



ANNEX

HeLa
2N DE BATXILLERAT
CURS 2021/22
ÀMBIT CIENTÍFIC
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES



ÍNDEX

GLOSSARI D'ABREVIATURES	4
1. Conceptes teòrics	6
1.5. Tractaments actuals	6
2.2.2. Classificació de Baltimore (extensió)	7
3.2. La teràpia gènica i el càncer.	9
2. Materials i mètodes	10
2.1. Tècniques de manipulació de bacteris	10
2.1.1. Preparació de bacteris competents	11
2.1.2. Transformació de bacteris competents per electroporació	11
2.1.3. Aïllament de DNA plasmídic	12
1.3.2. Preparacions a gran escala	12
2.2. Tècniques de manipulació de llevats	13
2.2.1. Preparació de llevats competents	13
2.2.2. Transformació de llevats pel mètode LiAc / SS-CARRIER DNA / PEG	14
2.2.3. Aïllament de el DNA plasmídic	15
2.3. Cultius cel·lulars	15
2.3.1. Condicions de cultiu de les línies cel·lulars	15
2.3.2. Recompte cel·lular	16
2.3.3. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars	16
2.4. Adenovirus recombinants	17
2.4.1. Construcció dels Adenovirus canins recombinants	17
2.4.2. Generació d'adenovirus recombinants per transfecció amb fosfat càlcic	17
2.4.3. Amplificació i purificació dels adenovirus	18
2.4.3.1. Amplificació d'adenovirus	19
2.4.3.2. Purificació d'adenovirus	19
2.5. Tècniques emprades per a titular adenovirus	21



<u>2.5.1. Determinació de les partícules víriques per espectrofotometria (vp / ml)</u>	<u>21</u>
<u>2.5.2. Determinació de les partícules víriques per PCR a temps real (vp / ml)</u>	<u>22</u>
2.5.2.1 Preparació de les mostres	22
2.5.2.2. RT-PCR	22
<u>2.5.3. Determinació de les partícules virals funcionals (el teu / ml) per tinció de l'hexón</u>	<u>23</u>



GLOSSARI D'ABREVIATURES

ARS	Seqüència de recombinació autònoma
Ad	Adenovirus
BSA	En anglès, Bovine serum albumin
CO ₂	Diòxid de carboni
CsCl	Clorur de cesi
CEC	En anglès, Cell Extract Clarified
°C	Graus centígrads
DNA	Àcid desoxiribonucleic
E.Coli	Escherichia Coli
FBS	En anglès, Fetal Bovine Serum
HSV-tk	En anglès, herpes simplex virus thymidine kinase
HBS	En anglès, Sickle haemoglobin
h	Hores
LB	En anglès, Lysogeny Broth
L	Litres
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
min	Minuts
ml	Mil·lilitres
mM	Mil·limols
mg	Mil·ligrams
M	Molar
NaCl	Clorur de sodi
nm	Nanometres
NaOH	Hidròxid de sodi
ng	Nanogram
pg	Picogram
pH	Potencial d'hidrogen
PBS	En anglès, Phosphate buffered saline
RNA	Àcid ribonucleic
RT-PCR	En anglès, Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	En anglès, sodium dodecyl sulphate
s	Segons



TE	En anglès, Tris and EDTA
TU	En anglès, transducing unit (unitats de transducció)
V	Volts
%	Tant per cent
Ω	Potència



1. *Conceptes teòrics*

En aquest apartat apareixen els conceptes teòrics complementaris, és a dir, no són necessaris per entendre el treball, però poden ser interessants per acabar d'ampliar coneixements.

1.5. Tractaments actuals

Actualment, no existeix un tractament definitiu per aturar el càncer, però s'ha aconseguit grans resultats combinants les següents teràpies:

- *Cirurgia*: La cirurgia és un procediment en el qual s'extreu, completament o només una part, depenent de les circumstàncies, el tumor del cos.
- *Quimioteràpia*: És un tipus de tractament que consisteix en la utilització d'uns fàrmacs concrets que s'encarreguen de destruir les cèl·lules canceroses. Aquesta teràpia causa molts efectes secundaris negatius en el pacient.
- *Radioteràpia*: En la radioteràpia s'utilitza altes dosis de radiació per destruir les cèl·lules canceroses i així reduir la mida del tumor.
- *Teràpia dirigida*: La teràpia dirigida és un tipus de tractament del càncer que ataca els canvis en les cèl·lules canceroses que els ajuda a créixer, a dividir-se i a disseminar.
- *Immunoteràpia*: La immunoteràpia és un tipus de tractament que ajuda al propi sistema immunitari del pacient a combatre el càncer.
- *Trasplantament de cèl·lules mare o moll d'os*: En aquest tractament es restauren les cèl·lules mare que formen la sang dels pacients amb càncer i que es van destruir amb dosis molt altes de quimioteràpia o de radioteràpia.



- *Teràpia hormonal:* La teràpia hormonal és un tractament que redueix o atura el creixement de càncers de mama i de pròstata, els quals utilitzen hormones per créixer.

2.2.2. Classificació de Baltimore (extensió)

El material genètic i el mètode de replicació dels virus varia entre aquests tipus:

Els virus de DNA utilitzen àcids nucleics com a material genètic. La replicació d'aquests virus succeeix principalment en el nucli de la cèl·lula hoste. Mitjançant la fusió amb la membrana o la endocitosi són capaços d'infectar la cèl·lula que els permetrà replicar-se. Són completament dependents de la maquinària de síntesi de la cèl·lula hoste. Per accedir a aquest mecanisme els és necessari travessar l'embolcall nuclear.

