

Programa de Doctorat de Biomedicina
Facultat de Biologia
Bienni 2001-2003

Modulació de la sensibilitat a la gemcitabina mitjançant estratègies de teràpia gènica en càncer de pàncreas humà.

Memòria presentada per
Sandra Pérez Torras

Per optar al grau de
Doctor

Tesi doctoral sota la direcció de la **Dra. Adela Mazo Sánchez**
al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona

La directora

L'autora

Adela Mazo

Sandra Pérez

Barcelona, Maig 2007

Materials i Mètodes

1. Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars NP-9, NP-18, NP-29 i NP-31 van ser establertes en el Servei de Digestiu de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona en col·laboració amb Merck Farma i Química. Aquestes línies van ser gentilment cedides pel laboratori d'Investigació Gastrointestinal de l'esmentat hospital. Totes quatre deriven d'adenocarcinomes pancreàtics humans implantats en ratolins atímics i que s'han perpetuat com a xenografts (Reyes *et al.*, 1996; Villanueva *et al.*, 1998).

Aquestes línies estan àmpliament caracteritzades en quant a les seves característiques de creixement i adhesió, així com respecte als nivells d'expressió i estat dels gens més rellevants en la tumorigènesi del càncer de pàncreas exocrí humà, entre ells els supressors tumorals p53 i p16 i també l'oncogèn K-ras. La taula 7 mostra alguna d'aquestes característiques.

Línia cel·lular	Gen								
	K-ras		p53		p16		p21		Temps doblatge
	Estat	Estat	Nivells	Estat	Nivells	Estat	Nivells		
NP-9	GGT-GAT	175 CGC-CAC	+	Deleció 11pb	-	Salvatge	-	97 h	
NP-18	salvatge	246 ATG-GTG	+	Salvatge	+	Salvatge	-	36 h	
NP-29	GGT-TGT	salvatge	-	Deleció 1pb	-	Salvatge	+	45 h	
NP-31	GGT-GAT	Exó 7 ^a	+	Homo (exó I, II, III)	-	salvatge	+	54 h	

Taula 7. Estat i nivells d'expressió en les línies cel·lulars tumorals pancreàtiques d'alguns gens supressors i oncogèns importants en càncer de pàncreas: GGT, glicina; GAT, àcid aspàrtic; TGT, cisteïna; CGC, arginina; CAC, histidina; ATG, metionina; GTG, valina. Homo, indica una deleció homozigòtica. ^a: en aquesta línia es va evidenciar un patró anòmal en assajos de polimorfisme conformacional de cadena simple (SSCP) en diversos experiments, però no es va poder aïllar cap mutació ni per seqüenciació directe.

En tots els casos, el medi es complementa amb un 10% de serum fetal boví (FBS), i una mescla dels antibiòtics penicil·lina i estreptomycina (100 U/ml i 100µg/ml, respectivament). A la taula 8 es recullen les línies emprades en aquesta tesi, així com un breu apunt sobre el seu ús.

Línia cel·lular	Teixit d'origen	Medi de cultiu	Origen	Emprades en aquesta tesi per
NP-9	Adenocarcinoma pancreàtic humà	DMEM-F12	(Villanueva et al. 1998)	Transportadors de nucleòsids, adenovirus replicatius i models ortotòpics.
NP-18	Adenocarcinoma pancreàtic humà	RPMI	(Villanueva et al. 1998)	Transportadors de nucleòsids, comunicació intercel·lular i models ortotòpics.
NP-29	Adenocarcinoma pancreàtic humà	DMEM-F12	(Villanueva et al. 1998)	Transportadors de nucleòsids i adenovirus replicatius.
NP-31	Adenocarcinoma pancreàtic humà	RPMI	(Villanueva et al. 1998)	Adenovirus replicatius.
A549	Carcinoma pulmonar humà	DMEM	ATCC	Adenovirus replicatius.
Caco-2	Adenocarcinoma de colon humà	EMEM + 1%NEAA	ATCC	Transportadors de nucleòsids.
293	Ronyó embrionari humà	DMEM	ATCC	Amplificació i titolació adenovirus.
911	Retinoblast embrionari humà	DMEM	ATCC	Amplificació adenovirus.
BxPC3	Adenocarcinoma pancreàtic humà	DMEM	ATCC	Comunicació intercel·lular.
MIA PaCa-2	Adenocarcinoma pancreàtic humà	DMEM	ATCC	Comunicació intercel·lular.
NP-18 Cx26	Adenocarcinoma pancreàtic humà	RPMI	Laboratori C.Fillat (Carrió et al, 2001)	Comunicació intercel·lular.
MIIA PaCa-2 Cx26	Adenocarcinoma pancreàtic humà	DMEM	Laboratori C.Fillat	Comunicació intercel·lular.

Taula 8. Breu descripció de les cèl·lules emprades en aquest treball

1.1. Cultiu de les línies cel·lulars

Totes les línies cel·lulars utilitzades en aquest estudi creixen formant una monocapa cel·lular adherida al suport sòlid en el qual es cultiven. Quan la monocapa assoleix un 80-90% de la superfície es fa necessari el replaqueig, mitjançant la tripsinització, per tal d'assegurar-ne la correcta viabilitat. La tripsinització consisteix en la disgregació cel·lular del cultiu utilitzant un procés enzimàtic i mecànic que permet la recuperació de les cèl·lules i el replaqueig subsegüent. Cada línia cel·lular es replaqueja a una densitat suficient per tal que assoleixin un 80-90% de confluència al cap de 3-4 dies entre els quals, el medi es renova cada dos dies per aspiració del medi vell i addició de medi fresc. Les cèl·lules es mantenen en un incubador humidificat a 37°C en una atmosfera al 5% en CO₂.

1.1.1. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars

Per poder disposar sempre que es desitgi de les línies cel·lulars en condicions òptimes és necessari mantenir un estoc de cèl·lules dels passatges inicials congelades en nitrogen líquid. Per realitzar la congelació mantenint la viabilitat de les cèl·lules és necessari l'ús d'un crioprotector com el dimetilsulfòxid (DMSO). Així doncs, les diferents línies cel·lulars es tripsinitzen, es centrifuguen 5 minuts a 1500 rpm s'aspira el sobrenadant i es resuspenen en medi de congelació que està format per un 60% de medi definit (RPMI, DMEM o DMEM:F12, en funció de la línia), un 20% de sèrum fetal boví i el 20% restant de DMSO. La suspensió cel·lular s'aliquota en criotubs i es col·loquen en un dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80°C. Passat un mínim de 4 hores ja es poden traslladar les cèl·lules a un tanc de nitrogen líquid per a la seva conservació.

Cal tenir en compte que els agents crioprotectors, malgrat ser imprescindibles en el procés de congelació, són altament tòxics per les cèl·lules a temperatura ambient i a concentracions superiors a l'1%. Per aquest motiu és aconsellable realitzar la congelació i descongelació amb la màxima rapidesa possible per tal de garantir-ne la viabilitat cel·lular.

La descongelació d'un criotub comporta el ràpid traspàs de les cèl·lules mantingudes en nitrogen líquid a un bany termostatitzat a 37°C per tal de minimitzar el contacte del DMSO amb les cèl·lules. El contingut del criotub es traspassa a un tub de 15 ml i es centrifuga a 1500 rpm durant 5 minuts. Les cèl·lules es resuspenen amb medi fresc suplementat amb un 20% de FBS i es sembren en una placa de cultiu.

2. Tractaments amb agents quimioterapèutics

Per a la realització del tractament, les cèl·lules es sembren en el suport adequat en funció de l'estudi que es vulgui fer: corba dosi-resposta, aïllament de RNA o proteïna, transport, etc. Passades de 12 a 24 hores els cultius s'incuben amb les concentracions de fàrmac escollides dissoltes en el medi estàndard durant un temps determinat i transcorregut aquest temps el medi amb l'agent és aspirat i substituït per medi fresc.

La gemcitabina (Gemzar; 2',2'-difluorodesoxicitidina) és una donació de Lilly S.A. (Madrid, Espanya). Per a la seva manipulació es prepara una solució mare 10mM, dissolent en PBS la quantitat adequada del fàrmac comercial GEMZAR™ (48,3 g de principi actiu en 100 g de GEMZAR). Les solucions així preparades s'esterilitzen per filtració i es consideren estables durant 24 hores.

3. Anàlisi de la citotoxicitat:

L'anàlisi de citotoxicitat d'un determinat fàrmac es basa en la mesura de la viabilitat cel·lular després de l'exposició al fàrmac.

3.1 Corbes dosi-resposta

Les corbes dosi-resposta es presenten com la viabilitat relativa prenent com a 100% el nombre de cèl·lules del cultiu control, en absència de fàrmac. Utilitzant el software Grafit (Erithacus Software Ltd., USA), i partint d'uns valors inicials dels paràmetres fixats arbitràriament, cada conjunt de dades experimentals s'ajusta per regressió no-lineal a la funció matemàtica corresponent a una forma adaptada de l'equació de Hill, el que permet obtenir un valor d'IC₅₀, que correspon a la dosi de fàrmac que redueix la viabilitat en un 50%.

$$\% \text{ supervivència} = (C \cdot IC_{50}^h) / IC_{50}^h + [fàrmac]^h + (\% \text{ supervivència})_{\infty}$$

on es representa:

% supervivència: quocient entre les cèl·lules vives per a cada concentració de fàrmac i les cèl·lules vives a concentració zero del fàrmac (viabilitat).

C : màxima capacitat d'inhibició.

IC₅₀ : valor de la dosi del fàrmac que redueix la viabilitat en un 50%.

(%supervivència)_∞ : viabilitat residual del cultiu quan la [fàrmac] → ∞.

h : coeficient de Hill

[fàrmac] : concentració de fàrmac emprada en la incubació.

En aquest treball s'han utilitzat dos mètodes per mesurar la viabilitat cel·lular: comptatge cel·lular i l'activitat metabòlica mitocondrial mitjançant la reducció de sals de tetrazoli.

3.1.1 Comptatge de cèl·lules

Les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous, el nombre de cèl·lules que es sembren per placa és variable en funció de la línia cel·lular i de la durada de l'experiment. Transcorregudes entre 12 i 24 hores, les cèl·lules es sotmeten al tractament corresponent (agents quimioterapèutics i/o infecció amb adenovirus). En tractar-se d'un cultiu en monocapa les cèl·lules mortes es desenganxen de la placa, pel que es poden eliminar amb facilitat al rentar amb PBS, de manera que el nombre de cèl·lules que es compta correspon al nombre de cèl·lules viables. Per a cada experiment, es tripsinitzen quatre pous de cada tractament i, prèvia dilució 1/40 amb PBS, es procedeix al comptatge amb un autoanализador automàtic Multisizer (Coulter, USA). Aquest aparell conté un elèctrode capaç de detectar les partícules presents en una suspensió com un pols elèctric que travessa un camp elèctric. El sistema també pot calcular simultàniament el diàmetre de la partícula detectada, i estimar així el volum mig de les partícules/cèl·lules que constitueixen la mostra. Això ens permet eliminar les cèl·lules que no es troben dins del rang de mida establert amb les cèl·lules de la mostra control (sense tractament).

3.1.2. Reducció de sals de tetrazolium: MTT

L'assaig de MTT (bromur de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) es basa en la formació de cristalls de formazan, d'un color blau i insolubles en aigua, després de la ruptura de la sal de tetrazoli. Els cristalls només es produeixen en cèl·lules viables mitjançant l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa.

