

_____ ***MATERIALS I MÈTODES***

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. Introducció

S'entén per cultiu cel·lular el conjunt de tècniques que permeten el manteniment de cèl·lules de diferents teixits o línies cel·lulars establertes fora del seu hàbitat, preservant al màxim les seves propietats fisiològiques, bioquímiques i genètiques. Aquest tipus de tècnica és útil no únicament en la investigació bàsica, sinó que també té aplicació dins de l'àmbit del diagnòstic, en estudis farmacològics i de toxicitat o en teràpia gènica, entre d'altres.

Els cultius de cèl·lules animals es poden classificar en funció de la seva capacitat d'adherència o no a una superfície, el que ve determinat normalment pel tipus de cèl·lula de la qual deriven. La majoria de les cèl·lules que es mantenen en cultiu provenen de la disgregació tissular o de tumors formats per cèl·lules adherides i mantenen aquesta característica en créixer en monocapa. Els cultius en suspensió acostumen a coincidir amb els d'aquelles cèl·lules que *in vivo* són circulants, com és el cas de les cèl·lules sanguínies.

Els cultius procedents de cèl·lules disgregades a partir d'un teixit original reben el nom de cultiu primari. Per altra banda, es parla de línies cel·lulars quan aquest cultiu és sotmès a processos de transformació que li confereixen capacitat il·limitada de multiplicació.

Una de les característiques més importants del treball amb cultius cel·lulars és garantir al màxim les condicions d'esterilitat, ja que les cèl·lules de mamífer es cultiven en un medi nutritiu molt ric en nutrients, sals i vitamines, el que el fa òptim pel creixement d'altres organismes eucariotes i procariotes no desitjats. Per evitar aquesta situació és necessari treballar en una campana de flux laminar, prèviament esterilitzada amb radiacions ultravioletes. Totes les superfícies de treball, incloent-hi la cabina i les pròpies mans de l'operador, es desinfecten amb etanol al 70% abans d'iniciar el treball amb el cultiu cel·lular. Addicionalment, els medis de cultiu i les solucions emprades han de ser estèrils.

Aparells:

- Campana de flux laminar vertical amb sistema d'il·luminació ultravioleta, sistema d'aspiració de líquids per buit i bec de Bunsen.
- Incubador de cèl·lules amb atmosfera controlada (5% CO₂, 95% O₂, 95% d'humitat i 37°C de temperatura)
- Microscopi òptic invertit
- Instal·lació de criogènia, que inclou un contenidor d'isopropanol per a la congelació gradual de cèl·lules (Nalgene) i un tanc de N₂ líquid, per tal d'emmagatzemar-les.

1.2. Cultiu de línies cel.lulars

El cultiu de línies cel.lulars, en termes generals, implica la propagació de cèl.lules immortalitzades i/o transformades sense que aquestes perdin les seves característiques bioquímiques, fisiològiques i genètiques. El manteniment de les línies cel.lulars es fa mitjançant el replaqueig, que consisteix en el pas d'una part de les cèl.lules d'un flascó a un de nou amb medi fresc. Les tècniques de replaqueig utilitzades són diferents en funció de si el cultiu creix en monocapa o en suspensió.

1.2.1. Cultiu en monocapa: tripsinització i replaqueig

Les cèl.lules en monocapa creixen adherides a la superfície, generalment plàstic. Quan la monocapa ha cobert pràcticament la totalitat de la superfície es fa necessari el replaqueig, mitjançant la tripsinització, per tal d'assegurar-ne la viabilitat. La tripsinització consisteix en la disgregació cel.lular del cultiu utilitzant un procés enzimàtic i mecànic que permet la recuperació de les cèl.lules i el replaqueig subsegüent. La finalitat d'aquest pas pot ser exclusivament el manteniment cel.lular o la generació d'un *stock* congelat, si bé pot respondre a un objectiu merament experimental sembrant una quantitat determinada de cèl.lules en plaques adequades pel seu anàlisi.

Medis i reactius:

- Tripsina-EDTA (Gibco)
- Tampó fosfat PBS: NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM i Na₂HPO₄ 8.1 mM

Procediment:

Les cèl.lules es mantenen creixent en flascons de plàstic de 75 cm² dins l'incubador. Un cop el cultiu assoleix aproximadament el 80 % de confluència es realitza la tripsinització. En una campana de flux laminar s'aspira el medi de cultiu del flascó i es renta amb uns 10ml de PBS estèril, amb l'objectiu d'eliminar qualsevol resta de sèrum present que podria interferir en l'activitat de la tripsina. A continuació s'afegeixen 1.5 ml de tripsina que es retira immediatament després de comprovar que tota la monocapa cel.lular ha quedat ben banyada. El flascó es diposita entre un i cinc minuts a l'incubador, passats els quals s'analitza l'estat de disgregació a simple vista o al microscopi òptic. Les cèl.lules es resuspenen en 10 ml de medi de cultiu suplementat amb 10% de sèrum, inhibint-se així qualsevol acció enzimàtica posterior, i es procedeix a la disgregació mecànica amb la pipeta de plàstic.

A partir d'aquest punt el procediment a seguir varia en funció del que es vulgui realitzar. Si el que es pretén és el manteniment de la línia cel.lular, es traspassen de 0.5 a 1 ml d'aquesta suspensió a nous flascons de 75 cm² i s'hi afegeixen fins a 12 ml de medi fresc. En cas que es vulguin realitzar assajos diversos, es contenen les cèl.lules per tal de sembrar-les en plaques de diferents mides en funció del disseny experimental.

És important comptabilitzar el nombre de vegades que les cèl.lules entren en contacte amb la tripsina, el que anomenem passatge, ja que a mesura que aquest augmenta és possible que algunes característiques fenotípiques del cultiu variïn. Precisament per aquest motiu és necessari minimitzar-los al màxim i multiplicar els vials congelats amb la finalitat de mantenir una reserva de cèl.lules amb un passatge baix.

1.2.2. Cultiu en suspensió

El treball amb cèl.lules en suspensió presenta algunes avantatges i inconvenients respecte a les cèl.lules en monocapa. En no estar adherides a la superfície no requereixen separació del substrat i el replaqueig es realitza per centrifugació i dilució. Això alhora pot suposar un inconvenient quan el que es vol és únicament realitzar un canvi de medi o un tractament. Per altra banda, al no dependre de la superfície del flascó es pot fer créixer un major nombre de cèl.lules per flascó, amb l'estalvi que això comporta.

Les cèl.lules en suspensió poden créixer aïllades o formant grups, en el darrer cas es poden observar a simple vista. El paràmetre, equivalent a la confluència en cèl.lules en monocapa, que indica quan és necessari el replaqueig és la densitat. Aquesta depèn de la línia cel.lular però generalment es treballen entre $2 \cdot 10^5$ i 10^6 cèl.lules per mil.lilitre.

Procediment:

La suspensió de cèl.lules es traspasa a un tub de plàstic de 50 ml i es centrifuga a 1500 r.p.m de 3 a 5 minuts. Acabat el procés s'aspira el sobrenedant i les cèl.lules es resuspenen en 5 ó 10 ml de medi fresc. A continuació es fa la dilució adequada pel manteniment de la línia, amb medi fresc o es contenen les cèl.lules per tal de sembrar per fer experiments. En créixer en suspensió és difícil saber quina densitat té el cultiu, per tant és important quan es comença a treballar amb una línia cel.lular comptar també a l'hora de sembrar els flascons de manteniment, per tal de mantenir sempre el cultiu entre les densitats permeses.

1.2.3. Congelació i descongelació

Per raons pràctiques i tècniques és aconsellable mantenir una reserva de cèl.lules congelades en nitrogen líquid. Per a realitzar la congelació mantenint la viabilitat de les cèl.lules és necessari l'ús de crioprotectors, com el glicerol o el dimetilsulfòxid (DMSO). La composició del medi de congelació pot variar lleugerament d'una línia cel.lular a una altra, en funció de la seva sensibilitat als processos de congelació i descongelació. El medi pot estar compost simplement amb medi de cultiu suplementat amb un 10% de DMSO. Tot i això en augmentar la quantitat de sèrum la viabilitat és major, per tant el medi ideal i el que s'ha utilitzat en aquesta memòria està compost per sèrum suplementat amb un 10% de DMSO.

Les cèl.lules en monocapa tripsinitzades o la suspensió de cèl.lules es traspassen a un tub de plàstic i es centrifuguen a 1500 r.p.m de 3 a 5 minuts. A continuació s'aspira el sobrenedant, es resuspèn en medi de congelació i s'aliquota ràpidament en un o dos

criotubs, que es col.loquen en un dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80°C . Passat un mínim de 4 hores i un màxim d'un mes es traslladen les cèl.lules a un tanc de nitrogen líquid on es mantindran emmagatzemades fins a futures aplicacions.

Cal tenir en compte que els agents crioprotectors, malgrat ser imprescindibles en el procés de congelació, són altament tòxics per les cèl.lules a temperatura ambient i a concentracions superiors al 2%. Per aquest motiu és aconsellable realitzar la congelació i descongelació amb la màxima rapidesa possible per tal de garantir-ne la viabilitat cel.lular.

La descongelació d'un criotub suposa el ràpid traspàs de les cèl.lules mantingudes en nitrogen líquid a un bany termostatitzat a 37°C . Per tal de minimitzar el contacte del DMSO amb les cèl.lules no és necessari arribar a la descongelació total. Quan les cèl.lules es comencen a descongelar es traspassen a un tub de plàstic amb 15 ml de medi i es centrifuguen a 1500 r.p.m. durant 5 minuts. En el cas d'un cultiu en monocapa, les cèl.lules es resuspenen en medi fresc i es sembren en un o més flascons de 75 cm^2 , als que s'hi afegeixen medi fins a 12 ml. Quan es tracta d'un cultiu en suspensió les cèl.lules es resuspenen en el volum necessari de medi fresc per tal d'assolir una densitat com a mínim de 500.000 cèl.lules/ml.