- Virus de DNA bicatenari

Aquests tipus de virus presenten un DNA de doble cadena i es repliquen mitjançant el DNA polimerasa dependent del DNA. Per tal de poder replicar-se, han d'accedir al nucli de la cèl·lula hoste on es troben els mecanismes de síntesi, per tant, són completament dependents del cicle cel·lular.

- Virus de DNA monocatenari

Aquests tipus de virus presenten un DNA de cadena simple i es repliquen mitjançant el DNA polimerasa dependent del DNA. Per realitzar la replicació és necessari que la cadena simple de material genètic es converteixi en una doble hèlix a dins de la cèl·lula hoste.

Els virus de RNA utilitzen àcids ribonucleics com a material genètic. A diferència dels virus de DNA, aquests es repliquen al citoplasma de la cèl·lula hoste. Una de les característiques d'aquests virus és que el seu material genètic té polaritat, la qual determina el mecanisme de replicació. Per tal de crear el seu genoma utilitzen les seves propies RNA replicases, una enzima que s'encarrega de copiar el material genètic.



- Virus de RNA bicatenari

Aquests tipus de virus presenten un RNA de doble cadena. Com la majoria dels virus de RNA es replica al citoplasma de la cèl·lula, tot i així, aquests no depenen de les polimerases de la cèl·lula. La traducció sol ser monocistronica.

- Virus de RNA monocatenari positiu

Aquests tipus de virus presenten un RNA de cadena senzilla i de sentit positiu. Fan la replicació al citoplasma i no necessiten un DNA intermig per realitzar-la, per tant, no són dependents del cicle cel·lular. Aquests virus són idèntics al mRNA viral, per aquesta raó, el seu material genètic és immediatament traduït per la cèl·lula, fent que sigui directament utilitzat per la síntesi de proteïnes del virus. Una d'aquestes proteïnes és la RNA replicasa, la qual s'encarrega de copiar la cadena de RNA sense necessitat de passar per DNA.

- RNA monocatenari negatiu

Aquests tipus de virus presenten un RNA de cadena senzilla i de sentit negatiu. De la mateixa manera que els virus de RNA monocatenari positiu, fan la replicació al citoplasma i no necessiten un DNA intermig per realitzar-la, per tant, no són dependents del cicle cel·lular. El RNA viral és complementari a la cadena de mRNA, per tant, ha de convertir-se en RNA⁺ mitjançant RNA polimerasa abans de la traducció. Després de convertir-se en RNA⁺, aquest actua com a mRNA, fent que la cèl·lula faci la síntesi de proteïnes. Les proteïnes resultants es dediquen a la producció de nous virions.

Els virus retrotranscrits poden tenir dos tipus de genoma.

- Virus RNA monocatenari retrotranscrit

Aquest tipus de virus presenten un RNA de cadena senzilla i realitzen la replicació mitjançant la transcripció inversa i que es basa en la formació de DNA a partir d'una cadena de RNA. Per fer-la utilitzen la transcriptasa inversa, un DNA polimerasa dependent del RNA. Sovint aquest DNA s'integra al genoma de la cèl·lula hoste fent que aquesta s'encarregui de replicar-lo i traduir-lo.



- Virus DNA bicatenari retrotranscrit

Aquest tipus de virus presenten una doble cadena de DNA, i de la mateixa manera que la resta de virus retrotranscrits, realitzen la replicació mitjançant la transcriptasa inversa amb la diferència que utilitzen un intermig de RNA.

3.2. La teràpia gènica i el càncer.

Darrerament la teràpia gènica ha estat molt utilitzada en els tractaments de diverses malalties així com també en el tractament del càncer. Aquesta teràpia és utilitzada de diverses maneres per la curació d'aquesta malaltia:

- *Augment de la resposta immunològica cel·lular antitumoral*: es basa en la capacitat del sistema immunitari per atacar al càncer. Consisteix en la introducció d'antígens a les cèl·lules tumorals per fer que el sistema immunitari del mateix pacient sigui capaç de reconèixer les cèl·lules tumorals com a malignes. D'aquesta manera es poden transformar les cèl·lules tumorals amb la proteïna CD80, glicoproteïna de membrana de cèl·lules presentadores d'antígens que s'uneix als limfòcits T.
- *Introducció de gens activadors de drogues dins les cèl·lules tumorals o teràpia de gens suïcides*: consisteix en la introducció selectiva de gens, únicament a les cèl·lules tumorals, que codifiquen la succeïbilitat de les cèl·lules tumorals a drogues que són inofensives per les cèl·lules dels mamífers. Tot això porta a la introducció d'enzimes com la HSV-tk (Herpes simplex virus timidina kinasa) i la citosina desaminasa les quals es converteixen en prodrogues que destrueixen les cèl·lules tumorals en proliferació.
- *Normalització del cicle cel·lular*: consisteix en la inactivació d'oncogens modificats, com el ras, o en la reexpressió d'antioncogens inactivats pel tumor, com la p53. El problema principal amb el qual s'han hagut d'enfrontar els investigadors és la necessitat de grans quantitats de virus i la baixa eficiència de transfecció que aquest té.
- *Ús de ribozimes i tecnologia antisentit o "antisense"*: les ribozimes són RNA amb activitat catalítica que incrementen la degradació del RNA recent traduït, de la



mateixa manera que, disminueix considerablement algunes proteïnes específiques no desitjades, les quals poden provocar alteracions tumorals. La tecnologia antisense consisteix en oligonucleòtids del RNA que no presenten activitat catalítica, només són complementaris a la seqüència i poden actuar bloquejant el processament del RNA, evitant així el transport del mRNA i/o bloquejant la traducció.

