

---

### ***3.MATERIALS I MÈTODES***



### 3.1. Línies cel·lulars i cultius primaris

Les línies cel·lulars ECV-304 (*Human urinary bladder carcinoma*), KB3.1 (*Human Epidermoid Cancer*), A7r5 (*Rat smooth muscle embryonic aorta*) (ATCC, *American type Culture Collection*), i el cultiu primari de cèl·lules SMC (*rat smooth muscle aorta cells*) es van fer créixer en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* (Invitrogen-Life Technologies), suplementat amb 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Linus), L-glutamina (2mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicilina 100 unitats/ml i estreptomicina 100µg/ml) (Invitrogen).

El cultiu primari de cèl·lules endotelials HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (Advancell) es van créixer en EGM bullet kit (Clonetics), que consta de medi EBM (*Endothelial Basal Medium*), suplementat amb 10% FBS, rhEGF (*Human Epidermal Growth Factor*), hidrocortisona, BBE (*Bovine Brain Extract*), GA-100 (gentamicina), L-glutamina (2mM) i antibiòtics (penicilina 100 unitats/ml i estreptomicina 100µg/ml).

La línia cel·lular NRK-52E (*Rat Kidney Epithelial*), HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) i HEK-293T (*HEK 293 cells expressing the SV40 T-antigen*) es van fer créixer en DMEM (Invitrogen), suplementat amb 10% FBS (Linus), L-glutamina (2mM) (Invitrogen), antibiòtics (penicilina 100 unitats/ml i estreptomicina 100µg/ml) (Invitrogen) i un 1% de NEAA (*Non Essential Amino Acids*) (Invitrogen).

Les línies cel·lulars hematopoiètiques de limfòcits B, Jurkat, Jurkat D1.1 i Raji es van fer créixer en RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (Invitrogen) suplementat amb 10% HI-FBS (*Heat inactivated-FBS*) (Linus), L-glutamina (2mM) (Invitrogen), antibiòtics (penicilina 100 unitats/ml i estreptomicina 100µg/ml) (Invitrogen). La línia cel·lular de leucèmia promielocítica HL-60 es va fer créixer en RPMI suplementat amb 20% HI-FBS, L-glutamina (2mM) (Invitrogen), antibiòtics (penicilina 100 unitats/ml i estreptomicina 100µg/ml) (Invitrogen).

Totes les cèl·lules es van fer créixer en una estufa d'atmosfera humida a 37°C i 5%CO<sub>2</sub>.

### 3.2. Estimulació de ECV-304 amb citoquines proinflamàtòries

Per tal d'incrementar l'expressió de la proteïna CD40 en les cèl·lules ECV-304, aquestes van ser cultivades amb medi en presència de les citoquines proinflamàtòries IFN-γ i TNF-α a una concentració de 1000U/ml i 100U/ml respectivament. Després de diferents períodes d'incubació (14, 24 i 48h) amb aquestes citoquines proinflamàtòries, les cèl·lules es van rentar 2 vegades amb PBS i es van recollir per analitzar l'expressió de CD40 a nivell de proteïna per Western Blot.

### 3.3. Estimulació de HUVEC amb cèl·lules Jurkat D1.1

Per tal d'activar les cèl·lules endotelials via CD40-CD40L, un cop transfectades, les cèl·lules del cultiu primari HUVEC van ser activades per coincubació amb cèl·lules Jurkat D1.1. Es tracta d'un subclon de cèl·lules Jurkat que expressa de forma constitutiva el lligand de CD40, CD40L. Al cultiu de cèl·lules HUVEC es van afegir Jurkat D1.1 amb un relació T/EC (cèl·lula T/cèl·lula endotelial) de 5:1 o 10:1 durant diferents temps d'incubació (4h, 6h, 10h, o 16h) prèviament a l'anàlisi.

48 hores posttransfecció, aquests cocultius eren rentats exhaustivament amb PBS per tal d'eliminar les Jurkat D1.1 que havien quedat adherides a la monocapa de HUVEC. Després, les cèl·lules HUVEC eren recollides per a ser analitzades.

### 3.4. Disseny i síntesi dels siRNAs anti-CD40 humà i de rata

Per al disseny dels siRNAs dirigits contra la seqüència del mRNA de CD40 humà (GenBank Acc.Nº NM\_001250) i del mRNA de CD40 de rata (GenBank Acc.Nº AF241231; seqüència parcial del cDNA de 547 pb), es van seguir les recomanacions generals descrites en la pàgina web de *Protocol on line* (<http://www.protocol-online.org/prot/Detailed/3210.html>) [218, 224]. Es van buscar seqüències de 23 parells de bases al llarg del cDNA, 19 de les quals serien complementàries al gen diana, del tipus AA(19)TT, evitant les regions 5' i 3' no traduïdes i les regions properes al codó d'inici de la traducció, ja que són regions riques en llocs d'unió a proteïnes reguladores que podrien interferir amb la unió del complex RISC.

Es va fer servir el programa informàtic de Michael Zucker, Mfold versió 3.0 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>), un programa de predicció de plegament i estructura secundària dels mRNA diana per identificar les regions d'aquest mRNA que podrien ser més accessibles a la unió pels diferents siRNAs dissenyats.

Un cop escollides les seqüències dels diferents siRNAs, i per tal d'evitar efectes *off-target* en altres gens i assegurar l'especificitat d'unió d'aquests siRNAs al gen diana, es va comprovar que la seva seqüència no presentava homologia amb cap altra seqüència de mRNA publicada a la base de dades de GenBank utilitzant el programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Per al cribatge inicial dels siRNAs anti-CD40, aquests RNAs dúplex de 21nt van ser sintetitzats per transcripció *in vitro* utilitzant el kit *Silencer<sup>TM</sup> siRNA Construction kit* (Ambion) seguint les instruccions del fabricant. Es van dissenyar i sintetitzar un total de 8 siRNAs anti-CD40 humà i 9 siRNAs anti-CD40 de rata.

Un cop obtinguda la seqüència de siRNA més eficient en la inhibició de CD40 humà,

aquest siRNA (siRNA-2) va ser generat per síntesi química (Xeragon, Qiagen) amb residus 2-deoxytimidina en posició 3'cohesiu per tal d'incrementar la resistència a degradació per nucleases. Per altra banda, es va sintetitzar un siRNA-*mismatched* control (misRNA-2) amb la mateixa longitud i composició de bases que el seu corresponent siRNA-2 però amb una transversió de 5 nucleòtids centrals (Taula 9).

siRNA anti-CD40 humà	seqüència	posició mRNA CD40 (ATG)
siRNA-1	5'-UGCCUCCUUGCGGUGAAAUU-3' 3'-UUACGGAAGGAACGCCACUUU-5'	173-193
siRNA-2	5'-GCGAAUCCUAGACACCUGUU-3' 3'-UUCGCUAAGGAUCUGUGGAC-5'	192-212
siRNA-3	5'-UGUCACCCUUGGACAAGCUUU-3' 3'-UUACAGUGGGAACCGUUCGU-5'	479-499
siRNA-4	5'-UUUCCCGACGAUCUCCUUU-3' 3'-UUAAAAGGCUGCUAGAAGGA-5'	709-729
siRNA-5	5'-CCACCACUGCAUGCAGAGUU-3' 3'-UUGGUGGGUGACGUACGUCUC-3'	62-82
siRNA-6	5'-CUGGUGAGUGACUGCACAGUU-3' 3'-UUGACCACUCACUGACGUGUC-5'	137-157
siRNA-7	5'-CAGAGACACACUGCCACUU-3' 3'-UUGUCUCUCUGUGACGGUG-5'	214-234
siRNA-8	5'-UACUGCGACCCCAACCUAGUU-3' 3'-UUAUGACGCUGGGGUUGGAUC-5'	242-262
msiRNA-2	5'-GCGAAUCCUAGACACCUGUU-3' 3'-UUCGCUAAGGAUCUGUGGAC-5'	192-212
siRNA-C	5'-ACUACAAGACUCGUGACCAUU-3' 3'-UUUGAUGUUCUGACACUGGU-5'	-

Taula 9. Seqüència dels diferents siRNAs dissenyats anti-CD40 humà, els siRNAs control i la seva posició respecte al codó d'inici de la traducció dins la seqüència del mRNA de CD40 humà.

A la Taula 10 es mostren les seqüències dels siRNAs dissenyats anti-CD40 de rata.

siRNA anti-CD40 rata	seqüència	posició mRNA CD40 (ATG)
siRNA-2	5'-ACAGUACCUCCAAGGUGGCUU-3' 3'-UUUGUCAUGGAGGUUCCACCG-5'	124-145
siRNA-4	5'-ACCGACUAGUUAGCCACUGUU-3' 3'-UUUGGUGAUCUAAUCGGUGAC-5'	171-192
siRNA-6	5'-UGCCAACCGUGCGACUCAGUU-3' 3'-UUACGGUUGGCACGCUGAGUC-5'	212-233
siRNA-10	5'-CUCAAUCAAGGGCUUCAGGUU-3' 3'-UUGAGUUAGUUCGGAAGUCC-5'	290-251
siRNA-12	5'-GGGCUUCAGGUUAGAAGGUU-3' 3'-UCCCCGAAGUCCAAUUCUCC-5'	299-320
siRNA-21	5'-GUGUCAUCCAUGGACAAGCUU-3' 3'-UUCACAGUAGGUACCGUUCG-5'	517-538
TNFRSF5-1	5'-GCUCUUGAGAAGACCCAAUUU-3' 3'-GTTCGAGAACUCUUCUGGGUUA-5'	157-175
TNFRSF5-2	5'-GGCGAAUUCACAGCUCACUUU-3' 3'-GTCCGCUAAGAGUCGAGUGA-5'	193-211
TNFRSF5-3	5'-GUGUGUUACGUGCAGUGACUU-3' 3'-GTCACACAAUGCACGUCACUG-5'	66-84
siRNA-C	5'-ACUACAAGACUCGUGACCAUU-3' 3'-UUUGAUGUUCUGACACUGGU-5'	-

Taula 10. Seqüència i localització dels siRNAs dissenyats dins del mRNA de CD40 de rata.

En el cas dels estudis d'inhibició de CD40 de rata a més dels 6 siRNAs sintetitzats per transcripció *in vitro* (siRNA-2, siRNA-4, siRNA-6, siRNA-10, siRNA-12, siRNA-21) es van fer servir 3 siRNAs (TNFRSF5\_1, TNFRSF5\_2, TNFRSF5\_3), anomenats *Silencer pre-designed siRNAs*, els quals van ser dissenyats i sintetitzats per Ambion fent servir un algoritme desenvolupat per *Cenix BioScience*.

### 3.5. Transfecció de siRNAs

Existeixen diferents estratègies per introduir DNA en cèl·lules eucariotes: transfecció per mètodes químics, transfecció per mètodes físics o transducció amb virus. En aquest apartat es descriuen els mètodes que s'han utilitzat per transfectar diferents línies cel·lulars humanes i de rata amb siRNAs.

#### 3.5.1. Transfecció amb OligofectAMINA

La transfecció mitjançant lípids catiónics es basa en l'habilitat que tenen aquests per unir-se a les molècules de DNA amb càrrega neta negativa i formar un complex catiónic estable que s'uneix i es fusiona amb la membrana cel·lular, carregada negativament.

Per tal d'optimitzar l'eficiència d'incorporació dels siRNAs en les cèl·lules ECV-304, es va fer servir un oligonucleòtid fosforotioat (PS-ODN) marcat a 3' amb fluoresceïna (FITC) i el lípid catiónic OligofectAMINA (Invitrogen).

El dia abans de la transfecció es van sembrar les cèl·lules ECV-304 a una densitat de  $1 \times 10^5$  cèl·lules per pou en plaques de 6 pous. Es va seguir el protocol de transfecció descrit pel fabricant, utilitzant medi OptiMEM (Invitrogen) i diferents quantitats de OligofectAMINA (2, 3 i 4  $\mu$ l) amb dues concentracions diferents de ODN-FITC: 200nM o 25 nM. Les cèl·lules es van incubar amb els complexos durant 4 hores, després el medi de transfecció es canviava per medi complet. A les 48 hores posttransfecció, es quantificava el percentatge de cèl·lules transfectades per citometria de flux fent servir el citòmetre de flux EPICS XL (Coulter Electronics) i es determinava la localització cel·lular dels complexos visualitzant les cèl·lules transfectades al microscopi invertit de fluorescència *Olympus IX-70*.

Per als experiments de transfecció dels diferents siRNAs anti-CD40 humà en la línia de cèl·lules ECV-304, es va fer servir 3  $\mu$ l del lípid catiónic OligofectAMINA i una concentració final del siRNA de 100nM.

#### 3.5.2. Transfecció amb Targefect *siRNA transfection reagent*

Per als experiments inicials de transfecció del cultiu primari de cèl·lules HUVEC amb

siRNA anti-CD40, es va fer servir el *Targefect siRNA transfection reagent* (Targeting systems). Es tracta d'un lípid catiònic que permet assolir una elevada eficiència de transfecció de siRNA en cultius primaris i altres línies cel·lulars difícils de transfectar, causant menor toxicitat que altres liposomes catiònics.

Les cèl·lules HUVEC van ser transfectades entre el passatge 3è i 4rt. El dia abans de la transfecció les HUVEC es van sembrar a una densitat de  $4 \times 10^5$  cèl·lules per pou en placa de 6 pous. La concentració final de siRNA utilitzada va ser de 100nM. Seguint les recomanacions descrites pel fabricant, per tal d'incrementar l'eficiència d'entrada del siRNA en aquestes cèl·lules, es van realitzar dues transfeccions en dies consecutius. 24hores després de la primera transfecció es van tornar a transfectar les mateixes cèl·lules amb aquest lípid catiònic. Després es canviava el medi de les cèl·lules i s'afegia medi complet. A les 24 hores, es recollien les cèl·lules i s'analitzava l'expressió de CD40.

En el cas de rata, per a optimitzar la transfecció del cultiu primari de cèl·lules de musculatura llisa d'aorta (SMC) amb el lípid catiònic *Targefect siRNA transfection reagent* es va utilitzar un siRNA marcat amb el fluorocrom cianina 3 (Cy3).

Per al cribatge dels 6 siRNAs anti-CD40 de rata sintetitzats per transcripció *in vitro*, en aquest cultiu primari, les cèl·lules van ser transfectades entre el passatge 4rt i 6è. El protocol utilitzat va ser: el dia abans de la transfecció es van sembrar  $4 \times 10^5$  cèl·lules per pou en plaques de 6 pous i seguint les recomanacions descrites pel fabricant, es va realitzar dues transfeccions consecutives amb aquest lípid catiònic per tal d'incrementar l'eficiència d'entrada del siRNA en aquestes cèl·lules. La concentració final de siRNA utilitzada va ser de 100nM. A les 48 hores posttransfecció, es recollien les cèl·lules per analitzar l'expressió de CD40.

### 3.5.3. Electroporació

Es va aconseguir incrementar l'eficiència d'entrada de siRNA dins de les cèl·lules HUVEC canviant el sistema de transfecció explicat anteriorment, per l'electroporació o electrotransfecció. L'electroporació és un mètode físic en el qual s'aplica un voltatge elèctric que desestabilitza transitòriament la cèl·lula induint la formació de porus aquosos a la seva membrana plasmàtica que permeten l'entrada dels àcids nucleics.