Les cèl·lules es sembren en plaques de 96 pous a una densitat variable en funció de la línia cel·lular i la durada de l'experiment. Per a cada assaig s'utilitzen un mínim de quatre pous per condició. Un cop finalitzat l'experiment es retira el medi i s'afegeix medi fresc amb 0.75 mg/ml de MTT (Sigma), s'incuba 1h a 37°C per permetre la formació dels cristalls. Els cristalls poden ser solubilitzats amb un solvent orgànic com el DMSO i la densitat òptica dels cristalls dissolts es mesura espectofotomètricament a 550 nm en un lector d'ELISA (BIORAD). El valor d'absorbància obtingut correlaciona de manera directa amb el nombre de cèl·lules metabòlicament actives presents en el cultiu cel·lular.

4. Tècniques de citometria de flux

El citòmetre de flux o FACS (de Flow Assessed Cell Sorter) és un aparell que, a partir de la injecció de cèl·lules o partícules en un sistema de flux provoca la seva intercepció amb la llum d'un o més làsers i permet l'anàlisi de l'emissió de fluorescències i de llum dispersada per les partícules. La tècnica es caracteritza per l'alta velocitat d'anàlisi i la detecció individualitzada de les partícules, fet que permet un estudi estadístic multiparamètric. Molts citòmetres, a més, permeten també la separació física de les poblacions d'interès amb una alta puresa i en funció d'un dels diferents paràmetres quantificables. En el moment de realitzar les mesures en el citòmetre de flux, les cèl·lules poden estar vives o

fixades, però obligatòriament han d'estar en suspensió i en forma de cèl·lula aïllada. Les cèl·lules són obligades a passar aliniades una a una davant d'un feix de làser mitjançant un flux continu. Cada cèl·lula a la vegada dispersa la llum i emet llum fluorescent com a conseqüència de l'excitació del làser a la que és sotmesa. Els paràmetres que típicament es mesuren de forma simultània per a cada cèl·lula són: la dispersió frontal de la llum (*forward scatter*), que és proporcional a la mida cel·lular, la dispersió de la llum ortogonal (*side scatter*), proporcional a la quantitat d'estructures granulars o complexitat de la cèl·lula, i les intensitats de fluorescència a diferents longituds d'ona. Una de les més emprades, en base a la seva rapidesa i exactitud, és l'anàlisi del contingut en ADN d'un cultiu cel·lular, que permet assignar la freqüència de la distribució de les poblacions en cada fase del cicle cel·lular, que permet assignar la freqüència de la distribució de les poblacions en cada fase del cicle cel·lular. També la detecció d'antígens, tant de membrana com intracel·lulars, a partir d'anticossos específics o altres sistemes d'afinitat conjugats a fluorocroms (tipus fluoresceïna o similars), esdevé un protocol molt útil per estimar el percentatge de cèl·lules que estan expressant una determinada proteïna o disposen d'un fenotip concret dins d'un cultiu. En aquest treball la citometria de flux s'ha utilitzat per a l'anàlisi del cicle cel·lular, mitjançant la mesura del contingut d'ADN, i per a la determinació de l'apoptosi mitjançant el mètode d'unió a annexina V.

4.1. Anàlisi del perfil de cicle cel·lular

La citometria de flux permet determinar el cicle cel·lular mitjançant la determinació de la quantitat d'ADN de les cèl·lules. La distribució típica de l'ADN d'una població cel·lular en creixement està formada per dos pics que corresponen a la fase G_1/G_0 i a la fase G_2/M i una vall corresponent a la fase S. En la fase G_2/M la cèl·lula té el doble de quantitat d'ADN que en la fase G_1/G_0 . La fase S correspon a la síntesi d'ADN pel que les cèl·lules tenen quantitats variables d'ADN, que es troben entre les fases G_1/G_0 i G_2/M .

El mètode més habitual de monitoratge del percentatge de cèl·lules a les fases del cicle cel·lular és la tinció amb iodur de propidi (IP), un fluorocrom que s'intercala estequiomètricament a la doble cadena de les molècules d'àcids nucleics (revisat a (Vindelov and Christensen, 1990). S'excita a 538 nm, emetent una fluorescència en un rang ampli al voltant de 617 nm.

Es parteix de plaques de 60 mm de diàmetre ja que aquestes contenen un nombre de cèl·lules adequat per a realitzar una anàlisi citomètrica (entre $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa). Cada placa esdevé una mostra i cada condició s'analitza com a mínim per duplicat. Després de realitzar els tractaments oportuns, en el moment de l'anàlisi del cicle es recull el sobrenadant i es barreja amb les cèl·lules de la monocapa que es sotmeten a un procés de tripsinització suau. La suspensió resultant es centrifuga a 1500 rpm durant 5 minuts, es fa un rentat amb PBS i es torna a centrifugar. Les cèl·lules (a raó de $5 \cdot 10^5$ o $1 \cdot 10^6$) es resuspenen en 200µl de PBS. A continuació s'afegeixen gota a gota 800µl d'etanol absolut fred (-20°C) mentre la suspensió s'agita de forma contínua i suaument en un agitador

de tipus vòrtex, ja que és molt important una addició lenta i homogènia de l'etanol. L'etanol actua com a fixador i permeabilitzador, condicions necessàries perquè el iodur de propidi s'intercali a l'ADN. Les mostres es deixen a -20°C , on són estables durant un màxim de 15 dies.

En el moment de l'anàlisi les cèl·lules es centrifuguen per a eliminar l'etanol i es resuspenen en $500\ \mu\text{l}$ de PBS amb $50\ \mu\text{g/ml}$ de iodur de propidi (Sigma) i $10\ \mu\text{g/ml}$ de RNasa (Roche), per tal d'evitar la unió del iodur de propidi a l'ARN. Les mostres s'analitzen en un citòmetre de flux Epics-XL (Coulter, USA). El conjunt de dades provinents d'un mínim de 10.000/12.000 cèl·lules acaba composant un arxiu informàtic que constitueix el material de base del programa d'anàlisi del cicle cel·lular (software Multicycle, phoenix Flow Systems, USA). Aquest programa, emprant mètodes d'ajust no-lineal, assimila les dades experimentals a corbes matemàtiques i calcula el percentatge de cèl·lules presents a cada fase del cicle.

4.2. Quantificació de cèl·lules apoptòtiques: incorporació d'annexina V

La membrana cel·lular està formada per una bicapa lipídica de distribució asimètrica. En l'apoptosi primerenca la fosfatidilserina, que en condicions normals es troba exclusivament en la cara interna, passa a exposar-se a la cara exterior de la membrana. L'annexina V és una proteïna que s'uneix preferentment als fosfolípids carregats negativament, mitjançant una unió reversible i dependent de calci, pel que en una preparació de cèl·lules no permeabilitzades s'unirà a la fosfatidilserina de les cèl·lules apoptòtiques.

En processos d'apoptosi avançada i necrosi, la membrana plasmàtica es deteriora i esdevé permeable a substàncies com el iodur de propidi (IP) que s'intercala a la doble cadena dels àcids nucleics. La viabilitat cel·lular i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques es determina per citometria de flux, mitjançant un doble marcatge amb annexina V conjugada amb FITC (fluorescència verda) i IP (fluorescència vermella). Així s'obté el percentatge de cèl·lules vives (annexina i IP negatives), cèl·lules apoptòtiques primerenques (positives pel marcatge d'annexina i negatives pel IP) i cèl·lules amb apoptosi avançada o necrosi (annexina i IP positives).

Les cèl·lules es preparen i es tracten igual que per a l'anàlisi del cicle cel·lular i de la mateixa manera es recull el sobrenadant i la monocapa mitjançant una tripsinització suau. Un cop centrifugades es fa un rentat amb PBS + 1% FBS (per preservar-les vives) i es resuspenen entre $5 \cdot 10^5$ i $1 \cdot 10^6$ cèl·lules amb tampó d'unió de l'annexina amb $2.5\ \mu\text{g/ml}$ d'annexina V-FITC i $5\ \mu\text{g/ml}$ IP (Bender Medsystems). La suspensió s'incuba de 30 minuts a 1 hora a les fosques a temperatura ambient i seguidament s'analitza per citometria de flux. En aquest cas, les dades s'analitzen amb un programa acoblat al citòmetre (Elite, USA).

5. Tècniques relacionades amb la manipulació d'ADN

5.1 Aïllament d'ADN plasmídic

Aquest procediment té com a objectiu l'obtenció de petites quantitats d'ADN plasmídic a partir d'un creixement bacterià. Les minipreparacions d'ADN es van realitzar a partir de 3 ml d'un cultiu bacterià crescut durant 12-16 hores a 37°C i en agitació. El mètode utilitzat es basa en la lisi alcalina de les bacteries i la precipitació diferencial dels àcids nucleics de baix pes molecular. Es parteix de 1,5 ml del cultiu líquid i es centrifuga durant 30 segons a 14000 rpm a temperatura ambient (TA). Es descarta el sobrenadant per decantació i es resuspèn el sediment amb les restes de cultiu amb un aparell tipus vòrtex. Tot seguit s'afegeixen 400 µl de tampó de lisi TENS (Tris 10mM a pH 8.0, 1mM EDTA, 0.1 M NaOH i 0.5% SDS), s'agita per inversió i s'afegeixen 200 µl d'acetat de sodi 3M a pH 5.4 es torna a agitar per inversió i es centrifuga 10 minuts a 14000 rpm a TA. Un cop centrifugat, es recull el sobrenadant (uns 500 µl) i es passa a un altre tub tipus eppendorf, on s'hi afegeix 1 ml d'etanol absolut (2 volums) per fer precipitar l'ADN plasmídic i l'ARN, i s'agita per inversió. Després d'una centrifugació de 5 minuts a 14000 rpm a TA i es renta el sediment amb etanol 70% (v/v), es torna a centrifugar 2 minuts a 14000 rpm s'elimina tot l'etanol i es deixa assecat el sediment a TA. Un cop assecat, es resuspèn amb 50 µl d'aigua desionitzada o TE (Tris 10 mM a pH 8.0 i EDTA 1mM) suplementat amb 20 ng RNasa A per eliminar l'ARN que ha precipitat junt amb l'ADN plasmídic.

5.2. Midipreparació d'ADN plasmídic

Aquest procediment permet l'obtenció de quantitats majors d'ADN plasmídic (≤ 100 µg). Les midipreparacions d'ADN es van realitzar a partir de 50-100 ml de cultiu bacterià en funció de l'origen de replicació bacterià del plasmidi (alta o baixa còpia, respectivament) amb el *kit* comercial Phoenix plasmid midi *kit* (Q-BIOgene), seguint el protocol recomanat pel fabricant.

5.3. Anàlisi d'ADN en gels d'agarosa

L'anàlisi, la identificació i la separació de fragments d'ADN es va realitzar mitjançant l'electroforesi en gels d'agarosa. El percentatge d'agarosa del gel utilitzat depèn de la mida dels fragments que es volen aïllar i analitzar. En aquest treball, les concentracions utilitzades han variat entre 0.7% i 1.5%. Per preparar els gels d'agarosa i com a tampó d'electroforesi s'ha utilitzat el tampó TAE 1X (Tris-acetat 40 mM i EDTA 2mM a pH 8.5) que permet una bona separació dels fragments de mida gran. La detecció de l'ADN es realitza mitjançant la tinció amb bromur d'etidí (0.5 µg/µl), un potent agent mitogènic que s'intercala als àcids nucleics i la visualització sota una làmpara de llum ultraviolada. L'estimació de la

mida dels fragments analitzats es duu a terme per comparació amb un marcador de pes molecular que es corre en paral·lel a les mostres.

