biològics WT de les dues línies cel·lulars, i posteriorment, hem dividit cada valor obtingut de la fórmula (WT i AZA de cada línia cel·lular) entre la mitja de  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  del WT de la seva línia cel·lular corresponent. Finalment hem fet la mitja de la relativització de cada condició en les dues línies cel·lulars (WT per una part i AZA per l'altra) on hem obtingut un número relativitzat a 1. A les figures següents es mostren els resultats obtinguts.

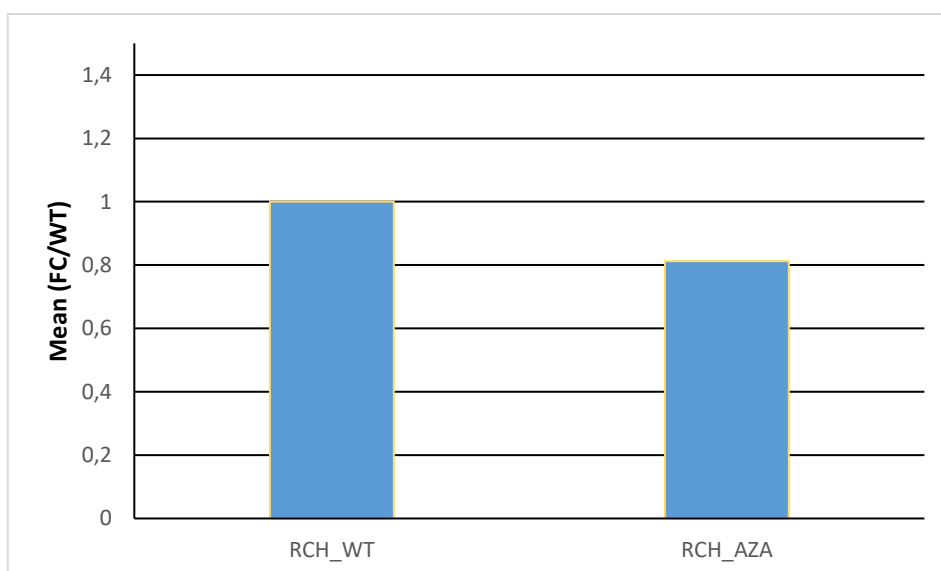


**Figura 12.** Comparació de l'expressió d'ARN missatger del gen *SETD6* de les dos línies cel·lulars sense tractament. A l'eix de les y es representa el  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  i a l'eix de les x, el tipus de mostra que s'està analitzant.

Tal com es pot veure a la Figura 12, hi ha una diferència significativa entre l'expressió d'ARN missatger de la línia RCH-ACV i la línia REH, on hem pogut veure que aquesta diferència es dona en la disminució d'expressió en REH\_WT. És el resultat esperat, ja que, REH\_WT té metilat el promotor del gen *SETD6*, i RCH\_WT no presenta cap metilació al promotor d'aquest gen.

Així doncs, a partir d'aquest resultat hem pogut veure que la metilació al promotor sí que afecta a l'expressió a nivell d'ARN missatger reduint la seva expressió, tal com s'ha afirmat en estudis previs (Yildirim-Buharalioglu et al., 2017). Tot i així, s'hauria de repetir diversos cops aquest experiment per tal de poder determinar quant de significativa és aquesta diferència d'expressió.

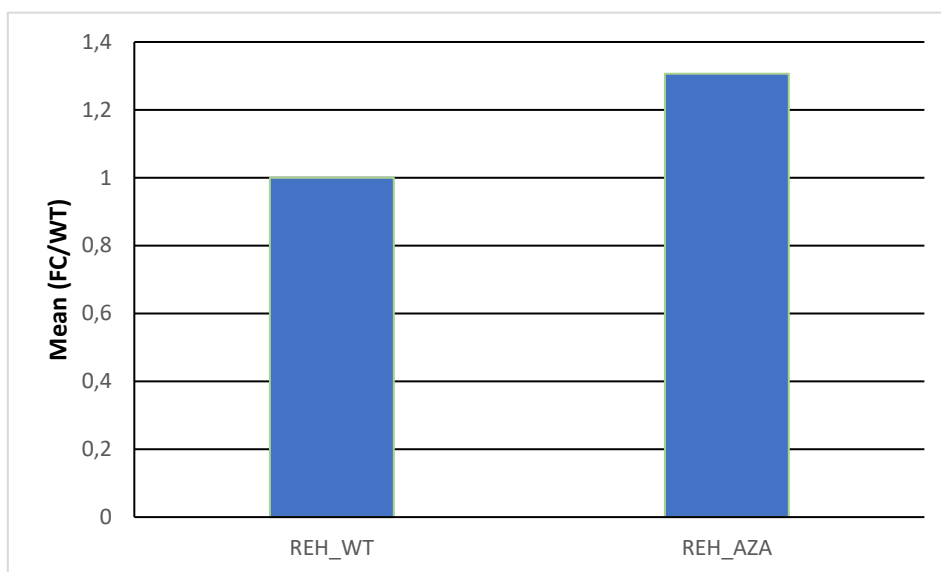
D'altra banda, per tal de poder observar la diferència d'expressió a nivell d'ARN missatger amb el tractament d'AZA i sense (WT) de cada línia cel·lular, el que hem fet ha sigut relativitzar les dues línies cel·lulars amb AZA respecte al WT de cada línia cel·lular (tal com s'ha explicat anteriorment). A la Figura 13 es mostren els resultats obtinguts.



**Figura 13. Representació de la relativització de la línia cel·lular no metilada RCH-ACV amb condició de tractament amb AZA respecte al seu WT.** A l'eix de les y es representa la mitja entre el  $2^{(-ddCt)}/WT$  i a l'eix de les x es representa les mostres que s'estan analitzant.