Per a l'electroporació del cultiu primari de cèl·lules HUVEC es va fer servir l'electroporador ECM 830 *Electropulse Generator System* (BTX). La transfecció es va fer utilitzant el tampó siPORT siRNA *Electroporation Buffer* (Ambion), un medi d'electroporació amb baixa conductivitat. El protocol seguit va ser el següent: es van transferir 400µl de la suspensió cel·lular de HUVEC ( $2 \times 10^6$  cèl·lules) i 100nM de siRNA a una

cubeta d'electroporació de 4-mm de pas (BTX), es va barrejar i es van incubar en gel 10 min. Després, es va aplicar un camp elèctric de 160V durant 70 msec per induir l'entrada del siRNA dins les cèl·lules. Un cop electroporades, les cèl·lules es van incubar en la cubeta 10 min més a temperatura ambient i a continuació es van transferir a un placa de 10cm de diàmetre amb 10ml de medi EBM complet. A les 48 hores posttransfecció, es recollien les cèl·lules per analitzar l'expressió gènica.

### 3.6. Assaig luciferasa

S'ha utilitzat un mètode alternatiu de cribatge dels diferents siRNAs dissenyats anti-CD40 de rata fent servir el sistema *GeneEraser luciferase supression-test system* (Promega) que es basa en l'activitat del gen reporter de la luciferasa. Mitjançant aquest sistema, es clona la seqüència del cDNA parcial de rata (GenBank Acc. N° AF241231) en el plasmidi *pTarget-luc vector* que expressa el gen de la luciferasa. Després, es cotransfecten cèl·lules eucariotes de mamífer, en el nostre cas HEK-293, amb aquest plasmidi i el corresponent siRNA anti-CD40 de rata que volem testar. Un cop dins la cèl·lula, si el siRNA es capaç d'unir-se al seu gen diana, té lloc la degradació del mRNA del gen de la luciferasa-CD40. Aquesta degradació causa una disminució de l'expressió del gen reporter i per tant una disminució de l'activitat luciferasa en aquestes cèl·lules, la qual pot ser mesurada fent servir un luminòmetre.

S'ha utilitzat com a gen reporter l'enzim de la luciferasa (*firefly luciferase*), la presència del qual es detectable en extractes de cèl·lules transfectades. Es tracta d'una proteïna monomèrica de 61 kDa que catalitza l'oxidació de D-luciferina en oxiluciferina en presència de ATP, Mg<sup>2+</sup> i O<sub>2</sub>, donant lloc a l'emissió de fotons. Per a la detecció de l'activitat luciferasa en aquest assaig s'ha fet servir el kit *Luciferase Assay System* (Promega) seguint les instruccions del fabricant. Es preparaven extractes citoplasmàtics de cèl·lules transfectades i s'analitzava l'activitat de la luciferasa quantificant aquesta reacció luminiscent fent servir un luminòmetre. L'eficiència de transfecció es determinava cotransfectant les mateixes cèl·lules amb un plasmidi que contenia el gen reporter de la β-galactosidasa.

#### 3.6.1. Clonatge de CD40 de rata en el plasmidi pTarget-luc

El cDNA parcial de CD40 de rata de 547 pb havia estat clonat anteriorment en el plasmidi Bluescript-SK, mitjançant RT-PCR amb encebadors específics del gen CD40 que presentaven en els seus extrems la diana de l'enzim de restricció XhoI. El fragment corresponent a l'insert de CD40 es va alliberar digerint aquesta construcció pBluescript-rCD40 amb l'enzim XhoI. El producte de la digestió es va comprovar mitjançant electroforesi



en gel d'agarosa 1% en TBE 0.5X i posterior tinció amb bromur d'etidi (0.15µg/ml). El DNA corresponent al fragment CD40 de 547 pb digerit es va aïllar per escissió del gel amb una fulla de bisturí, i es va purificar utilitzant el sistema *Qiaquick gel extraction kit* (Qiagen).

Seguint les instruccions del fabricant, es va realitzar una reacció de *polishing* per tal de generar extrems roms, i a continuació aquest fragment digerit es va lligar en el plasmidi pTarget-luc fent servir la T4 DNA lligasa i una relació insert:vector de 95:1. Es van transformar cèl·lules electrocompetents *Escherichia coli* XL-Blue amb aquest producte de lligació seguint el protocol d'electroporació descrit a l'apartat 3.13.2.3. En aquest cas l'antibiòtic de selecció utilitzat va ser Kanamicina a 50 ng/µl.

A partir del cultiu bacterià d'una sèrie de colònies aïllades es va fer l'extracció de DNA plasmídic amb el sistema *QUIAprep Spin Miniprep Kit* seguint les instruccions del fabricant. Per tal de comprovar la presència de l'insert en l'orientació correcta, aquest DNA plasmídic va ser digerit amb els enzims de restricció XhoI i PvuII (Roche Diagnostics) en un volum final de 20 µl que contenia 10x tampó H, 5 U d'enzim i 1 µg de DNA plasmídic.

Per tal d'obtenir gran quantitat de DNA de la construcció pTarget-luc-rCD40, requerit per la posterior transfecció de cèl·lules eucariotes, es va emprar el sistema *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), seguint el protocol recomanat pel fabricant.

### Solucions:

- TBE 10X: 900 mM Tris-Base; 720 mM àcid bòric; 24 mM EDTA.
- Tampó de càrrega: Blau de bromofenol 0.25%; xilen cianol 0.25%; glicerol 30%.

## 3.6.2. Transfecció de les cèl·lules HEK-293

### 3.6.2.1. Transfecció de siRNA amb OligofectAMINA

La introducció dels diferents siRNAs anti-CD40 de rata en aquestes cèl·lules HEK-293 es va fer utilitzant el lípid catiònic OligofectAMINA i medi OptiMEM (Invitrogen) seguint el protocol de transfecció descrit pel fabricant i explicat amb anterioritat a l'apartat 3.5.1. El dia abans de la transfecció es sembraven les cèl·lules HEK-293 a una densitat de  $4 \times 10^5$  cèl·lules per pou en plaques de 6 pous. La concentració final de siRNA utilitzada va ser de 200nM.

### 3.6.2.2. Transfecció de DNA plasmídic amb PolyFect

6 hores després de ser transfectades amb els siRNAs, les cèl·lules es van transfectar amb el lípid catiònic PolyFect (Qiagen) i 400ng del plasmidi pTarget-luc-rCD40, i 500ng del pCMV-βgal, seguint les instruccions del fabricant. El plasmidi que contenia el gen reporter de la β-galactosidasa es va fer servir com a control intern per normalitzar l'eficiència de

transfecció. Posteriorment, les cèl·lules transfectades es van créixer a 37°C amb 5%CO<sub>2</sub>.

### 3.6.3. Obtenció dels extractes proteics

Per obtenir els extractes proteics cel·lulars, 48 hores posttransfecció, es rentaven les cèl·lules 2 vegades amb PBS i es lisaven afegint directament al pou 1x *reporter lysis buffer* (Promega) aplicant un cicle ràpid de congelació-descongelació. Després, el lisat es centrifugava a 12.000g 5 minuts i es recollia el sobrenadant per analitzar l'activitat dels gens de luciferasa i  $\beta$ -galactosidasa.

### 3.6.4. Determinació de l'activitat luciferasa

Per a determinar l'activitat luciferasa d'aquests extractes cel·lulars es va fer servir el kit *Luciferase Assay System* (Promega) que subministra el substrat de la luciferasa. La lectura de l'activitat d'aquest gen reporter s'obtenia amb l'aparell *Luminometer TD-20/20* (Turner Designs), mesurant durant 10segons la luminiscència produïda per 10 $\mu$ l de l'extracte proteic diluït 1/100, al qual es van afegir 50 $\mu$ l de *Luciferase assay substrate*. Els valors d'activitat luciferasa van ser normalitzats per l'expressió de  $\beta$ -galactosidasa.

### 3.6.5. Determinació de l'activitat $\beta$ -galactosidasa

Per a la quantificació de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa, s'afegien 70  $\mu$ l del substrat de  $\beta$ -galactosidasa ONPG (*o-Nitrophenyl-b-D-Galactopyranoside*) dissolt en 0,1M de tampó fosfat, a 10  $\mu$ l d'extracte proteic en pous d'una placa de 96 pous, i s'incubava a temperatura ambient durant 10 minuts. Després, s'aturava la reacció afegint 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i es llegia l'absorbància a 405nm amb el lector de plaques *Titertek Multiskan<sup>®</sup> microplate reader* (Labsystems).

#### Solucions:

- Solució ONPG: 6g/L *o-Nitrophenyl-b-D-Galactopyranoside*; 0.01 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

## 3.7. Citometria de flux

Totes les anàlisis per FACS (*fluorescence activated cell sorting*) van ser realitzades emprant el citòmetre de flux Coulter EPICS XL al Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) de l'Hospital Clínic.

### 3.7.1. Determinació de l'eficiència de transfecció

6 hores posttransfecció, les cèl·lules ECV-304 i HEK-293 que havien estat transfectades

amb un ODN-FITC i diferents quantitats del lípid catiónic OligofectAMINA (tal i com es descriu a l'apartat 3.5.1), van ser tripsinitzades i recollides en tampó FACS. Després de 2 rentats amb el mateix tampó, les cèl·lules van ser centrifugades a 12.000g durant 1 minut. Finalment, el precipitat cel·lular va ser resuspès en 400 µl de tampó FACS, al qual es va afegir 4 µl de iodur de propidi (10 µg/ml). El percentatge de cèl·lules transfectades que havien incorporat l'oligonucleòtid fluorescent es va quantificar fent servir el citòmetre de flux.

### 3.7.2. Quantificació de l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular

Mitjançant anticossos monoclonals específics, es va quantificar l'expressió de les molècules d'adhesió: E-selectina, ICAM-1 i VCAM-1 en un assaig d'adhesió leucocitària en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA anti-CD40.

Un cop transfectades seguint el protocol descrit a l'apartat 3.5.2, les cèl·lules HUVEC van ser activades per coincubació amb Jurkat D1.1 (tal i com es descriu a l'apartat 3.3), amb un ratio T/EC de 5:1 durant 6 hores (E-selectina) o 16 hores (ICAM-1 i VCAM-1) prèviament a l'anàlisi. 48 hores posttransfecció, els cocultius van ser rentats amb PBS per eliminar les Jurkat D1.1 que havien quedat adherides a la monocapa de HUVEC.

Per poder ser analitzades, un cop rentades, les HUVEC es van recollir amb Tripsina/EDTA. Després, la suspensió cel·lular es va transferir a un eppendorf i es van fer dos rentats amb tampó FACS. Finalment, el precipitat de cèl·lules es resuspenia amb 50µl de tampó FACS, s'afegien 5µl del corresponent anticòs i s'incubava durant 20minuts a temperatura ambient abans d'analitzar les dades de fluorescència amb el citòmetre de flux.

Per quantificar l'expressió de les molècules d'adhesió anteriors es van fer servir els següents anticossos monoclonals de ratolí: anti-ICAM-1 conjugat amb ficoeritrina (PE), CD54 (clon HA58); anti-VCAM-1 conjugat amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC), CD106 (clon 51-10C9); i anti-E-selectina conjugat amb aloficocianina (APC), CD62E (clon 68-5H11) (tots de BD Pharmingen).

### 3.7.3. Assaig d'adhesió leucocitària

En el cas de l'assaig d'adhesió leucocitària, es volia quantificar el percentatge de leucòcits que s'adherien a les cèl·lules endotelials un cop transfectades amb siRNA anti-CD40. Es van marcar les HL-60 amb Calcein-AM (*calcein acetoxymethyl ester*) seguint un protocol modificat del prèviament descrit [97]. Es va afegir Calcein-AM a una suspensió de cèl·lules HL-60 ( $1 \times 10^7$  cèl·lules/ml) fins a una concentració final de 5µM de Calcein-AM. Aquesta suspensió cel·lular es va incubar durant 30 minuts a 37°C per tal que les cèl·lules

incorporessin el marcatge. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb PBS i es van resuspendre en medi de cultiu a una concentració final de  $1 \times 10^6$  cèl·lules/ml. Les HL-60 marcades es van afegir al cultiu de HUVEC transfectades amb el siRNA anti-CD40 (tal i com es descriu a l'apartat 3.5.2). Es van afegir  $2 \times 10^6$  cèl·lules HL-60/pou, i el cocultiu es va incubar durant 30 minuts a  $37^\circ\text{C}$   $5\%\text{CO}_2$ . Les cèl·lules HL60 que no s'havien adherit van ser eliminades fent 2 rentats amb PBS. Les HUVEC i els leucòcits adherits es van recollir amb tripsina/EDTA, la suspensió cel·lular es van rentar i resuspendre en tampó FACS. Les dades de fluorescència van ser adquirides fent servir el citòmetre de flux.

### Solucions:

- PBS 1X: KCl 0.20 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20 g/L; NaCl 8 g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.15g/L.
- Tampó FACS: PBS; 0.1% Azida sòdica; 1%BSA (albúmina sèrica bovina).

### **3.8. Extracció de RNA total**

El RNA total de les cèl·lules en cultiu va ser aïllat emprant el kit *RNeasy RNA Isolation kit* (Qiagen). Les restes de DNA genòmic de la mostra van ser digerides amb l'enzim *desoxiribonuclease I* (DNase I) utilitzant el reactiu DNafree (Ambion) seguint les instruccions recomanades pel fabricant.

Posteriorment, el RNA va ser quantificat llegint l'absorbància a 260nm fent servir l'espectrofotòmetre Nanodrop (ND-1000 *spectrophotometer*) i la seva qualitat va ser comprovada per electroforesi en gel d'agarosa al 1% no desnaturalitzant i posterior visualització per tinció amb bromur d'etidi ( $0.15\mu\text{g/ml}$ ).

### **3.9. Retrotranscripció o Transcripció reversa (RT)**

La síntesi de la cadena de DNA complementari (cDNA) a partir del RNA, es va realitzar amb la transcriptasa reversa Omniscript, fent servir el sistema *Omniscript RT kit* (Qiagen). Seguint les instruccions del fabricant,  $2\mu\text{g}$  de RNA total van ser retrotranscrits a cDNA. Els productes de cDNA obtinguts van ser analitzats mitjançant PCR a temps real (*Real time Polymerase Chain Reaction*).

### **3.10. PCR semiquantitativa a temps real**

Per tal de quantificar l'expressió gènica es va utilitzar la tècnica de PCR quantitativa a temps real. Es tracta d'una tècnica molt sensible que permet quantificar nivells d'expressió gènica de manera ràpida i reproduïble, monitoritzant l'amplificació a temps real. La PCR a

temps real permet tant una quantificació absoluta del nombre de còpies del RNA missatger com una quantificació relativa. En aquest treball es va optar per la quantificació relativa, que es basa en mesurar l'expressió del gen diana respecte a un gen de referència o gen d'expressió constant (*housekeeping gene*) que s'utilitza com a element normalitzador.