5.4. Seqüenciació

S'ha utilitzat un mètode de seqüenciació automàtica, basada en el mètode enzimàtic descrit per Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Per a la reacció de seqüenciació (volum final 10 µl) s'utilitzen entre 100 ng d'ADN plasmídic per cada kb que es vol analitzar, 3.2 pmol d'encebador i 2 µl de la barreja de reacció del *kit* comercial Big-Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) que inclou la polimerasa, els dNTPs i els ddNTPs (cadascun d'ells marcats amb un fluorocrom diferent).

Les condicions de reacció utilitzades són:

- 1 cicle de desnaturalització inicial: 1 min a 94°C
- 25 cicles: 30 s a 94°C, 30 s a 50°C i 4 min a 60°C

Un cop finalitzada la reacció de seqüència es porta a un volum final de 26 µl amb aigua desionitzada i s'afegeixen 64 µl d'etanol al 95% per precipitar el producte, s'agita suaument i es deixa incubar un mínim de 30 minuts a TA. Un cop transcorregut aquest temps es centrifuga 30 minuts a 14000 rpm a TA i el sediment es renta amb 200 µl d'etanol 70%, es centrifuga 5 minuts a 14000 rpm i es repeteixen els rentats 2 cops més. S'asseca el sediment i es porten a analitzar amb un seqüenciador automàtic. Un cop analitzades les seqüències es processen amb el programa informàtic BioEdit (BioEdit sequence alignment editor).

6. Tècniques relacionades amb la manipulació d'ARN

6.1. Extracció d'ARN total a partir de cultius cel·lulars

Existeixen diferents alternatives per a la purificació d'ARN a partir de qualsevol tipus de mostra de partida. Malgrat l'existència de mètodes de purificació clàssics, com el descrit per Chomzynsky i Sacchi el 1987, els ARN utilitzats en aquesta tesi s'han obtingut a partir de *kits* comercials, amb els quals s'obtenen rendiments equivalents al mètode clàssic, amb l'avantatge de que el temps necessari per a realitzar la purificació és clarament inferior.

L'extrema fragilitat de l'ARN i la presència de RNases endògenes i exògenes, presents en la totalitat dels objectes que entren en contacte amb els éssers humans, fa necessari prendre una sèrie de mesures abans i durant la seva manipulació amb la finalitat d'evitar la contaminació i degradació de la mostra. Per treballar amb ARN és necessari utilitzar guants i material lliure de RNases. Les solucions es preparen a partir d'aigua tractada amb un agent que inactiva les ribonucleases, el DEPC (Diethyl pirocarbonat). En aquest treball, per a la

purificació d'ARN a partir de cèl·lules en cultiu s'ha emprat el *kit* comercial SV Total RNA Isolation System (Promega). El protocol s'ha realitzat seguint les indicacions detallades del *kit* comercial. El mètode es basa en un primer pas de lisi cel·lular que utilitza les propietats disruptives i protectores del tiocianat de guanidina i el β -mercaptoetanol per a inactivar les ribonucleases presents en els extractes cel·lulars. Després de la centrifugació del lisat cel·lular, l'ARN és precipitat selectivament i purificat mitjançant una columna de sílice a la que s'hi uneix ràpidament. Aquest *kit* permet el tractament de l'ARN amb DNasa mentre l'ARN està adherit a la columna. L'eliminació de l'ADN contaminant és un pas important quan l'ARN s'ha d'utilitzar en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) ja que aquest ADN pot servir de motlle en la reacció de PCR i produir falsos positius. Un cop finalitzat el tractament amb DNasa i els diversos processos de rentat, l'ARN s'elueix amb aigua lliure de nucleases.

Degut a la fragilitat de l'ARN és molt important comprovar la qualitat de l'ARN obtingut, mitjançant la valoració espectrofotomètrica i l'electroforesi en gel d'agarosa.

6.2. Qualitat de l'ARN: valoració espectrofotomètrica d'àcids nucleics

Els àcids nucleics presenten un màxim d'absorció a 260 nm, mentre que les proteïnes, possibles contaminants d'una mostra d'àcids nucleics, presenten un màxim d'absorció a 280 nm. La relació entre les absorbàncies a les dues longituds d'ona proporciona informació tant de la integritat com de la puresa de la mostra. La relació òptima DO_{260}/DO_{280} es troba entre 1.7 i 2.0. Si aquesta relació és superior a 2.0 els àcids nucleics podrien estar degradats, mentre que si la relació és inferior a 1.7 indica una presència excessiva de proteïnes en la mostra.

En aquest treball les mesures espectrofotomètriques s'han realitzat amb el nanodrop (NanoDrop technologies) que permet realitzar les mesures directament a partir d'1 μ l de la dissolució d'ARN. Aquest aparell calcula automàticament la concentració de l'àcid nucleic que té la mostra i la relació entre les diferents densitat òptiques (DO).

La concentració d'àcids nucleics s'obté a partir de l'absorbància a 260 nm utilitzant la següent fórmula:

$$[\text{Àcid nucleic}] (\text{ng}/\mu\text{l}) = ((\text{Absorbància} * \epsilon) / \text{longitud de pas (cm)}) \times (\text{dilució si s'escau})$$

on $\epsilon = 33 \text{ ng-cm}/\mu\text{l}$ per ADN de cadena senzilla

$\epsilon = 50 \text{ ng-cm}/\mu\text{l}$ per ADN de cadena doble

$\epsilon = 40 \text{ ng-cm}/\mu\text{l}$ per ARN

6.2.1. Electroforesi en gel d'agarosa

L'ARN total obtingut està format per ARN ribosomal (80-85%), ARN de transferència (10-15%) i ARN missatger, que suposa únicament 1-5% de l'ARN total. L'ARN ribosomal que, és majoritari, està format per les subunitats 28S (3808-6333 bases), 18S (1898-1976 bases) i 5S (~120 bases).

L'electroforesi en gel d'agarosa de l'ARN ha de mostrar dues bandes clares corresponents als ARN ribosomals 28S i 18S. Si s'observa un marcatge difós o l'aparició d'altres bandes significa que l'ARN està degradat. La relació de la intensitat entre la banda 28S i 18S ha de ser idealment 2, tot i que s'accepten relacions entre 1.5 i 2.5. Per tant, un cop corregut el gel, a part d'observar en el transiluminador la presència de les dues bandes ribosomals es pot fer una densitometria per comprovar la relació.

El protocol d'electroforesi en gel d'agarosa de l'ARN és el mateix que s'ha detallat per l'anàlisi de l'ADN. En aquest cas, però s'utilitza un tampó de càrrega desnaturalitzant (glicerol 50%, EDTA 1mM, blau de bromofenol 0.4%, cianol xilè 0.4%) i les mostres d'ARN amb el tampó de càrrega es poden escalfar a 65°C durant 5 minuts i posar ràpidament en gel abans de carregar, per tal de desnaturalitzar els ARN presents en la mostra.

6.3. Retrotranscripció: Síntesi d'ADNc

Un mètode per a analitzar l'expressió d'un determinat gen és detectar el seu ARN transcrit. Tanmateix, l'ARN no serveix com a motlle de la reacció de PCR, per tant és necessari retrotranscriure'l a ADNc. La síntesi d'ADN pot utilitzar com a motlle ARN total o ARN missatger. L'ús d'ARNm purificat és útil en el cas de la detecció de gens poc abundants, ja que la proporció d'ARNm en un preparació d'ARN total és aproximadament de l'1%.

Els principals enzims utilitzats en la retrotranscripció de l'ARN provenen del virus de la leucèmia murina de Moloney (M-MLV) o del virus de la mieloblastosi d'aus (AMV). A l'hora d'escollir l'enzim més indicat pel nostre assaig s'ha de tenir en compte diversos factors. La reacció guanya en especificitat en augmentar la temperatura de treball, sobretot quan treballem amb seqüències riques en G/C. D'altra banda, l'activitat RNasa H present en alguns enzims degrada específicament els híbrids ARN:ADN, el que pot suposar un problema si la degradació de l'ARN motlle competeix amb la síntesi de l'ADNc.

La reacció de retrotranscripció requereix d'uns encebadors, l'elecció dels quals afecta la mida i l'especificitat de l'ADNc obtingut. Existeixen tres tipus d'encebadors que poden ser emprats per a la retrotranscripció:

- Oligo(dT)₁₂₋₁₈: s'uneix a la cua de poli(A) endògena de l'extrem 3' dels ARNm dels mamífers. Acostuma a produir ADNc complets (*full-length*).
- Hexanucleòtids aleatoris: s'uneixen a diversos llocs de l'ARN i generen ADNc curts. Són ideals per tal d'evitar estructures

secundàries en el motlle. A més, transcriuen de forma més eficaç les regions 5' del ARNm.

- Oligonucleòtids específics: s'uneixen únicament a l'ARN d'interès.

En aquest treball el protocol i els enzims utilitzats han estat els que es descriuen a continuació:

La síntesi d'ADNc es realitza a partir d'1µg d'ARN total utilitzant hexanucleòtids a l'atzar com a encebadors per a la reacció de la M-MLV. La reacció s'inicia amb la desnaturalització de l'ARN a 65°C durant 5 minuts. Passat aquest temps els tubs es disposen en gel i s'hi afegeix una barreja que conté (concentracions finals) el tampó de l'enzim, DTT 1mM, dNTPs 1mM cada un, 100 µg/ml de *random hexamer* (Amersham Pharmacia Biotech), 0.75 U/µl de RNasyn (Promega) i 7.2 U/µl de M-MLVRT (Gibco), en un volum final de 40 µl. La reacció es deixa procedir durant 2 hores a 37°C i s'acaba amb la inactivació de l'enzim durant 10 minuts a 65°C.

6.4. PCR en temps real

En la PCR en temps real, de manera equivalent a la PCR semiquantitativa, el producte de PCR s'analitza en uns cicles en els que encara hi ha una relació lineal entre el producte de partida i la quantitat d'amplicó sintetitzat. La diferència està en què la PCR en temps real permet la detecció del producte de PCR a mida que aquest s'acumula, i per tant, proporciona un mètode molt sensible per a la quantificació del nombre de còpies d'una mostra o la comparació dels nivells d'expressió entre mostres diferents.

En aquesta tesi s'ha utilitzat la tecnologia TaqMan d'Applied Biosystems, que es basa en la utilització d'una sonda consistent en un oligonucleòtid que porta unides dos tipus de molècules: un marcador fluorescent (o *reporter*) al seu extrem 5' i un reductor de l'emissió (o *quencher*) a l'extrem 3'. Mentre la sonda es troba intacta, la proximitat del *quencher* redueix enormement la fluorescència emesa pel *reporter* pel fenomen de FRET (*Föster resonance energy transfer*). A mesura que la Taq DNA polimerasa allarga l'encebador, l'activitat 5' nucleasa d'aquesta degrada la sonda, que es troba unida entre els dos encebadors. D'aquesta manera els dos fluorocroms es separen, incrementant així el senyal del *reporter*. A cada cicle hi ha més molècules de *reporter* alliberades, produint-se un augment de la fluorescència proporcional a la quantitat d'amplicó generat.

6.4.1. Quantificació relativa de l'expressió gènica

Les reaccions de PCR en temps real venen caracteritzades pel cicle en què l'amplificació d'un determinat producte es detecta per primer cop enlloc de per la quantitat de producte acumulat després d'un determinat nombre de cicles. Quantes més còpies del gen d'interès es trobin a l'inici, abans es detectarà un increment significatiu de la fluorescència observada. En els primers cicles de la PCR hi ha pocs canvis en la fluorescència, és el que defineix una línia base. Un increment de la fluorescència per sobre de la línia base indica la detecció del

producte de PCR acumulat. Empíricament es fixa un llindar (*threshold*) de fluorescència per sobre de la línia base. El paràmetre C_T (cicle llindar o *threshold cycle*) es defineix com el cicle en què la fluorescència supera el llindar fixat. Aquest és el paràmetre que permet fer la quantificació, quan menor sigui el valor de C_T major quantitat del gen d'interès hi ha a la mostra.