1.3. Línies cel.lulars utilitzades

1.3.1. Línia cel.lular JVM-2

La línia cel.lular JVM-2 és una línia cel.lular humana derivada de leucèmia limfàtica crònica. Va ser establerta de sang perifèrica d'una dona de 63 anys amb leucèmia prolimfocítica de cèl.lules B (B-PLL) per transformació amb el virus Epstein-Barr durant el tractament amb l'éster de forbol TPA (Melo et al., 1986).

Presenten una morfologia limfoblastoid. Són cèl.lules poligonals que creixen en suspensió formant agrupacions. Les cèl.lules es cultiven en medi RPMI 1640 complet (BioWhittaker) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (Gibco-BRL) inactivat per calor (30 minuts a 56°C , per tal d'inhibir les proteïnes del complement), amb 2 mM L-glutamina, i un 1% d'una barreja d'antibiòtics i antimicòtics (Gibco-BRL) formada per penicil.lina 10000 U/ml, estreptomicina 10000 U/ml i fungizona 25 U/ml. Per al bon manteniment de les cèl.lules han de créixer entre unes densitats de $2 \cdot 10^5$ i $5 \cdot 10^5$ cèl.lules/ml i s'ha d'evitar arribar a una densitat de $1.5 \cdot 10^6$ cèl.lules/ml. Per tal de mantenir la densitat cel.lular cal efectuar substitucions de part del medi de cultiu per medi complet nou dos o tres cops per setmana, aquest procediment s'ha d'efectuar també en totes les línies cel.lulars que creixen en suspensió detallades a continuació. Poden presentar una cinètica de creixement lenta, amb un temps de duplicació de 50-70 hores.

1.3.2. Línia cel.lular Granta-519

La línia cel.lular Granta-519 és una línia humana derivada de limfoma de cèl.lules B. Va ser establerta de sang perifèrica obtinguda el 1991 en la recaiguda d'una transformació leucèmica de limfoma de mantell en fase IV, diagnosticat a una dona caucàsica de 58 anys

amb un historial previ de carcinoma cervical (Jadayel et al. 1997). Es caracteritza per presentar la translocació cromosòmica t(11;14)(q13;q32) i alteracions en el cromosoma 11q que afecten l'ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated gene*).

Presenten una morfologia esfèrica i creixen en suspensió tant aïllades com formant petites agrupacions. Les cèl.lules es cultiven en medi DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) (BioWhittaker) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví inactivat per calor, 2 mM L-glutamina i un 1% d'una barreja d'antibiòtics i antimicòtics. El cultiu s'ha de mantenir en unes densitats entre $5 \cdot 10^5$ i 10^6 cèl.lules/ml i no ha d'arribar a una densitat màxima de $2.6 \cdot 10^6$ cèl.lules/ml. El temps de duplicació és de 2 dies.

1.3.3. Línia cel.lular Jeko-1

La línia cel.lular humana Jeko-1 deriva d'un limfoma de cèl.lules B. Va ser establerta de sang perifèrica d'una dona de 78 anys amb limfoma de mantell (Jeon et al., 1998) i com a tal presenta la translocació cromosòmica t(11;14)(q13;q32), així com mutacions en el gen p53.

Creixen en suspensió com a cèl.lules aïllades amb morfologia esfèrica. Es cultiven en medi RPMI 1640 complet suplementat amb un 20% de sèrum fetal boví inactivat per calor, 2 mM L-glutamina i 1% d'una barreja d'antibiòtics i antimicòtics. Pel correcte creixement de la línia cel.lular, el cultiu s'ha de mantenir entre $5 \cdot 10^5$ i $1.5 \cdot 10^6$ cèl.lules/ml. El temps de duplicació és de 50 hores.

1.3.4. Línia cel.lular REC-1

La línia cel.lular REC-1 és una línia cel.lular humana derivada de limfoma de cèl.lules B que presenta la translocació cromosòmica t(11;14)(q13;q32). Es va generar de manera espontània a partir de sang perifèrica d'una pacient amb limfoma de mantell de variant blàstoid.

Creixen en suspensió com cèl.lules aïllades. Es cultiven en medi RPMI 1640 complet suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví inactivat per calor, 2mM L-glutamina i 1% d'una barreja d'antibiòtics i antimicòtics. El treball amb aquesta línia cel.lular es realitza quan presenta densitats entre $5 \cdot 10^5$ i $1.5 \cdot 10^6$ cèl.lules/ml.

1.3.5. Línia cel.lular NCEB-1

La línia cel.lular NCEB-1 va ser establerta per transformació amb el virus Epstein-Barr en cèl.lules mononucleades de sang perifèrica d'un pacient amb limfoma difús centroblàstic i centrocític (Saltman et al., 1988). Les cèl.lules transformades són limfoblastoids i a part de la translocació cromosòmica t(11;14)(q13;q32) característica de limfoma de mantell presenten mutacions en el gen p53 i alteracions en el cromosoma 11q que afecten l'ATM. El medi i condicions de cultiu són idèntics als descrits per la línia cel.lular REC-1.

1.3.6. Línia cel.lular MCF7

La línia cel.lular MCF7 és una línia humana derivada d'adenocarcinoma de mama. Va ser establerta per efusió pleural en una dona caucàsica de 69 anys amb carcinoma de mama metastàtic. La línia manté diverses característiques d'epiteli mamari diferenciat, incloent l'habilitat de processar estradiol via els receptors d'estrogen citoplasmàtics.

Les cèl.lules MCF7 creixen en monocapa i presenten una morfologia de tipus epitelial. Es fan créixer en medi DMEM suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, 2mM L-glutamina i 1% d'una barreja d'antibiòtics i antimicòtics. El bon manteniment de la línia implica un canvi de medi cada 2 ó 3 dies. Aproximadament un cop per setmana, quan el cultiu arriba a un 80-90% de confluència les cèl.lules es replaquen utilitzant tripsina/EDTA i es sembren a $2-4 \times 10^4$ cèl.lules/cm². Les cèl.lules tenen un temps de doblatge d'aproximadament 50 hores (entre 30-72 hores).

1.3.7. Altres línies cel.lulars utilitzades

En aquesta tesi s'ha utilitzat l'ARN d'altres línies cel.lulars en col.laboració amb la doctora Dolors Colomer (Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic) i el doctor Xavier Martínez Picado (Fundació Irsi Caixa, Hospital Germans Trias i Pujol). Degut a què en cap moment s'han mantingut en cultiu, a continuació únicament es detalla el tipus cel.lular del què deriven. Totes les línies cel.lulars utilitzades són humanes.

- **Raji i DAUDI:** limfòcits B procedents de limfoma de Burkitt.
- **DOOH-2:** limfòcit B procedent d'un limfoma fol.licular. Presenta la translocació cromosòmica 14:18.
- **NB4:** línia cel.lular establerta a partir de medul.la òssia d'un pacient amb leucèmia promielocítica aguda.
- **U937:** línia cel.lular establerta per difusió pleural d'un pacient amb limfoma histiocític difós. Les cèl.lules presenten propietats i marcadors característics de monòcits.
- **Jurkat:** línia cel.lular de limfòcit T establerta a partir de sang perifèrica d'un pacient amb leucèmia limfoblàstica aguda
- **MT2 i MT4:** limfoblasts derivats de pacients amb leucèmia adulta de cèl.lules T.
- **MOLT-4:** línia cel.lular derivada de limfòcit T, establerta a partir de sang perifèrica d'un pacient amb leucèmia limfoblàstica aguda.
- **A301F7 i CEM13:** línies T-limfoblastoids amb un origen comú, establertes a partir de sang perifèrica d'un pacient amb leucèmia limfoblàstica aguda.
- **SW480:** línia cel.lular derivada d'adenocarcinoma de colon

1.4. Cultiu primari

Les cèl.lules de cultius primaris presenten la morfologia de les cèl.lules de l'òrgan del que van ser aïllades i el fet d'estar més properes a les cèl.lules que les van originar i no haver sofert cap procés de transformació es veu reflexat en una millor activitat i una funcionalitat similar al seu ambient natural. Generalment el cultiu primari es fa a partir de cèl.lules d'origen animal ja que l'òrgan s'obté a través del sacrifici de l'animal. El cultiu

primari de cèl.lules humanes és molt més complicat degut a la dificultat d'obtenir mostres de partida i a la importància d'una correcta manipulació de la mostra, ja que generalment la persona que obté la mostra no és la mateixa que realitza el cultiu. Pel contrari el cultiu primari de cèl.lules del sistema immunitari és senzill ja que aquestes es poden obtenir directament a partir de sang perifèrica de donants. Aquesta característica fa que en el cas de les leucèmies sigui possible l'anàlisi de diferents paràmetres com la citotoxicitat a un fàrmac o fins i tot mesures de transport directe del fàrmac, dades que pels tumors sòlids són pràcticament impossibles d'obtenir.

En aquesta tesi s'han realitzat cultius primaris de cèl.lules mononucleades de donants, de cèl.lules de pacients amb leucèmia limfàtica crònica (LLC) i de limfòcits T de tipus CD4, en col.laboració amb el servei d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic i la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol. En tots es casos, els pacients han donat el seu consentiment per escrit per a la utilització de les seves mostres en estudis de recerca i els projectes desenvolupats estan avalats pels comitès ètics dels Hospitals.