Es va fer servir el sistema de LightCycler (*Roche Molecular Biochemicals*) i el SYBR Green, un fluorocrom intercalant que s'uneix amb gran afinitat però de manera inespecífica a la doble cadena de DNA a mida que aquesta es va sintetitzant. L'especificitat i sensibilitat d'aquest mètode ve determinada pels encebadors utilitzats en la reacció. El principal avantatge d'aquest sistema es que només requereix d'una parella d'encebadors que amplifiqui un determinat producte gènic de manera específica. L'aplicació de la tècnica es veu limitada per la presència en la reacció de PCR de productes amplificats de manera no específica, que contribuirien a la mesura de la fluorescència impeding una correcta quantificació de l'expressió gènica.

### 3.10.1. Quantificació de l'expressió de CD40 humà i de rata

La tècnica de PCR semiquantitativa a temps real es va fer servir per a l'anàlisi de l'expressió endògena de CD40 humà i de rata en cèl·lules transfectades amb els diferents siRNAs.

Els encebadors específics per amplificar CD40 humà i CD40 de rata es van dissenyar fent servir el programa Oligo 4.0 en base a la seqüència de cDNA de la base de dades de GenBank: NM\_001250 (CD40 humà), i AF241231 (seqüència parcial del mRNA de CD40 de rata de 547 pb). En el cas de les mostres humanes, per a la normalització de l'expressió gènica es va fer servir com a gen de referència el gen de la ciclofilina-A (*CypA*) i el gen GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). En canvi, en el cas de les mostres de rata, es va fer servir el gen de RNA ribosòmic 18S (18S rRNA). Els encebadors utilitzats per a l'amplificació d'aquests gens es mostren a la següent taula:

Gen	Accession Number	seqüència encebadors	MgCl <sub>2</sub>	T <sup>a</sup>	mida
<b>CD40 humà</b>	NM_001250	F 5'-CAGCCAGGACAGAACTGGTGAGT-3' R 5'-CTTCTTCACAGGTGCAGATGGTGTC-3'	3mM	64°C	199pb
<b>CD40 rata</b>	AF241231	F 5'-TCAAGGGCTTCAGGTTAAGAAGGAG-3' R 5'-GTGATGACCCATTGGAGAAGAATCC-3'	3mM	64°C	310pb
<b>CypA</b>	NM_021130	F 5'-CTCCTTTGAGCTGTTGCAG-3' R 5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3'	4mM	56°C	325pb
<b>GAPDH</b>	NM_002046	F 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3' R 5'-ATGACCTTGCCACAGCCT-3'	3mM	56°C	446pb
<b>18S rRNA</b>	M11188	F 5'-ACGGACCAGAGCGAAAGCAT-3' R 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAGAC-3'	3mM	64°C	531pb

Taula 11. Gens analitzats per PCR a temps real, encebadors i condicions d'amplificació.

La reacció de PCR es va realitzar per triplicat en un volum final de 20 µl que contenia MgCl<sub>2</sub> (de 3 mM a 4 mM com s'indica a la Taula 11); 0.15 µM de cada encebador; 5% *dimethyl sulfoxide* (DMSO); 2 µl Lightcycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals) i 75 ng de cDNA com a motlle. El programa d'amplificació utilitzat consta d'un primer pas de desnaturalització a 95°C 10 minuts, seguit de 45 cicles d'amplificació: desnaturalització a 95°C 1 seg; anellament 5 seg a 56°C o 64°C (com s'indica a la Taula 11); i extensió a 72°C 20 seg.

### 3.10.2. Validació de l'expressió gènica obtinguda per microarrays

Els resultats d'expressió gènica obtinguts per microarrays es van confirmar per als gens d'interès mitjançant PCR semiquantitativa a temps real. En aquest cas es va utilitzar el gen de la ciclofilina-A com a gen de referència.

Pel disseny dels encebadors o oligonucleòtids específics de cada gen es van utilitzar els programes Oligo 4.0 i primer3. Per determinar la formació d'estructures secundàries que podien adquirir aquestes parelles d'encebadors, es va fer servir el programa Oligo 4.0. Aquests encebadors van ser seleccionats evitant la possible formació de dimers d'encebadors (*primer-dimers*) per no afavorir una amplificació inespecífica durant la reacció de PCR.

Les reaccions de PCR es van fer per triplicat i en un volum de 20 µl que contenia 2 µl Lightcycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals); MgCl<sub>2</sub> (de 3 mM a 5 mM, com s'indica a la Taula 12); 0.15 µM de cada encebador; i 75 ng de cDNA com a motlle. En alguns casos s'ha utilitzat un 5% *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Les condicions d'amplificació utilitzades van ser: un pas de desnaturalització inicial (10 min, 95°C), anellament (5 seg, 52°C a 64°C, com s'indica a la Taula 12), i extensió (18 seg, 72°C) amb adquisició de fluorescència al final de cada extensió.

La lectura de la fluorescència o mesura de la intensitat del fluoròfor SYBR Green, es realitzava al final de cada cicle d'amplificació. El seguiment d'aquesta fluorescència es feia utilitzant el software d'anàlisi del Lightcycler versió 3.5 i el mètode de la segona derivada màxima (*Second Derivate Maximum Method*) tenint en compte únicament la fase exponencial d'amplificació. Aquest mètode defineix un determinat llindar de fluorescència, en el qual el senyal es major que el soroll de fons (*background*) i estableix un valor d'emissió de fluorescència basal (*threshold*). El cicle en el qual es supera aquesta fluorescència basal s'anomena punt de creuament o *crossing point*. El *crossing point* representa el número de cicles on la intensitat de la fluorescència supera aquest llindar i depèn de la quantitat de DNA inicial present a la mostra.

Gen	Accession Number	seqüència encebadors	MgCl <sub>2</sub>	T <sup>a</sup> anellament	mida
ICAM-1	NM_000201	F 5'-CCAGACATCTGTGTCCC-3' R 5'-GGCTATCTTCTGCACAT-3'	4mM	54°C	185pb
CCL2	NM_002982	F 5'-CTGTGCCTGCTGCTCATAG-3' R 5'-AGTTTGGGTTTGTCTGTCC-3'	3mM	52°C	267pb
SELE	NM_000450	F 5'-GCAGGGTTTTGTGTGAAG-3' R 5'-AGCCATTGAGCGTCCATCC-3'	3mM	52°C	389pb
IL-8	NM_000584	F 5'-AGCCTTCCTGATTTCTGC-3' R 5'-TTCTCCACAACCCTCTGC-3'	3mM	52°C	240pb
CD69	NM_001781	F 5'-CTCTCATTGCCTTATCAGTG-3' R 5'-ACCCAGTGTTCTCTCTACC-3'	3mM	52°C	259pb
BIRC3	NM_001165	F 5'-GCTGGTTTCTATTACACTGG-3' R 5'-GGCATTTCGTTATTCATTG-3'	3mM	52°C	357pb
THBD	NM_000361	F 5'-GAGGACGTGGATGACTGCAT-3' R 5'-TCACAGTCGGTGCCAATGTG-3'	4mM	60°C	473pb
DSCR1	NM_004414	F 5'-CAACCCCTTCTCCGACG-3' R 5'-TTCTCTTCTTCTCTCT-3'	4mM	58°C	340pb
SOD2	NM_000636	F 5'-GACAAACCTCAGCCCTAAC-3' R 5'-ACACATCAATCCCCAGCAGT-3'	4mM	58°C	248pb
IL-11	NM_000641	F 5'-AGCGGACAGGGAAGGGTTA-3' R 5'-CAGGGTGGCAGGGAATC-3'	4mM	64°C	307pb
IF	NM_000204	F 5'-GAGGAAAGCGAGCACAAC-3' R 5'-GACACAGGCAGGGATGGA-3'	4mM	64°C	338pb
VEGF	NM_003376	F 5'-GAGGGCAGAATCATCACGAA-3' F 5'-GCATCAGGGCAGCACAGGA-3'	5mM	63°C	147pb
FOSB	NM_006732	F 5'-AGCAGCAGCTAAATGCAGGA-3' F 5'-TTTGGAGCTCGGCGATCT-3'	5mM	63°C	117pb
MMP10	NM_002425	F 5'-CTGGAACCTGAACCTGAAT-3' R 5'-CTTGGATAACCTGCTGTAC-3'	4mM	59°C	166pb
CSF2	NM_000758	F 5'-AGAAATGTTGACCTCCAGGA-3' R 5'-TTGCACAGGAAGTTTCCG-3'	4mM	63°C	161pb
APLN	NM_017413	F 5'-CACAAAATGAATCCCTATGCT-3' R 5'-TGGCTAAAAAGTCTGAAAGT-3'	4mM	57°C	244pb
NLF2	NM_001007595	F 5'-AGCCGCGTGGTACAGAATAA-3' R 5'-AAGCCAACCCATTTTCTT-3'	4mM	61°C	198pb
NLF1	NM_207322	F 5'-AATCAGCCACATCCAGGAGC-3' R 5'-AAAATGAATGTTGGCTTGAGG-3'	4mM	61°C	129pb
IFN-β	NM_002176	F 5'-GCCGCATTGACCATCTATGAGA-3' R 5'-GAGATCTCAGTTTCGGAGGTAAC-3'	5mM	60°C	346pb
TLR-3	NM_003265	F 5'-AACCTTGCCTTCTGCACGA-3' R 5'-CCAATTGCGTGAAAACACCC-3'	5mM	60°C	312pb

Taula 12. Gens analitzats per PCR a temps real, encebadors i condicions d'amplificació. F, forward; R, reverse; CD40, CD40 receptor (*TNF receptor superfamily member 5*); ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*; CCL-2, *chemokine (C-C motif) ligand 2* or MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*; SELE, *selectin E*; IL-8, *interleukin-8*; CD69, *early T-cell activation antigen p60*; BIRC3, *baculoviral IAP repeat-containing protein-3*; THBD, *thrombomodulin*; DSCR1, *Down syndrome critical region gene 1*; SOD2, *superoxide dismutase 2*; IL-11, *interleukin 11*; IF, *I Factor (complement)*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; FOSB, *V-FOS FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*; MMP10, *matrix metalloproteinase 10*; CSF-2 or GM-CSF, *colony-stimulating factor 2 or granulocyte-macrophage CSF*; APLN, *Apelin*; NLF1/2, *nuclear localized factor1/2*; IFN-β, *interferon β*; TLR-3, *Toll like receptor-3*.

Per determinar l'especificitat de la reacció, al final de cada amplificació, es realitzava un anàlisi de la corba de fusió (*melting curve*) amb mesura constant de la fluorescència a mida

que va augmentant la temperatura. Es tracta d'incrementar molt lentament la temperatura i mesurar de manera contínua la pèrdua d'emissió de la fluorescència. A mida que el producte amplificat es va desnaturalitzant i es separaren les dues cadenes de DNA té lloc l'alliberament de les molècules de SYBR Green. L'objectiu d'aquest anàlisi és determinar la temperatura de fusió característica de cada fragment amplificat, el qual depèn de la seva mida i composició de bases, i descartar l'amplificació de productes de PCR no desitjats. El programa d'anàlisi de la corba de fusió utilitzat es basava en escalfar el producte a 20°C/seg fins a 95°C, refredar-lo a 20°C/seg fins a 65°C i tornar a escalfar lentament a 0,2°C/seg fins a 95°C-98°C amb lectura contínua de la fluorescència.

La mida esperada del producte específic també es comprovava per electroforesi en un gel d'agarosa 2% en TBE 0.5X i posterior tinció amb bromur d'etidi (0.15µg/ml).

Els nivells de mRNA de cada gen diana i el gen de referència es van determinar en paral·lel per cada mostra. Totes les quantificacions es van fer per duplicat a partir de dos experiments independents. Per tal de poder quantificar de forma relativa l'expressió d'un mRNA per PCR a temps real, les mostres a comparar han de tenir eficiències de PCR similars i la cinètica d'amplificació ha de seguir una resposta lineal dins el rang de concentracions de treball. Per això, cada gen d'interès va ser amplificat a partir de dilucions seriadades del cDNA amb factor 5 (de 0.12 a 75ng) i es va determinar la seva eficiència d'amplificació tenint en compte la pendent de la recta obtinguda i segons l'equació:  $E=10^{(-1/pendent)}$ .

Per a la quantificació relativa, els nivells d'expressió del gen problema s'analitzen respecte el gen de referència. Dins de la fase exponencial de l'amplificació es calcula el ratio d'expressió relativa (R) del gen problema segons un model matemàtic [265, 266] en base a la diferència del valor de *crossing point* de la mostra tractada amb el siRNA-2 respecte la mostra control, tenint en compte les eficiències d'amplificació de tots dos gens.

$$\text{Ratio expressió} = \frac{(E \text{ gen diana})^{\Delta \text{CP gen diana (mitjana siRNAcontrol-mitjana siRNA-2)}}}{(E \text{ gen ref.})^{\Delta \text{CP gen ref (mitjana siRNAcontrol-mitjana siRNA-2)}}$$

Figura 22. Equació utilitzada pel càlcul de la ratio d'expressió gènica. E: eficiència de la reacció de PCR; Δ CP: desviació de *crossing point* de la mostra control respecte la mostra tractada amb siRNA-2.

### 3.11. Anàlisi per Western Blot

En aquest treball s'ha utilitzat la tècnica de Western Blot per quantificar la inhibició de la proteïna CD40 humana i de rata en cèl·lules ECV-304, SMC i HUVEC que havien estat



transfectades amb els diferents siRNAs anti-CD40 en comparació amb les mateixes cèl·lules transfectades amb un siRNA-control.

També s'ha fet servir aquest sistema per quantificar l'expressió de les proteïnes MAPK: Erk1/2, p38 i JNK, IFN- $\beta$  i del pèptid de l'Apelin humà en el cultiu primari de cèl·lules endotelials HUVEC.

### 3.11.1. Obtenció dels extractes proteics

Les cèl·lules en cultiu crescudes en plaques de 60mm quan van arribar a un 80% de confluència, van ser rentades 2 vegades amb PBS abans de ser lisades en tampó RIPA. Les cèl·lules es van lissar afegint 100 $\mu$ l de tampó RIPA fred a la placa, amb un rascador es van desenganxar les cèl·lules i es van transferir a un eppendorf. Després d'incubar-se 30 minuts en gel, els lisats van ser centrifugats a 12.000g a 4°C durant 10 minuts. Es va recuperar el sobrenadant que contenia l'extracte proteic total i es va determinar la concentració de proteïna.

En el cas de la quantificació proteica de les formes fosforilades de les MAPKs en el cultiu primari de cèl·lules HUVEC, es va fer servir un tampó de lisi que contenia els inhibidors de fosfatases  $\beta$ -glicerolfosfat i ortovanadat sòdic ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) i fluorur sòdic (NaF).

#### Solucions:

- Tampó RIPA: 25mM Tris-HCl pH 7.5; 150mM NaCl; 1% Tritó X-100; 1%Deoxycholate; 0.1%SDS; 10mM Iodoacetate; 100 $\mu$ M PMSF; 1 comprimit d'inhibidors de proteases (Complete<sup>TM</sup>, Roche).
- Tampó de lisi amb inhibidors de fosfatases: 20mM Tris-HCl pH 8; 150mM NaCl; 1% Tritó X-100; 10mM NaF; 40 mM  $\beta$ -glicerolfosfat; 2mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 1 comprimit d'inhibidors de proteases (Complete<sup>TM</sup>, Roche).