Com es pot observar a la Figura 13, el WT i l'AZA no han variat molt. WT té una relativització d'1 i l'AZA de 0,81. Cosa que ha de resultar així perquè hem analitzat una línia cel·lular no metilada, i per aquest motiu, l'agent desmetilant AZA no ha d'afectar a l'expressió d'ARN missatger, atès que, no presenta cap metilació al seu promotor (a l'apartat de Metodologia s'ha mencionat com és el mecanisme d'acció d'aquest agent desmetilant), veient doncs, que el resultat obtingut és l'esperat.

A la Figura 14 es mostren els resultats obtinguts en el cas de la línia cel·lular REH.



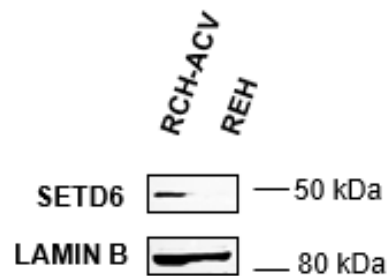
**Figura 14. Representació de la relativització de la línia cel·lular metilada *REH* amb condició de tractament AZA respecte al seu WT.** A l'eix de les y es representa la mitja entre el  $2^{(-ddCt)}/WT$  i a l'eix de les x es representa les mostres que s'estan analitzant.

En aquesta Figura 14 podem veure com REH\_AZA augmenta respecte a WT, amb un número d'1 pel que fa a la relativització de WT i 1,31 el d'AZA. No es pot considerar un augment significatiu, ja que, no hem tingut suficients dades per poder dir que és significatiu. A raó de que hem hagut de descartar un valor perquè s'ha desviat molt en comparació als altres. Per aquest motiu, no hem acabat tenint el mínim de dades per poder calcular la desviació típica.

Tot i que sí que es pot observar que el tractament desmetilant amb AZA ha realitzat un efecte sobre les cèl·lules d'aquesta línia metilada. Fent que es recuperi una mica la seva expressió a nivell transcrit, perquè hi ha hagut un petit augment en comparació al WT. Però no es pot considerar un augment significatiu i per tant, no hem pogut afirmar que l'AZA ha donat l'efecte desitjat de recuperació d'expressió a nivell d'ARN missatger de la línia cel·lular REH (línia amb el promotor metilat).

### 4.3 La proteïna SETD6 de la línia cel·lular REH no s'expressa a nivell proteic.

Després d'haver realitzat els passos previs d'extracció proteica de les diferents mostres, electroforesi, transferència a la membrana i reacció amb anticossos, a la Figura 15 es mostren els resultats d'expressió proteica del nostre gen d'interès, *SETD6*, que s'han obtingut en les dues línies cel·lulars amb tractament d'AZA i sense (WT).



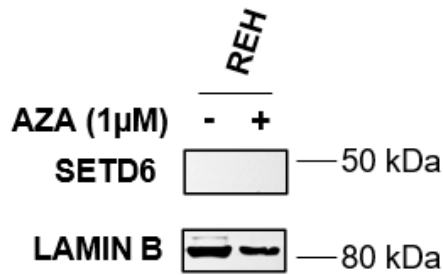
**Figura 15.** Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna *SETD6* en la línia cel·lular no metilada *RCH-ACV* i en la línia cel·lular WT metilada *REH*. L'expressió proteica s'ha analitzat a través de Western Blot. A la esquerra s'indica la mostra a la que pertany cada banda i a la dreta el pes molecular (en kDa) a la que equival la banda. A sobre es dona indicat el tipus de línia cel·lular a la que pertany la proteïna.

Com podem veure a la Figura 15, l'experiment ha funcionat tal com esperàvem, ja que, el gen control *Lamin B* s'ha expressat en totes les bandes i per tant, la reacció de l'anticòs primari i secundari amb la proteïna del gen de *SETD6* ha funcionat adequadament, i la quantitat de mostra ha sigut igual en cada banda de les diferents mostres. Podria ser més precisa, vist que no ha quedat del tot perfecte pel que fa al control, però es pot apreciar que ha anat com s'esperava. Es pot veure una banda pel que fa a *RCH-ACV* i cap banda a *REH*. És el resultat que s'ha esperat obtenir, tal com hem pogut veure en estudis previs (Siraj et al., 2019), una línia no metilada expressa a nivell proteic de manera normal i en canvi, una línia amb el promotor del gen que analitzem metilat, no expressarà a nivell proteic. Per aquest motiu, *RCH-ACV* s'ha d'expressar perquè no té el promotor metilat i *REH* no s'expressa, a raó de la metilació al seu promotor.



**Figura 16.** Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna *SETD6* en la línia cel·lular no metilada *RCH-ACV* amb tractament d'*AZA* i sense (WT). La concentració diluïda del tractament és d'1 µM. L'expressió proteica s'ha analitzat a través de Western Blot. A la esquerra s'indica la mostra a la que pertany cada banda i a la dreta el pes molecular (en kDa) a la que equival la banda. A sobre es dona indicat el tipus de línia cel·lular a la que pertany la proteïna i la banda que pertany a WT (-) i a *AZA* (+).

Tal com s'aprecia a la Figura 16, es pot veure el resultat d'expressió proteica de la línia cel·lular no metilada *RCH-ACV*. Veiem la presència de banda tant amb tractament d'*AZA* com en WT. Tal com s'ha mencionat abans a la Figura 15, es pot veure que l'experiment ha funcionat com s'esperava, ja que, hem obtingut la presència de les bandes del control de *Lamin B* expressades mitjanament correctes pel que fa a la quantitat de mostra carregada, i correctament quant a presència d'expressió proteica. El resultat obtingut ha sigut l'esperat, atès que, hem analitzat la línia cel·lular no metilada, i el tractament no ha d'actuar quan a possible recuperació d'expressió proteica del gen *SETD6* perquè no presenta cap metilació. Podem veure la mateixa banda tant a WT com a *AZA*, veient que sí que s'ha expressat a nivell proteic el gen d'interès *SETD6* en aquesta línia cel·lular.