La PCR en temps real permet tant una quantificació absoluta del nombre de còpies de cada missatger com una quantificació relativa. En aquesta tesi doctoral es va optar per la utilització de la quantificació relativa, que es basa en la comparació de C_T . Es tracta d'una tècnica equivalent a la PCR semiquantitativa i que utilitza, per tant, un control endogen com a element normalitzador. La relació entre el C_T de la diana i el del control endogen proporciona un valor de C_T normalitzat (C_{TN}) de la diana, que serveix per a estandaritzar la quantitat de l'ARN o ADN afegit a la reacció. En aquest treball hem escollit com a control endogen la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH).

Els encebadors i sondes utilitzats en aquest treball es detallen a continuació a la taula 9 (Molina-Arcas *et al.*, 2003).

hENT1	5'-GCA AAG GAG AGG AGC CAA GA FAM 5'-CAG GCA AAG AGG AAT CTG GAG TTT CAG TCT C-3' TAMRA	5'-TTC ATT GGT GGG CTG AGA GTT
hCNT1	5'- TGA TTT CTT GGA AAG CCT GGA FAM 5'-AAG GCC AGC TCC CTA GGA GTG ACT TGA G-3' TAMRA	5'-CTG CTC CTG ATC TCT GCG G

Taula 9. Encebadors i sondes per la detecció dels transportadors de nucleòsids per PCR a temps real.

La resta dels primers i encebadors utilitzats són predissenyats per Applied Biosystems (*Assay on Demand Gene Expression*), pel que no es disposa de la seqüència exacta. Les referències utilitzades per a cada gen són:

GEN	Referència
dCK	Hs00176127_m1
RR R2	Hs00357247_g1
MRP5	Hs00194701_m1
MDR1	Hs00184500_m1
GAPDH	Hs99999905_m1

Cada reacció de PCR conté TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, encebadors i sonda i 2.5 μ l d'ADNc diluït 4 vegades en un volum final de 25 μ l. Per a l'amplificació de les diferents isoformes dels transportadors de nucleòsids es va utilitzar una concentració de sonda de 200 nM i d'encebadors de 400 nM. Els *Assay on Demand Gene Expression* es presenten com una solució 20x on els encebadors i la sonda es troben ja a les concentracions òptimes d'utilització de manera que aquestes són desconegudes per l'usuari.

Els assaigs dissenyats utilitzant el *software* i els reactius Master Mix d'Applied Biosystems poden ser duts a terme utilitzant uns paràmetres de PCR universals.

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

Tal i com s'ha comentat prèviament aquest mètode es basa en el càlcul de la relació entre el C_T de la diana i el del control endogen, que serveix per a estandaritzar la quantitat d'ARN o ADN afegit a la reacció. Tot i això, aquest valor és un valor sense cap tipus d'unitat que pot ser utilitzat per a la comparació relativa de la quantitat de la diana entre diferents mostres. Una forma d'aconseguir-ho és designar una de les mostres com a calibrador. El calibrador no és més que una mostra que serveix com a base per a comparar els resultats, és a dir, és el que proporciona el valor 1 d'expressió.

La quantitat de la diana, normalitzada al control endogen i relativa al calibrador, ve donada per:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

On $\Delta C_T = C_T \text{ diana} - C_T \text{ control endogen}$
 $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ mostra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$

L'error estàndard (SE) de ΔC_T pot ser calculat com:

$$\sqrt{(SE_{\text{diana}})^2 + (SE_{\text{control}})^2}$$

Sempre i quan el nombre de rèpliques sigui el mateix pels dos elements. El càlcul de $\Delta\Delta C_T$ no és més que una substracció d'una constant arbitrària, per tant, el SE de $\Delta\Delta C_T$ és la mateixa que la de ΔC_T de la diana.

7. Tècniques relacionades amb la manipulació de bacteris

7.1. Preparació de cèl·lules competents

La soca bacteriana utilitzada en aquest treball per amplificar els plasmidis generats ha estat la DH5 α d'*Escherichia coli* (*E.coli*). Es pica una colònia única de la soca bacteriana crescuda en placa i es deixa créixer tota la nit a 37°C en agitació. Al dia següent es dilueixen 2 ml d'aquest creixement en 100ml de LB i es deixa créixer fins que el cultiu assoleix una densitat òptica a 550 nm de 0.4 corresponent a la fase de creixement exponencial dels bacteris. A partir d'aquest punt tot es farà en gel. Les bactèries es centrifuguen a 2500 rpm a 4°C durant 5 minuts, es resuspenen amb 30 ml de TfBI (30mM KOAC, 50 mM MnCl₂, 100 mM de RbCl, 10 mM de CaCl₂ a pH 5.8 i 15% de glicerol) i es deixa reposar 5 minuts en

gel. Després es tornen a centrifugar, es resuspenen amb 4 ml de TfbII (10mM Mops a pH 7.0, 75 mM Ca Cl₂, 10mM de RbCl i 15% de glicerol), s'aliqüoten en 50 µl i es desen a -80°C fins al moment de ser utilitzades.

7.2. Transformació per xoc tèrmic

En aquest treball s'han utilitzat dos mètodes per transformar les bacteries, per xoc tèrmic i per electroporació.

Per dur a terme la transformació es barregen 50 µl de la suspensió de cèl·lules competents que s'han descongelat en gel amb l'ADN a transformar i s'incuba en gel durant 20 minuts. Passat aquest temps, es realitza el xoc tèrmic que consisteix en posar els tubs que contenen les bacteries i l'ADN en un bany a 42°C durant 1 minut i ràpidament es tornen a posar en gel on es deixen 4 minuts. Tot seguit, s'afegeixen 300 µl de LB i s'incuba durant 1 hora en agitació a 37°C, transcorreguda la qual es plaqueja el cultiu líquid en una placa de LB amb l'antibiòtic de selecció adequat per cada plasmidi.

7.3. Transformació per electroporació

Aquest protocol s'ha utilitzat per a la doble recombinació en la generació dels adenovirus i es descriu detingudament en l'apartat de la doble transformació del vector llançadora i el genoma adenoviral.

8. Tècniques relacionades amb la manipulació d'adenovirus

8.1. Generació dels adenovirus

En aquesta tesi, s'han generat tres vectors adenovirals derivats d'un adenovirus humà del serotip 5. D'aquests, un es defectiu (Ad-hCNT1), mentre que els altres dos són replicatius (AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53). En el vector defectiu s'ha substituït la regió E1A de l'Ad5 pel casset d'expressió que conté l'ADNc del hCNT1 sota el control del promotor fort del citomegalovirus (CMV). Per altra banda, als vectors replicatius se'ls ha introduït l'ADNc del gen p53 sol o amb la seqüència tat al davant amb un acceptor d'splicing sota el control del *major late promoter* (MLP) de l'adenovirus. A més a més, aquests vectors presenten una modificació a la càpside que consisteix en la inserció de la seqüència RGD al domini knob de la proteïna de la fibra, amb l'objectiu d'augmentar la seva infectivitat (Suzuki *et al.*, 2001).

El mètode utilitzat per la generació dels tres adenovirus es basa en el fenomen de la recombinació homòloga que es produeix entre el genoma sencer de l'adenovirus liniaritzat (integrat al plasmidi p3602 per l'adenovirus defectiu i al pVK50 pels replicatius) i un fragment d'ADN linial que conté el gen d'interès flanquejat per les zones d'homologia. Aquesta recombinació té lloc gràcies als braços d'homologia que comparteixen aquests dos elements i es produeix després de la seva cotransformació a la soca electrocompetent rec A positiva d'*E. coli* BJ5183 (Stratagene).

8.1.1. Clonació del gen d'interès en el vector llançadora

Els fragments d'ADNc que es volien clonar s'han obtingut seguint dos procediments diferents: a) mitjançant la digestió directa amb els enzims de restricció adequats i la posterior purificació del fragment d'interès a partir d'un gel d'agarosa (Ad-hCNT1); b) mitjançant l'amplificació per PCR del fragment d'interès amb uns encebadors que contenen la diana dels enzims de restricció necessaris per la seva lligació al vector llançadora (AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53).

En el cas de l'Ad-hCNT1 el vector llançadora emprat ha estat el pShuttleCMV on s'ha lligat l'ADNc mitjançant les dianes de l'enzim de restricció NotI. Es digereixen entre 10 i 20 µg del vector pBS-hCNT1 amb l'enzim necessari, tenint en compte que es requereix 1U d'enzim per cada µg, en un volum final de 20 µl on s'afegeix el tampó adequat i l'aigua bidestil·lada necessària. La reacció s'incuba a la temperatura òptima de l'enzim, generalment 37°C durant tota la nit. Es separen les bandes en un gel d'agarosa, es retalla la banda que conté el nostre ADNc i es purifica amb el *kit* comercial DNA and Gel Band Purification kit (Amersham).

En el cas de AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53 el vector llançadora utilitzat ha estat el pNKfiber RGD on s'ha lligat l'ADNc mitjançant les dianes de l'enzim de restricció MfeI.

Els encebadors emprats per la generació dels vectors AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53 es detallen a continuació:

p53 Fw:

5'-GCACAATTGTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGATGGAGGAGCCGCAGTCA-3'

tatp53 Fw:

5'-GCACAATTGTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGATGGGAGGTGGAGGTTATGGCAGGAAGAAG-CGGAGACAGGAGGAGCCGCAGTCA-3'

Rv:

5'-CGTCAATTGAAAATAAATTTATTAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3'

Un cop amplificat el fragment desitjat, es digereixen entre 200 i 500 ng del producte de PCR amb l'enzim MfeI en 10 µl de volum final durant un mínim de 2 hores i es purifica amb el *kit* comercial DNA and Gel Band Purification kit (Amersham).

Per la seva banda, el vector es prepara mitjançant la digestió amb els enzims de restricció escollits i el tractament amb fosfatasa alcalina (Roche) per evitar

que es relligui el vector, ja que en tots els casos es digereix amb un únic enzim, i finalment es purifica amb el *kit* comercial DNA and Gel Band Purification kit (Amersham).

La fosfatasa alcalina és un enzim capaç de defosforilar els extrems 5' de l'ADN, mitjançant la hidròlisi dels residus fosfat. El volum total del vector digerit i purificat s'incuba 1 hora a 37°C amb el seu tampó i les unitats necessàries de l'enzim (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Roche). Finalment, s'inactiva durant 15 minuts a 65°C i es torna a purificar amb el *Gel Band Purification kit* (Amersham).

El vector i l'insert ja purificats es lliguen en una relació molar vector:insert (50 ng: x ng) de 1:2 i 1:3 en un volum final de 10 µl. S'utilitza 1 U de la *T4 DNA lligasa* (Roche) i 1 µl del tampó 10x). La barreja s'incuba tota la nit en una barreja d'aigua i gel. Després, la lligació es transforma les cèl·lules competents DH5α, es fan minipreps de les colònies obtingudes, es testen per digestió i es seqüencien.

8.1.2. Doble transformació del vector llançadora i el genoma adenoviral

En primer lloc, es digereixen els vectors que es volen co-transformar per tal de facilitar el procés de recombinació. El vector pShuttleCMV-hCNT1 es digereix amb l'enzim PmeI, els vectors pNKfiberRGD-p53 i pNKfiberRGD-tatp53 amb els enzims NotI i KpnI i el vector pVK50 amb Swal.