1.4.1. Aïllament de cèl.lules mononucleades

Les cèl.lules mononucleades, que corresponen als limfòcits B, limfòcits T i monòcits, tenen una densitat inferior als eritròcits i cèl.lules polinucleades, pel que sedimenten més lentament. Aquesta característica és aprofitada per separar cèl.lules mononucleades seguint el protocol descrit per Böyum mitjançant un gradient de Ficoll (Boyum et al., 1964). En l'aïllament de cèl.lules mononucleades de donants sans, la majoria de cèl.lules que s'obtenen són limfòcits T. En el cas de cèl.lules de pacients de LLC, el protocol seguit és el mateix, però la proporció de limfòcits B és tan elevada (superior al 90%) que no és necessari separar els limfòcits T i monòcits per a realitzar els experiments.

Procediment:

La mostra de sang (5 ml) es dilueix en tampó PBS en una proporció 1:1 (v/v). La sang diluïda s'addiciona sobre la solució de Ficoll (Seromed) en una proporció de dos volums de sang diluïda per cada volum de solució de Ficoll. El tub es centrifuga durant 20 minuts a 2000 r.p.m a temperatura ambient i sense fre per no trencar el gradient de Ficoll. En la separació resultant els eritròcits i les cèl.lules polinucleades queden sedimentades en la part inferior del tub, mentre que les cèl.lules mononucleades queden dipositades formant un anell en la interfase entre el Ficoll i el plasma. L'anell de cèl.lules mononucleades es recull intentant agafar la menor quantitat de Ficoll possible i es passa a un tub de plàstic de 50 ml. El tub s'omple fins dalt amb PBS, es barreja per inversió i es centrifuga a 1500 r.p.m. durant 10 minuts. El sobrenedant es decanta i es fa un segon rentat amb PBS.

Les cèl.lules obtingudes poden utilitzar-se al moment o bé criopreservar-les en nitrogen líquid. Les cèl.lules es congelen seguint el protocol descrit en l'apartat 1.2.3 en vials que contenen $20 \cdot 10^6$ cèl.lules. En el moment de la descongelació les cèl.lules es cultiven en medi RPMI suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (Gibco-BRL) inactivat per calor, amb 2 mM de L-glutamina i 1% d'una barreja d'antibiòtics (BioWhittaker) i es

mantenen en cultiu com a mínim dues hores abans de realitzar l'experiment. Diferents experiments realitzats en el Servei d'Hematologia de l'Hospital Clínic han demostrat que les cèl.lules congelades mantenen les mateixes característiques que les cèl.lules fresques.

1.4.2. Aïllament de limfòcits T CD4

L'aïllament de limfòcits T CD4 s'ha realitzat en la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol, utilitzant el kit comercial *StemSep™ Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail* de StemCell Technologies. Aquest kit es basa en la selecció negativa de les cèl.lules d'interès. Es parteix d'una solució de cèl.lules mononucleades, obtingudes segons el protocol detallat en l'apartat anterior, que s'incuben amb una barreja d'anticossos dirigits contra antígens de la superfície cel.lular de les diferents cèl.lules hematopoiètiques humanes excepte les d'interès, en aquest cas els limfòcits T CD4. A continuació els anticossos s'uneixen a unes boles magnètiques i la solució resultant es fa passar per una columna unida a un imant, de manera que només es recullen els limfòcits T CD4.

2. TRACTAMENTS EN CULTIUS CEL.LULARS

En aquest apartat es descriuen els diferents tractaments als que han estat sotmeses les diferents línies cel.lulars o cultius primaris anteriorment descrits.

2.1. Tractament de cèl.lules amb agents quimioterapèutics

Al realitzar un tractament en una línia cel.lular les cèl.lules es sembren en el suport adequat en funció de l'estudi que es vulgui fer: transport, aïllament d'ARN o proteïna, corbes de dosi-resposta, etc. Passades de 12 a 24 hores s'incuben amb les concentracions escollides de fàrmac un temps determinat (de 90 minuts a 48 hores) i finalitzat aquest temps el medi amb fàrmac és substituït per medi fresc.

2.1.1. Agents quimioterapèutics

La majoria dels fàrmacs utilitzats es subministren en forma sòlida/pols que és necessari reconstituir abans de la seva utilització experimental. És important treballar en condicions d'esterilitat i amb solvents prèviament filtrats amb filtres de 0.2 µm de mida de porus. És recomanable no sotmetre les solucions mare a repetits cicles de congelació/descongelació, pel que s'aconsella generar petites aliquotes.

La **fludarabina** (9-β-D-arabinosil-2-fluoroadenina) utilitzada en els tractaments tant de línies cel.lulars com de cèl.lules de pacients de leucèmia limfàtica crònica es troba en forma monofosforilada, tal i com s'administra farmacològicament (Fludara®, Shering, Berlin, Alemanya). Les cèl.lules desfosforilen ràpidament la fludarabina mitjançant nucleases extracel.lulars i és la forma desfosforilada la que és internalitzada a la cèl.lula. La solució mare utilitzada correspon al volum restant després de l'administració del fàrmac als pacients. En aquest cas, la fludarabina es troba a una concentració de 10 mg/ml dissolta

en aigua amb 10 mg/ml de manitol. En els experiments de transport la fludarabina utilitzada correspon a la forma defosforilada distribuïda per Sigma. Aquest compost té menor solubilitat, pel que el vial ha de ser reconstituït en DMSO a una concentració de 100 mM i emmagatzemat a -20°C.

La **5'-desoxi-5-fluorouridina** (5'-DFUR) i el **5-fluorouracil** (5-FU) es distribueixen comercialment en pols (Sigma) i són estables a temperatura ambient. La solució mare de 5'-DFUR es prepara a una concentració de 100 mM en aigua. En el cas del 5-FU, la solució mare de 200 mM s'ha de dissoldre en DMSO, mentre que les dilucions posteriors es poden realitzar en aigua. Les alíquotes derivades es mantenen a -20°C.

La **gemcitabina** (Gemzar; 2',2'-difluorodesoxicitidina) és una donació de Lilly S.A. (Madrid, España). És important tenir en compte que es parteix del fàrmac comercial (Gemzar) i que la quantitat del principi actiu (gemcitabina) és de 48.3 g per 100 g de Gemzar. La solució mare es prepara a una concentració de 100 mM en aigua i es guarda alíquotada a -20°C.

2.1.2. Anàlisi de la citotoxicitat: corbes de dosi-resposta

L'anàlisi de citotoxicitat d'un determinat fàrmac es basa en la mesura de la supervivència després de l'exposició al fàrmac. Existeixen gran varietat de mètodes per a determinar citotoxicitat que es diferencien en funció del paràmetre que mesuren: proliferació cel.lular (quantificació de la síntesi d'ADN mitjançant ³H-timidina), viabilitat cel.lular (reducció de sals de tetrazolium o inclusió de blau de tripà) o apoptosi (marcatge amb annexina V). L'elecció del mètode dependrà del tipus de fàrmac que s'analitza, del tipus cel.lular i de la metodologia disponible, ja que alguns mètodes poden donar resultats equivalents.

Un cop escollit el mètode les cèl.lules es tracten amb diferents concentracions del fàrmac i es mesura la citotoxicitat. Les corbes de dosi-resposta es presenten com la viabilitat relativa prenent com 100% el nombre de cèl.lules del cultiu control, en absència del fàrmac. Utilitzant el software GraphPad Prism 4.0 cada conjunt de dades s'ajusta a una corba dosi-resposta sigmoïdal, el que permet obtenir un valor d'IC₅₀, que correspon a la dosi de fàrmac que redueix la viabilitat en un 50%.

2.1.2.1. Recompte cel.lular

Les corbes de dosi-resposta en la línia cel.lular MCF7 es van realitzar per recompte cel.lular utilitzant un comptador de cèl.lules Coulter-Multisizer (Servei de Citometria de Flux, Parc Científic de Barcelona). En tractar-se d'un cultiu en monocapa les cèl.lules mortes es desenganxen de la placa, pel que es poden eliminar amb facilitat al rentar amb PBS, de manera que el nombre de cèl.lules que es conta correspon al nombre de cèl.lules viables. L'inconvenient d'aquest mètode és que si la cèl.lula no està prou danyada com per desenganxar-se de la placa també es detecta. Tot i això quan una cèl.lula està en procés d'apoptosi es produeix una disminució del volum i en el recompte cel.lular només es

compten aquelles partícules que tenen un rang de mida determinat, que es determina a partir de les cèl.lules control (sense fàrmac).

Procediment:

Es sembren 40,000 cèl.lules per pou en plaques de 24 pous i a les 24 hores s'incuben amb diferents concentracions de fàrmac durant 90 minuts. Passat aquest temps es canvia el medi per medi fresc i es permet el creixement cel.lular durant 48 hores. En el moment d'avaluar la citotoxicitat les cèl.lules es tripsinitzen i el nombre de cèl.lules present en la suspensió es compta mitjançant el contador Coulter-Multisizer.

2.1.2.2. Reducció de sals de tetrazolium: MTT

L'interior cel.lular en cèl.lules proliferatives és més reductor que en cèl.lules no proliferatives. Aquest estat reductor es pot mesurar utilitzant acceptors d'electrons com les sals de tetrazolium, una de les més utilitzades és el MTT (bromur de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). L'assaig es basa en la formació de cristalls de formazan, d'un color blau i insolubles en aigua, després de la ruptura de la sal de tetrazolium. Els cristalls només es produeixen en cèl.lules viables mitjançant l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa. Els cristalls poden ser solubilitzats amb un solvent orgànic i la densitat òptica dels cristalls dissolts es pot mesurar espectofotomètricament. El valor d'absorbància obtingut correlaciona de manera directa amb el nombre de cèl.lules metabòlicament actives presents en el cultiu cel.lular.