**Figura 17.** Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna *SETD6* en la línia cel·lular metilada *REH* amb tractament d'*AZA* i sense (WT). La concentració diluïda del tractament és d'1  $\mu$ M. L'expressió proteica s'ha analitzat a través de Western Blot. A la esquerra s'indica la mostra a la que pertany cada banda i a la dreta el pes molecular (en kDa) a la que equival la banda. A sobre es dona indicat el tipus de línia cel·lular a la que pertany la proteïna i la banda que pertany a WT (-) i a *AZA* (+).

En el cas de la Figura 17 es mostra l'expressió proteica del gen *SETD6* de la línia cel·lular metilada *REH* amb tractament d'*AZA* a 1  $\mu$ M i sense (WT). No s'ha observat cap presència de bandes a l'expressió del gen *SETD6* d'aquesta línia cel·lular i en canvi, hem pogut veure que el control utilitzat (*Lamin B*) per comprovar que l'experiment ha funcionat degudament, ja que hem obtingut presència de banda. Pel que fa a la banda de WT (-), l'absència de banda és el que s'ha esperat obtenir, atès que la metilació provoca que no hi hagi expressió a nivell proteic. En canvi, les cèl·lules tractades amb *AZA* (+) el que s'ha esperat obtenir és una recuperació a nivell proteic, ja que, l'agent desmetilant hauria de fer que el promotor no estigui metilat en les cèl·lules replicades i es pugui recuperar l'expressió proteica, cosa que no s'ha pogut aconseguir, a causa que no hi ha hagut presència de banda. Possiblement aquesta falta d'expressió ha sorgit pel fet que les condicions d'*AZA* emprades no han sigut lo suficient òptimes com perquè aquesta línia cel·lular pugui recuperar l'expressió de manera que pugui transcriure i expressar a nivell proteic. Una altra possibilitat és que hi hagi un error mecànic de pipeteig, ja que, com s'ha mencionat anteriorment, la banda de control (*Lamin B*) no ha estat del tot correcta quan a quantitat, així que pot ser un possible factor que influeixi al resultat amb *AZA* d'aquesta línia cel·lular. S'hauria de repetir aquest experiment canviant les condicions del tractament per tal de veure si l'error està en les condicions aplicades pel tractament d'*AZA*.



Analitzant en general les bandes de la Figura 15, Figura 16 i Figura 17, s'ha pogut veure que la metilació sí que altera l'expressió proteica del gen *SETD6*.

## 5 Conclusions

A partir dels diferents resultats obtinguts en aquest treball experimental s'ha pogut arribar a les següents conclusions:

- S'ha pogut afirmar que la metilació a nivell de promotor és un factor alterant de l'expressió a nivell de missatger i proteic del gen *SETD6*. S'ha pogut veure ben reflectit en les diferències d'expressió en la línia cel·lular metilada REH en comparació amb la línia cel·lular no metilada RCH-ACV amb els diferents experiments realitzats, tant a nivell de transcrit (qPCR), com a nivell d'expressió proteica (Western Blot) en ambdues línies cel·lulars analitzades.
- El tractament amb l'agent desmetilant *Azacitidina (AZA)* a una concentració d'1  $\mu\text{M}$  no ha sigut l'esperat en els diferents experiments realitzats en aquest treball experimental, cosa que dona a concloure que no s'ha pogut recuperar l'expressió a nivell de ARN missatger i proteic del gen *SETD6* de la línia cel·lular metilada REH de B-ALL. S'hauria de repetir l'experiment amb diferents condicions de tractament d'*AZA* per poder veure si la no recuperació d'expressió gènica s'origina a causa de les condicions aplicades en aquest treball o si s'hauria de provar amb un altre tractament o enfocament.

En conclusió, la metilació del promotor de la metiltransferasa *SETD6* dona afectacions d'expressió, atès que no es produeix la mateixa quantitat a nivell de transcrit i per tant, causa la no expressió a nivell proteic provocant que les cèl·lules metilades no realitzin les funcions d'expressió com es realitzen en un microambient normal no metilat.

## 5.1 Limitacions i millores a realitzar en projectes futurs

En general, els experiments realitzats en aquest treball experimental han resultat l'esperat, atès que s'ha pogut observar com la metilació al promotor d'una línia cel·lular de B-ALL altera l'expressió del gen *SETD6* a nivell d'ARN missatger i proteic.

L'altre enfocament d'aquest treball experimental ha sigut recuperar l'expressió a nivell de transcrit i proteic a partir de l'aplicació d'un tractament desmetilant anomenat *Azacidina*, cosa que no ha resultat exitosa tal com s'ha explicat a l'apartat de resultats i discussió, on s'ha explicat les possibles hipòtesis del perquè no ha donat el que esperàvem. Per tant, per futurs estudis enfocats en aquest treball de recerca, el que recomano a tenir un enfocament és al canvi de condicions d'aquest tractament amb AZA, atès que a nivell d'ARN missatger s'ha pogut veure un petit increment amb aquest tractament tot i que no ha resultat significatiu, però és possible recuperar l'expressió de manera significativa del gen *SETD6* on té el seu promotor metilat amb un canvi de condicions d'AZA.