Per realitzar la doble transformació, es descongelen en gel les cèl·lules electrocompetents BJ5183 (Stratagene) i s'aliquoten en 20 µl en tubs tipus eppendorf, on s'afegeix el DNA (entre 50 i 70 ng del fragment i del vector). Posteriorment, es traspasa aquesta barreja a una cubeta d'electroporació (0.2 cm de diàmetre; BioRad) prèviament refredada en gel. Després d'assegurar-nos que no hi ha cap bombolla d'aire dins de la cubeta, es col·loca a l'electroporador (BTX) i s'aplica una descàrrega elèctrica curta de voltatge alt (Capacitència 0, 13 Ohm de resistència i 2.5 kV de voltatge). Immediatament s'afegeix 1 ml de LB a TA i es transfereix la barreja a un tub i s'incuba 1h a 37°C en agitació. Finalment es plaquegen 100, 300 i 600 µl per separat en plaques de LB-agar amb l'antibiòtic de selecció necessari i s'incuba tota la nit a 37°C.

A continuació es fan minipreparacions d'ADN plasmídic a partir de les colònies obtingudes i es comproven per digestió els elements introduïts al genoma de l'adenovirus. Després de seleccionar els clons positius aquests s'amplifiquen per midiprep i es digereixen amb PacI per linealitzar-lo i eliminar la zona que conté el gen de resistència i procedir a la transformació en 293.

8.1.3. Transfecció amb CaCl₂

L'ADN recombinant s'introdueix a l'interior de les cèl·lules 293 mitjançant la transfecció amb clorur de calci. Prèviament, l'ADN s'ha purificat mitjançant una extracció/purificació amb fenol-cloroform/alcohol isoamílic. Breument, es porten 20 µg del vector digerit a un volum final de 100 µl amb aigua bidestil·lada. S'afegeix un volum de fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 i s'agita vigorosament durant 10 segons. Es centrifuga al màxim 15 segons a TA, es recull la fracció aquosa i s'afegeix 1/10 volums d'acetat sòdic 3M a pH 5.2, de 2 a 2.5 volums d'etanol 100% fred, es barreja suaument i es deixa 1 hora a -80°C. Es

centrifuga, es renta amb etanol 70% i es deixa assecar el precipitat. Finalment, es resuspèn amb 50 µl de TE (Tris 10mM i EDTA 0.1 mM) estèril.

Per realitzar la transfecció, el dia anterior es sembra $1 \cdot 10^6$ cèl·lules de la línia 293 en una placa de 6 cm de diàmetre amb DMEM+5% FBS. En primer lloc, ja en condicions d'esterilitat es preparen en un tub tipus eppendorf 5µg del vector purificat en un volum final de 50µl. A més a més per cada transfecció es preparen dos tubs:

Tub 1	Tub2
169 µl d'aigua bidestil·lada	250 µl d'HBS 2x:
5µl de CaCl_2 2M	50 mM Hepes
	280 mM NaCl
	1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

En el tub 1, s'afegeix gota a gota els 50µl del vector purificat i després 26µl més de CaCl_2 2M i es barreja lentament dos cops. A continuació amb un pipetejador automàtic i una pipeta de 1ml es bombolleja el contingut del tub 2 i alhora s'hi afegeix gota a gota els 250 µl del tub 1, un cop afegit es continua bombollejant 5 segons més i es deixa reposar 1 minut. Finalment els 500 µl finals s'afegeixen gota a gota a la placa de 293 i s'agita suament per millorar la distribució. Els precipitats són visibles a les 4 hores i a les 16 hores s'elimina el medi i es renta la monocapa amb molta cura un cop amb 1 mM EGTA en PBS i 2 cops amb PBS sol.

A partir d'aquest punt, els protocols pels vectors replicatius i els no replicatius es diferencien. Les cèl·lules transfectades amb els vectors replicatius es deixen a la placa i aproximadament una setmana més tard, quan s'observa un efecte citopàtic general a tota la placa (cèl·lules arrodonides i refringents) es recullen i es sotmeten a tres cicles de congelació-descongelació ($-80^\circ\text{C}/37^\circ\text{C}$, respectivament) per lisar les cèl·lules i alliberar les partícules virals. Després d'una centrifugació de 5 minuts a 2500 rpm, es recull el sobrenedant, que és el primer estoc viral i s'emmagatzema a -80°C . Aquest estoc constitueix el lisat inicial a partir del qual es procedeix a amplificar per successives rondes de propagació.

Per altra banda, les cèl·lules transfectades amb els vectors no replicatius es resuspèn amb el mateix medi de la placa amb molta cura i es reparteix cada una en una placa de 6 pous. Transcorregudes 6 hores, temps suficient perquè s'adhereixin, es realitza el revestiment amb agarosa per tal d'obtenir clons aïllats.

La realització del revestiment d'agarosa s'ha de fer prou ràpid per evitar que solidifiqui i amb molta cura perquè no salti la monocapa de cèl·lules 293. Es prepara una solució estoc d'agarosa al 5% en PBS estèril, s'autoclava i es deixa temperar en un bany a 45°C . Just abans de posar l'agarosa al damunt de les cèl·lules, es barreja amb DMEM 5% de FBS a 37°C per tal d'obtenir una solució d'agarosa a l'1,25% que s'ha d'utilitzar immediatament. S'afegeixen 3ml de la solució DMEM/agarosa lentament als pous prèviament aspirats. Les calbes de lisi apareixen al cap de 10-20 dies. Cada 4 o 5 dies cal afegir un nou revestiment d'agarosa per mantenir la viabilitat de les cèl·lules.

Les calbes es formen per la producció dels virions a les cèl·lules que han incorporat l'ADN viral i la infecció posterior de les cèl·lules adjacents. Un cop

apareixen, seleccionem entre 6 i 12 calbes aïllades i ben definides i les recollim utilitzant puntes de pipeta, de manera que s'extrauen cilindres d'agarosa que contenen els virus de la calba, es transfereixen a pous de plaques de 24 que contenen 0.5 ml de DMEM 5% FBS i es deixen eluir durant 24 hores a 37°C. A part, es sembren 10^5 cèl·lules de 293 per pou en una placa de 24 pous per duplicat per a cada clon aïllat, s'infecten amb 0.1 ml del virus eluït i al cap de 90 minuts es complementa el medi amb DMEM 5% FBS. Al cap d'uns 5-10 dies la monocapa es lisa completament i es recull el virus, que anomenarem estoc inicial. A partir d'aquest punt es procedeix a amplificar per successives rondes de propagació.

8.2. Amplificació dels adenovirus

En condicions normals de propagació, el sobrenedant pot infectar 5 plaques de la mateixa mida del qual prové i el lisat cel·lular en pot infectar 20.

Per a cada amplificació s'utilitzen entre 20 i 40 plaques de 15 cm de diàmetre. Quan les cèl·lules estan a una confluència del 80% s'infecten i després d'unes 48 hores, l'efecte citopàtic es fa evident en el 95-100% de les cèl·lules, de les quals un 20% es troben desadherides. En aquest moment es recull el sobrenedant i les cèl·lules de totes les plaques i es centrifuguen en tubs de 50 ml durant 5 minuts a 1500rpm. El sobrenedant es guarda a -80°C per a posteriors infeccions. Els sediments es poden guardar congelats fins al moment de la purificació. Els virus que no es purifiquen es resuspenen amb PBS⁺⁺ (PBS amb 10mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ i 10 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) seguint la relació 1ml per cada 10 plaques, s'aliquoten i es guarden a -80°C fins al moment del seu ús, prèvia quantificació per partícules infectives.

8.3. Purificació dels estocs virals

El mètode emprat per a la purificació de virus en aquesta tesi es basa en la ultracentrifugació en un gradient de densitat fet amb diferents concentracions de clorur de cesi. Aquest mètode permet separar les partícules virals de la resta d'elements presents en el lisat cel·lular (càpsides virals buides, restes cel·lulars...).

En primer lloc, es prepara una solució de CsCl de densitat 1.5 g/ml a partir de la qual es preparen les altres dues solucions necessàries de 1.35 g/ml i de 1.25 g/ml i s'esterilitzen per filtració. El gradient de densitat es preparen afegint una primera fase de 0.5 ml de la solució de 1.5 mg/ml i a continuació, amb molta cura per no malmetre les fases anteriors, s'afegeixen 3 ml de la de 1.35 mg/ml i 3 ml de la de 1.25 mg/ml fent lliscar gota a gota les solucions per la paret del tub. A sobre de la tercera fase s'afegeix la suspensió viral.

Els tubs es centrifuguen a 35000 rpm durant una hora a 10°C (rotor SW41 Ti, Beckman). En aquestes condicions, les partícules virals es separen de les restes cel·lulars i es concentren en el punt del gradient de densitat corresponent a la densitat de la partícula viral 1.32 g/ml formant-se una banda blanquinosa. La

banda formada per les partícules virals es recull punxant el tub amb una xeringa i es sotmet a una segona ultracentrifugació amb un gradient continu. La banda de virus recollida es barreja amb la solució de 1.35 g/ml de clorur de cesi i es diposita a un nou tub, que es sotmet a una ultracentrifugació a 35000 rpm 16 hores a 10°C. Al final de la segona centrífuga s'obté una banda blanquinosa que es correspon a l'adenovirus. Aquesta es recull igual que l'anterior i s'introdueix en una membrana de diàlisi. Es dialitza enfront de 500 ml de tampó PBS⁺⁺ a 4°C en agitació durant 2 hores. Es renova el tampó de la diàlisi i es deixa dues hores més en les mateixes condicions i el tercer i darrer canvi es fa enfront del mateix tampó complementat amb 10% de glicerol, per conservar el virus.

8.4. Titulació dels estocs virals

8.4.1. Determinació de les partícules físiques per espectrofotometria (pv/ml)

Es barregen amb un agitador tipus vòrtex 5µl de la suspensió viral dialitzada i 95 µl de tampó de lisi (Tris 10 mM, EDTA 1mM, 0.1% SDS, pH 8.0) i s'incuba durant 5 minuts a 56°C per a la lisi de les càpsides virals. A continuació es mesura la densitat òptica a l'espectrofotòmetre a les longituds d'ona de 260 i 280nm. El valor de la densitat òptica a 260nm es multiplica per 20 (factor de dilució) i per $1.1 \cdot 10^{12}$, la quantitat resultant equival a partícules virals per ml⁻¹. La relació DO_{260}/DO_{280} ens dóna idea de la integritat de la mostra purificada. Òptimament ha d'estar al voltant de 1.4.