### 3.11.2. Valoració de la concentració de proteïnes

La concentració de proteïna de l'extracte proteic total va ser quantificada fent servir el sistema *BCA protein assay reagent kit* (Pierce). En plaques de 96 pouets, a partir de 2 $\mu$ l de lisat cel·lular i 200 $\mu$ l del reactiu BCA i al mateix temps que es realitzava una recta patró amb diferents concentracions de BSA. Després d'incubar la placa a 37°C 30 minuts, es llegia l'absorbància a 562nm utilitzant el lector de plaques *Titertek Multiskan<sup>®</sup> microplate reader* (Labsystems) i es determinava la concentració de proteïna de la mostra a partir de la corba patró de BSA.

### 3.11.3. Electroforesi en gel SDS-PAGE i electrotransferència

Es va fer servir el sistema *Mini-protean TransBlot Cell* (Bio-Rad). 40µg de proteïna total resuspesa en tampó de càrrega Laemmli 6X, prèviament desnaturalitzada a 98°C 10 minuts, va ser separada per electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) del 10% durant 2h a 200V. Un cop finalitzada l'electroforesi les proteïnes del gel es transferien a una membrana de nitrocel·lulosa Hybond<sup>TM</sup>C extra (Amersham, Pharmacia). La transferència es feia a 4°C durant 1h a un amperatge constant de 0,4A.

En el cas de la quantificació intracel·lular del pèptid de l'Apelin de 77 aa en el cultiu primari de cèl·lules HUVEC, es va realitzar una electroforesi en gel SDS-PAGE del 15%.

#### Solucions:

- Tampó de càrrega Laemmli 6X: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 60% glicerol; 12% SDS; 0.06% blau de bromofenol.
- Gel separador (10% acrilamida): 10% acrilamida:bis-acrilamida (37,1:1); 0.375 M Tris-HCl pH 8.8; 0.1% SDS; 0.1% persulfat amònic (APS); 0.1% TEMED.
- Gel concentrador (3.9% acrilamida): 3.9% acrilamida:bis-acrilamida (37,1:1); 0.125 M Tris-HCl pH 6.8; 0.1% SDS; 0.1% persulfat amònic (APS); 0.1% TEMED.
- Tampó electroforesi 5X: 125mM Tris-HCl pH 8.8; 0.95 M glicina, 0.5% SDS.

### 3.11.4. Immunodetecció

Per tal d'evitar l'unió inespecífica de l'anticòs, la membrana era bloquejada 1h a temperatura ambient amb 10 ml de solució de bloqueig. Posteriorment, la membrana era incubada durant 16 hores a 4°C amb l'anticòs primari específic. Per eliminar l'excés d'anticòs primari i les interaccions inespecífiques, es feien 3 rentats de 10 minuts cadascun amb 10 ml de TBST abans d'incubar la membrana durant 1h a temperatura ambient amb un anticòs secundari que reconeix l'anticòs primari i està conjugat amb la peroxidase de rabe (HRP, *horseradish peroxidase*). Després de rentar la membrana 3 vegades amb TBST, l'activitat enzimàtica de la peroxidasa es detectava amb un sistema quimioluminiscent fent servir el kit de detecció ECL+Plus (ECL, *Enhanced Chemiluminescence*, Amersham, Pharmacia) seguint les instruccions del fabricant. A continuació amb la membrana s'exposava un film de raig X i es revelava a diferents temps d'exposició.

S'han utilitzat les següents solucions d'anticossos:

- Per detectar la proteïna **CD40 humana** s'ha fet servir un anticòs monoclonal de ratolí anti-CD40 H-10 a una dilució 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology). Com a anticòs

secundari s'ha utilitzat un anti-IgG de ratolí conjugat a HRP a una dilució 1:2000 (Dako).

○ Per a quantificar l'expressió a nivell proteic de **CD40 de rata**, es va utilitzar un anticòs policlonal de conill anti-CD40 L-17 a una dilució 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) i un anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat a HRP a una dilució dilució 1:2000 (Dako). En aquest cas s'ha seguit el mateix protocol descrit per CD40 humà incubant l'anticòs primari 1h a temperatura ambient.

○ Per a detectar l'expressió a nivell proteic del pèptid de l'**Apelin** intracel·lular es va fer servir un anticòs policlonal de cabra anti-Apelin S-20 (que reconeix les formes d'Apelin-36, Apelin-31 i Apelin-28) a una dilució 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) i un anticòs secundari anti-IgG de cabra conjugat a HRP a una dilució 1:5000 (Dako).

○ Per a quantificar l'expressió de les proteïnes **MAPK**: Erk1/2, p38 i JNK es van fer servir els kits: Phospho-MAPK Family Antibody Sampler kit i MAPK Family Antibody Sampler kit de Cell Signaling. El kit Phospho-MAPK Family Antibody Sampler kit conté tres anticòssos policlonals de *rabbit* Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) i Phospho-p38/MAPK (Thr180/Tyr182) que reconeixen les formes fosforilades d'aquestes proteïnes. El kit MAPK Family Antibody Sampler kit conté un anticòs policlonal *rabbit* p44/42 MAPK, l'anticòs monoclonal SAPK/JNK (56G8) i un anticòs policlonal de *rabbit* p38/MAPK que reconeixen les formes totals d'aquestes proteïnes. La dilució utilitzada per als anticòssos primaris anteriors va ser de 1:1000 i de 1:2000 en el cas de l'anticòs secundari anti-IgG de conill. El protocol d'immunodetecció seguit va ser el descrit pel fabricant en cada cas.

○ Per a detectar l'expressió a nivell proteic de la citoquina **IFN- $\beta$**  es va utilitzar un anticòs policlonal de conill anti-IFN- $\beta$  humà (ab 9662) a una dilució 1:1000 (Abcam) i un anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat a HRP a una dilució 1:2000 (Dako).

Les mateixes membranes van ser hibridades amb un anticòs policlonal *rabbit anti-actin* (dilució 1:2000, Sigma). L'expressió d'aquestes proteïnes va ser quantificada per densitometria fent servir el *software* Phoretix 10 (*Nonlinear Dynamics*) i els resultats van ser normalitzats per l'expressió de la  $\beta$ -actina.

#### Solucions:

- Tampó de transferència: 20 mM Tris-base; 150 mM glicina; 20% metanol.
- Solució de bloqueig: 5% llet desnatada en pols en TBST.
- TBS 10x: 50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl.
- TBST: 1xTBS; 0.1%Tween-20.

### 3.12. Activació Endotelial

L'activació de les cèl·lules endotelials HUVEC via CD40-CD40L, es va mesurar a dos nivells. A nivell molecular es va quantificar l'expressió de les molècules d'adhesió E-selectina, ICAM-1 i VCAM-1 en cèl·lules endotelials transfectades amb siRNA i activades mitjançant Jurkat D1.1. Per altra banda es va avaluar de manera directa l'adhesió leucocitària en aquestes cèl·lules endotelials fent servir un cultiu de HL-60 que expressa els lligands de les 3 molècules d'adhesió anteriors.

#### 3.12.1. Expressió de molècules d'adhesió

Les cèl·lules HUVEC, un cop transfectades amb 100nM de siRNA anti-CD40 o siRNA-control (tal i com es descriu a l'apartat 3.5.2), van ser activades per coincubació amb Jurkat D1.1 (tal i com es descriu a l'apartat 3.3) amb un ratio T/EC de 5:1 durant 6 hores (E-selectina) o 16 hores (ICAM-1 i VCAM-1) prèviament a l'anàlisi.

48 hores posttransfecció, els cocultius van ser rentats amb PBS per eliminar les Jurkat D1.1 que havien quedat adherides a la monocapa de cèl·lules HUVEC. Aquestes cèl·lules endotelials activades via CD40-CD40L, van ser analitzades mitjançant citometria de flux per determinar la inhibició de l'expressió de les molècules d'adhesió E-selectina, ICAM-1 i VCAM-1 mediada per RNAi (tal i com es descriu a l'apartat 3.7.2).

#### 3.12.2. Adhesió Leucocitària

Les cèl·lules HUVEC crescudes en pous d'una placa de 6, sense transfectar o transfectades amb el siRNA-2 o el siRNA-control, van ser activades per coincubació amb Jurkat D1.1 amb un ratio T/EC de 5:1, o per incubació en presència de TNF- $\alpha$  (300 U/ml) 16 hores abans de l'assaig. 48 hores posttransfecció les cèl·lules van ser rentades amb PBS i posteriorment, es van coincubar amb HL-60 durant 30 minuts ( $2 \times 10^6$  cèl·lules per pou, a una densitat de  $1 \times 10^6$  cèl·lules/ml). Les cèl·lules HL-60 que no s'havien adherit a la monocapa de HUVEC, van ser eliminades fent 2 rentats amb PBS.

Es van adquirir imatges de contrast de fases fent servir el microscopi invertit *Olympus IX-70 inverted microscope* (Olympus America) i la càmera *SPOT camera* i *SPOT 3.2.4 software* (Diagnostic Instruments).

Per quantificar el percentatge d'adhesió leucocitària a les cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2, es va fer el mateix assaig que el descrit anteriorment fent servir cèl·lules HL-60 marcades amb calcein-AM (marcant les cèl·lules amb 5 $\mu$ M de calcein AM durant 60 minuts a 37°C, tal i com es descriu a l'apartat 3.7.3). Finalment, les cèl·lules es van

recollir per tripsinització i es va determinar el ratio de cèl·lules HL-60 fluorescents adherides a les HUVEC per citometria de flux (contant 10.000 cèl·lules per mostra). Es van realitzar 5 experiments independents.

### 3.13. Construcció d'un vector lentiviral

Per assolir una expressió estable del siRNA anti-CD40 en el cultiu primari de cèl·lules HUVEC i realitzar posteriors estudis funcionals *in vitro*, es van generar lentivirus recombinants productors d'aquest siRNA i el corresponent siRNA-control en forma de shRNA. Com a sistema de transferència gènica es van escollir els vectors lentivirals ja que permeten la introducció d'un gen de manera eficient i estable dins la cèl·lula. Pertanyents a la família dels retrovirus, els lentivirus són vectors integratius capaços d'infectar cèl·lules que no estan en divisió.

La construcció dels virus lentivirals es basa en el virus de HIV (virus de la immunodeficiència humana). L'estructura genòmica d'aquest lentivirus és molt similar a la dels retrovirus, conté els gens *gag*, *pol* i *env*, les proteïnes codificades pels quals són úniques per a cada tipus de retrovirus. El gen *gag* codifica per les proteïnes virals del nucli (proteïnes de la matriu, de la càpside i la nucleocàpside), el gen *pol* codifica els enzims virals per la replicació, i el gen *env* codifica per l'envoltori glicoproteic del virus.

Els lentivirus recombinants productors de shRNA anti-CD40 i shRNA control van ser generats utilitzant els següents plàsmids:

- **psPAX-2** (vector d'empaquetament de segona generació): Conté els gens *gag* i *pol*, que codifiquen per les proteïnes responsables de l'empaquetament i pels enzims de la replicació. Conté el promotor del citomegalovirus (CMV) seguit de les proteïnes virals en trans. La modificació d'aquest DNA implica l'eliminació de les seqüències en cis crucials per l'empaquetament, transcripció reversa i la integració dels transcrits derivats del plasmidi d'empaquetament. Aquest vector que és una modificació de l'anterior pCMV-dR8.2 dvpr, el qual permet assolir una major i més eficient expressió de les proteïnes virals.

- **pMD2.G** (vector codificador de la càpside del virus): Conté el gen *env* que codifica per la glicoproteïna G del virus de l'estomatitis vesicular (VSV-G) i les proteïnes de la càpside del virus. Incrementa l'estabilitat de les partícules virals, permetent la concentració d'aquestes per ultracentrifugació.

- **pLVTHM** (vector de traducció): Conté el gen d'interès sota el promotor del CMV i els elements del HIV en cis, necessaris per l'empaquetament, transcripció reversa i la

integració, així com un lloc únic MluI per al clonatge directe del shRNA. Aquest disseny permet augmentar l'eficiència d'empaquetament, i que l'eficiència de transcripció i l'exportació citoplasmàtica del vector tingui lloc només en presència de proteïnes reguladores Tat i Rev del HIV, codificades per psPAX-2.

### 3.13.1. Síntesi dels shRNAs

Es van sintetitzar seqüències nucleotídiques de 67 i 65 pb corresponents a la cadena sentit i antisentit tant per shRNA2 com per shRNAcontrol. Es va seguir el disseny proposat pel Dr. Didier Trono (*Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, School of Life Sciences*) que consisteix en generar un shRNA que comprèn les seqüències sentit i antisentit del siRNA, unides per un *loop* de 9 pb, una cua de poli-A i les dianes de restricció dels enzims MluI i ClaI als extrems 5' i 3' respectivament.

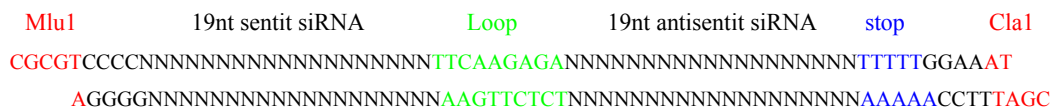


Figura 23. Estructura del shRNA dissenyat i utilitzat en l'estudi.

Les seqüències sentit i antisentit utilitzades van ser les següents:

<b>shRNA-2</b>	
Seq. Sentit	5'-CGCGTCCCGCGAATTCCTAGACACCTGTTCAAGAGACAGGTGTCTAGGAATTCGCTTTTTGGAAAT-3'
Seq. antisentit	5'-CGATTTCACAAAAGCGAATTCCTAGACACCTGTCTCTTGAACAGGTGTCTAGGAATTCGCGGGGA-3'
<b>shRNA-Control</b>	
Seq. Sentit	5'-CGCGTCCCGCGAATTCGATCTCACCTGTTCAAGAGACAGGTGAGATCGAATTCGCTTTTTGGAAAT-3'
Seq. antisentit	5'-CGATTTCACAAAAGCGAATTCGATCTCACCTGTCTCTTGAACAGGTGAGATCGAATTCGCGGGGA-3'

Taula 13. Seqüències sentit i antisentit utilitzades en l'anellament de shRNA-2 i shRNA control.

A partir de les seqüències sentit i antisentit anteriors es va realitzar la reacció d'anellament que consistia en resuspendre 0,05 µM de cada oligonucleòtid en 48 µl del tampó d'anellament i incubar 4 min a 95°C i 10 min a 70°C.

#### shRNA-2



#### shRNA-Control



Figura 24. Seqüències dels shRNA-2 i shRNAcontrol obtingudes en la reacció d'anellament.

#### Solucions:

- Tampó anellament: Acetat potàssic 100mM, HEPES 30mM pH 7.4; Acetat Magnesi 2mM.

## 3.13.2. Clonació dels shRNAs en el vector pLVTHM

Per a la generació de lentivirus recombinants es va utilitzar un vector lentiviral anomenat pLVTHM de 11,085 kb (cedit per D. Trono) que expressa el gen reporter de GFP (*Green fluorescent protein*). Utilitzant aquest vector lentiviral, la unitat de shRNA s'introdueix sota el control del promotor H1 dependent de polimerasa III. Durant la transcripció reversa, la regió U3 de la unitat 5'LTR del vector víric és sintetitzada utilitzant la regió 3' homòloga com a motlle, la qual cosa permet una duplicació del *cassette* del siRNA en el provirus integrat dins el genoma de les cèl·lules transduïdes [267].