- *Teràpia CAR-T*: consisteix en l'extracció de limfòcits T del pacient, modificar-los genèticament i reintroduir-los a l'organisme del pacient ja modificats. D'aquesta manera, els limfòcits T són capaços de reconèixer els limfòcits B malignes i atacar-los.

2. Materials i mètodes¹

Aquesta versió detallada dels materials i mètodes del treball han estat recuperada sense fer-hi modificacions de:

LABORDA JAMBRINA, Eduardo (2013). *Aumento de la potencia oncolítica de los adenovirus mediante el uso de virus adeno-asociados y generación de un adenovirus oncolítico canino como tratamiento para la clínica veterinaria y modelo para la clínica humana con adenovirus*. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/120183/elj1de1.pdf?sequence=1>

2.1. Tècniques de manipulació de bacteris

Per tal d'obtenir quantitats suficients de DNA en forma de plasmidi i poder treballar amb ell, és necessari l'amplificació d'aquests plasmidis en bacteris. Per a això, el plasmidi ha de contenir un origen de replicació que li permeti replicar-se en la soca d'interès i un gen de resistència a un antibiòtic (Kanamicina o ampicil·lina normalment) per poder seleccionar els bacteris i impedir contaminacions. En aquest treball s'ha utilitzat la soca DH5α d'*Escherichia coli*. Per tal de poder amplificar els plasmidis, aquests van ser introduïts en les DH5α per transformació, un cop induït l'estat de competència.

¹ <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/120183/elj1de1.pdf?sequence=1>



2.1.1. Preparació de bacteris competents

Es conserva l'estoc mare de bacteris a -80°C en forma de glicerinat. Per induir l'estat de competència, es deixa créixer tota la nit a 37°C en 10 ml de LB (1% Triptona, 0.5% d'extracte de llevat, 0.5% NaCl) en un tub falcon de 50 ml en agitació una petita alíquota obtinguda per rascat del glicerinat amb una punta estèril. L'endemà, els 10 ml de precultiu es fan créixer en 1L d'LB a 37°C en agitació fins a obtenir un cultiu amb densitat òptica de 0,6-0,7 a 600 nm de longitud d'ona. La solució bacteriana es distribueix en ampolles de 250 ml (aptas per a l'ús en la centrifuga SORVALL) i es conserven durant 40 minuts en un bany d'aigua i gel per aturar el creixement bacterià. A partir d'aquest moment, la manipulació dels bacteris s'ha de fer sempre a 4°C . Es centrifuguen els bacteris a 4000 g durant 15 minuts a 4°C en una centrífuga SORVALL. Es descarta el sobrenedant i el pèl·let bacterià es renta amb aigua miliQ refrigerada a 4°C . Aquest procés de centrífuga i rentat es repeteix tres vegades, sent l'última resuspensió en 45 ml d'aigua amb un 10% de glicerol. Es tornen a centrifugar els bacteris per quarta vegada i es resuspenen en 3 ml d'aigua amb un 10% de glicerol. A continuació, es mesura la DO d'una dilució 1/100 de la suspensió bacteriana a 600nm. La DO ha de ser similar a 1 (equivalent a 2.5×10^8 bacteris /ml). Finalment, es realitzen alíquotes de 50 ml congelades immediatament en neu carbònica i s'emmagatzemen a -80°C .

2.1.2. Transformació de bacteris competents per electroporació

Les alíquotes de bacteris competents emmagatzemades a -80°C es descongelen i s'afegeix una quantitat d'ADN plasmídic d'entre 10pg i 25ng en un volum final de 2 μl . S'incuba la mescla 5 minuts en gel i s'afegeix a unes cubetes d'electroporació prèviament refrigerades amb gel. Mitjançant l'ús d'un electroporador Electro Cell Manipulator TM ECM 630 amb les següents condicions: 50 F, 1500 V i 125 Ω , s'electroporen els bacteris. Amb polsos inferiors a 5 mil·lisegons l'electroporació es dona per correcta. Tot seguit es resuspenen els bacteris en 300 ml de LB i s'incuben 1h en agitació a 37°C . La suspensió es plaqueja en plaques de LB amb l'antibiòtic d'elecció.



2.1.3. Aïllament de DNA plasmídic

Els protocols usats en aquest treball per a l'aïllament de DNA plasmídic es basen en un mètode de lisi alcalina amb SDS a partir de cultius d'E.coli crescuts en LB amb antibiòtic. S'han realitzat preparacions de DNA a petita i gran escala.

1.3.1. Preparacions a petita escala

Les minipreparacions s'han realitzat seguint el protocol descrit per Birnboim i Doly (Birnboim and Doly, 1979) que permet obtenir preparacions d'entre 20 i 50 mg. El procediment a seguir es detalla a continuació.

Breument, s'inocula una colònia crescuda en una placa de LB amb antibiòtic en 2 ml d'LB amb antibiòtic i es creix tota la nit. L'endemà es pren una alíquota de 1,5 ml i es centrifuga a 13000 rpm durant 1 minut. Es resuspèn el pèl·let amb l'ajuda d'un vòrtex en 200 µl de la solució 1 (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa) refrigerada a 4°C. S'afegeixen 200 µl de solució 2 (SDS 1%, NaOH 0,2 M), acabada de preparar, i es barreja per inversió. Finalment, s'afegeixen 200 µl de la solució 3 (3 M acetat de potassi, 11,5% àcid acètic) refrigerada i s'inverteix fins que aparegui un precipitat blanc. La barreja s'incuba 5 minuts en gel i es centrifuga a 15000 g durant 15 minuts. A continuació, es recull el sobrenedant transparent i es barreja amb 2 volums d'etanol i es deixa reposar 15 minuts a temperatura ambient. Es precipita el DNA plasmídic per centrifugació a 15000g durant 10 minuts. El sobrenedant es descarta i el pèl·let es renta amb etanol al 70%. Es torna a centrifugar 5 minuts a 15000 g, es descarta el sobrenedant i es deixa assecar el pèl·let. Finalment, el DNA plasmídic es resuspèn en 50 µl de TE amb RNAsa (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 mg / ml RNAsa).