## 6 Bibliografía

- 16.4 *Regulación de genes de transcripción eucariota - Biología | OpenStax*. (n.d.). Retrieved June 2, 2021, from <https://openstax.org/books/biology/pages/16-4-eukaryotic-transcription-gene-regulation>
2. *¿Qué es la Leucemia Linfoblástica Aguda? | AEAL*. (n.d.). Retrieved June 2, 2021, from <http://www.aeal.es/leucemia-linfoblastica-aguda-espana/2-que-es-la-leucemia-linfoblastica-aguda/>
- An, Q., Fan, C. H., & Xu, S. M. (2017). Recent perspectives of pediatric leukemia - an update. In *European review for medical and pharmacological sciences* (Vol. 21, Issue 4, pp. 31–36). Eur Rev Med Pharmacol Sci. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29165768/>
- AZACITIDINA VIDAZA ? (Celgene)*. (n.d.).
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H. F., John, R. M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M., & Fisher, A. G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature Cell Biology*, 8(5), 532–538. <https://doi.org/10.1038/ncb1403>
- Bacher, U., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2010). Molecular genetics in acute myeloid leukemia. In *Current Opinion in Oncology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 646–655). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32833ed806>
- Baldwin, A. S. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 14, 649–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.649>
- Binda, O. (2020). Lysine methyltransferase SETD6 modifies histones on a glycine-lysine motif. *Epigenetics*, 15(1–2), 26–31. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1649529>
- Blecua, P., Martinez-Verbo, L., & Esteller, M. (2020). The DNA methylation landscape of hematological malignancies: an update. In *Molecular Oncology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 1616–1639). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12744>

- Čihák, A. (1974). Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes: A review. *Oncology (Switzerland)*, 30(5), 405–422. <https://doi.org/10.1159/000224981>
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. In *Trends in Genetics* (Vol. 29, Issue 10, pp. 569–574). Trends Genet. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
- Estey, E., & Döhner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. In *Lancet* (Vol. 368, Issue 9550, pp. 1894–1907). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69780-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69780-8)
- Gowda, C., & Dovat, S. (2013). Genetic targets in pediatric acute lymphoblastic leukemia. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 779, pp. 327–340). Springer Science and Business Media, LLC. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6176-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6176-0_15)
- Grabowski, P. J., & Black, D. L. (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 65, Issue 3, pp. 289–308). Prog Neurobiol. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00007-7)
- Greaves, M. F. (2004). Biological models for leukaemia and lymphoma. *IARC Scientific Publications*, 157, 351–372.
- Huang, H., Sabari, B. R., Garcia, B. A., David Allis, C., & Zhao, Y. (2014). SnapShot: Histone modifications. In *Cell* (Vol. 159, Issue 2). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.037>
- Katz, A. J., Chia, V. M., Schoonen, W. M., & Kelsh, M. A. (2015). Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes and Control*, 26(11), 1627–1642. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0657-6>
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA Methylation and Cancer. In *Advances in Genetics* (Vol. 70, Issue C). Adv Genet. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>
- Li, G., & Zhu, P. (2015). Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. In *FEBS Letters* (Vol. 589, Issue 20, pp. 2893–2904). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.023>

- Maksimenko, O. G., Chetverina, D. A., & Georgiev, P. G. (2006). Insulators of higher eukaryotes: Properties, mechanisms of action, and role in transcriptional regulation. *Russian Journal of Genetics*, 42(8), 845–857. <https://doi.org/10.1134/S1022795406080023>
- Medinger, M., Heim, D., Lengerke, C., Halter, J. P., & Passweg, J. R. (2019). Acute lymphoblastic leukemia – Diagnosis and therapy. *Therapeutische Umschau*, 76(9), 510–515. <https://doi.org/10.1024/0040-5930/a001127>
- Müller, A., & Florek, M. (2010). 5-Azacytidine/Azacitidine. In *Recent Results in Cancer Research* (Vol. 184, pp. 159–170). Recent Results Cancer Res. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01222-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01222-8_11)
- Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell’Aversana, C., & Altucci, L. (2018). Cancer epigenetics: Moving forward. In *PLoS Genetics* (Vol. 14, Issue 6). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>
- Reményi, A., Schöler, H. R., & Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 812–815). <https://doi.org/10.1038/nsmb820>
- Siddiqui, M. A. A., & Scott, L. J. (2005). Azacitidine: In myelodysplastic syndromes. In *Drugs* (Vol. 65, Issue 13, pp. 1781–1789). <https://doi.org/10.2165/00003495-200565130-00004>
- Siraj, A. K., Pratheeshkumar, P., Parvathareddy, S. K., Bu, R., Masoodi, T., Iqbal, K., Al-Rasheed, M., Al-Dayel, F., Al-Sobhi, S. S., Alzahrani, A. S., Al-Dawish, M., & Al-Kuraya, K. S. (2019). Prognostic significance of DNMT3A alterations in Middle Eastern papillary thyroid carcinoma. *European Journal of Cancer*, 117, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.05.025>
- Stamm, O., Jostameling, M., Graze, S., & Scotti, S. (2012). Getting specific. *EBR - European Biopharmaceutical Review*, AUTUMN, 74–80. <https://doi.org/10.1038/nrm1800>
- Stresemann, C., & Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. In *International Journal of Cancer* (Vol. 123, Issue 1, pp. 8–13). Int J Cancer. <https://doi.org/10.1002/ijc.23607>
- Sudmant, P. H., Rausch, T., Gardner, E. J., Handsaker, R. E., Abyzov, A., Huddleston,

- J., Zhang, Y., Ye, K., Jun, G., Fritz, M. H. Y., Konkel, M. K., Malhotra, A., Stütz, A. M., Shi, X., Casale, F. P., Chen, J., Hormozdiari, F., Dayama, G., Chen, K., ... Korbil, J. O. (2015). An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*, *526*(7571), 75–81. <https://doi.org/10.1038/nature15394>
- Sullivan, M., Hahn, K., & Kolesar, J. M. (2005). Azacitidine: A novel agent for myelodysplastic syndromes. In *American Journal of Health-System Pharmacy* (Vol. 62, Issue 15, pp. 1567–1573). American Society of Health-Systems Pharmacy. <https://doi.org/10.2146/ajhp040385>
- Tremblay, C. S., Hoang, T., & Hoang, T. (2010). Early T cell differentiation: Lessons from T-cell acute lymphoblastic leukemia. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 92, Issue C, pp. 121–156). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(10\)92006-1](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(10)92006-1)
- Vershinin, Z., Feldman, M., Chen, A., & Levy, D. (2016). PAK4 methylation by setd6 promotes the activation of the wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(13), 6786–6795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.697292>
- Wang, R., Xin, M., Li, Y., Zhang, P., & Zhang, M. (2016). The Functions of Histone Modification Enzymes in Cancer. *Current Protein & Peptide Science*, *17*(5), 438–445. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160122120521>
- Yildirim-Buharalioğlu, G., Bond, M., Sala-Newby, G. B., Hindmarch, C. C. T., & Newby, A. C. (2017). Regulation of epigenetic modifiers, including KDM6B, by interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in human macrophages. *Frontiers in Immunology*, *8*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00092>