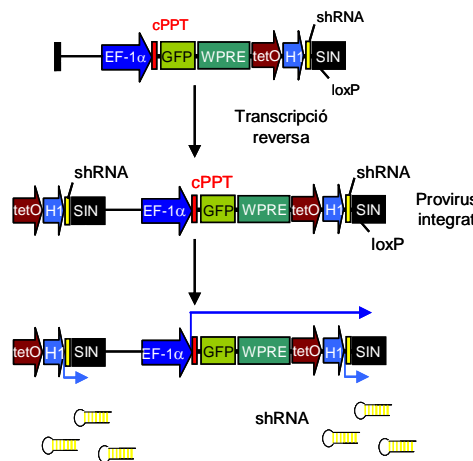


Figura 25. Esquema del vector lentiviral utilitzat. Duplicació del cassette shRNA durant la transcripció reversa i configuració del provirus integrat dins el genoma de les cèl·lules transduïdes.

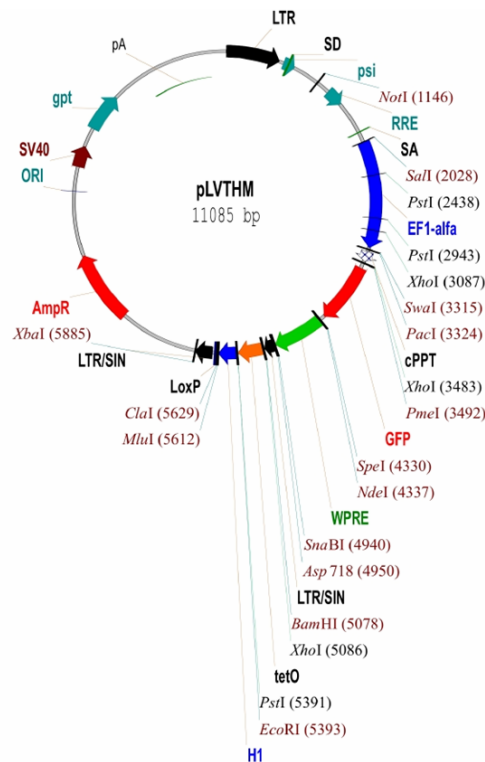


Figura 26. Representació gràfica del mapa del plasmidi pLVTHM.

### 3.13.2.1. Digestió de pLVTHM amb els enzims de restricció ClaI i MluI

Es va digerir el plasmidi pLVTHM amb els enzims de restricció ClaI i MluI (Roche Diagnostics) en un volum final de 60 µl que contenia 10x tampó H, 10 U de cada enzim i 5 µg de DNA (en general es fa servir 1-5 U enzim/µg DNA). Es va incubar la reacció a 37°C durant 16 hores i es va comprovar la digestió mitjançant electroforesi en gel d'agarosa 1% en TBE 0.5X i posterior tinció amb bromur d'etidi (0.15µg/ml). El DNA corresponent al plasmidi digerit es va aïllar per escissió del gel amb una fulla de bisturí, i es va purificar utilitzant el sistema *Qiaquick gel extraction kit* (Qiagen).

### 3.13.2.2. Lligació del plasmidi amb els shRNAs

La lligació del plasmidi pLVTHM digerit amb els enzims de restricció ClaI i MluI i els shRNAs es va dur a terme utilitzant la *T4 DNA ligase* (Roche Diagnostics), una DNA lligasa purificada a partir del bacteriòfag T4. La reacció de lligació es va realitzar en un volum final de 10µl que contenia: 10x tampó Lligasa, 1 µg del vector pLVTHM digerit i purificat, 1U Lligasa T4, i diferents proporcions de l'insert corresponent al shRNA (generalment la relació vector:insert era de 1:1, 1:2 i 1:3). La reacció es va incubar a 15°C durant 16 hores.

### 3.13.2.3. Electroporació de cèl·lules *Escherichia coli* XL-Blue

Per transformar els bacteris amb aquest producte de lligació es va fer servir el mètode d'electroporació amb el sistema Gene Pulser II (BioRad) i cubetes de 0.2 cm de pas (BioRad). Es va electroporar una soca de cèl·lules electrocompetents *Escherichia coli* XL-Blue amb 1 µl del producte de lligació. Les condicions d'electroporació van ser les següents: 200 Ohms, 25 µF i 2.5 KV. Un cop electroporades, les cèl·lules es van recollir amb 1 ml de medi LB sense antibiòtic i es van créixer durant 1 hora a 37°C en condicions no selectives per permetre l'expressió del gen de resistència. Tot seguit les cèl·lules es plaquejaven en medi selectiu LB agar amb l'antibiòtic ampicil·lina a 50 ng/µl. Les plaques s'incubaven 16-20 hores a 37°C fins que les colònies bacterianes recombinants tenien la mida suficient per ser analitzades.

#### Solucions i medis:

- LB (Luria Broth): 10g/L NaCl; 10g/L bactotripton; 5g/L extracte de llevat.
- LB agar: 15g/L agar en LB.
- Ampicil·lina: 50mg/ml en H<sub>2</sub>O.

### 3.13.2.4. Minipreparació de DNA plasmídic

Es va aïllar una sèrie de colònies i es van fer créixer en medi LB amb ampicil·lina (50



ng/μl) a 37°C 16 hores. A partir d'aquest cultiu bacterià es va fer l'extracció de DNA plasmídic amb el sistema *QUIAprep Spin Miniprep Kit* seguint les instruccions del fabricant.

#### 3.13.2.5. Digestió del DNA plasmídic

Per tal de comprovar que el DNA plasmídic contenia l'insert corresponent al shRNA, aquest va ser digerit amb els enzims de restricció: EcoRI; BamHI i ClaI; i XbaI i BamHI (tots els enzims de *Roche Diagnostics*). Cada reacció es realitzava en un volum final de 20 μl que contenia 10x tampó B o tampó H (digestió amb EcoRI), 5 U de cada enzim i 1.5 μg de DNA plasmídic. La reacció s'incubava a 37°C durant 3h. Posteriorment totes les digestions es van visualitzar en un gel d'agarosa 1% en TBE 0.5X i tinció amb bromur d'etidi (0.15μg/ml).

Per preservar les soques de bacteris recombinants es va utilitzar com a crioprotector el glicerol. Un cop comprovada la presència d'insert, es barrejaven 800 μl del cultiu bacterià amb 200 μl de glicerol 80% i l'estoc bacterià es guardava a -80°C.

#### 3.13.2.6. PCR de seqüenciació

Per tal de descartar possibles canvis en la seqüència nucleotídica dels plasmidis pLVTHM-shRNA i pLVTHM-shRNAControl, aquests DNAs plasmídics van ser seqüenciats utilitzant el sistema *Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v2.0* (Applied Biosystems). La reacció de seqüenciació es realitzava en un volum final de 10μl que contenia 2 μl de reactiu BigDye, 0,32 μM de l'encebador intern H1-For (5'-GCATGTCGCTATGTGTTCTGGG-3') i 1 μg de plasmidi com a DNA motlle.

El programa de la PCR de seqüenciació constava d'un cicle de desnaturalització inicial a 94°C 5 min., seguit de 28 cicles d'amplificació consistent en un pas de 94°C 30 seg., anellament a 50°C 15 seg., elongació a 60°C 4 min., i un cicle d'elongació final a 72°C 5 min.

Per eliminar els terminadors, es va filtrar el producte de la PCR de seqüència per una columna de Sephadex G-50 seguint les instruccions del fabricant. Les seqüències van ser analitzades de forma automàtica en gels verticals de seqüència mitjançant el seqüenciador automàtic ABI PRISM-377 (Applied Biosystems), al Servei de seqüenciació de l'IDIBELL.

#### Solucions:

- Sephadex G-50 (en H<sub>2</sub>Od): 1g Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia) en 10 ml H<sub>2</sub>Od.

#### 3.13.2.7. Maxipreparació de DNA plasmídic

Per tal d'obtenir suficient quantitat de DNA plasmídic de gran puresa requerida per a la posterior transfecció de cèl·lules, es va emprar el sistema *Quiagen Plasmid Maxi Kit*

(Qiagen), seguint el protocol recomanat pel fabricant. A partir de cultius bacterians de 150ml de volum es va extreure DNA dels plasmidis pLVTHM, pLVTHM-shRNA2, pLVTHM-shRNAControl i de 2 plàsmids utilitzats per a la producció dels lentivirus recombinants pMD2.G i pSPAX-2.

### 3.13.3. Producció de vectors lentivirals

La producció dels vectors lentivirals es va realitzar per transfecció transitòria en les cèl·lules 293-FT, utilitzada com a línia cel·lular productora. Aquesta línia cel·lular 293FT és un clon derivat de les HEK-293 (*human embryonic kidney cell line*) que conté l'antigen T, la qual cosa permet assolir una elevada expressió de les proteïnes empaquetadores víriques i contribueix a l'obtenció d'un elevat títol viral.

Es va cotransfectar el cultiu de cèl·lules 293-FT amb tres plasmidis: pLVTHM que conté el shRNA i la seqüència del gen reporter GFP, el plasmidi pMD2.G el qual conté la seqüència que codifica per la proteïna VSV-G necessària per formar una envolta viral pantròpica (Figura 27A) i el plasmidi pSPAX-2 que conté les seqüències que codifiquen per les proteïnes necessàries per empaquetar el DNA viral (Figura 27B).

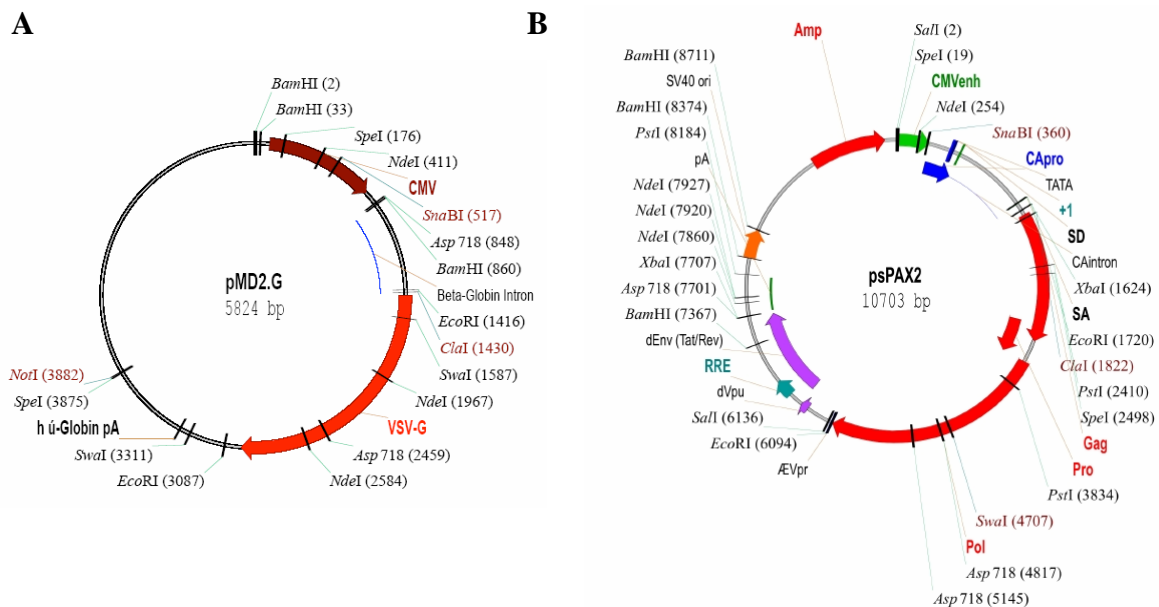


Figura 27. Representació gràfica dels plasmidis utilitzats per a l'obtenció dels lentivirus recombinants. A). pMD2.G. B). psPAX-2.

Per cotransfectar les cèl·lules HEK 293-FT amb aquests tres plasmidis, es va utilitzar com a mètode de transfecció la coprecipitació del DNA amb fosfat càlcic [268]. Aquest sistema es basa en la barreja del DNA en un tampó de fosfats amb CaCl<sub>2</sub>, de manera que es formen complexos de DNA i fosfat càlcic que precipiten sobre la cèl·lula, adherint-se a la seva membrana cel·lular i penetrant al citoplasma per endocitosi.

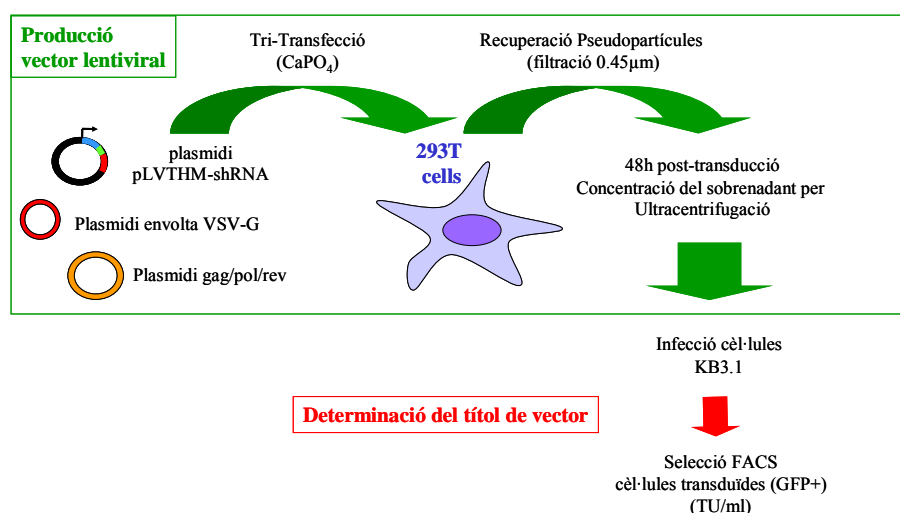


Figura 28. Esquema del protocol utilitzat per a la producció dels vectors lentivirals recombinants.

A la Figura 28 es mostra un esquema del procediment seguit per a la producció dels vectors lentivirals recombinants. 24 hores abans de la transfecció es van sembrar  $2 \times 10^6$  cèl·lules HEK 293-FT en plaques de 100mm de diàmetre. La cotransfecció amb fosfat càlcic es va realitzar amb una barreja dels 3 plasmid: 2,5 µg pMD2.G; 7,5 µg pSPAX-2 i 10 µg de pLVTHM-shRNA. A les 24 hores posttransfecció, es va canviar el medi de cultiu de les cèl·lules i 48 hores després es va recollir el sobrenadant que contenia les partícules virals recombinants. Aquest sobrenadant es va filtrar utilitzant un filtre de 0.45 µm (Millipore) per eliminar restes de cèl·lules del medi, i després es va concentrar centrifugant durant 90 minuts a 20.000 rpm a 4°C en l'ultracentrífuga Beckman utilitzant el rotor SW28. Es va descartar el sobrenadant i el precipitat es va resuspendre amb 10 ml de PBS i es va incubar en gel durant 30 minuts. Posteriorment es va realitzar una nova ultracentrifugació en les mateixes condicions. El precipitat final es va resuspendre amb 120 µl de PBS i es va incubar durant 2 hores en gel. Per tal de realitzar posteriorment la titulació de l'estoc lentiviral es van preparar dilucions 1/100 i 1/200 de la suspensió viral en medi DMEM suplementat amb 10% de FBS. La resta es va aliquotar i es va guardar a -80°C fins a la seva utilització.