En aquesta memòria l'assaig de citotoxicitat mitjançant MTT s'ha utilitzat en cèl.lules de pacients de leucèmia limfàtica crònica.

Procediment:

Les cèl.lules de LLC s'incuben a una densitat de $5 \cdot 10^5$ cèl.lules/ml en absència o presència de diferents dosis de fludarabina en un volum final de 100 µl. Passades 48 hores s'afegeixen 10 µl de MTT 5 mg/ml dissolt en PBS i les cèl.lules s'incuben durant 6 hores a 37°C per permetre la formació dels cristalls de formazan. Acabat el procés els cristalls es dissolen en 100 µl d'isopropanol/HCl 1M (24:1) i es mesura l'absorbància a 550 nm en un lector de plaques.

3. MESURES DE TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS

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

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

Degut a la seva diferent capacitat d'adherència a la superfície de creixement els protocols de transport de cèl.lules en suspensió i en monocapa són diferents. Per aquest motiu a continuació es detallaran els dos protocols per separat.

3.1. Medis de transport, reactius i material

Medis i reactius:

- Medi de transport amb sodi: NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Hepes 10 mM. S'ajusta a pH 7.4 amb Tris base 1 M (Trizma base, Sigma).
- Medi de transport amb colina: La composició és idèntica a la del medi anterior si bé es substitueix el clorur de sodi per clorur de colina 137 mM. Anàlogament s'ajusta a pH 7.4 amb Tris base 1 M.
- Stocks de citidina, guanosina, uridina, hipoxantina, NBTI, dipiridamol, fludarabina, 5'-DFUR (Sigma) i gemcitabina (Eli Lilly) a concentracions de 1 a 100 mM.
- Nucleòsids i anàlegs marcats amb triti. [5-³H(N)]Citidina, [8-³H]Guanosina, [2,8-³H]Hipoxantina, [8-³H]Fludarabina, [5-³H]Gemcitabina, [6-³H]5'-DFUR (Moravek Biotech). [5,6-³H]Uridina (Amersham Pharmacia Biotech)
- Líquid de cintil.lació (Ecolite, ICN)
- Solució comercial "Bio-Rad Protein Assay", formada per blau brillant de Coomassie, àcid fosfòric i metanol (Biorad)
- Dissolució aquosa al 1% d'albumina sèrica bovina.

Els reactius i materials detallats corresponen a aquells comuns pels protocols de transport en suspensió i monocapa. A continuació s'indica el material específic per cadascun dels protocols.

Transport en monocapa

- Solució d'atur: NaCl 137 mM, Hepes 10 mM. S'ajusta a pH 7.4 amb Tris base
- Solució de lisi: Tritó X-100 0.5%, NaOH 100 mM

Transport en suspensió

- D-[1-¹⁴C]Manitol (Amersham Pharmacia Biotech)
- Solució de lisi: àcid perclòric 10%, glicerol 25%
- Barreja d'olis: dibutilftalat i diisonilftalat (3:2)

- Tritó X-100 0.5%
- Tubs eppendorfs allargats de 0.4 ml (Ecogen)
- Microcentrifuga de tubs eppendorf

3.2. Transport de cèl.lules en monocapa

Els estudis de captació dels diferents substrats analitzats es realitzen en plaques agrupades de 24 pous. La densitat cel.lular depèn del tipus d'experiment. En el cas concret de les cèl.lules MCF7 es sembraven 40,000 cèl.lules per pou i l'assaig de transport es feia a les 24 ó 48 hores.

3.2.1. Preparació dels medis de transport

Per a la mesura de la captació de nucleòsids es suplementen paral.lelament els medis sodi i colina amb el nucleòsid no radioactiu, de manera que la concentració final sigui 1 μ M. Addicionalment, cal afegir un volum determinat de l'anàleg marcat corresponent que asseuri 1 μ Ci per mil.lilitre de medi de transport. En el cas de les mesures de transport de 5'-DFUR es va utilitzar una concentració de 2 μ Ci/ml de substrat radioactiu.

3.2.2. Assaig de transport

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

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

3.2.3. Valoració de proteïnes

Tot i l'intent de fer una sembra cel.lular el més homogènia possible, el nombre de cèl.lules per pou mai és el mateix. Aquesta diferència cal tenir-la en compte per tal que els resultats de les mesures de transport siguin comparables entre sí. Per tant, cal corregir els valors de les mesures de captació per la concentració proteica present en cada mostra.

La valoració de la concentració de les proteïnes es realitza mitjançant el mètode de Bradford (Bradford et al., 1976). La dissolució comercial "Bio-Rad protein assay" (Biorad) es dilueix 1/4 en aigua i es dispensa a raó d'1 ml per cubeta semimicro de plàstic. En funció del tipus i de l'estat de confluència cel.lular, s'afegeixen 10 ó 20 µl de mostra de lisat proteic. Addicionalment, es prepara una patró amb albúmina sèrica bovina al 0.1 % fins a 10 µg/µl, on interpolar els valor de les absorbàncies mesurades a 595 nm de longitud d'ona.

3.2.4. Càlculs

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

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

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

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

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

3.3. Transport de cèl.lules en suspensió

El fonament del protocol de transport de les cèl.lules en suspensió és similar al de les cèl.lules en monocapa, però degut a seva incapacitat d'adherència tant els rentats com la parada del transport es fan per centrifugació. Les cèl.lules es fan créixer en flascons de

75 cm², a una densitat de 2·10⁵ a 5·10⁵ cèl.lules/ml i l'assaig de transport es fa generalment a les 24 hores.

En aquesta tesi s'ha posat a punt un nou protocol de transport de cèl.lules en suspensió per a cèl.lules de leucèmia limfàtica crònica. El tamany reduït d'aquest tipus cel.lular dificultava la utilització del protocol anterior, descrit prèviament en el nostre grup de recerca (Soler et al., 1998). La principal variació ha suposat la utilització de tubs eppendorfs allargats per parar el transport. Tanmateix, tal com es comentarà posteriorment, és molt important que hi hagi un nombre mínim de cèl.lules per tal que aquestes puguin travessar la fase d'olis.

3.3.1. Preparació dels medis de transport

Els medis de transport es suplementen de manera que continguin el doble de la concentració de substrat, ja que aquest es barreja amb un volum equivalent de cèl.lules. Així doncs s'afegeix als medis sodi i colina 2 µM de nucleòsid fred i 2 µCi/ml de substrat radioactiu. En aquest cas s'addicionen també 0.4 µCi/ml de D-[1-¹⁴C]manitol. El manitol no és captat per la cèl.lula, pel que és un indicatiu del medi radioactiu que ha quedat retingut fora de les cèl.lules després de la centrifugació. Per a les mesures de transport d'anàlegs de nucleòsids o quan el transport es fa en cèl.lules de malalts de leucèmia limfàtica crònica és necessari pujar la quantitat de substrat radioactiu.

3.3.2. Assaig de transport

Abans de començar el transport cal rentar les cèl.lules amb medi sodi i colina. La suspensió de cèl.lules es divideix en dos tubs de plàstic de 50 ml i es centrifuguen a 1500 r.p.m. de 3 a 5 minuts. Les cèl.lules es resuspenen amb 40 ml de medi sodi o colina i es tornen a centrifugar. El procés de rentat es repeteix un o dos cops més i les cèl.lules es resuspenen en el volum adequat de medi sodi o colina, tenint en compte que calen 50 µl de suspensió per punt. El nombre de cèl.lules que hi ha per punt és un factor molt important ja que si aquest no és suficient poden haver-hi problemes a l'hora de la centrifugació. En el cas de les línies cel.lulars calen 1 ó 2 milions de cèl.lules per punt. Quan les mesures de captació es fan amb cèl.lules de pacient de leucèmia limfàtica crònica són necessaris de 3 a 4 milions per punt, ja que la mida d'aquestes cèl.lules és molt inferior al d'una línia cel.lular. Generalment cada punt es realitza com a mínim per triplicat.

El transport comença quan es barregen 50 µl de cèl.lules amb un volum idèntic de medi radioactiu. Passat el temps de captació, la suspensió s'afegeix ràpidament a un tub de parada i es centrifuga en una microcentrifuga de tubs eppendorfs a 12000 r.p.m. durant 30 segons si es tracta d'una línia cel.lular o 1 minut per a cèl.lules de pacients de leucèmia. Els tubs de parada són tubs allargats de 0.4 ml formats per tres fases, que s'han preparat prèviament. La fase inferior conté 50 µl de solució de lisi (àcid perclòric 10%, glicerol 25%), a continuació s'afegeixen 150 µl d'una barreja d'olis (dibutylftalat i diisonilftalat, 3:2) i finalment 100 µl de medi sodi o colina, que s'addicionen lentament per tal de no distorsionar les fases. Els tubs de parada es mantenen en gel. D'aquesta manera el

transport s'atura per dilució i per fred i al centrifugar-se únicament les cèl.lules travessen la fase d'olis arribant a la solució de lisi. Un cop finalitzat el transport es talla el tub i s'introdueix la fase inferior en un vial amb 3 ml de líquid de cintil.lació. De manera equivalent al transport en monocapa cal preparar també vials que continguin els medis de transport radioactius, per tal d'obtenir els estàndards necessaris per als càlculs.