1.3.2. Preparacions a gran escala

Amb aquest tipus de preparacions s'obtenen grans quantitats de DNA (≥ 100 mg) de gran puresa. Les maxipreparacions s'obtenen a partir de 200 ml de cultiu bacterià mitjançant el kit comercial d'Invitrogen "PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kits", segons les indicacions de fabricant.



2.2. Tècniques de manipulació de llevats

Totes les recombinacions d'aquest treball s'han fet en llevats per la seva gran eficiència.

Com en el cas dels bacteris, per amplificar plasmidis en llevats, cal introduir els elements

necessaris per a la replicació i un marcador de selecció que estigui mutat o deleccionat en la soca de llevats a utilitzar. En aquest treball, la seqüència CAL ha estat clonada en tots els plasmidis utilitzats per a la construcció dels adenovirus (Ad) recombinants (Sikorski and Hieter, 1989). La seqüència CAL consta d'un centròmer, un origen de replicació de llevats o seqüència de recombinació autònoma (ARS) i el gen de la leucina. Els plasmidis obtinguts per recombinació homòloga són de baix nombre de còpies (1-3 còpies per cèl·lula) i, per tant, cal amplificar en bacteris.

Cal que aquests plasmidis també continguin els elements necessaris per a la replicació i selecció en bacteris.

Els llevats utilitzats en aquest treball pertanyen a la soca *Saccharomyces cerevisiae* YPH857. Aquesta soca ha estat modificada genèticament per presentar mutacions o delecions en gens implicats en la síntesi de diferents molècules (ura3-53, lys2-801, ade2-101, HIS3-Δ200, TRP1-Δ63, leu2-Δ1cyh2R). Aquestes mutacions permeten la selecció condicionada a la inclusió en el medi o mitjançant un plasmidi d'uracil, lisina, adenina, histidina, triptòfan i leucina.

Les recombinacions homòlogues es realitzen mitjançant la transformació dels dos DNAs d'interès linealitzats en llevats a les que prèviament se'ls havia induït l'estat de competència. Les homologies necessàries per a la recombinació entre els dos fragments de forma eficient són de 40 parells de bases a cada extrem.

2.2.1. Preparació de llevats competents

El preparat mare de la soca YPH857 es conserva en forma de glicerinat a -80°C. Es grata el glicerinat amb una punta de pipeta estèril i es dibuixa una estria en una placa d'agar amb medi ric per al creixement de llevats (YPDA ++). Es deixen créixer durant 3 dies a 30°C i la placa es guarda durant un període màxim de dues setmanes a 4°C.



Per induir competència als llevats, es pica una colònia de la placa de YPDA ++ i es creix tota la nit en 5 ml d'YPDA ++ líquid a 30°C, en agitació a 200 rpm. L'endemà es mesura la DO d'una dilució 1/10 del cultiu ($DO_{600} = 1$ equival a 1.5×10^7 llevats / ml) i es prepara una suspensió de llevats de $DO = 0.15$ en un volum de 50 ml ($DO_{600} = 0.15$ equival a 2.25×10^6 llevats / ml). Es deixa créixer a 30°C en agitació de 200 rpm fins a obtenir una

$DO_{600} = 0.4$ a 0.9 (aproximadament 5 h). A continuació, la suspensió es traspassa a un falcon de 50 ml i es centrifuga a 3000g durant 5 minuts a temperatura ambient. Es descarta el sobrenedant i es renta amb 25 ml d'aigua miliQ autoclavada. Es torna a centrifugar en les mateixes condicions, descartant el sobrenedant altra vegada. El pèl·let es resuspèn en 1 ml d'aigua i la suspensió es passa a un eppendorf de 1,5 ml per centrifugar 30 segons a 6500 g en una microcentrífuga. Es descarta de nou el sobrenedant i el pèl·let es torna a resuspendre en aigua en un volum final d'1 ml. A partir d'aquesta suspensió es fan alíquotes de 100 µl (108 cèl·lules) i es centrifuguen durant 30 segons a 6500 g. Es descarta el sobrenedant i el pèl·let de llevats ja està disponible per a ser transformat amb DNA. Els llevats competents han de ser frescs i ha de realitzar-se aquest procés el mateix dia de la seva utilització.

2.2.2. Transformació de llevats pel mètode LiAc / SS-CARRIER DNA / PEG

Aquest mètode es va descriure el 2002 per Daniel Gietz i Robin A. Woods (Gietz and Woods, 2002). Es basa en la desestabilització de les membranes per l'acetat de liti i en la utilització de DNA de cadena simple (SS-carrier DNA) per bloquejar possibles zones repetides on es podria unir de forma inespecífica el DNA per transformar. El DNA s'introdueix mitjançant un xoc tèrmic.