8.4.2. Determinació de les partícules virals infectives (ut/ml)

Aquesta titulació es basa en la detecció de la proteïna de l'hexó i també permet la titulació de virus no purificats. En primer lloc, es prepara un banc de dilucions del virus purificat utilitzant DMEM amb 5% de FBS. A continuació es transfereixen, per triplicat, 100 µl de cada dilució a una placa de 96 pouets i s'afegeix una suspensió cel·lular de 293 a raó de 50000 cèl·lules en 100 µl de medi. Després de 24-36 hores d'incubació a 37 °C s'aspira el medi, es deixen assecar les cèl·lules 5 minuts a TA i es fixen 10 minuts a -20°C amb 50 µl de metanol fred. Tot seguit, es fan tres rentats amb PBS⁺⁺ + 1% de BSA (Roche) i s'incuba amb 50 µl de l'anticòs primari (α-hexó, cedit pel laboratori del Dr. Ramon Alemany) 1-2 hores a 37°C (dilució 1:5 en PBS⁺⁺ + 1% de BSA). Tot seguit, es fan dos rentats PBS⁺⁺ + 1% de BSA i s'incuba 1 hora a 37°C protegit de la llum amb l'anticòs secundari conjugat amb Alexa-488 (dilució 1:300 en PBS⁺⁺ + 1% de BSA). Finalment, es fan tres rentats amb PBS⁺⁺ + 1% de BSA i es procedeix al comptatge de cèl·lules positives per pouet al microscopi de fluorescència. El títol viral, nombre d'unitats de transducció/ml, es calcula amb la següent fórmula:

$$\text{UT/ml} = (\text{mitja} \times \text{f.dil.} \times 1000 \mu\text{l}) / 100 \mu\text{l}$$

mitja: dels comptatges de les cèl·lules

f.dil.: factor de dilució

1000 μl : per referir-les a 1 ml

100 μl : volum de virus per cada pou

8.5. Transducció de cèl·lules en monocapa amb adenovirus

La transducció amb adenovirus consisteix en la introducció del material genètic del virus modificat a l'interior de la cèl·lula diana. Aquest procés es produeix posant en contacte el medi que conté els virus amb les cèl·lules que es volen transduir.

En aquest treball s'han realitzat transduccions sobre cèl·lules adherents a partir tant dels virus purificats com de l'extracte cru no purificat.

Per tal de transduir cèl·lules adherents amb adenovirus, es descongela el virus en gel i es prepara el banc de dilucions necessari per aconseguir tenir les dosis desitjades per infectar les cèl·lules. Tot seguit s'aspira el medi de les cèl·lules sembrades entre 12 i 24 hores abans i s'afegeix el medi sense sèrum amb el virus. Després de 2-4 h d'incubació a 37°C, es dilueixen els virus amb medi fresc suplementat amb 10% FBS inactivat (30 minuts a 56°C).

9. Tècniques relacionades amb la manipulació de proteïnes

9.1. Extracció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars

Per a l'obtenció dels homogenats totals les proteïnes cel·lulars que després seran corregudes en una electroforesi monodimensional i analitzats per Western blot es recullen tant les cèl·lules de la monocapa com les cèl·lules presents al sobrenadant del cultiu. Aquesta precaució és necessària des del moment que les cèl·lules apoptòtiques es desadhereixen del cultiu, i la seva omisió en el moment de la lisi cel·lular deformaria la informació del patró proteic dels cultius.

Així, per a la realització de l'extracte cel·lular es recull en el mateix tub el sobrenadant del cultiu i les cèl·lules de la monocapa, que provenen de la tripsinització. Una centrifugació a 1500 rpm durant 5 minuts permet obtenir un precipitat únic, que es resuspèn en PBS, i del qual se'n fa un comptatge amb càmera de Neubauer a partir d'una al·lquota. Després d'una segona centrifugació, el precipitat es resuspèn en tampó de lisi a raó de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml de tampó.

En aquest treball s'ha utilitzat un tampó de lisi que preserva l'estat de fosforilació (Shieh *et al.*, 1997). Aquest tampó consisteix en 10 mM Tris a pH 7.4, 400mM NaCl, 5mM NaF, 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadat sòdic, 0.5%

Igepal CA-630, 4 mM ditiotreititol (DTT) i còctel d'inhibidors de proteases (Complete Mini, Roche).

La incubació amb el tampó de lisi té lloc durant 1 hora a 4°C en agitació constant. L'homogenat resultant es centrifuga a 14000 rpm durant 15 minuts a 4°C per tal d'eliminar les restes cel·lulars i de DNA. El sobrenadant d'aquesta darrera centrifugació constitueix l'extracte cel·lular i es conserva a -80°C fins al moment de l'ús.

9.2. Determinació de la concentració de la proteïna total

La quantitat de proteïna total present a cada extracte es determina segons el mètode de Bradford usant el reactiu de Bio-Rad (Bio-Rad, Alemanya). Aquest protocol es basa en el canvi del màxim d'absorbància d'una solució àcida de blau de Coomassie brillant G-250 des de 465 nm fins a 595 nm quan es produeix unió a proteïna (Sedmak and Grossberg, 1977). D'aquesta forma, i per aplicació de la llei de Lambert-Beer, es pot determinar la concentració proteica d'un extracte a partir de la interpolació del valor d' A_{595} d'una mescla de l'extracte amb reactiu de Bradford en una recta patró construïda a partir de l'absorbància determinada per diferents solucions patró d'albumina sèrica bovina (BSA). Aquest mètode ha estat escollit en base a la baixa quantitat d'extracte necessari per fer la determinació (5 μ l), la seva rapidesa i l'absència d'interferències del mètode amb els components dels diferents tampons de mostra emprats.

9.3. Anàlisi de proteïnes mitjançant western blot

La tècnica de western blot (Towbin *et al.*, 1979) permet la detecció de proteïnes d'una mescla fent ús d'anticossos específics per la proteïna d'interès, prèvia electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE). El protocol pot dividir-se en tres etapes: la separació electroforètica de les diferents proteïnes de la mostra, la transferència d'aquestes a una membrana de nitrocel·lulosa, i la visualització mitjançant anticossos específics.

9.3.1. Electroforesi en SDS-PAGE

El sistema més clàssic per a la detecció de barreges de proteïnes en funció de la seva mida és l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (Laemmli, 1970). El dodecil sulfat sòdic o SDS és un detergent iònic que s'uneix fàcilment a les proteïnes i els hi confereix una càrrega negativa, mantenint però la relació càrrega/massa constant. La barreja proteica resultant d'aquesta unió es fa córrer per l'acció d'un camp elèctric en una xarxa polimèrica constituïda per una combinació d'acrilamida/bisacrilamida, de tal manera que la mobilitat electroforètica de cada component depèn de la seva grandària (pes molecular).

En aquest tipus d'electroforesi les proteïnes corren seqüencialment a través de dos tipus de gels de diferent concentració d'acrilamida: el gel concentrador

(3.3% acrilamida, 0.088% bis-acrilamida, 0.1% SDS, 0.1% persulfat amònic, 6.6 mM TEMED en Tris-HCl 125 mM pH 6.8), que permet l'agrupament de les proteïnes presents a la mostra immediatament abans de la seva entrada al gel separador, i el gel separador (% de poli-acrilamida variable entre 8 i 12%, segons el pes molecular de la proteïna que es vulgui separar, 0.1% SDS, 0.043% de persulfat amònic, 2,2 mM TEMED en Tris-HCl 375 mM pH 8.8), que degut a la grandària de porus inferior actua de veritable separador de les proteïnes.

Les mostres a analitzar es dilueixen 1/5 en un tampó de càrrega que les desnatura i aporta les condicions reductores necessàries (50% glicerol, 5% SDS, 0.5% blau de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol en Tris 630 mM pH 6.8). D'aquesta forma la quantitat de proteïna total present entre mostres és constant (generalment 30 o 40 μ g/mostra). Prèviament a la càrrega en el gel, les proteïnes es bullen 7 minuts a 100°C per a completar la desnaturització. Tots els gels inclouen una mostra formada per proteïnes pre-tenyides de pes molecular conegut que actuen de marcadors de pes molecular (RPN800, Amersham).

Els gels es corren durant 1.5-2 hores a 20 mA/gel de 0.75 mm de gruix i 75 volts en presència d'un tampó 191 mM glicina i 0.1% SDS en Tris 25 mM pH 8.2.

9.3.2. Electrotransferència de proteïnes

Un cop finalitzada l'electroforesi en SDS-PAGE, es procedeix a la transferència de les proteïnes ja separades a un suport de nitrocel·lulosa emprant el sistema Mini-Protean III (Bio-Rad, Alemanya).

Així, el gel que conté les proteïnes s'equilibra en el tampó de transferència (191 mM glicina i 20% de metanol en Tris 25mM). Paral·lelament es prepara un full de nitrocel·lulosa (Schleider & Schuell, Alemanya) de les mateixes dimensions que el gel que també s'equilibra en el mateix tampó. La transferència s'efectua en humit a 150 mA i 75 volts durant 70-120 minuts (en funció del pes molecular de la proteïna que es vol detectar).

L'èxit de la transferència es pot monitoritzar gràcies a un revelat reversible i general de proteïnes damunt de la membrana amb el colorant vermell de Ponceau S (0.2% de tint en solució al 3% d'acid acètic). La decoloració es fa amb aigua destilada.

9.3.3. Immunodetecció

El primer pas necessari per a la detecció de la proteïna desitjada damunt de la membrana és el bloqueig d'aquesta, com a mínim 1 hora a TA, amb una solució al 5% de llet descremada en el tampó TBS-I (150 mM NaCl i 0.05% Tween-20 en Tris 50 mM pH 7.4). Aquest pas evitarà la unió inespecífica dels anticossos a la membrana, disminuint així el soroll de fons en la detecció.

Posteriorment, es procedeix a la incubació amb un anticòs generat específicament contra la proteïna a detectar (anticòs primari). Aquest es dilueix en tampó de dilució d'anticòs (5% de llet descremada en TBS-I i 0.1% azida sòdica per a evitar la contaminació de la solució) fins a obtenir una concentració final de 0.5-1 μ g/ml.

La incubació de l'anticòs primari es realitza durant 1-2 hores a TA o alternativament tota una nit a 4°C, sempre en agitació constant per tal d'evitar la

dessecació de la membrana i assegurar un marcatge uniforme. Finalitzada aquesta, es fan 3 rentats amb tampó TBS-I.

Donat que l'anticòs primari no conté cap marcatge que permeti la seva visualització, és necessari incubar la membrana amb un segon anticòs capaç de reconèixer el primari, i que simultàniament incorpori un sistema de detecció (anticòs secundari). Tots els anticossos secundaris emprats per a aquesta tècnica es troben conjugats amb l'enzim peroxidasa de rave (HRP) que disposa d'un ampli ventall de substrats, els productes dels quals són detectables per diferents mètodes.

En funció de l'espècie en que ha estat generat l'anticòs primari, es requereix un secundari dissenyat per a reconèixer le immunoglobulines (IgG) d'aquesta espècie. Els anticossos emprats en aquesta tesi, tant primaris com secundaris, es detallen a la taula 10.

Anticòs contra	Id.	Font	Pes mol. (kDa)	Dilució	Proveïdor
hENT1		Rab-Pol.	50	1/1000	Cedit M.Pastor
hCNT1		Rab-Pol.	65	1/1000	Cedit M.Pastor
PARP-1	556493	Mo-Mono.	116	1/1000	Pharmingen
CycE	HE12	Mo-Mono.	50	1/1000	Santa Cruz
CycB	GNS1	Mo-Mono.	67	1/1000	Santa Cruz
p53	DO7	Mo-Mono	53	1/1000	Novocastra
p16		Mo-Mono.	16	1/1000	Pharmingen
DPC4	B-8	Mo-Mono.	62	1/1000	Santa Cruz
Adenovirus	Ab6982	Rab-Pol.	Proteïnes de la càpside Ad5	1/4000	Abcam
Actina	A2066	Rab-Pol.	42	1/2000	Sigma
Secundaris					
Mouse-HRP	P0260	Rabbit		1/1000	Dako
Rabbit-HRP	SJ-434	Donkey		1/5000	Amersham

Taula 10. Anticossos emprats i dilució emprada.

La solució d'anticòs secundari es prepara per dilució d'aquest en el tampó de dilució d'anticòs, tot i que, en aquest cas, la solució no conté azida sòdica (NaN_3), ja que aquesta actua com a inhibidora de l'activitat peroxidasa. La incubació s'efectua a TA durant un mínim d'1 hora en agitació. Es finalitza amb 3 rentats de TBS-I.