# Annex A

## Protocol de quantificació cel·lular

### Materials i reactius:

1. Colorant Blau de Tripà
2. Càmera de Neubauer
3. Microscopi òptic invertit
4. Barreja de medi *RPMI* + antibiòtics Streptomycina i Penicil·lina

### Procediment:

1. Passar tot el volum que tenim de medi amb cèl·lules a un falcon. Per evitar que quedin moltes cèl·lules adherides per les parets del flasc, es recomana d'homogeneïtzar un parell de cops amb la pipeta que agafes el medi amb cèl·lules per evitar de perdre gran quantitat cel·lular.
2. Homogeneïtzar les cèl·lules amb la pipeta perquè el colorant Blau de Tripà es barregi correctament i pugui penetrar en aquelles cèl·lules que estiguin mortes.
3. Fem una dilució 1:2 de les cèl·lules i passem el volum indicat a un *ependorf*.  
En el nostre cas, posem 30 µL de mostra i 30 µL de Blau de Tripà (dilució 1:2).
4. Carregar la mostra a la Càmera de Neubauer poc a poc perquè la mostra es pugui homogeneïtzar correctament.
5. Contar les cèl·lules vives que tenim a la part d'a dalt de la Càmera de Neubauer i a la part d'a baix. S'han de comptar les quatre quadrants que hi ha a les dos bandes.
6. Càlculs a partir dels resultats obtinguts del numero de cèl·lules vives per quadrant.

$$\frac{\sum \text{totes celules vives de tots els quadrants}}{\text{número de quadrants}} \times \text{factor dilució} \times \text{factor dilució de cada quadrant} = \text{cel/ml}$$

**Equació 1.** Càlcul per trobar la concentració cel·lular d'una mostra a partir de la quantificació amb la Càmera de Neubauer.



**Taula 2.** Càlcul per trobar la concentració cel·lular a partir de la quantificació amb la Càmera de Neubauer

Numero de quadrants	4
Factor de dilució utilitzat	1:2
Factor de dilució de cada quadrant	$10^{4*}$

7. Realitzar els càlculs per saber quants mL de mostra necessitem per tenir la quantitat de cèl·lules desitjada a cada flasc.

En el nostre cas hem sembrat  $2 \cdot 10^6$  i a partir d'aquí hem preparat quatre flascos amb un volum final de 10 ml (WT i AZA per línia cel·lular RCH-ACV i WT i AZA per línia cel·lular REH). Cada flasc tindrà la mateixa quantitat de cèl·lules. La resta de volum serà medi *RPMI* + barreja d'antibiòtics Streptomycina i Penicil·lina.

8. Afegir la quantitat d'AZA desitjada als dos flascos on realitzarem el tractament.

En el nostre cas volem una concentració d' $1 \mu\text{M}$  i per tant hem afegit  $10 \mu\text{L}$  d'AZA a cada flasc.

9. Preparem un flasc de volum major pel manteniment de les cèl·lules de les dos línies cel·lulars. Realitzar els càlculs per saber quants mL de mostra necessitem per tenir la quantitat de cèl·lules desitjada a cada flasc.

En el nostre cas hem sembrat  $7 \cdot 10^6$  per cada línia cel·lular en un volum final de 20 mL. La resta de volum serà medi *RPMI* + barreja d'antibiòtics Streptomycina i Penicil·lina.

\*L'àrea d'un quadrant de la Càmera de Neubauer és de  $0,1 \text{ mm}^3$ , per tant, si passem aquesta àrea a  $\text{cm}^3$  ens dona  $10^4 \text{ cm}^3$  i així tenim la equació amb les mateixes unitats per tal de poder obtenir un resultat amb unitats de cèl·lules/ml.

## **Protocol de canvi de medi i AZA en cèl·lules que porten 48h de tractament d'AZA**

### **Materials i reactius:**

1. AZA a una concentració de 1 mM
2. Barreja de medi *RPMI* + antibiòtics Streptomycina i Penicil·lina

### **Procediment:**

1. Temperar el medi que utilitzarem.
2. Observació de les cèl·lules al microscopi.
3. Agafar tot el volum dels dos flascs de les diferents línies cel·lulars tractats amb AZA i passar-los a 2 falcons de 15 mL.
4. Centrifugar els dos falcons durant 5 minuts a 300 rpm.
5. Extreure el sobrenedant.
6. Afegir el nou medi i AZA.  
En el nostre cas hem posat 10 µL d'AZA i 10 mL de medi a cada flasc.
7. Homogeneïtzar tot correctament i passar-ho un altre cop als flascs i els deixem incubar.

## **Protocol de congelació de les cèl·lules en cultiu en forma de pellet**

### **Materials i reactius:**

1. Gel sec
2. PBS pH 7.2 1X
3. Falcons
4. Centrifuga
5. *Eppendorfs*

### **Procediment:**

1. Recollir tot el volum de cèl·lules i medi i passar-ho a un falcon.
2. Centrifugar els diferents falcons amb el contingut cel·lular i medi.
3. Aspirar el sobrenedant (medi)
4. Afegir 1mL de PBS pH 7.2 a cada falcon i homogeneïtzar el pellet cel·lular amb el PBS.
5. Agafar 1 mL de la solució de PBS homogeneïtzat amb el pellet cel·lular i transferir-ho a un *eppendorf*.
6. Centrifugar els *eppendorfs* 1 minut a 12000g.
7. Aspirar el PBS.  
A mesura que es van aspirant els diferents *eppendorfs* els anem posant amb gel sec per mantenir-los a una temperatura optima.
8. Guardar els *eppendorfs* a -80°C pel correcte manteniment cel·lular.