#### Solucions:

- CaCl<sub>2</sub> 2.5M
- 2X HBS: 16g/L NaCl; 0.76g/L KCl; 0.2g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10g/L HEPES; 2g/L glucosa; pH 7.10.
- 0.1X TE: 1mM Tris-HCl pH 8; 0.1 mM EDTA pH 8.

#### 3.13.4. Titulació dels vectors lentivirals

Per tal de quantificar el títol de partícules virals presents a l'estoc lentiviral es va infectar un cultiu de cèl·lules KB3.1, les quals són permissives a ser transduïdes per vectors

## Materials i mètodes

---

retrovirals. El protocol de transducció utilitzat es va fer per addició directa del sobrenadant lentiviral al cultiu cel·lular. Per afavorir la transducció d'aquestes cèl·lules es va utilitzar un polibré, el qual facilita la unió del virus a la superfície cel·lular mitjançant la neutralització de les forces electrostàtiques que es generen entre les càrregues negatives de les partícules víriques i les membranes cel·lulars.

Entre 12-24h abans de la infecció, es van sembrar les cèl·lules KB3.1 a una densitat de  $0.5 \times 10^5$  cèl·lules per pou en una placa de 6 pous. 4 hores abans de transduir aquestes cèl·lules es va afegir al medi polibré a una concentració de 8 µg/ml. A les 4 hores, es van transduir aquestes cèl·lules amb diferents dilucions de l'estoc de partícules virals recombinants: 25 µl i 50 µl de la dilució 1/100 i 25 µl, 50 µl i 100 µl de la dilució 1/200.

Les cèl·lules transduïdes es deixaven creixent dos dies a 37°C en una atmosfera de 5%CO<sub>2</sub>. A les 48 hores posttransducció, les cèl·lules es rentaven 2 vegades amb PBS, i es recollien amb tripsina/EDTA. La suspensió cel·lular es centrifugava a 12.000g durant 1 minut i finalment, les cèl·lules es resuspenien amb tampó FACS. Les dades de fluorescència es van adquirir amb el citòmetre de flux. A partir del número de cèl·lules positives per GFP (*green fluorescent protein*), es va calcular el títol viral en unitats transductores per mil·lilitre (TU/ml) d'acord amb la següent fórmula:

$$\text{TU/ml} = \frac{1 \times 10^5 \text{ cèls. sembrades} \times (\% \text{ cèls. positives-GFP}/100)}{\text{ml de vector}}$$

Figura 29. Equació utilitzada pel càlcul del títol viral en TU/ml.

### Solucions:

- Polibré 800µg/ml (p/v) en H<sub>2</sub>Od.

### **3.14. Transducció de HUVEC amb lentivirus**

Es va comprovar l'eficiència de transducció d'aquests vectors lentivirals en el cultiu primari de cèl·lules endotelials HUVEC, i es va determinar la multiplicitat d'infecció o MOI (*multiplicity of infection*). La MOI es defineix com el nombre d'unitats formadores de calves (pfu, *plaque forming units*) que hi ha per cèl·lula.

12-16 hores abans de la transducció, es van sembrar les HUVEC a una densitat de  $1.4 \times 10^5$  cèl·lules/pou en una placa de 6 pous, i es van fer créixer a 37°C fins a assolir un 90% de confluència. La transducció d'aquestes cèl·lules es va realitzar seguint el mateix protocol que per les cèl·lules KB3.1, explicat amb anterioritat a l'apartat 3.13.4, amb diferents unitats transductores ( $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  i  $1 \times 10^5$  TU) dels estocs lentivirals pLVTHM-shRNA-2 i

pLVTHM-shRNA-control.

### 3.14.1. Quantificació de l'eficiència de transducció en HUVEC

Les cèl·lules HUVEC que havien estat transduïdes amb  $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  i  $1 \times 10^5$  unitats transductores (TU) de cadascun dels estocs lentivirals anteriors, es deixaven creixent dos dies a 37°C en una atmosfera de 5%CO<sub>2</sub>. A les 24 hores posttransducció, es visualitzaven les cèl·lules HUVEC transduïdes fent servir el microscopi invertit de fluorescència *Olympus IX-70 inverted microscope* (Olympus). Posteriorment, a les 48 hores, les cèl·lules es rentaven 2 vegades amb PBS, i es recollien amb tripsina/EDTA. La suspensió cel·lular es centrifugava a 12.000g durant 1 minut i finalment, el precipitat cel·lular es resuspensia amb tampó FACS. Fent servir el citòmetre de flux, es quantificava el nombre de cèl·lules transduïdes que expressaven GFP i es calculava la multiplicitat d'infecció o MOI (*multiplicity of infection*).

## 3.15. Determinació de perfils d'expressió gènica

En els estudis d'expressió gènica, la tecnologia d'arrays de DNA permet l'anàlisi simultani de milers de gens en un únic experiment. De manera similar a altres tècniques com el Northern blot, la RT-PCR, el *differential display* o l'anàlisi seriat d'expressió gènica (SAGE), els microarrays permeten la quantificació relativa de l'expressió gènica amb l'avantatge de que es poden analitzar milers de gens a la vegada.

Els microarrays consisteixen en un suport sòlid, generalment un portaobjectes de vidre pretractat, sobre el qual han estat dipositades amb elevada precisió milers de sondes conegudes, ja siguin sondes de cDNA o oligonucleòtids. L'abundància del cada transcrit és determina hibridant aquest microarray amb mostres de RNA marcades amb un fluorocrom. La intensitat del senyal obtinguda és una mesura de l'abundància del mRNA en la mostra analitzada.

### 3.15.1. Classes de microarrays d'expressió

S'han descrit diferents tipus de microarrays segons el material immobilitzat, que pot ser cDNA, mRNA, proteïna o teixit. Pel que fa a l'estudi de l'expressió gènica, existeixen dos tipus principals de microarrays que es diferencien en funció del mètode de fabricació i el tipus d'àcid nucleic immobilitzat: els microarrays de DNA i els microarrays d'oligonucleòtids.

-Els **microarrays d'oligonucleòtids** comercials es poden sintetitzar *in situ* o de manera externa. Per a la fabricació dels microarrays d'oligonucleòtids *in situ* Affymetrix utilitza la tècnica de fotolitografia, que consisteix en la síntesi *in situ* d'oligonucleòtids de 25 bases

mitjançant un sistema d'emascament litogràfic i fotodesprotecció de grups reactius. Aquesta tecnologia requereix una infraestructura molt sofisticada, permet generar fins a 100.000 *spots* per array i és utilitzada únicament per Affymetrix. En el cas dels microarrays comercials que fabrica Agilent, els oligonucleòtids tenen un tamany de 60 mer i són sintetitzats *in situ* en el porta mitjançant tecnologia ink-jet i un sistema piezoelèctric.

-Els **microarrays de DNA** es sintetitzen per impressió del DNA utilitzant un *spotter* o *arrayer*, en superfícies de vidre recobertes químicament per a permetre la unió d'aquest DNA. Aquesta unió pot ser iònica o covalent. El DNA utilitzat prové de productes amplificats per PCR a partir de genoteques o llibreries de DNA genòmic. Es tracta de fragments de DNA de doble cadena amb longitud variable, de 500 a 2500 bases, que són purificats per tal d'eliminar les sals, els encebadors i les proteïnes presents en la reacció de PCR. Cada punt de l'array es genera mitjançant la deposició de pocs nanolitres del producte purificat fent servir el robot *arrayer*, i permet generar fins a 20.000 spots per array.

Els microarrays de cDNA generats per deposició de productes de PCR a partir d'una llibreria de clons, presenten certes limitacions a causa per exemple de la crosshibridació entre el mRNA marcat utilitzat com a sonda i altres elements no específics del clon de cDNA, i sovint existeixen clons mal assignats dins de la llibreria de cDNA. Els microarrays d'oligonucleòtids en canvi, confereixen una elevada especificitat del senyal d'hibridació, però poden generar una baixa sensibilitat i especificitat en comparació amb els arrays de cDNA per a un gen únic, per això la majoria d'arrays utilitzen diferents seqüències d'oligonucleòtids per a un mateix gen distribuïdes al llarg de l'array.

Els experiments d'hibridació de microarrays presentats en aquest treball es van realitzar en el Laboratori de la Unitat de Microarrays del Centre de Regulació Genòmica (CRG). En aquests experiments, les cèl·lules HUVEC que havien estat electroporades amb siRNA-2 o siRNA-control (seguint el protocol descrit a l'apartat 3.5.3), van ser activades per coincidència amb cèl·lules Jurkat D1.1 a una ratio T/EC de 10:1 durant 3 temps d'estimulació: 16, 10 o 4 hores, prèviament a l'anàlisi. 48 hores posttransfecció, el cocultiu va ser rentat amb PBS per tal d'eliminar les Jurkat D1.1 que havien quedat adherides a la monocapa de HUVEC i procedir així a l'extracció del RNA total d'aquestes cèl·lules.

### 3.15.2. Disseny de l'experiment de microarrays

El disseny típic d'un experiment de microarrays consta de diverses etapes: l'aïllament de la mostra de RNA, l'amplificació i el marcatge d'aquest RNA, la hibridació amb l'array i la detecció del senyal i posterior anàlisi de les dades.

### 3.15.2.1. Extracció de RNA total

Les mostres de RNA total es van extreure fent servir el kit *RNeasy RNA Isolation kit* (Qiagen) i posteriorment van ser tractades amb *RNase-free DNase I* (Ambion) per eliminar les restes de DNA genòmic tal i com s'ha descrit anteriorment a l'apartat 3.8.

### 3.15.2.2. Comprovació de la qualitat del RNA

La puresa del RNA utilitzat és un factor crític en la hibridació de microarrays, particularment quan s'utilitza fluorescència, ja que les proteïnes cel·lulars, els lípids i els carbohidrats poden produir unions no específiques del DNA marcat en la superfície dels arrays. Per aquest motiu abans de procedir amb els passos següents calia comprovar la qualitat del RNA obtingut.

La concentració del RNA va ser mesurada fent servir l'espectrofotòmetre Nanodrop i la seva qualitat va ser determinada per nanoelectroforesis amb el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent). Tots els RNAs presentaven un RIN (*RNA integrity number*) entre 9.3 i 10 (en una escala de 1 a 10), i un ratio 28S/18S entre 1.67 i 2.07.

### 3.15.2.3. Amplificació, síntesi i marcatge del cDNA

500 ng de RNA total van ser retrotranscrit, amplificat i marcat per transcripció *in vitro* fent servir el kit *Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit* (Agilent 5184-3523) seguint les instruccions del fabricant. Breument, per a la síntesi del cDNA a partir del RNA total s'utilitza l'enzim transcriptasa reversa MMLV-RT i un oligodT que conté el promotor de T7 RNA polimerasa. Posteriorment, té lloc una reacció de transcripció *in vitro* i síntesi de la cadena de RNA complementari (cRNA) amb la T7 RNA polimerasa al mateix temps que s'incorporen els fluorocroms Cy5 i Cy3 conjugats a dCTP. Finalment, aquest cRNA amplificat es purifica i quantifica.

El principal problema d'aquest mètode de marcatge directe és que els fluorocroms utilitzats són compostos relativament grans, a més, Cy5 és major que Cy3 i per tant, la seva incorporació pot ser menor. Per tal de solucionar aquest problema s'ha utilitzat un marcatge recíproc, que consisteix en hibridar dos arrays per a cada condició, un marcant la mostra problema amb Cy3 i el control amb Cy5 i l'altre fent el marcatge invers.

### 3.15.2.4. Hibridació dels microarrays

Es van utilitzar microarrays comercials d'Agilent de genoma complet *Whole Human Genome Oligo Microarray* (Agilent G4112A). Es tracta de microarrays d'oligonucleòtids de 60 mer sintetitzats *in situ* mitjançant el sistema *Ink-jet*. Aquests microarrays contenien 44.290

spots, 41.000 dels quals representaven en còpia única o múltiple, un total de 37.312 transcrits humans.

Les mostres de RNA complementari (cRNA) marcat amb Cy5 o Cy3 es van hibridar a aquests microarrays d'oligonucleòtids de 44k seguint les instruccions del fabricant.

Es van realitzar dos experiments o rèpliques biològiques, en cadascun d'aquests experiments es comparaven cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2 i les mateixes cèl·lules tractades amb el siRNA-control. Cada parella experimental de mostres marcades va ser cohibridada per separat en dos microarrays amb intercanvi de fluorocroms (*dye swapping*) per tal de corregir l'efecte explicat anteriorment d'incorporació preferencial d'un dels fluorocroms (*dye bias*). Per cada temps d'estimulació es van fer 4 hibridacions, generant en total 12 conjunts de dades de microarrays.

### **3.15.2.5. Anàlisi de les imatges i extracció de les dades**

Les imatges dels dos canals de fluorescència, Cy5 i Cy3, van ser captades amb l'escàner Agilent G2565BA i quantificades fent servir el software GenePix 6.0 (Axon, Molecular Devices) emprant la opció de trobar elements irregulars.

### **3.15.2.6. Normalització**

Les dades crues extretes van ser filtrades i normalitzades utilitzant MMarge (Lozano et al, *unpublished*), i un servidor web local que implementa el paquet Limma desenvolupat dintre del projecte Bioconductor en l'entorn de programació estadística R [269]. La intensitat dels dos canals es va compensar fent servir normalització per regressió robusta (mètode *lowess*) emprant 0.3 com a paràmetre de cobertura amb pesos reduïts per a elements control o de baixa qualitat. Es va fer un escalat entre els diferents xips per poder comparar les dades entre si.

### **3.15.2.7. Processat de les dades**

Es va calcular un estadístic empíric Bayesià,  $B$ , tenint en compte l'intercanvi de fluorocroms, i les sondes es van ordenar segons el valor de  $B$ , encara que a causa del baix nombre de rèpliques no es va considerar el valor de  $B$  sinó el rang de  $B$  com a valor indicatiu de significació.

Els gens diferencialment expressats es van escollir fent servir com a criteri de tall (*cut off*) un percentil de rang de  $B$  superior al 95% o 99% i una taxa de canvi (FC, *Fold Change*) absoluta per damunt de 1.2 o 1.45 en almenys un dels tres temps d'estimulació. A més, es va fer servir el següent filtre de qualitat: senyal detectable pel software *GenePix* en 6 de les 12



hibridacions i intensitat (restada del senyal de fons i normalitzada) superior a 250 en almenys un dels dos canals i en dues o més de les 4 hibridacions de cada temps d'estimulació. Les taules de dades van ser visualitzades emprant *AFM 4.0 Array File Maker*, una aplicació d'Excel [270].