Inicialment es bull el DNA de cadena simple (DNA d'esperma de salmó) durant 5 min a 95°C. A continuació per a cada transformació es prepara una barreja de:

- PEG (50% en pes / volum)	240 ml
- Acetat de liti (1M)	36 ml
- ADN d'esperma de salmó (10mg / ml)	10 ml
- Plàsmids d'ADN + H ₂ O milliQ	74 ml



La quantitat d'ADN per a la recombinació serà d'uns 100 ng d'insert i unes 10 vegades menys de quantitat en mols del vector a què volem introduir l'insert. La barreja s'afegeix al pèl·let de llevats preparat anteriorment, es barreja amb l'ajuda d'un vòrtex i s'incuba 40 min a 42°C. Es centrifuga la barreja 30 s a 6500 g i s'elimina el sobrenedant. El pèl·let de llevats es resuspèn en 100 ml d'aigua i es plaquea en una placa d'agar amb medi SC Leu-. S'incuben les plaques a 30°C durant dos dies fins que apareguin colònies que correspondran teòricament als plasmidis recombinats.

2.2.3. Aïllament de el DNA plasmídic

Mitjançant cultius de llevats crescuts a partir d'una colònia durant 20 h a 30°C i 200 rpm en 2 ml de medi de selecció líquid SC Leu- es va procedir a obtenir el plasmidi objectiu. Es traspassa 1,5 ml de cultiu a un eppendorf de 1,5 ml i es centrifuga durant 5 segons a màxima velocitat. Es descarta el sobrenedant i el pèl·let de llevats es resuspèn en 400 µl d'una solució de: 2% Tritó-X100, 1% SDS, 0,1 M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0 i 1mM EDTA. A continuació s'afegeixen 400 µl de fenol-cloroform i 0,3 g de boles (glass beads unwashed, Sigma). Es barreja durant 2 min en un vòrtex vertical a 4°C i es centrifuga a 15000 g durant 5 minuts. Es traspassa el sobrenedant a un nou eppendorf i el DNA plasmídic es precipita amb 2 volums d'acetat de sodi al 2% d'etanol durant 30 min a -20°C. Es centrifuga a 16500 g per 20 min a temperatura ambient, es descarta el sobrenedant i el pèl·let es renta amb etanol al 70%. Finalment el pèl·let de DNA es resupende en 40 µl d'aigua.

Per tal d'amplificar el DNA obtingut de la recombinació en llevats es transformen 2 µl de la minipreparació al cep bacteriana DH5α pel mètode d'electroporació.

2.3. Cultius cel·lulars

2.3.1. Condicions de cultiu de les línies cel·lulars

Totes les línies cel·lulars utilitzades en aquest estudi creixen formant una monocapa amb morfologia epitelial adherida al suport sòlid en el qual es van conrear. Les línies cel·lulars es mantenen amb DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, Gibco BRL) suplementades amb sèrum fetal boví (FBS, Gibco BRL), prèviament inactivat en un bany humit durant 30 min a 56°C, al 5%. Als mitjans de cultiu se'ls agrega una barreja dels antibiòtics penicil·lina i estreptomicina (Gibco BRL), a 100 U / ml i 100 mg / ml, respectivament, en una proporció 1: 100. En el cas de les DEK, el mitjà utilitzat va ser el



CNT-09 obtingut de CELLnTEC (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). En tots dos casos, el medi es va renovar cada 2-3 dies per aspiració de l'mig vell i addició de medi nou. Les cèl·lules es van mantenir en un incubador humidificat a 37°C en una atmosfera a el 5% de CO₂.

2.3.2. Recompte cel·lular

Per determinar el nombre de cèl·lules d'un cultiu i sembrar la quantitat desitjada, les cèl·lules es tripsinitzen (Trypsina-EDTA de Gibco BRL) i resuspenen en DMEM al 5% FBS.

De la suspensió cel·lular es pren una alíquota i es realitza una dilució amb el colorant Blau de Tripà, de manera que es poguessin comptar entre 10 i 100 cèl·lules per cada quadrant de la càmera de Neubauer o hemocitómetre. El Blau de Tripà penetra a l'interior de les cèl·lules només quan la membrana cel·lular es troba deteriorada. Per al recompte de les cèl·lules viables en una solució cel·lular, s'expliquen les cèl·lules viables presents en cada un dels quadrants de la cambra de Neubauer i es fa una mitjana. El nombre de cèl·lules per ml es calcula mitjançant la següent fórmula:

Nº cèl·lules / ml: Mitjana del nº de cèl·lules viables per quadrant x dilució x 10⁴

Aquest càlcul va permetre determinar la concentració i el percentatge de viabilitat del cultiu cel·lular. Finalment, les cèl·lules es resuspenen amb el mitjà necessari per portar les cèl·lules del cultiu a la concentració desitjada.

2.3.3. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars

Per a la criopreservació de les cèl·lules, aquestes es tripsinitzen i després es renten dues vegades amb PBS i es compten com s'ha indicat en l'apartat anterior.

Les cèl·lules es porten a una concentració d'entre 5 i 20 milions de cèl·lules per ml enmig de congelació. El medi de congelació conté un 90% de FBS inactivat (Gibco BRL) i un 10% de l'agent crioprotector DMSO (Di-metil-sulfòxid, Sigma).

La suspensió cel·lular es distribueix a raó de 0.5 ml per criotubo i els vials es congelen en un tanc d'alcohol isoamílic, que col·locat a -80°C disminueix la temperatura



progressivament. A partir de les 4h, les al·líquotes es passen als tancs de nitrogen líquid per a ser emmagatzemades.

Per a la descongelació, les cèl·lules es passen del tanc de nitrogen líquid a un bany a 37°C perquè la descongelació sigui ràpida. La suspensió cel·lular es passa a un falcon de 15 ml i es centrifuga 5 minuts a 750-1000g. El mitjà de congelació es retira per aspiració i les cèl·lules es resuspenen amb el medi de cultiu adequat a cadascuna de les línies cel·lulars a 37°C. A les 24h les cèl·lules estan majoritàriament adherides i es realitza un canvi de mitjà per eliminar les cèl·lules mortes.