3.3.3. Valoració de proteïnes

A diferència del transport de cèl.lules en monocapa en aquest cas no es pot mesurar la proteïna de cadascun dels punts, sinó que únicament es valora la concentració proteica de les suspensions de cèl.lules provinents dels rentats, generalment amb medi sodi i colina.

En funció de la quantitat de cèl.lules es lisen 5 ó 10 µl de la suspensió de cèl.lules amb un volum equivalent de tritó X-100 0.5% pipetejant vigorosament. La valoració de la concentració proteica es realitza mitjançant el mètode de Bradford, tal i com es descriu en l'apartat 3.2.3.

3.3.4. Càlculs

Els càlculs del transport en suspensió es fan de la mateixa manera que els descrits en l'apartat 3.2.4. pel transport en monocapa. En aquest cas es corregeixen les dpm de ³H, per les dpm de ¹⁴C, que corresponen al manitol afegit al medi com a marcador del medi extracel.lular retintut. A més, cal tenir en compte que el medi radioactiu es dilueix amb les cèl.lules, per tant per a obtenir l'activitat específica a part de dividir pel volum de medi comptat i per la concentració de substrat, s'ha de dividir per 2. Així doncs l'activitat de la mostra és:

$$\text{Activitat mostra (pmol/mg/min)} = \frac{\text{dpm}^3\text{H} - [\text{dpm}^{14}\text{C} \times (\text{AE}^3\text{H}/\text{AE}^{14}\text{C})]}{\text{AE}^3\text{H} \times V_{(\text{ml})} \times \text{prot total (mg)} \times \text{temps (min)}}$$

4. TÈCNiques D'ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES

4.1 Obtenció de lisats cel.lulars

Els lisats cel.lulars s'obtenen a partir de cultius en monocapa sembrats en plaques individuals de 60 ó 100 mm de diàmetre, o en flascons de 25 ó 75 cm² quan es tracta de cèl.lules en suspensió. Degut a la utilització de diferents anticossos primaris s'han emprat diversos tampons de lisis (**Taula 1**) amb l'objectiu d'optimitzar el reconeixement de l'epítot en cada cas.

Reactius i material:

- Tampó PBS: NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM
- Inhibidors de proteases: cocktail comercial "Complete, MINI" (Roche), a raó d'una pastilla per cada 10 ml de tampó d'extracció.
- Sonicador
- Rascadors de cèl.lules (*scrapers*)

TAMPÓ	Composició
Tris-tritó	Tris 10 mM (pH = 7.4), tritó X-100 0.5 %
Tampó d'homogenització	Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), sacarosa 0.3 M, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, β-mercaptoetanol 10 mM
SB (tampó de lisi)	Tris-HCl 80 mM (pH = 6.8), glicerol 10%, SDS 2%, DTT 0.1 M
Tampó RIPA	Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, SDS 0.1%, desoxicolat sòdic 0.5%, NP-40 1%, Na ₃ VO ₄ 1 mM, PMSF 1 mM
Tampó hipotònic	fosfat de sodi 0.5 mM – EDTA 0.1 mM, pH 7.0

Taula 1. Tampons utilitzats per a l'extracció de proteïnes

4.1.1. Obtenció de lisats crus amb Tris-tritó

Per a la detecció d'hENT1 i hENT2 s'han obtingut lisats crus utilitzant com tampó de lisi Tris-HCl 10mM / Tritó X-100 0.5%.

Moments abans de lisar les cèl.lules es suplementa el tampó de lisi amb els inhibidors de proteases i es manté en gel. La suspensió de cèl.lules es centrifuga a 1500 r.p.m durant 5 minuts i el precipitat resultant es resuspèn en un volum variable de tampó de lisi suplementat (de 100 a 200 µl de tampó per 10 milions de cèl.lules). En el cas de cèl.lules en monocapa, les plaques es renten amb PBS fred. A continuació, mantenint les plaques sobre gel es procedeix a la lisi afegint un volum variable del tampó de lisi i rasant amb un *scraper* (per a plaques de 100 mm amb una confluència del 50% es solen afegir de 100 a 150 µl de tampó).

La solució resultant es passa a un tub eppendorf i es deixa en gel uns 15 minuts. Durant aquest temps es va homogeneïtzant amb l'ajuda d'un agitador tipus *vortex*. Els lisats obtinguts es centrifuguen 5 minuts a 10000 r.p.m. a 4°C en una minifuga per tal de precipitar les restes de material no disgregat. Els sobrenedants es poden utilitzar directament o bé conservar-se a -20 °C.

4.1.2. Obtenció d'extractes de membrana de cèl.lules de LLC

Els nivells d'expressió de la proteïna hENT1 en cèl.lules de pacients de LLC són força baixos, pel que ha estat necessari utilitzar un protocol d'obtenció d'extractes de membrana.

Les cèl.lules es centrifuguen a 1500 r.p.m. durant 5 minuts i el *pellet* resultant es lisa en un volum variable de tampó d'homogenització (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, sacarosa 0.3 M, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, β -mercaptoetanol 10 mM) suplementat amb inhibidors de proteases. Per cada 15-20 milions de cèl.lules de LLC s'utilitzen 100 μ l de tampó. La solució es sonica tres cops durant 10 segons i es centrifuga 30 minuts a 14000 r.p.m. a 4°C. El precipitat resultant es torna a lisar amb 50 μ l del tampó d'homogenització suplementat amb Nonidet P-40 0.15% i EGTA 3 mM i s'incuba en gel durant 30 minuts. El lisat obtingut es sonica i es centrifuga de la mateixa manera que el primer lisat. Finalment, el precipitat, que correspon a la fracció de membrana, es resuspèn en 50 μ l de tampó SB (Tris-HCl 80 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, DTT 0.1 mM).

4.1.3. Obtenció de lisats crus amb tampó RIPA

La detecció de p53, Bax i Bcl-2 en cèl.lules MCF7 s'ha realitzat a partir de lisats crus obtinguts utilitzant el tampó RIPA.

Una vegada fets els tractaments oportuns, s'aspira el medi de cultiu i es renten les plaques dos cops amb PBS fred. S'afegeix un volum variable de tampó RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, desoxicolat sòdic 0.5%, NP-40 1%, Na_3VO_4 1 mM, PMSF 1 mM) suplementat amb inhibidors de proteases (en general 100-200 μ l per placa de 10 mm) i es desenganxen les cèl.lules mitjançant un rascador. La solució resultant es recull en tubs eppendorf i s'homogenitza amb l'ajuda d'una pipeta automàtica o d'un agitador tipus *vortex*. Els lisats obtinguts es centrifuguen 15 minuts a 12000 r.p.m. a 4°C en una minifuga. El sobrenedant corresponent s'utilitza directament o bé es conserva a -20°C.

4.1.4. Extracció d'homogenats crus de membrana

Per a la detecció de hCNT1 en les cèl.lules MCF7 s'han utilitzat homogenats crus de membrana obtinguts utilitzant un tampó hipotònic.

Una vegada fets els tractaments oportuns les cèl.lules es tripsinitzen, la suspensió de cèl.lules es centrifuga i es resuspèn en 1 ml de tampó hipotònic (fosfat de sodi 0.5 mM – EDTA 0.1 mM, pH 7.0) suplementat amb inhibidors de proteases. Les cèl.lules es soniquen durant 15 segons al 40 % i el lisat es centrifuga 15 minuts a 13200 r.p.m. Finalment, el precipitat obtingut es resuspèn en un volum variable de tampó hipotònic (200 μ l per cada 10 milions de cèl.lules).

4.2. Valoració de la concentració de proteïnes

La valoració de proteïnes es fa a partir del mètode Bradford, descrit anteriorment en l'apartat 3.2.3. Tal i com ja s'ha comentat, la solució comercial "Bio-Rad protein assay" (Biorad) es dilueix 1/4 (v/v), es traspassa 1 ml a cubetes d'espectrofotòmetre semimicro (Rubilabor) i s'hi afegeixen de 1 a 5 μ l de la mostra de lisat proteic. La recta patró es realitza amb albúmina en un rang de concentracions entre 0 i 12 μ g/ μ l. La determinació d'absorbància es du a terme a 595 nm de longitud d'ona.

4.3. Purificació de IgGs

Quan es treballa amb anticossos no comercials, com és el cas dels anticossos anti-hENT1, anti-hENT2 i anti-hCNT1 es recomana fer una purificació prèvia d'IgGs, a no ser que es disposi d'un anticòs extremadament específic i sensible. En el nostre cas el procediment escollit per a la separació de les IgGs ha estat la columna de proteïna A-sefarosa.

Reactius i material:

- PBS pH 7.4
- Columna de proteïna A-Sefarosa CL-4B (Pharmacia)
- Tampó Tris 10 mM, pH 8
- Tampó Tris 100 mM, pH 8
- Tampó Tris 1 M, pH 9
- Glicina 100 mM, pH 2.7 (amb HCl)
- Bosses de diàlisi pretractades (Sigma)

Procediment:

Es recomana treballar a 4°C durant tot el procés de purificació. Abans de començar cal equilibrar la columna amb 20 ml de Tris 100 mM pH 8. La mostra de sèrum (2 ml) es dilueix tres cops en Tris 100 mM pH 8 i es passa per la columna dos o tres cops. Amb l'anticòs unit a la columna es realitza un primer rentat amb 20 ml de Tris 100 mM seguit d'un altre amb Tris 10 mM. Finalment, s'elueixen les IgGs retingudes en la columna amb glicina 100 mM pH 2.7. Cal recollir unes 10 fraccions d'1 ml en eppendorfs en els que prèviament s'hi han dispensat 50 µl de Tris 1M pH 9, agitant així que la mostra caigui per neutralitzar la solució. La columna es renta amb 20 ml d'aigua destil·lada i es guarda a 4°C per a utilitzacions posteriors. Les fraccions resultants es valoren espectrofotomètricament a 280 nm en cubetes de quars, prèvia dilució 1/20 en PBS. Aquelles fraccions que presenten una bona concentració de proteïna es reuneixen i es dialitzen tota la nit en una solució de PBS pH 8.5. Abans de procedir a la diàlisi, les bosses han de ser tractades seguint les instruccions del fabricant. La fracció d'IgGs obtinguda s'aliqota, un cop mesurada la concentració final, i es conserva a -20 ó -80 °C.