### 3.15.2.8. Anàlisi o interpretació de les dades de microarrays

#### *Clustering*

Possiblement l'eina informàtica més utilitzada en l'anàlisi de dades dels microarrays són els mètodes d'agrupament o *clustering*, que s'utilitzen per a trobar gens amb un mateix patró d'expressió o per agrupar condicions experimentals. És d'esperar que gens que comparteixen una mateixa funció biològica es comportaran de la mateixa manera. Per a trobar aquestes relacions entre gens, cal saber quan es pot considerar que dos gens es comporten igual, definint una distància entre patrons. Existeixen dos tipus de funcions de distància: la distància euclídea i correlació lineal. La primera es basa en diferències absolutes, mentre que la segona es fixa en tendències. Si s'utilitza la distància euclídea, s'agrupen gens amb nivells de transcripció similars, mentre que si s'utilitza la correlació lineal, els gens s'agrupen segons les seves tendències. En funció de la distància utilitzada per agrupar els diferents patrons d'expressió s'obtenen uns grups o uns altres, és a dir, la distància utilitzada defineix la relació que es busca entre els gens.

Els mètodes de *clustering* es divideixen en supervisats i no supervisats, en funció de si s'utilitza o no informació externa per a determinar els grups que tenen patrons similars d'expressió gènica. Els mètodes més utilitzats són els no supervisats, que en funció de com agrupen les dades es poden dividir en mètodes jeràrquics o no jeràrquics, segons generin o no una classificació amb informació de possibles relacions jeràrquiques entre les dades.

L'objectiu de l'anàlisi de les dades o de les anàlisis de clustering, és l'obtenció d'informació sobre característiques biològiques comunes en un grup de gens d'interès. Existeixen diversos programes que faciliten aquest anàlisi, la majoria dels quals utilitzen el termes de *Gene Ontology*.

*Gene Ontology* (GO) és un projecte col·laboratiu que té com a objectiu generar un vocabulari comú i dinàmic per a les descripcions dels productes gènics en les diferents bases de dades. Els tres principis organitzatius del terme GO són la funció molecular, el procés biològic i el component cel·lular. Un producte gènica pot tenir més d'una funció molecular, pot ser utilitzat en un o més processos biològics, i podria estar associat amb més d'un component cel·lular. Dins de cada categoria de GO específica existeixen fins a 9 nivells descriptius.

En el nostre cas, per tal d'identificar patrons d'expressió similars en la llista de gens regulats al llarg dels 3 períodes de temps d'estimulació, es va fer servir un mètode de clustering no supervisat-no jeràrquic anomenat K-Means a través del software TMEV (*TIGR Multiple Experiment Viewer*) [271] (<http://www.tm4org/mev.html>). Mitjançant aquest software, es va aplicar l'algoritme de K-Means a la llista de 714 gens diferencialment regulats amb un criteri de  $|\text{fold change}| \geq 1.2$  i  $B \text{ rank} \geq 95\%$ . Es va fer servir la distància euclídea i es va fixar el número de clusters a 4 (segons l'anàlisi de FOM, *Figure Of Merit*). Posteriorment, el grup de gens de cada cluster individual es va analitzar mitjançant l'eina de classificació funcional *Gene Ontology*, la qual també forma part del software TMEV.

### **Anotació Funcional**

Una part de l'anàlisi de les dades de microarrays realitzada en aquest treball es va fer utilitzant una sèrie de programes que es troben agrupats i connectats entre ells via web en el paquet GEPAS (*Gene Expression Patern Analysis Suite v3.0*). Es tracta d'una eina desenvolupada per la Unitat de Bioinformàtica del CIPF (Centro de Investigación Príncipe Felipe) que engloba diversos programes d'anàlisi de microarrays (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>). Les principals aplicacions que ofereix el paquet GEPAS que s'han utilitzat en aquest treball es detallen a continuació.

Per tal d'esbrinar si els gens significativament regulats o que coexpressaven en el nostre sistema, compartien entre ells una funció biològica similar, es va realitzar un estudi d' anotació funcional fent servir els programes FatiGo i FatiGo+:

-FatiGO (*Fast transference of information using Gene Ontology*).  
<http://www.fatigo.bioinfo.cipf.es>

-FatiGo+: extensió de FatiGO per motius InterPro, vies KEGG i Swisprot, factors de transcripció i elements reguladors cisRed.

<http://www.babelomics.bioinfo.cipf.es/fatigoplus/cgi-bin/fatigoplus.cgi>

Es va comparar la llista de gens diferencialment regulats amb un criteri de  $B \text{ rank} \geq 95\%$  i  $FC \geq 1.2$  amb la resta de gens presents al xip, i es va fer servir la base de dades de GO i *KEGG pathways*.

Per analitzar grups de gens amb una funció biològica o mecanisme de regulació comú, es va utilitzar l'aplicació GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) en versió java, fent servir el paquet p-GSEA, un software desenvolupat pel *Massachussetts Institute of Technology* (MIT) [272]. L'aplicació GSEA analitza grups de gens i calcula un *Enrichment Score* (ES) que indica el grau amb què una determinat grup de gens està sobrerepresentat a la nostra llista total de gens. Al mateix temps fa una estimació del nivell de significància d'aquest ES donant

un p-valor ajustat per múltiples tests (*Multiple Hypothesis Testing*). Aquesta aplicació desenvolupada per el MIT fa servir una col·lecció de base de dades que ells mateixos han generat anomenada MSigDB 1.0 (*Molecular Signature Database*) que conté 4 categories o bases de dades de gens (C1, C2, C3 i C4) que representen un total de 1325 grups de gens. Per a aquest estudi hem fet servir la base de dades funcional C2 que inclou un total de 522 grups de gens: 472 dels quals corresponen a productes implicats en un determinada via metabòlica o via de senyalització i 50 són grups de gens regulats en resposta a determinada pertorbació genètica o química.

### 3.16. Extracció de proteïnes nuclears

Les cèl·lules HUVEC ( $2 \times 10^6$  cèl·lules) un cop transfectades amb siRNA (seguint el protocol descrit a l'apartat 3.5.3), van ser cocultivades amb Jurkat D1.1 amb una relació T/EC de 10:1, durant 4 hores prèviament a l'anàlisi (tal i com es descriu a l'apartat 3.3). 48 hores posttransfecció, el cocultiu es va rentar amb PBS per eliminar les cèl·lules Jurkat D1.1 que havien quedat adherides a la monocapa de HUVEC.

Les proteïnes nuclears es van aïllar fent servir el kit *Transfactor Extraction Kit* (Clontech BD) seguint el protocol descrit pel fabricant. Breument, les cèl·lules van ser recollides en PBS fred, centrifugades i resuspeses en un tampó de lisi hipotònic (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 1mM dithiothreitol (DTT)) que contenia un *cocktail* d'inhibidors de proteases. Després de la disrupció cel·lular, el lisat va ser mantingut en gel 15 minuts i centrifugat a 11.000 g durant 20 minuts a 4°C, a continuació es va recollir la fracció citosòlica. El precipitat que contenia restes de membranes cel·lulars va ser resuspès en un tampó d'extracció (20mM HEPES, pH 7.9, 0.42mM NaCl, 25% glicerol, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 1mM DTT, inhibidors de fosfatases i proteases), es van trencar els nuclis i la suspensió nuclear es va agitar de forma vigorosa durant 30 minuts a 4°C. Posteriorment, les restes de nuclis es van eliminar per centrifugació a 16.000 g 5 minuts a 4°C, i es va recollir el sobrenadant que contenia la fracció nuclear. La concentració proteica va ser determinada fent servir el mètode de *Bradford* (Bio-Rad Laboratories) seguint les instruccions del fabricant.

### 3.17. Assaig d'activitat de Factors de Transcripció

La detecció de l'activitat de factors de transcripció a nivell proteic es va fer mitjançant un assaig d'ELISA utilitzant els kits: *BD Mercury Transfactor Profiling Kit Inflammation 1* (Clontech BD Biosciences), i *TransSAM AP-1 i MAPK family kits* (Active Motif).

### 3.17.1. Factors de transcripció de la família NFκB

El kit colorimètric *TransFactor Profiling Kit Inflammation I* (Clontech BD Biosciences) es va fer servir per determinar l'efecte del silenciament de CD40 en la translocació nuclear de factors de transcripció de la família de NFκB (p50, p65 i cRel).

A cada pou de la placa d'ELISA hi un oligonucleòtid amb la seqüència consens per cada factor de transcripció. Els extractes nuclears de les cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2 i siRNA-control es van incubar en cada pou (30 µg de proteïna/pou) durant 1h a temperatura ambient en agitació. Els pous van ser rentats 3 vegades amb tampó de rentat (100mM PBS, pH 7.5, 500mM NaCl and 1% Tween 20). Les proteïnes dels factors de transcripció que s'uneixen a la seqüència consens són detectades incubant amb un anticòs primari (dilució 1:100 en el cas de c-Fos, CREB-1, ATF-2, c-Rel; 1:500 per NFκB p65 i 1:5.000 per NFκB p50 en tampó de rentat) durant 1 hora a temperatura ambient en agitació. Després de 3 rentats, els pous van ser incubats 1 hora amb anticòs secundari *anti-rabbit* conjugat a peroxidasa (dilució 1:1.000 en tampó de rentat) abans d'afegir 100 µl del substrat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, subministrat pel fabricant. La reacció colorimètrica s'atura afegint al pou 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, posteriorment es llegeix l'absorbància a 450 nm fent servir el lector de plaques *Titertek Multiskan<sup>®</sup> microplate reader* (Labsystems).

### 3.17.2. Factors de transcripció de la família AP-1 i MAPK

L'activació dels factors de transcripció de la família de AP-1 i MAPK es va determinar fent servir els kits *TransAM<sup>®</sup> AP-1* i *MAPK family kits (Active Motif Europe)*. El protocol seguit és el mateix que el descrit en l'apartat anterior però en aquest cas s'ha partit de 10 µg d'extracte nuclear a cada pou on hi ha immobilitzat un oligonucleòtid amb la seqüència consens d'unió al factor de transcripció. L'anticòs primari utilitzat ha estat diluït 1:1.000 en tampó de rentat o 1:500 en el cas de phospho-c-Jun i c-Jun. L'anticòs secundari utilitzat ha estat un *anti-rabbit* o *anti-mouse* (en el cas de ATF-2) a dilució 1:1.000 en tampó de rentat.

## 3.18. Assaig d'activació de la via de *Toll like receptor-3*

Les cèl·lules HUVEC (2x10<sup>6</sup> cèl·lules) un cop transfectades amb siRNA (seguint el protocol descrit a l'apartat 3.5), van ser cocultivades amb Jurkat D1.1 amb una relació T/EC de 10:1, durant 4 i 16 hores prèviament a l'anàlisi (tal i com es descriu a l'apartat 3.3). 48 hores posttransfecció, el cocultiu es va rentar amb PBS per eliminar les cèl·lules Jurkat D1.1 que havien quedat adherides a la monocapa de HUVEC. Aquestes cèl·lules van ser incubades

durant 6 hores amb 25 µg/ml de *polyinosine-polycytidylic acid* (poly (I:C)), un anàleg sintètic de dsRNA (el lligand de TLR-3), per tal d'estimular la via del *Toll like receptor-3*. Posteriorment, es van lisar les cèl·lules i es va procedir a fer l'extracció de RNA per tal de quantificar la regulació transcripcional de IL-8 i IFN-β per RT-PCR. També es van fer extractes proteics totals per tal de mesurar l'expressió a nivell proteic de IFNβ.

### 3.19. Anàlisi per Northern Blot

Per tal de determinar la mida dels diferents transcrits del gen de l'Apelin i quantificar la seva abundància en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA i estimulades amb Jurkat D1.1 (tal i com es descriu als apartats 3.5.3 i 3.3), es va fer servir la tècnica de Northern Blot.

#### 3.19.1. Electroforesi del RNA en gel d'agarosa/formaldehid

Entre 15 i 25 µg de RNA total extret de cèl·lules HUVEC es va separar per electroforesi en condicions desnaturalitzants en un gel d'agarosa a l'1% i formaldehid 2.2M, durant 4-5 hores a 55-65V. Un cop finalitzada l'electroforesi es van visualitzar les bandes del gel corresponents als ribosòmics 28S i 18S per tinció amb bromur d'etidi (0.15µg/ml). Per tal d'eliminar el formaldehid del gel, el qual pot dificultar la posterior unió del RNA a la membrana durant la transferència, es va rentar el gel 2 vegades amb aigua bidestil·lada. Després el gel va ser rentat amb una solució desnaturalitzant durant 10 minuts i amb una solució neutralitzant durant 15 minuts més abans d'equilibrar-lo amb 20xSSC durant 30 minuts. Seguidament, es va procedir a la transferència del RNA del gel a la membrana, en aquest cas es va fer servir una membrana de nitrocel·lulosa Hybond XL (Amersham). La transferència es va realitzar durant 16 hores a temperatura ambient utilitzant 20xSSC. Posteriorment el RNA va ser immobilitzat a la membrana mitjançant *UV cross-linking* fent servir el UV Stratalinker 2400 (Stratagene).

#### Solucions:

- Gel d'agarosa desnat: 20 mM MOPS; 5 mM Acetat sòdic; 1 mM EDTA pH 7; formaldehid 2.2 M.
- Solució desnaturalitzant: 0.05 N NaOH; 0.15 M NaCl.
- Solució neutralitzant: 0.1 M Tris-HCl pH 7.4; 0.15 M NaCl.
- SSC 20X: 3 M NaCl; 0.3 M Citrat sòdic pH 7.

#### 3.19.2. Preparació de la sonda de DNA

Per analitzar l'expressió dels dos transcrits del gen de l'Apelin es van preparar dues

sondes de DNA de 244 pb i 295 pb per RT-PCR a partir de cDNA de cèl·lules HUVEC, amplificant amb les parelles d'encebadors: F3-R3 i F4-R4 respectivament. A continuació es mostra una taula amb la seqüència dels encebadors utilitzats en la reacció de PCR per amplificar les dues sondes utilitzades a l'anàlisi de Northern:

Encebador	seqüència	T° anellament	MgCl <sub>2</sub>	mida
APLN F3	5'-CACAAAATGAATCCCTATGCT-3'	58°C	2	244pb
APLN R3	5'-TGGCTAAAAAGTCTGAAAGT-3'			
APLN F4	5'-CTATCCACCTCCCCAAGC-3'	58°C	1,5	295pb
APLN R4	5'-CCCACCCACTACCCTCTTC-3'			

Taula 14. Encebadors i condicions d'amplificació utilitzades per amplificar el gen de l'Apelin.

Les reaccions de PCR es van realitzar en un volum final de 50 µl que contenia tampó de PCR 1x, una solució de dNTPs a 200 µM cadascun, MgCl<sub>2</sub> (de 1,5 mM a 2,5 mM com s'indica a la Taula 14); 0.4 µM de cada encebador; 1,25U de l'enzim BioTaq DNA polimerasa (Bioline) i 75 ng de cDNA com a motlle. El programa d'amplificació utilitzat consta d'un primer pas de desnaturalització a 95°C 5 min., seguit de 40 cicles d'amplificació: desnaturalització a 95°C 30 seg.; anellament 30 seg. a 58°C o 60°C (com s'indica a la Taula 14); i extensió 72°C 30 seg.; i un pas d'extensió final a 72°C 10 min. Es va utilitzar el termociclador Perkin Elmer, model 2400.