## **Protocol d'extracció d'ARN de la mostra**

### **Materials i reactius:**

1. DNAsa en pols
2. Colorant *Blue Dye*
3. *Nuclease Free Water*
4. *Homogeneization Buffer*
5. *Lysis Buffer*
6. Tubs d'elució de 0,5 mL
7. *Nanodrop*

### **Procediment:**

Utilitzem el kit *Maxwell RSC Simply RNA tissue* de la marca comercial *Promega Corporation*.

1. Afegir entre 30-50  $\mu$ L d'aigua lliure de nucleases als *ependorfs* amb les mostres d'on extraurem l'ARN per poder-lo eluir.

Depenent de la quantitat cel·lular posarem més quantitat d'aigua o menys. Les mostres tractades amb AZA solen tenir menys quantitat cel·lular per tant posarem menys quantitat d'aigua en comparació a les WT.

2. Afegir al tub corresponent del kit (el que conté el líquid de color groc), 10  $\mu$ L de DNAsa.

Tenim la DNAsa en forma de pols, per tant hem de dissoldre-la en 275  $\mu$ L de *Nuclease Free Water* i li afegim el colorant *Blue Dye* per poder identificar correctament la DNAsa.

3. Lisar les mostres (ja que és l'únic pas que no realitza la màquina).
  - a. Lisar amb el *Homogeneization Buffer* on li afegirem 20  $\mu$ L tioglicerol/mL.
  - b. Posem 200  $\mu$ L de *Homogeneization Buffer* per mostra.
4. Afegir el *Lysis Buffer* a cada pellet.
  - a. Afegir 200  $\mu$ L de *Lysis Buffer* a cada mostra i passar-ho pel vòrtex perquè s'homogeneïtzi correctament.
  - b. Barrejar mecànicament amb la micropipeta.
  - c. Ho deixem 5 minuts a temperatura ambient perquè lisi correctament.
5. Carregar les mostres als pous corresponents del *cassette*.

6. Deixar el kit amb les diferents mostres lisades a la maquina perquè realitzi la extracció d'ARN.
7. Quantificar l'ARN extret (*Nanodrop*).
  - a. Realitzar el blanc amb aigua.
  - b. Posar 1  $\mu\text{L}$  de cada mostra i quantificar ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ).
  - c. Entre mostra i mostra, anar netejant perquè no alteri el resultat.
  - d. Un cop quantificades totes les mostres, tornar a quantificar el blanc per comprovar que el *Nanodrop* ha funcionat degudament i no hi ha cap senyal del blanc.
8. Posar les mostres a  $-80^{\circ}\text{C}$  pel seu correcte manteniment.

## Protocol de retrotranscripció de l'ARN

### Materials i reactius:

1. Gel
2. Aigua bidestil·lada
3. OligoDT (primer)
4. *Mastermix* (mirar components a la Taula 1)
5. Termociclador

### Procediment:

1. Agafar les mostres de  $-80^{\circ}\text{C}$  i posar-les en gel.
2. Realitzar els càlculs pertinents a partir de la concentració d'ARN obtinguda pel *Nanodrop* per saber la dilució a realitzar a cada mostra per acabar obtenint  $1\ \mu\text{g}$  d'ARN en un volum final de  $11\ \mu\text{L}$ .

Mostra	[ARN] (ng/ $\mu\text{L}$ )	Aigua bidestil·lada
--------	----------------------------	---------------------

3. Afegir  $1\ \mu\text{L}$  d'oligoDT (primer).
4. Posar les mostres al termociclador durant 5 minuts a  $65^{\circ}\text{C}$  perquè el primer s'hibridi amb l'ARN.
5. Posar les mostres durant 5 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  (gel).
6. Preparar la *Mastermix*.

**Taula 3.** Quantitats dels diferents components de la *Mastermix* per fer RT.

	1x
<i>Buffer</i>	$4\ \mu\text{L}$
<i>Ribolock</i>	$1\ \mu\text{L}$
10 mM dNTPs	$2\ \mu\text{L}$
<i>Revert Aid</i> (Reverse Transcriptase)	$1\ \mu\text{L}$

7. Afegir  $8\ \mu\text{L}$  de *Mastermix* a cada mostra.
8. Posar les mostres al termociclador durant 1h. Hem utilitzat el programa del termociclador que feia el següent:  $25^{\circ}\text{C}$  durant 5 minuts,  $42^{\circ}\text{C}$  durant 1h,  $70^{\circ}\text{C}$  durant 5 minuts i  $4^{\circ}$  durant infinit.

9. Guardar les mostres a 20°C.

## Protocol de preparació de la placa per qPCR

### Material i reactius:

1. Aigua bidestil·lada
2. *SYBR Green PCR*
3. *Primers*
4. *Eppendorfs* opacs
5. Placa de 384 pous

### Procediment:

A cada *eppendorf* amb mostra, tenim 20  $\mu\text{L}$  de cDNA per tant, depenent de si s'ha fet la RT a 1 o 2  $\mu\text{g}$ , la concentració serà de 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$  o 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  realitzarem una dilució més alta o més baixa per acabar obtenint una concentració final d'1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

1. Fer la dilució amb aigua bidestil·lada corresponent a cada mostra en nous *eppendorfs* de menys volum per qPCR.

A cada pou de la placa de qPCR tindrem: 5  $\mu\text{L}$  de mostra diluïda i 5  $\mu\text{L}$  de mix (*SYBR* i *primers*), obtenint un volum final de 10  $\mu\text{L}$ .