2.4. Adenovirus recombinants

2.4.1. Construcció dels Adenovirus canins recombinants

Tots els Ad generats en aquest treball van ser obtinguts per recombinació homòloga en llevats del cep YPH857. El procés per a la construcció d'aquests Ad es compon de dos passos: primer, es genera un inserit obtingut per PCR o síntesi directa, que conté les modificacions que volem introduir en el genoma. Posteriorment, es recombina aquest inserit amb el plàsmid objectiu linealitzat. Un cop obtenim un plasmidi amb el genoma viral i les modificacions desitjades, el pas final consisteix en alliberar el genoma del suport de DNA que permet la replicació en bacteris i llevats mitjançant una digestió amb Not I. El genoma viral alliberat es transfecta a les cèl·lules per a la generació de l'adenovirus.

2.4.2. Generació d'adenovirus recombinants per transfecció amb fosfat càlcic

Un cop obtenim els plasmidis correctes s'han d'introduir linealitzats en cèl·lules especialitzades per iniciar el cicle viral i que es generi l'Ad. Un cop a l'interior de la cèl·lula empaquetadora, el DNA viral recombinant activa la replicació de l'ADN i la transcripció de proteïnes de la càpside. Aquest DNA viral s'encapsidarà donant lloc a nous virus (progènie viral), que s'alliberarà al medi extracel·lular. Un cop generat l'Ad recombinant, s'amplificarà per successives rondes de propagació en les cèl·lules i condicions adequades. A continuació es descriu detalladament el procediment a seguir per a la generació d'adenovirus recombinants un cop tenim els genomes inserits en un plasmidi.



El genoma viral recombinant s'allibera de la construcció plasmídica per digestió amb l'enzim de restricció paci (Ad humans) o noti (Ad canins) i es transfecta en cèl·lules pel mètode de fosfat càlcic .

El primer és obtenir una monocapa de cèl·lules al 60% en el moment de la transfecció.

Per a cada pou de cèl·lules es prepara una barreja que conté:

- 19,5 ml de clorur càlcic 2 M.
- 3 µg de DNA.
- H₂O bidestil·lada filtrada, fins a un volum final de 162 ml.

Es barreja pipetejant durant 10 seg amb suavitat. En un altre eppendorf de 1,5 ml s'afegeixen 162 ml de la solució HBS 2X (NaCl 274 mM, Hepes 50 mM, fosfat sòdic 1,5 mM en H₂O, pH ajustat a 6,95-7 amb NaOH). Amb l'ajuda d'una pipeta s'aireja creant bombolles mentre s'afegeix la barreja que conté el DNA gota a gota. Es deixa reposar 1 min i s'afegeix a les cèl·lules agitant suaument per afavorir la homogeneïtat. Els precipitats són visibles 4 hores després de la transfecció. A les 16-24 hores es canvia el medi per mitjà nou.

Al generar-se un Ad recombinant s'observa un efecte citopàtic localitzat en forma de cometa als 6 - 7 dies post transfecció. En aquest moment es recullen les cèl·lules al costat del sobrenedant i es sotmeten a tres cicles de congelació i descongelació per alliberar les partícules virals de l'interior de les cèl·lules. D'aquesta manera s'obté un lisat inicial. A partir d'aquest passi 0 s'amplifica el virus mitjançant successives rondes de replicació.

2.4.3. Amplificació i purificació dels adenovirus

L'amplificació i purificació d'Ad permet l'obtenció de virus en una quantitat prou gran i en una formulació adequada com per ser utilitzat en els assajos in vitro i in vivo. L'amplificació d'Ad es basa en la propagació de virus en plaques de cultius cada vegada més grans i en major quantitat. La purificació d'Ad es basa en la separació dels virus produïts pel cultiu cel·lular, mitjançant ultracentrifugació, en un gradient de clorur de cesi. A continuació es descriuen els dos mètodes:



2.4.3.1. Amplificació d'adenovirus

Per l'amplificació de Ads recombinants es parteix d'un clon aïllat en l'assaig de formació de calbes, amplificat per successives infeccions de plaques cada vegada més grans. En condicions normals de propagació, amb el lisat cel·lular es poden infectar 10 plaques de la mateixa mesura de la qual provenen. Un cop obtingudes dues plaques de 150 mm de diàmetre infectades amb adenovirus recombinant, ja es va tenir un extracte cel·lular amb suficient quantitat de virus per realitzar tots els experiments in vitro. Per a realitzar els experiments in vivo, es continua l'amplificació viral fins a obtenir 10-20 plaques de 150 mm de diàmetre infectades.

Quan les cèl·lules estan a una confluència del 80% s'infecten amb 10 m.o.i. (Unitats formadores de calba per cèl·lula o multiplicitat d'infecció). La infecció es realitza a partir d'un virus purificat o d'un lisat cel·lular. Després d'una incubació de 48 a 72 hores a 37°C al 5% de CO₂, l'efecte citopàtic és evident en el 95-100% de les cèl·lules. Un cop el 80% de les cèl·lules es desenganxa de la placa es recull el pellet i s'emmagatzema a -80°C.

En l'amplificació final, prèvia a la purificació de l'adenovirus, les cèl·lules es recullen quan el 90-100% de les cèl·lules en cultiu presenten un efecte citopàtic evident. En aquest moment es recullen les cèl·lules i el sobrenedant de cadascuna de les plaques i es centrifuguen en tubs de 50 ml, tipus falcon, durant 5 min a 750-1000g. Es guarden 40 ml de sobrenedant i la resta es descarta per aspiració. Els pèl·lets cel·lulars de les diferents plaques s'ajunten en una de sola i es resuspenen en un volum final d'uns 20 ml i s'emmagatzemen a -80°C fins a la seva purificació.