4.4. Electroforesi en SDS-PAGE

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

Es preparen dos gels que es carreguen seqüencialment. El gel concentrador constitueix la xarxa més laxa (5% d'acrilamida), destinada a alinear les proteïnes a l'entrada del segon gel, de xarxa més espessa (10-12 % d'acrilamida) i encarregat de separar-les en funció de la seva grandària.

Reactius i material:

- Tampó d'electroforesi: Es prepara deu cops concentrat (10X) i està format per Tris base 250 mM, glicina 1.91 mM i SDS a l'1%.
- Tampó de càrrega: Es prepara cinc vegades concentrat. Per 20 ml calen 6.4 ml Tris-HCl 1M pH=8, 2 g SDS, 10 ml glicerol, 0.2% blau de bromofenol. Per cada ml s'afegeixen 100 µl de β-mercaptoetanol. Un cop s'hi afegeix el β-mercaptoetanol s'ha de conservar en el congelador. Alternativament la solució sense β-mercaptoetanol es pot mantenir a temperatura ambient.
- Aparell de PAGE per plaques de poliacrilamida: sistema Mini Protean II (Biorad) equipat amb una font de voltatge.
- Gels d'acrilamida: es preparen a partir d'una solució comercial d'acrilamida/bis-acrilamida al 30% (37:5:1) (Biorad). Degut a la seva toxicitat és necessari treballar amb guants.
 - Gel separador: un volum final de 10 ml conté 3.3 ó 4 ml de la barreja d'acrilamida (en funció de si volem un gel al 10 ó 12%), 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 0.1 ml de SDS al 10%, 0.1 ml d'una solució de persulfat amònic al 10% i 4 µl de TEMED (Biorad)
 - Gel resolutiu: per 4 ml calen, 0.67 ml de la barreja d'acrilamida, 0.5 ml de Tris 1M pH 6.8, 40 µl de SDS al 10 %, 40 µl de persulfat amònic al 10% i 4µl de TEMED.
- Estàndard de pes molecular "Rainbow Mix RPN 800" (Amersham Pharmacia Biotech) que conté marcadors de pesos moleculars pretenyits entre 10 i 250 kDa.

4.4.1. Preparació de les mostres

La quantitat de mostra necessària ve determinada experimentalment en cada cas, ja que aquesta depèn del tipus de mostres a analitzar i de les variacions en la sensibilitat dels diferents anticossos primaris. Per regla general es treballa amb 5-40µg de proteïna. És molt important, quan el que es proposa és una anàlisi de caràcter quantitatiu, que la valoració de la mostra sigui precisa per a garantir una càrrega homogènia entre les diferents mostres. La quantitat desitjada de mostra es barreja amb el tampó de càrrega 5X, que li confereix densitat i color, i es porta fins a un volum de 20-40 µl, en funció de la concentració proteica i dels pous utilitzats. Amb l'objectiu de desnaturalitzar les proteïnes, les barreges així generades es fan bullir durant 5 minuts. En el cas de la detecció de hCNT1 les mostres, un cop s'ha addicionat el tampó de càrrega, es deixen a 37°C durant 30 minuts.

4.4.2. Preparació del gel i electroforesi

Com a sistema d'electroforesi s'utilitza el MiniProtean II SDS-PAGE de BioRad, que es munta seguint les instruccions del fabricant. En la preparació dels gels el TEMED s'afegeix en el moment de l'addició als vidres ja que és un agent polimeritzant. Una vegada preparat el gel resolutiu s'introdueix ràpidament entre els dos vidres i s'afegeix un petit volum d'aigua destil.lada suaument assegurant així una superfície plana i l'absència de contacte amb l'aire. Un cop polimeritzat (15-20 minuts), es retira l'aigua i s'hi aboca el gel concentrador, introduint-hi, tot seguit, una pinta de 10 ó 15 pous. Quan el segon gel ha polimeritzat, es retira la pinta, es munta el sistema, s'introdueix dins la cubeta d'electroforesi i s'afegeix el tampó. Acabat el procés de polimerització es carreguen les mostres i l'estàndard (3-4 µl). A continuació es tanca el circuit elèctric i s'aplica un voltatge de 120 V durant 60-90 minuts.

4.5. Assaig d'immunoblot

La tècnica del Western blotting o immunoblot, descrita per primer cop l'any 1981 per Burnette, consisteix en la transferència electroforètica de proteïnes des de gels de SDS-PAGE a membranes de nitrocel.lulosa o PDVF i la posterior detecció autoradiogràfica d'una determinada proteïna mitjançant anticossos específics.

4.5.1. Electrotransferència de proteïnes

Reactius i material:

- Tampó de transferència: Tris base 25 mM, glicina 192 mM i 20% metanol (v/v).
- Metanol
- Paper de filtre Whatman 3MM
- Immobilon-P Transfer Membrana (Millipore)
- Aparell de transferència Mini Protean II (Biorad)

Procediment:

Un cop acabada l'electroforesi es col.loca el gel de resolució en una safata amb tampó de transferència durant uns minuts, mentre es prepara el material necessari per a muntar la transferència. Es talla un tros de membrana de la mateixa mida que el gel i s'activa submergint-la en metanol durant un minut. Posteriorment, i sempre procedint amb guants per evitar embrutar-la, es renta amb aigua destil.lada i es deixa en tampó de transferència fins a la seva utilització. Es tallen 6 trossos de paper de filtre Whatman de la mateixa mida, que d'igual manera, es submergeixen en tampó. El muntatge es realitza seguint les instruccions descrites al manual, evitant al màxim la formació de bombolles d'aire. Es fixa el voltatge a 250 mA o 100 V durant 45-90 minuts, en funció del gruix del gel. El sistema es manté refrigerat mitjançant un bloc d'aigua congelada incorporat a l'interior.

4.5.2. Immunodetecció

La immunodetecció es basa en un procediment indirecte, en el qual la interacció entre l'antigen fixat en la membrana i l'anticòs primari es detecta mitjançant la reacció de la peroxidasa de rave que es troba lligada a l'anticòs secundari.

Reactius i material:

- Solució PBS/Tween-20 al 0.2 %
- Solució de blocatge: formada per un 5% (p/v) de llet descremada en pols (Molico Sveltesse) dissolta en PBS/Tween-20 al 0.2%

Procediment:

Una vegada finalitzada la transferència s'introdueix la membrana de nitrocel·lulosa en un bossa de plàstic amb 10 ml de solució de blocatge, amb l'objectiu de bloquejar els llocs d'unió inespecífics de la membrana. Es realitza una incubació d'una hora a temperatura ambient o, alternativament, tota la nit a 4°C, en agitació suau.

A continuació la membrana s'incuba amb 4-5 ml de la solució d'anticòs primari a la dilució corresponent (veure apartat 4.7) en solució de blocatge en una bossa de plàstic. La incubació es realitza com a mínim una hora en agitació suau (agitador orbital) a temperatura ambient, o bé durant tota la nit a 4°C. La solució d'anticòs es pot recuperar per a posteriors incubacions, conservant-la a 4 ó a -20°C, prèvia addició d'una petita quantitat d'azida sòdica, per evitar el creixement bacterià, tot i que la reutilització dels anticossos anti-hENTs i anti-hCNT1 dona resultats poc satisfactoris. A partir d'aquí i amb l'objectiu d'eliminar l'excés d'anticòs, es realitzen tres rentats de 10 minuts amb PBS/Tween-20 al 0.2% amb agitació suau i a temperatura ambient.

Finalitzats els rentats es preparen 5 ml d'una dilució 1:2000 de l'anticòs secundari en solució de blocatge i s'incuba durant 45-60 minuts a temperatura ambient. Una vegada finalitzada es realitza un rentat de 10 minuts amb PBS/Tween-20 al 0.2% i dos amb PBS.

4.5.3. Revelat i anàlisi

La detecció de l'anticòs secundari, acoblat a la peroxidasa, permet localitzar la unió específica de l'anticòs primari a la proteïna d'interès. Amb aquesta finalitat, s'utilitza un mètode químic, el reactiu ECL, que facilita la detecció luminescent d'antígens específics immobilitzats i conjugats de forma directa o indirecta amb anticossos marcats amb peroxidasa de rave. La visualització final dels resultats té lloc mitjançant autoradiografia.

Reactius i material:

- Cassette d'exposició
- Films d'alta sensibilitat Hyperfilm ECL RPN31034 (Amersham Pharmacia Biotech)
- ECL RPN 2106 (Amersham Pharmacia Biotech)

Procediment:

Un cop finalitzat el darrer rentat, es mulla la membrana durant un minut amb el reactiu ECL (preparat segons les instruccions del fabricant), transcorregut el qual s'elimina l'excés de líquid i es diposita en una bossa de plàstic. Aquest s'exposa dins d'un cassette a un film fotogràfic, en una cambra fosca. El temps d'exposició depèn de la sensibilitat de l'anticòs i de les mostres assajades. Passat aquest temps el film es revela i es fixa.