A la placa col·locarem les mostres amb la distribució següent:

**Taula 4.** Distribució de les mostres a la placa qPCR.

RCH_WT_1	RCH_WT_2	RCH_WT_3	RCH_AZA_1	RCH_AZA_2	RCH_AZA_3	REH_WT_1	REH_WT_2	REH_WT_3	REH_AZA_1	REH_AZA_2	REH_AZA_3
RCH_WT_1	RCH_WT_2	RCH_WT_3	RCH_AZA_1	RCH_AZA_2	RCH_AZA_3	REH_WT_1	REH_WT_2	REH_WT_3	REH_AZA_1	REH_AZA_2	REH_AZA_3
RCH_WT_1	RCH_WT_2	RCH_WT_3	RCH_AZA_1	RCH_AZA_2	RCH_AZA_3	REH_WT_1	REH_WT_2	REH_WT_3	REH_AZA_1	REH_AZA_2	REH_AZA_3
RCH_WT_1	RCH_WT_2	RCH_WT_3	RCH_AZA_1	RCH_AZA_2	RCH_AZA_3	REH_WT_1	REH_WT_2	REH_WT_3	REH_AZA_1	REH_AZA_2	REH_AZA_3
RCH_WT_1	RCH_WT_2	RCH_WT_3	RCH_AZA_1	RCH_AZA_2	RCH_AZA_3	REH_WT_1	REH_WT_2	REH_WT_3	REH_AZA_1	REH_AZA_2	REH_AZA_3
RCH_WT_1	RCH_WT_2	RCH_WT_3	RCH_AZA_1	RCH_AZA_2	RCH_AZA_3	REH_WT_1	REH_WT_2	REH_WT_3	REH_AZA_1	REH_AZA_2	REH_AZA_3

A dalt de la placa ho tindrem pel gen *SETD6* i a baix pel gen control, *GAPDH*.

2. Preparació de la mix.
  - a. Posar 0,3  $\mu\text{L}$  de *primers* (stock del primer *SETD6* a 10  $\mu\text{M}$  i stock del primer *GAPDH* a 10  $\mu\text{M}$ ) a cada mostra.
  - b. Posar 4,7  $\mu\text{L}$  de *SYBR Green PCR* (fotosensible, per tant preparar-ho en *eppendorfs* opacs) a cada mostra.



3. Afegir a casa pou 5  $\mu\text{L}$  de mostra i 5  $\mu\text{L}$  de mix.
4. Realitzar la qPCR a la màquina específica.
5. Anàlisi de resultats amb el programa *Termofisher Scientific*.

## Protocol de lisis per extracció de proteïnes pel Western Blot

### Material i reactius:

1. *Lysis Buffer RIPA*
2. Aigua Bidestil·lada
3. Gel
4. Estufa
5. BCA
6. Reactiu A
7. Reactiu B

### Procediment:

La quantificació de les proteïnes s'ha realitzat amb el kit de *Pierce BCA Protein Assay*.

1. Afegir l'inhibidor de proteases al *Lysis Buffer RIPA*.
2. Afegir el *Lysis Buffer RIPA* a les diferents mostres.  
Per les mostres amb més quantitat cel·lular (WT) li afegim més quantitat de *Buffer*.
3. Deixar 20 minuts en gel.
4. Centrifugar durant 20 minuts a màxima revolució a una temperatura de 4°C.
5. Preparar la corba de BCA per calcular la concentració de proteïna que tenim.
  - a. Preparar la dilució seriada (dilució 1:2) per fer la recta patró amb BCA.

**Taula 5.** Dilució seriada per la recta patró de BCA.

1	2	3	4	5	6
2 µg/µL	1 µg/µL	0,5 µg/µL	0,25 µg/µL	0,125 µg/µL	0,06 µg/µL

A la dilució seriada 1 li posem 25 µL d'aigua bidestil·lada i 25 µL de BCA (volum final= 50 µL).

6. Diluir les mostres perquè no estiguin molt concentrades.
7. Afegir els reactius A i B a les mostres amb una proporció de 1:50.

8. Preparar el blanc

Recta patró + 3 blancs
2 línies cel·lulars (WT + AZA)

9. Deixar la placa durant 30 minuts a 37°C.

10. Calcular la recta patró i a partir d'aquí es podrà realitzar els càlculs pertinents per saber la quantitat d'aigua, *Laemli* i mostra hem de carregar per fer el Western Blot.

## **Protocol d'Electroforesis i transferència a la membrana**

### **Materials i reactius:**

1. Vidres de 1,5 mm
2. Vòrtex
3. Equip d'electroforesis per gels amb accessoris (sistema de muntatge i preparació dels gels, espaiadors i pinta per formar els pous)
4. Font d'electroforesis
5. *Acrylamide* al 30%
6. SDS al 10%
7. 2-mercaptoetanol
8. Tris 1,5 M a pH 8.8
9. Tris 1,5 M a pH 6.8
10. EDTA
11. TEMED (preparació comercial)
12. 10% APS
13. Aigua destil·lada
14. Laemli
15. Isopropanol
16. *HyperPage Prestained* (escala de pesos moleculars)
17. PBS pH 7.2 (1X) + Tween
18. *Difco Skim Milk* al 5% (llet en pols)
19. Stock de STED6 antibody
20. Stock de Lamin B antibody
21. *Running buffer*
22. *Transferring buffer*
23. Metanol
24. Membrana de nitrocel·lulosa
25. *Immobilon Crescendo Western HRP Substrate*
26. *Immobilon Classic Western HRP Substrate*
27. Revelador de Western Blot