2.4.3.2. Purificació d'adenovirus

Els adenovirus es purifiquen amb la finalitat d'obtenir un estoc de virus en una formulació adequada per ser administrada als ratolins.

El mètode utilitzat en aquest treball per a la purificació dels adenovirus es basa en la ultracentrifugació d'un gradient de densitats fet amb diferents concentracions de clorur de cesi (CsCl). Aquest mètode permet la separació de les partícules virals de la resta dels elements presents en el lisat cel·lular -com són les càpsides virals buides o les restes



cel·lulars- i concentrar les partícules virals. L'eliminació de l' CsCl es fa posteriorment per diàlisi contra el tampó desitjat.

Breument, per alliberar les partícules virals de l'interior de les cèl·lules, als pèl·lets cel·lulars provinents de l'amplificació viral, se'ls sotmet a tres cicles de congelació (-80°C) i descongelació (37°C). Posteriorment, l'extracte viral lisat es centrifuga en tubs de 50 ml, tipus falcon, durant 5 min a 750-1000g per precipitar les restes cel·lulars. El sobrenedant és el que anomenem extracte cel·lular clarificat (CEC, Cell Extract Clarified), que conté els adenovirus per purificar posteriorment. El CEC es carrega sobre el gradient de CsCl per a la separació de les partícules adenovirals de les restes de cultiu cel·lular.

El gradient de CsCl es compon de:

- Solució A: 1.5 mg / ml CsCl en PBS.
- Solució B: 1.35 mg / ml CsCl en PBS.
- Solució C: 1.25 mg / ml CsCl en PBS.

El gradient de densitat de clorur de cesi es prepara en 4-6 tubs de ultracentrífuga (Beckman). Per formar el gradient s'agreguen les següents quantitats de solucions:

- 1r 0.5 ml solució A.
- 2n 2.5 ml solució B.
- 3r 2.5 ml solució C.

Després de fer el gradient de CsCl , s'agreguen 7 ml del CEC en cada tub ajustant el pes amb sobrenedant, guardat durant la recol·lecció de virus durant el procés d'amplificació viral, fins a un volum final de 12.5 ml per tub.

Els tubs es centrifuguen durant una hora a 10°C a 150.000 g [35.000 rpm (rotor SW41, Beckman)]. En aquestes condicions, les partícules virals es separen de les restes cel·lulars i es concentren en un punt del gradient de densitat corresponent a la densitat de la partícula viral (1.32g / ml per al Ad i 1.22 g / ml per al CAV2). És freqüent que apareguin dues bandes blanquinoses que corresponen al virus. Les càpsides buides queden a la banda superior i es descarten per aspiració juntament amb les restes cel·lulars. A la banda inferior queden les càpsides virals plenes que es retiren amb una



pipeta i es sotmeten a una segona ultracentrifugació, aquest cop en un gradient de CsCl continu.

Per a la segona ultracentrifugació dels HAD dels tubs d'ultracentrifugació s'omplen amb les bandes de virus obtingudes i es barregen amb una solució de 1.35 mg / ml d'CsCl. Per als virus canins, els tubs de ultracentrifugació s'omplen amb les bandes de virus obtingudes i es barregen amb una solució de 1.3 mg / ml d'CsCl (barreja 1: 1 de la solució de 1.35 mg / ml i de la solució de 1.25 mg / ml). Es centrifuga durant 16 hores a 10°C a 150.000 g (35.000 rpm, rotor SW41, Beckman).

Quan s'acaba la segona centrifugació s'obté una banda blanquinosa que correspon a l'adenovirus. La banda es retira amb una pipeta i s'introdueix en una membrana de diàlisi prèviament equilibrada en 500 ml d'aigua miliQ autoclavada durant 30 min. Es dialitza en un volum de 500 ml de PBS ++ a 4°C en agitació durant 2 hores. Es canvia el tampó de diàlisi i es deixa dues hores més en les mateixes condicions. En el tercer i últim canvi del tampó PBS ++ es complementa amb glicerol a una concentració final d'entre 2.5 i 5%, per conservar el virus alíquotat a -80°C.

2.5. Tècniques emprades per a titular adenovirus

2.5.1. Determinació de les partícules víriques per espectrofotometria (vp / ml)

Aquest protocol es basa en la determinació de l'absorbància del DNA viral a una longitud d'ona de 260 nm, el que ens permet determinar el nombre de partícules virals (vp) totals d'un estoc viral purificat sense discriminar entre partícules virals infectives i defectuoses.

Es prepara una dilució de l'estoc viral purificat, 5 ml, en 95 ml de el tampó de lisi (Tris 10mM, EDTA 1mM, 0.1% SDS, pH 8.0). La barreja s'incuba durant 5 min a 56°C i es mesura la densitat òptica a l'espectrofotòmetre a les longituds d'ona de 260 nm i 280 nm.

La concentració final es calcula tenint en compte que el quoficient d'extinció del virus és de 1.1×10^{12} per cada unitat de DO.

$$vp / ml = DO_{260} \times dilució \times 1,1 \cdot 10^{12}$$



La ràtio entre l'absorbància de la mostra a 260 nm i 280 nm dona una idea de la puresa de la mostra purificada. Òptimament hauria d'estar al voltant de 1,4.