La darrera etapa del procés és la detecció de l'activitat peroxidasa, que es correspon amb la localització de la proteïna d'interès. En el sistema de revelat escollit, el producte resultant és quimioluminiscent, el que aporta una elevada sensibilitat (sistema ECL d'*Enhanced ChemoLuminiscent Method*, Biological Industries). Posteriorment les imatges es quantifiquen amb el programa Multi Gauge v3.0 (Fujifilm).

El procés implica la incubació de la membrana amb dues solucions (A i B) que contenen respectivament H_2O_2 , i luminol (substrat de l'HRP) més un agent amplificador del senyal. Per a la detecció del senyal en aquest treball s'han

utilitzat dos sistemes. El primer consisteix en la detecció de la llum emesa en el transcurs de la reacció mitjançant el seu impacte damunt un film fotogràfic, que es revela amb les solucions habituals fotogràfiques. El segon consisteix en la detecció mitjançant una càmera fotogràfica de sensibilitat elevada que genera una imatge digital Las-3000(Fujifilm).

Les membranes emprades en l'assaig de Western blot poden ser re-utilitzades per a la detecció d'altres proteïnes a partir d'altres anticossos primaris. Tot i que existeixen mètodes destinats a eliminar de la superfície de la membrana tots els anticossos ja presents, i deixar la membrana lliure de qualsevol marcatge previ (mètodes d'*stripping-off*), en molts casos aquest pas no és necessari ja que els pesos moleculars són prou diferents i la presència d'un senyal anterior no interfereix en els determinacions subsegüents. Així, per reiniciar el procés de revelat amb un nou anticòs únicament és necessari rentar la membrana un mínim de 3 cops amb TBS-I (per tal d'eliminar les restes de reactiu d'ECL) i re-incubar novament amb el tampó de bloqueig.

10. Mesures de transport de nucleòsids

El mètode emprat per a la mesura de la captació de nucleòsids en cultius cel·lulars consisteix en la incubació simultània de les cèl·lules en presència d'una concentració coneguda de substrat no radioactiu (fred) i d'una proporció adient del mateix substrat marcat radioactivament, durant un temps determinat. La radioactivitat incorporada per les cèl·lules, indicatiu de la quantitat de substrat total captat, s'analitza per aturada del transport i posterior lisi i solubilització en un líquid de cintil·lació.

La proporció entre el substrat fred i radioactiu vindrà determinada per l'activitat específica del substrat radioactiu. En primer lloc és necessari disposar de prou marcatge per a que aquest pugui ser detectat, per tant quan la taxa de transport del substrat o el nombre de cèl·lules siguin baixos caldrà augmentar la quantitat de substrat radioactiu. Un cop determinada, la quantitat de substrat restant fins aconseguir la concentració desitjada es completarà amb substrat fred. El temps durant el que es realitza el transport ha de ser tal que la reacció de transport es trobi dins el rang de la velocitat inicial (V_0), en què la quantitat de substrat transportat és directament proporcional al temps d'incubació.

Els estudis de captació es realitzen en plaques de 24 pous. El nombre de cèl·lules depèn del tipus d'experiment.

10.1. Preparació dels medis de transport

Per a la mesura de la captació de nucleòsids es suplementen paral·lelament els medis sodi i colina amb el nucleòsid no radioactiu, de manera que la concentració final sigui 1 μM . Addicionalment, cal afegir un volum determinat de

l'anàleg marcat corresponent que assegurí 1.5 μCi per mil·lilitre de medi de transport.

Medis i reactius:

- Medi de transport amb sodi: NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Hepes 10 mM. S'ajusta a pH 7.4 amb Tris base 1 M (Trizma base, Sigma).
- Medi de transport amb colina: la composició és idèntica a la del medi anterior si bé es substitueix el clorur de sodi per clorur de colina 137 mM. Anàlogament s'ajusta a pH 7.4 amb Tris base 1 M.
- Estocs de citidina, uridina, NBTI, dipiridamol (Sigma) a concentracions de 1 a 100mM.
- Nucleòsids i anàlegs marcats amb triti. [5-³H(N)]Citidina, [5,6-³H(N)]Uridina (Amersham Pharmacia Biotech).

10.2. Assaig de transport

En el moment de començar l'assaig de transport, es renten dos cops les cèl·lules amb 2 ml de medi sodi o colina, prèviament temperats, per eliminar les restes de medi de cultiu. La captació intracel·lular comença en el moment que substituïm el medi de rentat per medi de transport radioactiu (250 μl per pou). Cada punt de transport es realitza per quadruplicat. Un cop finalitzat el temps d'incubació es realitzen ràpidament dos rentats amb solució d'aturada, mantinguda en gel. D'aquesta manera s'atura el transport per la baixada de la temperatura i per dilució al realitzar els rentats. Acabat el darrer rentat s'afegeixen 100 μl de solució de lisi (Tritó X-100 0.5%, 100 mM NaOH) i s'agiten vigorosament les plaques en un agitador horitzontal durant 30 minuts aproximadament. De cada pou, prèvia disgregació i homogenització del contingut, es recull una alíquota de 10 μl , per a mesurar posteriorment la concentració proteica. La resta del lisat es solubilitza en 3 ml de líquid de cintil·lació (Ecolite, ICN) per a la realització del comptatge radioactiu. A part dels vials amb les mostres radioactives, cal preparar per triplicat uns vials que continguin 10 μl de cadascun dels medis de transport radioactius per tal d'obtenir els patrons o estàndards als quals referir els resultats.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, és important tenir en compte que les mesures de transport han de realitzar-se sota condicions de velocitat inicial. Això implica la caracterització prèvia del sistema mitjançant el seguiment al llarg del temps de la incorporació d'una concentració fixa de substrat. Un cop definit l'interval en què la captació de solut es manté linial en funció del temps, s'està en condicions de triar el temps de treball.

10.3. Valoració de proteïnes

Degut a les manipulacions a les que es sotmeten les plaques junt amb el petit error acumulat en la sembra, el nombre de cèl·lules per pou mai és el mateix.

Aquesta diferència cal tenir-la en compte per tal que els resultats de les mesures de transport siguin comparables entre sí. Per tant, cal corregir els valors de les mesures de captació per la concentració proteica present en cada mostra.

La valoració de la concentració de les proteïnes es realitza mitjançant el mètode de BCA (Pierce). Consta de dos reactius A i B que es barregen a raó de 1:50 i s'afegeixen 100 µl per pou de placa de 96 on prèviament s'han afegit els 10 µl de la mostra a valorar. S'incuba 1h a 37°C i es deixa atemperar 15 minuts a TA abans de procedir a la seva lectura en un lector d'ELISA a 550 nm. Addicionalment es prepara una patró amb albúmina sèrica bovina al 0.1% on interpolar els valors de les absorbàncies de les mostres.

10.4. Càlculs

Les mesures realitzades en presència de sodi són un indicatiu de la taxa total de transport que inclou el transport dependent de sodi, el transport independent de sodi i la difusió. Les mesures determinades en el medi amb colina proporcionen exclusivament les taxes de transport independent de sodi i la difusió. La component dependent de sodi es determina en conseqüència per subtracció de les dues mesures anteriors. La component independent de sodi sensible a NBTI (ENT1) s'obté restant la taxa de transport en medi colina amb NBTI de la taxa de transport en medi colina únicament. La resta es considera transport independent de sodi sensible a NBTI (ENT2), difusió passiva i unions inespecífiques.

Els vials que contenen les mostres radioactives i els corresponents estàndards es mesuren al comptador beta amb un programa que proporciona dpms (desintegracions per minut) de triti. Per poder convertir les dpms a concentració és necessari calcular l'activitat específica (AE) del medi de transport radioactiu (estàndard) utilitzant la fórmula:

$$\text{Activitat específica (dpm/pmol)} = \text{dpm std} / [\text{substrat}] (\mu\text{M})$$

Amb aquest valor ja es pot obtenir un valor de transport de cada mostra, expressada en pmol substrat/mg proteïna/minut:

$$\text{Activitat mostra (pmol/mg/min)} = \text{dpm mostra} / (\text{AE} \times \text{prot total (mg)} \times \text{temps (min)})$$

11. Tècniques relacionades amb la manipulació de ratolins atòmics

11.1. Animals

Per a la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat ratolins atòmics BALB/c nu/nu femelles de 4-6 setmanes d'edat amb un pes mig de 20-22 grams (Harlan) en el moment de l'inici de l'experiment. Els animals es mantenen en un ambient

estèril, i tant les gàbies com l'aigua s'esterilitzen per autoclavat; els encenalls i el menjar s'esterilitzen mitjançant irradiació amb raigs gamma. Els animals són sotmesos a una dieta ordinària de laboratori amb lliure accés a aigua i menjar i es mantenen a temperatura controlada entre 22-24 °C en un cicle de llum foscor de 12h. Tots els procediments als quals han estat sotmesos els animals es realitzen d'acord amb les recomanacions per al correcte tractament i ús dels animals de laboratori segons protocol autoritzat pel comitè ètic. Implantació de cèl·lules tumorals al teixit subcutani de ratolins atímics.

Per a la generació de tumors d'origen pancreàtic en el teixit subcutani de ratolins Balb/C nu/nu, es cultiven les cèl·lules en plaques de 150 mm de diàmetre, i quan arriben a una confluència del 80-90% es tripsinitzen, es compten, es preparen per tenir la concentració desitjada i finalment s'injecten subcutàniament (s.c.) a cada ratolí en un volum final de 100-200 µl de PBS.

En tots els casos, la injecció s'ha realitzat als dos flancs de l'animal i la quantitat de cèl·lules inoculades varia entre 5 i $10 \cdot 10^6$ cèl·lules per tumor en funció de la línia cel·lular.

Per dur a terme la injecció de les cèl·lules, un cop el ratolí està immobilitzat, s'agafa i s'aixeca la pell del flanc lleugerament de manera que es formi un petit solc. A continuació es clava l'agulla i s'injecten les cèl·lules lentament amb una agulla de 25G.

11.2. Mesura i seguiment del creixement tumoral

Després de l'inòcul, els ratolins són controlats dos cops per setmana fins que es comprova l'existència del tumor. A partir d'aquest punt, el creixement de la massa tumoral es mesura de 2 a 3 cops per setmana amb un peu de rei digital en dues de les seves dimensions, i els volums de cada tumor es calculen mitjançant la següent fórmula:

$$\text{Volum (mm}^3\text{)} = a^2 \times b \times \pi/6$$

On a és la dimensió menor del tumor (en mm)
 b és la dimensió major del tumor (en mm)

11.3. Implantació de fragments tumorals al pàncreas de ratolins atímics

La generació de tumors intrapancreàtics es realitza a partir de la implantació directa d'un fragment tumoral al pàncreas del ratolí.

En primer lloc, s'anestesia l'animal amb una barreja de ketamina/xilacina 1:3 diluïda a la meitat amb salí fisiològic a raó de 3 µl per gram de ratolí, aquesta anestesia també té efectes analgèsics, pel què no s'administra un analgèsic addicional. Quan el ratolí no presenta reflexes plantars s'inicia l'operació.

Aquesta consisteix en realitzar una laparotomia subcostal esquerra per on s'exposa la melsa i el pàncreas del ratolí, on ràpidament s'implanta el fragment tumoral de 10 mg mitjançant un punt de sutura Prolene 5-0. Aleshores es reintrodueix el pàncreas amb el fragment de tumor a la cavitat abdominal i s'hi afegeixen 500 µl de salí fisiològic per rehidratar i facilitar la recol·locació dels òrgans del ratolí. Per acabar es tanca la ferida mitjançant una grapa quirúrgica que subjecta tant la paret muscular com la pell de l'animal i es col·loquen els animals sobre una placa temperada que els manté la temperatura corporal fins que es recuperen de l'anestèsia.