Posteriorment, els productes de PCR es van visualitzar per electroforesi en gel d'agarosa 1% en TBE 0.5X i posterior tinció amb bromur d'etidi (0.15µg/ml) i es van aïllar per escissió del gel amb una fulla de bisturí. El DNA corresponent a les dues sondes es va purificar utilitzant el sistema *Qiaquick gel purification kit* (Qiagen).

### 3.19.3. Marcatge radioactiu de les sondes de cDNA de doble cadena

25 ng del producte de PCR purificat es va marcar radioactivament amb fòsfor 32 ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) per *random priming* fent servir el kit *Rediprime II Random Prime Labelling System* (Amersham Biosciences) i el fragment Klenow de la DNA polimerasa I, seguint les recomanacions del fabricant. Per tal de que no interferissin en la posterior hibridació, la radioactivitat no incorporada i altres components de la reacció s'eliminaven fent servir les columnes *ProbeQuant G-50 Micro Columns* (Amersham Biosciences). Posteriorment es va determinar l'activitat específica de la sonda o quantitat de radioactivitat incorporada en el DNA mitjançant el comptador  $\beta$  *RabckBeta Liquid Scintillation Counter* (Pharmacia).

### 3.19.4. Prehibridació de la membrana de Northern

Per tal de bloquejar els llocs d'unió inespecífics de la sonda a la membrana, aquesta es

prehibridava durant 3 hores a 42°C amb 20 ml de solució de prehibridació.

### 3.19.5. Hibridació de la membrana amb la sonda radioactiva

Un cop prehibridada la membrana, es desnaturalitzava la sonda, per incubació a 98°C 5 minuts. S'afegien  $10^6$  cpm de sonda per ml de tampó d'hibridació (amb la mateixa composició que el tampó de prehibridació). Es van utilitzar 10 ml de tampó de hibridació i es va hibridar la membrana durant 16 hores a 42°C en rotació constant.

#### Solucions:

- Solució de prehibridació/hibridació: 50% formamida; 6XSSC; 5% dextran sulfat; 1%SDS; 5X solució Denhardt's; i 50 µg/ml d'esperma de salmó.

### 3.19.6. Rentats de la membrana

Al final de la hibridació, es feien una sèrie de rentats de la membrana amb una astringència creixent:

2 rentats amb 2x SSC/0,1%SDS, 10 minuts a temperatura ambient.

2 rentats amb 0,2x SSC/0,1%SDS, 10 minuts a temperatura ambient.

2 rentats amb 0,2x SSC/0,1%SDS, 10 minuts a 65°C.

### 3.19.7. Detecció del senyal

Quan la intensitat del senyal emès per la membrana era feble i localitzada (mesurat amb el comptador Geiger) aquesta es col·locava en un xassís amb pantalles intensificadores i s'exposava un film AGFA a -80°C.

Finalment, aquestes membranes es tornaven a hibridar amb una sonda del gen G3PDH marcada radioactivament seguint el protocol anterior, sense deshibridar la sonda de DNA prèviament hibridada amb el RNA de la membrana.

## **3.20. Estudis *in vivo* en un model animal**

Un cop seleccionat el siRNA amb major eficàcia inhibidora de CD40 de rata, els experiments *in vivo* aniran encaminats a determinar els efectes biològics d'aquest i veure si l'ús de siRNAs és una eina eficaç per al bloqueig del senyal coestimulador evitant el rebuig agut i induint un estat de tolerància en un model experimental d'al·lotrasplantament renal.

Per tal d'optimitzar el sistema de transferència i el vector que permetés la màxima incorporació d'aquest material genètic als tipus cel·lulars més rellevants en el rebuig en el trasplantament renal amb la mínima toxicitat, es van abordar diferents estratègies i es va

avaluar la biodistribució d'aquest material en el ronyó i la seva potencial citotoxicitat.

Tots aquests experiments es van realitzar en col·laboració amb el Laboratori de Nefrologia Experimental del Servei de Nefrologia de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (CSUB).

### 3.20.1. Sistema de bany d'òrgans

Per als experiments inicials d'optimització de la introducció dels siRNAs en ronyó de rata es va fer servir el sistema de bany d'òrgans i un oligonucleòtid fosforotioat marcat amb biotina i el polímer catiònic *in vivo* jet PEI (Qbiogene).

*In vivo* jet PEI és un derivat lineal de la polietilenimida, que igual com altres lípids catiònics i polímers, condensa els oligonucleòtids en partícules carregades positivament i els confereix la capacitat d'interaccionar amb els proteoglicans aniònics de la superfície cel·lular i entrar dins la cèl·lula per endocitosi. *In vivo* jetPEI™ té a més la capacitat de tamponar el pH de l'endosoma [273, 274], protegint així els oligonucleòtids de la degradació i afavorint l'alliberament d'aquests des de l'endosoma cap al citoplasma [275-277]. Aquest polímer catiònic és menys tòxic que la polietilenimida PEI 25KDa (no lineal) que s'ha descrit que causa dany glomerular i tubular en experiments *in vivo* [278].

Per a la preparació dels complexos es van seguir les instruccions recomanades pel fabricant. La concentració de ODN-Biotina utilitzada va ser de 250nM i es va fer servir una relació N/P de 5 (nombre de residus de Nitrogen de polímer jetPEI per cada grup fosfat de l'oligonucleòtid). La rata donadora va ser anestesiada intraperitonealment amb una barreja de ketamina, atropina i diazepam, la cavitat abdominal oberta i l'aorta abdominal i la vena cava inferior canulades. El ronyó va ser aïllat i perfós *ex vivo* en un bany d'òrgans.

El model de bany d'òrgans consisteix en reperfondre un òrgan *ex vivo* en condicions el més fisiològiques possibles. Un bany d'òrgans consta, bàsicament, d'un receptacle on reposa l'òrgan, un reservori on s'emmagatzema el líquid de reperfusió, un sistema d'oxigenació d'aquest líquid i una bomba que el fa circular (Figura 30). Es tracta d'una eina experimental introduïda per primer cop l'any 1959 per l'estudi de la regulació del flux sanguini renal, reperfont en el bany ronyons de rata [279]. En aquest treball s'ha fet servir un model de reperfusió de ronyó que havia estat descrit prèviament [280]. El bany d'òrgans usat en aquest treball era un sistema tancat, és a dir, que el líquid de reperfusió recircula. El medi s'escalfava a 37°C i s'oxigenava amb carbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) durant 2 hores abans de començar la reperfusió i es mantenia així durant tota la reperfusió. Aquest medi es mantenia en un recipient de vidre de 250 ml de capacitat, que tenia tres funcions bàsiques: actuar com a



reservori del líquid de reperfusió, fer de cambra d'expansió on s'esmorteïa el cop de la bomba de manera que el flux pulsàtil que produïa la bomba arribava a l'òrgan convertit en un flux continu i, per últim, evitar que pogués entrar aire i/o escuma a l'interior de l'òrgan provocant una embòlia gasosa. Des de la cambra reservori, el líquid de reperfusió passava directament a l'òrgan a través d'un tub connectat a la cànula arterial. L'efluent venós es recollia en un altre recipient on es tornava a oxigenar i es recirculava mitjançant una bomba peristàltica de nou cap al reservori, previ pas per un filtre de 5 µm de diàmetre (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) per tal de retirar qualsevol petit detritus de la circulació.

Tots els reservoris que contenien perfusat, així com el receptacle que acollia l'òrgan que s'estava reperfont, tenien una doble càmera exterior per on circulava aigua calenta (escalfada mitjançant un bany extern), que mantenia el líquid de reperfusió i l'òrgan a 37°C.

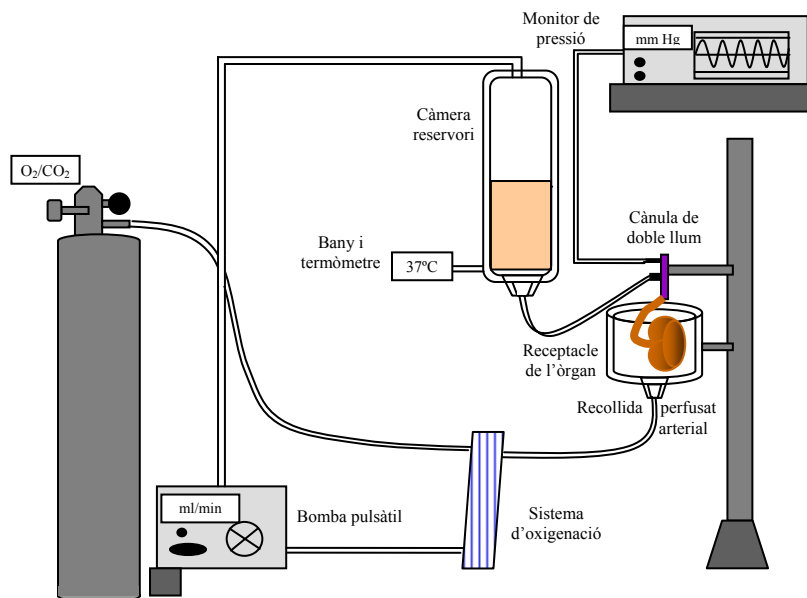


Figura 30. Esquema del sistema de bany d'òrgans utilitzat per reperfondre el ronyó.

El medi utilitzat per reperfondre el ronyó era una solució modificada de Krebs-Henseleit. El volum total de perfusió va ser de 50ml. El ronyó es va perfondre durant 45 minuts amb un flux de perfusió constant de 5ml/min i mantenint una pressió màxima de 80-100 mmHg. Al final de la reperfusió, es recollia el ronyó i es processava directament per a l'anàlisi immunohistoquímica seguint el protocol descrit a l'apartat 3.21.

Amb la finalitat d'avaluar els possibles efectes tòxics de la perfusió *ex vivo* de l'òrgan, en un altre estudi el ronyó reperfós era recollit i rentat amb líquid de preservació o solució d'Euro-Collins (EC). Després es realitzava un trasplantament singènic en una rata receptora on prèviament se li havia extret el ronyó contralateral (nefrectomia contralateral), el qual era utilitzat com a control. A les 48hores posttrasplantament, es procedia a l'extracció renal de

l'òrgan trasplantat i posterior processat per immunohistoquímica.

### 3.20.2. Perfusió del ronyó *in situ*

Amb el sistema de perfusió *in situ*, el ronyó era perfós *in situ* administrant l'oligonucleòtid biotinitat complexat amb el polímer catiònic *in vivo* jet PEI per injecció directa a l'artèria renal.

Per a la preparació dels complexos es van seguir les instruccions del fabricant i les mateixes condicions que en l'apartat anterior: una concentració de oligo-Biotina de 250nM i una relació N/P de 5. Aquests complexos eren dissolts en 1 ml de solució de perfusió Krebs-Henseleit. Breument, les rates eren anestesiades per via intraperitoneal amb una barreja de ketamina, atropina i diazepam. La cavitat abdominal s'obria i l'aorta abdominal i la vena cava inferior eren canulades. A continuació els complexos s'introduïen en el ronyó *in situ* per injecció intraarterial amb un flux d'entrada constant de 3ml/min.

48 hores després, l'animal es sacrificava, s'extreia el ronyó perfós i es fixava en una solució de formol per posteriorment analitzar la mostra per immunohistoquímica.

### 3.20.3. Electrotransferència de DNA en ronyó

S'ha demostrat que la tècnica d'electrotransferència de DNA *in vivo* en múscul esquelètic com a mètode de transferència gènica incrementa el procés d'introducció de DNA en la fibra muscular [281, 282]. En aquest estudi es volia avaluar si l'electrotransferència directa a ronyó també podia ser un mètode eficient per a l'entrada d'aquest material genètic dins les cèl·lules renals.

Per a l'electrotransferència de DNA en solució al ronyó, les rates eren anestesiades via intraperitoneal amb una barreja de ketamina, atropina i diazepam. La cavitat abdominal s'obria i l'aorta abdominal i la vena cava inferior eren canulades. Després es procedia a la injecció intraarterial de l'oligonucleòtid en solució seguida de l'aplicació d'un camp elèctric per afavorir l'entrada d'aquest DNA dins les cèl·lules.

Primer es rentava el ronyó amb solució EuroCollins i després s'introduïa 1 ml de la solució que contenia l'oligonucleòtid marcat amb biotina sense acomplexar amb cap lípid catiònic, per injecció directa a l'artèria renal (tal i com es descriu a l'apartat 3.20.2). Aquest oligonucleòtid estava resuspès en 1ml de sèrum fisiològic, i inicialment aquest es va utilitzar a dues concentracions diferents: 250 nM i 500 nM.

El camp elèctric s'aplicava mitjançant l'electroporador ECM 830 *Electropulse Generator System* (BTX) amb les condicions següents: 100V/cm, 6 polsos de 20mseg de

duració cadascun. 48 hores després de l'electroporació, l'animal es sacrificava, s'extreia el ronyó i es fixava en una solució de formol, per posteriorment ser processat per immunohistoquímica.

Solucions:

- Solució de reperfusió: Krebs-Henseleit (Na 140 mmol/l, Cl 123 mmol/l, K 4.9 mmol/l, Ca 2.2 mmol/l, Ca iònic 1.2 mmol/l, Mg 1.2 mmol/l, Bicarbonats 25 mmol/l, Fosfat inorgànic 1.2 mmol/l, Sulfats 1.2 mmol/l); 0.04 mM EDTA; 5 mM D-glucosa; 4.5 g/100 ml BSA; 10 mg/l estreptomina; 100.000 U/L penicil·lina; dilució 1/140 de barreja de 20 aminoàcids (Aminoplasmal L-12.5, Braun medical).

### **3.21. Immunohistoquímica**

La immunohistoquímica es realitzava sobre talls transversals de teixit renal fent servir estreptavidina conjugada amb peroxidasa (Pierce).

Les mostres de ronyó es van fixar amb formol tamponat al 4% durant 24 hores. El teixit es va incloure en parafina i es va tallar a seccions de 4µm de gruix. Posteriorment, aquestes seccions de ronyó incloses en parafina es van desparafinar i rehidratar amb xilol i una sèrie de gradients d'etanol (absolut-96°-70°). Després, els talls es rentaven amb aigua destil·lada i PBS. Les peroxidases endògenes eren bloquejades incubant la mostra amb una solució de peròxid d'hidrogen al 3% en PBS durant 15-30 minuts. Les possibles unions inespecífiques es van bloquejar amb 0.2% d'una solució de Tritó X-100 en PBS durant 5 minuts. Les seccions es van incubar amb una dilució 1:100 de Streptavidina-HRP en Tritó-gelatina (PBS, Tritó X-100 0.2%, gelatina 0.2%) durant 45 minuts-1 hora. Després de rentar els talls amb una solució de Tritó-X-100 en PBS, l'activitat peroxidasa es va visualitzar submergint els portaobjectes durant 10 minuts en un solució que contenia 0.6mg/ml del cromogen diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories) en 10mg/ml de peròxid d'hidrogen. Després de contratenyir la mostra amb una solució de Hematoxilina-Eosina, les seccions van ser montades amb DPX i visualitzades al microscopi òptic (Olympus).

Solucions:

- 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS.
- 0.2% Tritó X-100 en PBS.
- Tritó-gelatina: 1X PBS; 0.2%Tritó X-100, 0.2% gelatina.