2.5.2. Determinació de les partícules víriques per PCR a temps real (vp / ml)

Aquest protocol es basa en la determinació de genomes virals en una mostra per amplificació de l'ADN per PCR a temps real. El nombre de còpies de genomes virals es quantifica en relació a una corba patró realitzada a partir de dilucions 1/10 d'un estoc de plasmidis d'Ad o AAV en la mateixa solució que contenia els virus a quantificar.

2.5.2.1 Preparació de les mostres

Aquest procediment s'utilitza per quantificar virus purificats, CEC, sobrenadants, mostres de teixits o fluids corporals (tots dos s'explicaran més endavant). En el cas dels virus purificats o CEC, abans de quantificar-los va ser necessari un pretractament de les mostres ja que aquestes podien contenir genomes virals no encapsulats, proteïnes virals i cel·lulars o àcids nucleics cel·lulars a part de les partícules virals a quantificar. Aquests tractaments es basen en la digestió de l'ADN cel·lular i dels genomes no encapsulats amb DNasa i en l'alliberament del DNA encapsulat mitjançant digestió de la càpside amb proteïnasa K. El protocol a seguir està basat en protocol descrit per Ma i col. (Ma et al., 2001) que es descriu a continuació:

Es barregen 5ul d'una mostra amb 2ug de DNasa, en un volum final de 20ul i la barreja s'incuba 30 min a 37°C. La DNasa s'inactiva afegint EGTA (20mm) i s'incuba durant 10 min a 37°C seguit d'un procés d'inactivació per calor durant 10 min a 90°C. A continuació, les proteïnes de la càpside es digereixen amb 1ug / ul de proteïnasa K i SDS 0.1% durant 45 min a 56°C. La proteïnasa s'inactiva per calor en les mateixes condicions, 10 min a 90°C. La RT-PCR es porta a terme agafant una mostra de 2ul diluïda 10 o 100 vegades en aigua.

2.5.2.2. RT-PCR

La tècnica de la PCR a temps real es basa en una cinètica de quantificació que permet determinar i registrar la formació de productes de PCR en temps real. Consisteix en



quantificar, durant la fase exponencial de la reacció, els productes de PCR amplificats i marcats amb un fluorocrom. En aquest treball es realitza una quantificació absoluta d'AAV per SYBRgreen i had i CAV2 mitjançant una sonda TaqMan específica per a la regió E1a de l'CAV2 i per al hexón de l'HAD.

Per a la realització de la RT-PCR es va preparar una barreja que contenia:

- 1-2 ml de mostra (DNA a quantificar).
- 5 ml de Premier Extaq 2x (Takara) o de Màster SYBR Green.
- 0.3 ml de cada un dels encebadors o 1 ml en el cas de l'SYBR Green.
- 0.1 ml de sonda TaqMan (per sonda Taqman).
- 2.3 ml d'aigua o 2 ml per reacció amb SYBRGreen.

Totes les reaccions de RT-PCR es realitzen utilitzant el termociclador LightCycler v2.0 (Roche Molecular Biochemicals), juntament amb un programa d'anàlisi dels resultats LightCycler programari v4 .05.

Les condicions d'amplificació que s'utilitzen són:

- Un cicle de desnaturalització: 10 min a 95°C
- 40 cicles d'amplificació: 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C (reaccions Taqman)
- 40 cicles d'amplificació: 10 seg a 95°C, 20 seg a 66°C, 7 seg a 72°C (reaccions SYBRGreen).
- 1 cicle de fusió: 10 seg a 95°C, 1 min a 65°C (reaccions SYBRGreen).

2.5.3. Determinació de les partícules virals funcionals (el teu / ml) per tinció de l'hexón

Aquest protocol es basa en el recompte del nombre de cèl·lules positives per a la immunotinció de la proteïna viral de l'hexó en una monocapa de cèl·lules infectades amb dilucions seriades de virus. Permet determinar el nombre de partícules funcionals, o unitats de transducció, d'estocs virals purificats i d'extractes cel·lulars.

Es preparen per triplicat un banc de dilucions 1/10 de l'estoc viral en plaques de 96 pous (utilitzant el medi de cultiu com a mitjà de dilució) en un volum final de 100 µl. S'agrega una suspensió cel·lular a raó de 80.000 cèl·lules per pouet. Després d'una incubació a



37°C durant 24 hores es procedeix a la immunodetecció. El medi de cultiu es retira i les cèl·lules es deixen assecar durant 5 min. Per fixar les cèl·lules, s'agreguen 100 ml per pouet de metanol fred i es deixen 30 min a -20°C. Posteriorment, es realitzen tres rentats amb una solució de PBS ++ 1% BSA. L'addició d'ions bivalents, com el calci i el magnesi, ajuden a prevenir el despreniment de les cèl·lules dels vasos i el BSA actua com a solució de bloqueig. Posteriorment, les cèl·lules s'incuben amb un anticòs primari antiherpes (2Hx-2, ATCC) [dilució 1: 5 durant 1-2 hores a 37°C]. Es realitzen novament tres rentats amb solució de PBS ++ 1% BSA. S'incuba amb l'anticòs secundari conjugat amb el fluorocrom Alexa 488 (Invitrogen) [diluint 1: 500 en PBS ++ 1% BSA durant 1-2 hores a 37°C en foscor]. Després de tres rentats més, es determina el títol funcional viral mitjançant el recompte de les cèl·lules positives amb l'ajuda d'un microscopi de fluorescència. El títol viral, nombre d'unitats de transducció per ml, es calcula amb la següent fórmula:

$$TU / ml = (\text{mitjana del recompte de cèl·lules positives}/100) \times \text{factor de dilució} \times 1000$$