11.4. Seguiment del creixement tumoral

Després de l'implantació dels tumors, els ratolins són pesats cada setmana, transcorregudes unes dues setmanes, temps necessari per la desaparició de la inflamació produïda per l'operació, el tamany del tumor es mesura setmanalment per palpació abdominal del ratolí.

11.5. Tractament dels animals

11.5.1. Administració de fàrmacs

La gemcitabina es prepara just abans de la seva administració als animals, es dilueix en salí fisiològic i es filtra. La injecció es realitza amb una agulla de 30G i la concentració de l'estoc injectat s'ajusta de manera que la dosi a administrar estigui continguda en un volum final de 200 µl. En aquest treball les dosis de gemcitabina i les pautes de tractament han variat en funció de l'objectiu de l'assaig.

11.5.2. Administració intratumoral d'adenovirus

Les solucions virals injectades en els ratolins atímics es corresponen sempre a estocs d'adenovirus purificats. Amb l'objectiu d'aconseguir una màxima distribució de les partícules víriques l'inòcul es reparteix en 4 injeccions de 5 µl en diferents àrees del tumor, que es realitzen amb una agulla Hamilton de 30G.

Les solucions virals emprades en els experiment, així com els seus títols es recullen a la taula 11

Virus	Primer <i>in vivo</i>	Segon <i>in vivo</i>
Ad1613	8.0·10 ⁹ UT/ml	1.0·10 ¹¹ UT/ml
Ad-hENT1	3.0·10 ¹⁰ UT/ml	2.5·10 ¹¹ UT/ml
Ad-hCNT1	1.2·10 ¹⁰ UT/ml	1.2·10 ¹¹ UT/ml
AdwtRGD	8.3·10 ¹² pv/ml	4.5·10 ¹² pv/ml
AdRGD-p53	7.4·10 ¹² pv/ml	6.0·10 ¹² pv/ml
AdRGD-tatp53	9.0·10 ¹² pv/ml	2.3·10 ¹² pv/ml

Taula 11. Estocs adenovirals emprats en els experiments *in vivo*.

pv: partícules virals; UT: unitats de transducció.

Tots els adenovirus del primer *in vivo* estan diluïts en PBS enriquit complementat amb 2.5% de glicerol, mentre que en el segon *in vivo* aquest està complementat amb el 10% de glicerol.

11.6. Obtenció dels tumors subcutanis

Els ratolins es sacrifiquen per dislocació cervical i els tumors subcutanis s'extreuen i separen del teixit connectiu de l'animal utilitzant material quirúrgic. Un cop extrets el tumors es pesen i es processen en funció de la utilitat que es vulgui donar a cada mostra. Si el tumor té una mida superior a 200 mg es tallen per la meitat amb una fulla de bisturí i una meitat s'inclou amb parafina i l'altra en OCT.

11.6.1. Fixació de tumors en paraformaldèhid

En primer lloc es renten els tumors amb salí fisiològic, es col·loquen dins d'un motlle (Histosettell, Simport plastics) rotulat amb llapis i es submergeixen en paraformaldèhid (PFA) al 4% a TA durant un temps mínim de 12 hores i un màxim de 24 hores en funció del tamany de la mostra. Un cop transcorregut aquest temps, les mostres ja estan fixades, es retira el PFA de les mostres i es passen a PBS. En aquest punt les mostres es poden emmagatzemar a 4°C fins al moment del seu processament.

11.6.2. Inclusió de tumors en OCT

Els tumors es renten amb solució salina i es col·loquen en motlles *Criomold* (Tissue Tek Sakura) rotulats on prèviament s'hi ha afegit una capa de matriu crioprotectora OCT (Tissue Tek Sakura) i es congelen ràpidament en neu carbònica. Les mostres es guarden a -80°C fins al moment del seu processament.

11.6.3. Congelació en nitrogen líquid

Al igual que en els casos anteriors els tumors es renten amb solució salina. En aquest cas, els tumors s'empaqueten amb paper d'alumini i es submergeixen ràpidament en nitrogen líquid. Les mostres es guarden a -80°C fins a la seva utilització.

12. Tècniques histològiques

12.1. Inclusió en blocs de parafina

La deshidratació i la posterior inclusió del tumors fixats en PFA en blocs de parafina es realitza seguint el següent protocol: el tumor es submergeix en etanol

70% durant 3 hores i posteriorment es passen a etanol 96% on se'ls deixa tota la nit. Al dia següent, es passen a un primer pas d'etanol 100% durant 2h seguit d'un segon pas amb etanol 100% durant 1 hora. A continuació es deixen en xilol entre 30 i 60 minuts fins que tinguin la duresa adequada (depèn del tipus de teixit i de la seva mida). En aquest punt, amb les mostres totalment deshidratades, ja es pot començar la seva inclusió en parafina: primer es submergeixen en parafina tota la nit a 65°C i l'endemà es passa a parafina nova on es deixa un mínim de 2 hores (es poden deixar tota la nit). Per fer els blocs s'utilitza l'aparell Leica EG 1120, que manté la parafina líquida a 60°C i té un dosificador que permet omplir els motlles, junt amb una placa Leica EG 1140 C que està a una temperatura de 4°C i que permet la solidificació homogènia dels blocs.

12.2. Obtenció de talls histològics

En aquest treball s'han realitzat dos tipus de talls histològics: mitjançant un micròtom i mitjançant un criostat.

12.2.1. Obtenció de talls histològics amb micròtom

A partir dels blocs de parafina s'han obtingut talls de 5 µm de gruix amb un micròtom de rotació. Un cop tallades, les seccions es submergeixen en un bany amb aigua destil·lada atemperada a 42°C per aconseguir la seva màxima extensió. Un cop llises es dipositen en portaobjectes prèviament tractats amb poly-L-lisina (Sigma), per tal d'augmentar l'adherència de les mostres. Aquest tractament consisteix en submergir els portaobjectes 5 minuts a TA en una solució de poly-L-lisina al 10% en aigua destil·lada.

12.2.2. Obtenció de talls histològics amb criostat

En aquest cas partim de les mostres preservades en OCT i mitjançant un criostat que ens permet mantenir les mostres congelades a -20°C, realitzem talls de 5 µm. Aquests, a mesura que s'obtenen es col·loquen en portaobjectes tractats amb poly-L-lisina i per afavorir la seva adhesió la mostra s'escalfa lleugerament amb la mà pel revers del portaobjectes. Les crioseccions es guarden a -80°C fins al moment del seu processament.

12.3. Tinció hematoxilina-eosina de mostres parafinades

Aquesta tinció permet avaluar l'estructura dels teixits i es realitza sobre talls histològics de 5 µm de gruix obtinguts amb el micròtom, seguint un protocol estàndard: en primer lloc es desparafinen les mostres submergint-les en una bateria de 4 xilols (5 minuts cada una); després per tal de rehidratar-les, es submergeixen en solucions amb una concentració decreixent d'etanol: 100%, 96% i 70%, 5 minuts cadascuna i finalment en aigua destil·lada.

En aquest punt, les mostres es tenyeixen amb una dilució 1:5 en aigua bidestil·lada de l'hematoxilina de Mayer (Merck) durant 90 segons i posteriorment

s'elimina l'excés de colorant amb aigua corrent sota l'aixeta. Tot seguit es realitza la tinció amb eosina A (Merck) a l'1% (p/v) en etanol 80% i un 5% d'àcid acètic (v/v) durant 5-10 segons. Posteriorment, es procedeix a la rehidratació dels teixits submergeint-los en solucions creixents d'etanol (70, 96 i 100%, pocs segons per a cadascuna és suficient) i finalment xilol. Per acabar, es munten les mostres amb un medi de muntatge hidrofòbic DPX (Sigma).

12.4. Tinció tricròmica de Masson

Aquesta tinció posa de manifest la presència de teixit connectiu i fibres el·làstiques dins la mostra. Al igual que per la tinció d'hematoxilina-eosina les mostres es desparafinen amb xilol, es rehidraten amb etanol i s'equilibren en aigua bidestil·lada. A continuació, s'incuben al microones en Bouin durant 1 minut, es renten amb aigua i es submergeixen en hematoxilina de Weiger (Sigma) durant 10 minuts. Tot seguit, es tornen a rentar amb aigua, s'incuben 5 minuts amb el reactiu de Biebrich-Fucsina (Sigma) i es tornen a rentar amb aigua. Després, es submergeixen amb àcid fosfotúngstic durant 15 minuts, s'elimina l'excés i s'incuben 10 minuts amb blau d'anilina o alternativament amb verd llum. Per acabar, es tornen a rentar amb compte, ja que la coloració marxa amb facilitat i es deshidraten amb una bateria de 3 alcohols i 4 xilols i es procedeix al seu muntatge amb DPX.

12.5. Determinació de l'apoptosi en talls histològics

Un dels trets que caracteritza la cèl·lula apoptòtica és la fragmentació del DNA nuclear. Les endonucleases cel·lulars alliberades per efecte de la cascada apoptòtica són capaces de tallar la molècula de DNA nuclear per l'espai internucleosomal, produint una mescla de fragments de DNA la longitud dels quals varia en múltiples de 180-200 parells de bases. Basat en aquest fet, el marcatge dels extrems 3'-hidroxil lliures amb l'enzim TdT (deoxinucleotidil-transferasa terminal) pot esdevenir un bon mètode de detecció d'apoptosi tant en cèl·lules en cultiu, com damunt de teixits (Gavrieli *et al.*, 1992). És l'anomenat mètode TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*).

En aquest treball, l'anàlisi del grau d'apoptosi en els tumors s'ha realitzat mitjançant l'assaig de TUNEL sobre talls histològics de 5 µm de gruix obtinguts amb el criostat seguint el protocol del *kit* comercial *in situ* death detection kit (Roche) recomanat pel fabricant. Breument, un cop es tenen les mostres descongelades (deixant-les 15 minuts a TA), es fixen els talls amb una solució de PFA al 4% (p/v) durant 20 minuts a TA. Després de fer un rentat de 5 minuts i dos de 10 minuts amb PBS, es realitza un bloqueig de les mostres, amb una solució al 3% d'H₂O₂ (v/v) (Sigma) en metanol. Aquest pas requereix una incubació de 10 minuts a TA i la protecció de les mostres de la llum. Tot seguit es fan rentats ràpids amb PBS i es permeabilitzen les mostres durant 2 minuts a 4°C amb una solució que conté Tritó 0.1% (v/v) i citrat sòdic 0.1% (p/v) (Sigma) en aigua.

Després de fer diversos rentats amb PBS, es realitza la incubació amb la barreja de la reacció enzimàtica en una cambra humida durant 1 hora a 37°C.

La reacció es prepara mantenint una relació 9:1 entre el tampó de reacció i l'enzim TdT.

El control negatiu només s'incuba amb el tampó de reacció, sense l'enzim, i el control positiu es tracta durant 10 minuts a TA amb DNasa I a una concentració de 750 µg/ml, abans de la incubació amb la barreja de reacció.

Finalment, es fan tres rentats de 5 minuts amb PBS i es munten les mostres utilitzant un medi de muntatge comercial (Vectashield, Vector) amb 0.2 µg/ml 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que permet visualitzar els nuclis cel·lulars.

Les imatges s'analitzen i s'obtenen amb un microscopi de fluorescència Leica acoblat a una càmera digital.