## Procediment:

1. Preparar un gel al 10% d'Acrilamida.  
Tenir present de posar el reactiu TEMED lo últim, ja que és un agent accelerador per la solidificació.
  - a. Un cop el *Running gel* estigui preparat, abans de que solidifiqui, afegir una mica d'isopropanol per treure les bombolles que s'hagin pogut formar a la superfície. I després treure aquest isopropanol, netejar amb aigua i assecar amb un paper de cel·lulosa.
  - b. Preparar el *Stacking gel* seguint les quantitats de la taula i esperar a la seva solidificació.
  - c. Afegir les pintes de plàstic per a que el *Stacking gel* es solidifiqui amb els pous on s'afegiran les mostres format.
2. Calcular les quantitats de mostra, *Laemli* i aigua a afegir a cada pou per analitzar les mostres.
  - a. A partir de l'equació de la recta patró de BCA obtinguda (Protocol de lisis d'extracció de proteïnes pel Western Blot) s'ha calculat la concentració de mostra que tenim. Se li aplica una dilució 1/10 i es fa la mitja dels tres replicats tècnics que tenim de cada tipus cel·lular i de les diferents condicions, obtenint un resultat final de concentració de mostra.
  - b. Hem volgut posar 100 µg de proteïna, i en base a la concentració de cada mostra, hem calculat els µL que hem hagut d'afegir per aconseguir aquesta quantitat de proteïna.
  - c. Volem posar un total de 25 µL de mix (proteïna + Laemili + aigua) per tant, hem afegit un volum de 8,3 µL perquè el Laemli quedi a 1X a la mostra.
  - d. Per saber la quantitat d'aigua s'ha d'afegir a cada mostra realitzem la resta del volum total menys el volum de proteïna a afegir i el volum de *Laemli* a afegir.
3. Per poder preparar les mostres per carregar al gel, primer s'han de deixar incubant a 95°C durant 5 minuts i després les centrifuguem un moment per tal de concentrar tota la quantitat de mostra per poder agafar la concentració requerida.
4. Carregar les mostres al gel. Les mostres es carreguen seguint el següent ordre:

**Taula 6.** Distribució de la carrega de mostres al gel d'acrilamida.

Escala	RCH- ACV WT	REH WT	Escala	RCH- ACV WT	RCH- ACV AZA	REH WT	REH AZA	Escala
--------	-------------------	-----------	--------	-------------------	--------------------	-----------	------------	--------

D'escala posem 10  $\mu$ L i de mostra 25  $\mu$ L.

5. Preparar el *Running Buffer*. El tenim a 10X i el posem a 1X en 1L.
6. Posar els gels dins del suport d'electroforesis i afegir el *Running buffer* que recobreixi tot (inclòs els borns, perquè el corrent es produeixi correctament).
7. Posar a córrer el gel amb les mostres carregades.
  - a. Posar durant els 30 minuts primers a 60V per posar totes les mostres a la mateixa línia de partida del *Stacking gel*.
  - b. Després ho posem 2h30 a 90V.
8. Treure el *Running buffer* i extreure el gel de dins del suport. Treure el *Stacking gel* ja que no ens serveix per realitzar la transferència a la membrana.
9. Preparar tot lo necessari per fer la transferència del gel a la membrana.
  - a. Col·locar el gel a sobre del suport negre i la membrana a sobre. Se li posa dos papers (un a la part del gel i l'altre a la part de la membrana per facilitar la transferència del material a la membrana).
  - b. Preparar el *Transferring Buffer*, el tenim a 10X i el volem a 1X a 1L. Afegir dins d'aquest volum final d'1L 20% de metanol (posar-ho lo últim).
  - c. Impregnar tot el suport del muntatge on està el gel i la membrana amb *Transferring Buffer*. Posteriorment insertar-ho dins del suport on hi haurà el corrent per la transferència i omplir-ho tot (inclòs els borns) amb *Transferring Buffer*. Deixar-ho al corrent durant 90 minuts a 90V.
10. Realitzar el bloqueig de la membrana.
  - a. Dissoldre llet en pols al 5% amb PBS pH 7.2 + Tween i impregnar-ho a la membrana. Deixar bloquejant durant al menys 30 minuts.
11. Adició de l'anticòs primari.

En el nostre cas, el que vam fer es partir la membrana en dos, observant la escala de pes molecular vam separar la membrana una part amb la proteïna control (*Lamin B*) i una altra part amb la proteïna d'interès (*SETD6*). D'aquesta manera podíem afegir els anticossos primaris de les dos proteïnes diferents alhora per

separat. Això es possible perquè la diferència del pes molecular de les proteïnes que hem analitzat ens ho permet fer.

Del stock del anticòs primari de les dos proteïnes s'han de diluir, de *SETD6* a 1/1000 i de *Lamin B* a 1/4000.

- a. Dissoldre llet en pols al 5% i barrejar-ho amb 1  $\mu$ L d'anticòs primari en un volum final de 10 mL.
  - b. Afegir aquesta barreja a la membrana i deixar-ho incubant a 4°C *overnight*.
12. Realitzar 3 rentats de la membrana per treure l'excés d'anticòs primari.
- a. Es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb PBS pH 7.2 + Tween.
13. Adició de l'anticòs secundari.
- a. Igual que amb l'anticòs primari, s'ha de dissoldre a una dilució de 1/10.000 en un volum final de 10 mL, on també inclou la llet en pols dissolta. Per tant afegirem 1  $\mu$ L d'anticòs secundari.
  - b. Deixar la membrana incubant amb l'anticòs secundari durant 1h.
14. Realitzar 3 rentats de la membrana per treure l'excés d'anticòs secundari.
- a. Es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb PBS pH 7.2 + Tween.
15. Revelar el Western Blot: Posar 1 mL de substrat HRP a la membrana i deixar que reaccionï durant 1 minut.

En el cas de *Lamin B*, com la detecció serà immediata ja que es el control, posem HRP Classic i en el cas de *SETD6* posem el HRP Crescendo per intensificar i facilitar la detecció.