Per realitzar l'anàlisi de les imatges obtingudes s'utilitza el software Corel Photo-Paint 9, per a la captació, i el Phoretix 1D Gel Analysis, per realitzar les densitometries de les imatges.

4.5.4. Deshibridació de la membrana

En realitzar una anàlisi quantitativa és convenient tornar a incubar la membrana amb un anticòs contra una proteïna que s'expressi de manera equivalent en les mostres d'interès, amb l'objectiu de corregir les diferències de càrrega. Per a incubar la membrana amb un nou anticòs és necessari eliminar l'anticòs unit prèviament.

Reactius:

- Tampó de deshibridació: Tris 6.25 mM pH 6.8, 2% SDS, β -mercaptoetanol 100 mM
- Metanol
- PBS
- Solució PBS/Tween-20 al 0.2 %

Procediment:

Una mateixa membrana es pot incubar amb diferents anticossos primaris, sempre i quan aquests siguin prou sensibles. La membrana, que es guarda en una bossa a 4°C, s'introdueix durant 1 minut en metanol i seguidament es renta amb aigua destil·lada. A continuació s'incuba a 50°C amb 25 ml de tampó de deshibridació, per tal d'eliminar els anticossos units. Passat aquest temps es renta un minut amb PBS i es fan tres rentats de 10 minuts amb PBS-Tween-20 al 0.2 % a temperatura ambient amb agitació suau. A partir d'aquí ja es pot procedir a una nova immunodetecció, realitzant-se primer el blocatge, seguit de les incubacions amb els anticossos primaris i secundaris tal i com es detalla a l'apartat 4.5.2.

4.6. Immunocitoquímica de cèl·lules en cultiu

Aquesta tècnica permet la visualització i localització precisa de la proteïna d'interès mitjançant la utilització d'anticossos específics. La localització intracel·lular de l'antigen fa necessària la fixació i permeabilització de les cèl·lules per a facilitar l'accés de l'anticòs a l'antigen.

Reactius i material:

- Cubre-objectes estèrils de vidre de 12 mm
- PBS pH 7.4
- PBS-Glicina 20 mM
- Solució de fixació: paraformaldehid 4%, sacarosa 0.06 M en PBS-Gly
- Solució de permeabilització: tritó X-100 0.1% en PBS-Gly
- Solució de bloqueig: 1% BSA en PBS-Gly
- Solució de rentat: 0.1% tritó X-100, 0.1% BSA en PBS-Gly
- Medi de muntatge *Immunofluore* (Sigma)

Procediment:

Per a la immunodetecció de proteïnes en cèl.lules en cultiu, les cèl.lules es fan créixer en plaques de 24 pous sobre cubre-objectes i es tracten de la mateixa manera que en la resta d'experiments. En el moment de recollir les mostres, es renten amb PBS i es fixen mitjançant la incubació amb la solució de fixació durant 15 minuts. A continuació es permeabilitzen durant 15 minuts amb la solució amb tritó. Posteriorment, i després de rentar les cèl.lules amb solució de rentat durant 10 minuts, s'incuben 1 hora amb la solució de bloqueig. Un cop finalitzat el bloqueig es dipositen 50 µl de l'anticòs primari diluït (apartat 4.7) en solució de rentat sobre una superfície de parafilm plana. Amb molta cura els cubre-objectes es decanten per eliminar l'excés de líquid i es col.loquen sobre la gota d'anticòs, anant amb compte de què la banda on hi ha adherides les cèl.lules quedi en contacte amb l'anticòs. Després d'una hora d'incubació a temperatura ambient, els cubre-objectes es tornen a dipositar en la placa de 24 pous i es realitzen tres rentats de 10 minuts amb 1 ml de la solució de rentat. A continuació les cèl.lules s'incuben 1 hora amb 50 µl d'anticòs secundari diluït 1:500 seguint el mateix procediment que per a l'anticòs primari. A partir d'aquest moment es treballa amb els cubre-objectes protegits de la llum. Passada l'hora d'incubació es fa un rentat de 10 minuts amb solució de rentat i dos rentats amb PBS. Finalment les mostres es munten sobre porta-objectes mitjançant l'addició d'una gota de medi de muntatge. L'anàlisi s'ha realitzat utilitzant un Microscopi Olympus de fluorescència invertida, IX-70, en el Servei de Microscopia Confocal dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. El fluorocrom utilitzat (AlexaFluor 488) té un màxim d'absorció a 495 nm i un màxim d'emissió a 519 nm, emetent una fluorescència de color verd.

4.6. Anticossos utilitzats

Anti-hENT1, anti-hENT2 i anti-hCNT1: anticossos policlonals mono específics, generats i caracteritzats en el nostre laboratori dins del marc de la tesi doctoral d'Elena Guillén (Farre et al., 2004). Una vegada purificada la fracció d'IgGs (veure apartat 4.3), s'utilitzen a una dilució 1/2000 per els anti-ENTs i 1/1000 per anti-hCNT1 en el western blot. Per a la immunocitoquímica anti-hCNT1 s'ha utilitzat a una dilució 1/100.

Anti-p53 (Novocastra): anticòs comercial monoclonal, clon DO7. Per a tècniques de western blotting s'aconsella una dilució 1/1000.

Anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, Inc): anticòs policlonal purificat a partir de sèrum de conill. Malgrat es recomanen dilucions més baixes, degut als elevats nivells d'expressió de les mostres analitzades s'ha utilitzat una dilució 1/1000.

Anti-Bcl2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc): Anticòs monoclonal. És aconsellable una dilució 1/200 per a tècniques de western blotting.

Anti- α -tubulina (Oncogene): anticòs monoclonal. Per a tècniques de western blotting s'aconsella una dilució 1/1000.

Anti-Mdm2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc): anticòs monoclonal. Per a tècniques d'immunocitoquímica s'ha utilitzat a una dilució 1/50.

Anticossos secundaris. Per a western blot: anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated i anti-mouse horseradish peroxidase conjugated (Biorad). S'utilitzen a una dilució 1/2000. Per a immunocitoquímica: anti-mouse i anti-rabbit marcats amb AlexaFluor 488 (Molecular Probes). S'utilitzen a una dilució 1/500.

5. ANÀLISI DE CICLE CEL.LULAR I APOPTOSI PER CITOMETRIA DE FLUX

Tal com indica el seu nom, la citometria de flux consisteix en la mesura d'una sèrie de paràmetres de la cèl.lula en un sistema de flux. En el moment de realitzar les mesures en el citòmetre de flux, les cèl.lules poden estar vives o fixades, però obligatòriament han d'estar en suspensió i en forma de cèl.lula única. Les cèl.lules són obligades a passar alineades una a una davant d'un feix de làser mitjançant un flux continu. Cada cèl.lula a la vegada que dispersa la llum, emet llum fluorescent com a conseqüència de l'excitació del làser a la que és sotmesa. Els paràmetres que típicament es mesuren de forma simultània per a cada cèl.lula són: la dispersió frontal de la llum (*forward scatter*), que és proporcional al mida cel.lular, la dispersió de la llum ortogonal (*side scatter*), proporcional a la quantitat d'estructures granulars o complexitat de la cel.lular, i les intensitats de fluorescència a diferents longituds d'ona.

La citometria de flux té gran quantitat d'aplicacions, a més, la velocitat a l'hora de realitzar l'anàlisi la converteix en un complement excel.lent de les tècniques bioquímiques clàssiques. La tècnica de conjugació de fluorocroms permet analitzar qualsevol estructura per a la que existeixi un anticòs o una sonda fluorescent. Així, per exemple, es pot mesurar el contingut cel.lular d'ADN, quantificar la densitat antigènica de diferents marcadors o fins i tot distingir subpoblacions de tipus cel.lulars diferenciats. Addicionalment, és possible separar automàticament les cèl.lules en funció d'una o varies característiques (FACS, *Fluorescence Analyzer Cell Sorting*). En aquesta memòria la citometria de flux s'ha utilitzat per a l'anàlisi del cicle cel.lular, mitjançant la mesura del contingut d'ADN, i per a la determinació de l'apoptosi.

5.1. Anàlisi del cicle cel.lular

La citometria de flux permet determinar el cicle cel.lular mitjançant la determinació de la quantitat d'ADN de les cèl.lules. La distribució típica de l'ADN d'una població cel.lular en creixement està formada per dos pics que corresponen a la fase G₁/G₀ i a la fase G₂/M i una vall corresponent a la fase S. En la fase G₂/M la cèl.lula té el doble de quantitat d'ADN

que en la fase G_1/G_0 . La fase S correspon a la síntesi d'ADN pel que les cèl·lules tenen quantitats variables d'ADN, que es troben entre les fases G_1/G_0 i G_2/M . Segons el tipus i funció de la cèl·lula, aquesta pot tenir més o menys activitat proliferativa, a més el cicle cel·lular pot variar en diverses condicions com les radiacions o el tractament amb fàrmacs.

La mesura de la quantitat d'ADN es basa en la capacitat dels marcadors fluorescents per unir-s'hi específicament. Les cèl·lules tenyides amb el marcador emeten una fluorescència proporcional al contingut d'ADN. Un dels fluorocroms més utilitzats és el iodur de propidi que s'intercala en la doble cadena de les molècules d'àcids nucleics. S'excita a 536 nm, emetent una fluorescència en un rang ampli al voltant de 617 nm.

L'histograma que s'obté mostra el nombre de cèl·lules respecte a la quantitat de fluorescència. A partir de l'histograma es poden utilitzar diversos mètodes informàtics per a calcular el percentatge de cèl·lules en cada fase. En aquesta memòria s'ha utilitzat el software del citòmetre i el programa CellQuest (Becton Dickinson).

Procediment:

Les cèl·lules MCF7 es sembren en plaques de 6 pous a una densitat de 20,000 cèl·lules/cm². Després de realitzar els tractaments oportuns, en el moment de l'anàlisi del cicle, es tripsiniten. La suspensió resultant es centrifuga a 1200 rpm durant 5 minuts i les cèl·lules es resuspenen en 300 µl de PBS. A continuació s'afegeixen gota a gota 700 µl d'etanol absolut fred (-20°C) mentre la suspensió s'agita contínuament en un agitador de tipus vòrtex, ja que és molt important una addició lenta i homogènia de l'etanol per tal d'evitar la formació d'agregats. L'etanol actua com a fixador i permeabilitzador, condicions necessàries perquè el iodur de propidi s'intercali a l'ADN. Les mostres es deixen a 4°C, on són estables durant mesos.

En el moment de l'anàlisi les cèl·lules es centrifuguen per a eliminar l'etanol i es resuspenen en 200 µl de PBS amb 10 µg/ml de RNasa, per tal d'evitar la unió del iodur de propidi a l'ARN. Finalment s'afegeixen 100 µg/ml d'iodur de propidi i s'analitzen les mostres en el citòmetre de flux.

5.2. Determinació de l'apoptosi: incorporació d'anexina V

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

En processos d'apoptosi avançada i necrosi la membrana plasmàtica es deteriora i esdevé permeable a substàncies com el iodur de propidi (IP) que s'intercala en la doble cadena d'ADN. La viabilitat cel·lular i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques es determina

per citometria de flux, mitjançant un doble marcatge amb anexina V conjugada amb FITC (fluorescència verda) i IP (fluorescència vermella). Així s'obté el percentatge de cèl.lules vives (anexina i IP negatives), cèl.lules apoptòtiques primerenques (positives pel marcatge amb anexina i negatives pel IP) i cèl.lules amb apoptosi avançada o necrosi (anexina i IP positives).

Procediment:

Les cèl.lules, sembrades en plaques de 6 pous, es tripsinitzen en el moment de l'anàlisi. Un cop centrifugades es resuspenen en 200 µl de tampó d'unió de l'anexina (BB, *binding buffer*) i s'hi addiciona 1 µg/ml d'anexina V-FITC i 1 µg/ml d'IP. La suspensió s'incuba durant 15 minuts a les fosques a temperatura ambient i seguidament s'analitza per citometria de flux.

6. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA I TÈCNiques AFINS

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) és un mètode *in vitro* per a la síntesi enzimàtica de seqüències definides d'ADN. La reacció utilitza dos oligonucleòtids (*primers*) que hibriden en cada una de les dues cadenes complementàries i que flanquegen la seqüència a amplificar (diana). Donat que els productes de l'extensió dels *primers* sintetitzats a cada cicle poden servir com a motlle en el següent cicle, el nombre de còpies de l'ADN diana aproximadament es dobla en cada cicle.

La combinació de les tècniques de retrotranscripció i PCR ha generat una nova tècnica, la RT-PCR, que possibilita una nova forma d'anàlisi de l'ARN. En la actualitat, la introducció de mètodes de seguiment de l'aparició del segment diana (amplificó) a la tècnica de la PCR ha produït un nou concepte de PCR, la PCR a Temps Real, mitjançant la qual s'aconsegueix una major sensibilitat i fiabilitat dels resultats, que permeten la quantificació absoluta del nombre de còpies del gen d'interès present en un mostra.

6.1 Purificació d'ARN

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

L'extrema fragilitat de l'ARN i la presència de RNases endògenes i exògenes, presents en la totalitat dels objectes que entren en contacte amb els éssers humans, fa necessari prendre una sèrie de mesures abans i durant la seva manipulació amb la finalitat d'evitar la contaminació i degradació de la mostra. Per a treballar amb ARN és necessari utilitzar guants i material específic lliure de RNases. El material de vidre ha d'estar

perfectament net i autoclavat, així com les puntes i pipetes utilitzades durant el procés. Les solucions es preparen a partir d'aigua tractada amb un agent que inactiva les ribonucleases, el DEPC.

Procediment:

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

Degut a la fragilitat de l'ARN és molt importat comprovar la qualitat de l'ARN obtingut, mitjançant la valoració espectrofotomètrica i l'electroforesi en gel d'agarosa. Aquests protocols es detallaran àmpliament en l'apartat de microarrays d'ADN (apartat 7.2.2) on la qualitat de l'ARN utilitzat és un punt crític.

En el cas de l'estudi de l'expressió de l'ARN dels diferents sistemes de transport de nucleòsids en cèl.lules de malalts de leucèmia limfàtica crònica i limfoma de mantell els ARN s'han obtingut en el Servei d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic utilitzant el kit Ultraspec RNA (Biotech Laboratories) i posteriorment l'ARN obtingut ha estat tractat amb DNAsa (Ambion), seguint els protocols detallats en els kits comercials.

6.2 Retrotranscripció: Síntesi d'ADNc

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

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

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

- Oligo(dT)₁₂₋₁₈: s'uneix a la cua de poli(A) endògena de l'extrem 3' dels ARNm dels mamífers. Acostuma a produir ADNc complerts (*full-length*).
- Hexanucleòtids aleatoris: s'uneixen a diversos llocs de l'ARN i generen ADNc curts. Són ideals per tal d'evitar estructures secundàries en el motlle. A més, transcriuen de forma més eficaç les regions 5' dels ARNm.
- Oligonucleòtids específics: s'uneixen únicament a l'ARN d'interès.

En aquest treball s'han utilitzat dos protocols de síntesi d'ADNc diferents. La diferència principal entre ambdós protocols és l'enzim utilitzat, el que comporta alhora una temperatura de reacció diferent, malgrat en tots dos casos es tracta d'enzims provinents de M-MLV. Ambdues reaccions s'han fet utilitzant hexanucleòtids aleatoris com a *primers*.

6.2.1. Protocol 1

La síntesi d' ADNc es realitza a partir d'1µg d'ARN total utilitzant hexanucleòtids a l'atzar com a *primers* per a la reacció de la M-MLV. Aquest protocol s'ha utilitzat en totes les PCR a temps real realitzades, excepte les validacions dels gens obtinguts en MCF7 en els microarrays de ADN, on s'ha utilitzat el protocol 2.

La reacció s'inicia amb la desnaturalització de l'ARN a 65°C durant 5 minuts. Passat aquest temps els tubs es dipositen en gel i s'hi afegeix una barreja que conté (concentracions finals) el tampó de l'enzim, DTT 1 mM, dNTPs 1 mM cada un, 100 µg/ml de *random hexamer* (Amersham Pharmacia Biotech), 0.75 U/µl de RNAsyn (Promega) i 7.2 U/µl de M-MLVRT (Gibco ref.28025), en un volum final de 40 µl. La reacció es deixa procedir durant 2 hores a 37°C i s'acaba amb la inactivació de l'enzim durant 10 minuts a 65°C.

6.2.2. Protocol 2

En aquest protocol l'enzim utilitzat ha estat la Transcriptasa Reversa SuperScript™ II (Invitrogen) que és una versió millorada de la M-MLVRT amb una menor activitat RNAsa H i una major estabilitat tèrmica. De manera equivalent al protocol anterior es parteix d'1 µg d'ARN total i s'utilitzen hexanucleòtids a l'atzar com a *primers*. Aquest protocol s'ha utilitzat per a les validacions dels gens obtinguts en els microarrays de MCF7, tant per a la PCR semiquantitativa com per a la PCR a temps real.

Es parteix d'una solució que conté 1 µg d'ARN, 250 ng de *random hexamer* i dNTPs 500 µM, i s'escalfa a 65°C durant 5 minuts per tal de desnaturalitzar l'ARN. A continuació s'hi afegeix una segona barreja que conté el tampó de l'enzim, DTT 10 mM i 1 U/µl de RNAsyn, fins a un volum final de 39.5 µl, i s'incuba a 25°C durant 10 minuts seguit de 2 minuts a 42°C. Passat aquest temps s'afegeixen 0.5 µl de l'enzim Superscript II RT i es deixa procedir la reacció durant 50 minuts a 42°C. La reacció finalitza amb la inactivació de l'enzim a 70°C durant 15 minuts.

6.3 PCR: reacció en cadena de la polimerasa

Un cop ja es disposa de l'ADNc, motlle de la reacció d'amplificació, que representa a la població d'ARNs de la cèl.lula en el moment de l'extracció, podem detectar amb una alta sensibilitat la presència d'un ARN missatger concret de manera específica utilitzant oligonucleòtids específics pels gens d'interès.

6.3.1. Factors crítics

La gran capacitat de la PCR per amplificar fins i tot una única molècula d'ADN es tradueix en què petites traces d'ADN contaminant poden servir com a motlle, apareixent en aquest cas falsos positius. Per tal d'evitar aquest tipus de contaminació s'han d'adoptar una sèrie de mesures: treballar sempre amb tubs especialment indicats per a PCR, lliures de DNases i RNases; utilitzar puntes de micropipeta amb filtre i guants en tot moment al manipular el material; esterilitzar amb llum ultraviolada el material de plàstic i les pipetes que s'utilitzaran per a la PCR. Finalment, per assegurar que no hi ha cap contaminació és important incloure en totes les reaccions un control negatiu d'amplificació en el que no s'inclouï ADN.

6.3.2. Selecció de primers

Amb la finalitat de detectar de manera específica un gen utilitzant la tècnica de PCR un dels paràmetres més importants és la selecció dels *primers*. Existeixen diversos *softwares* per al disseny de primers. En concret, s'ha utilitzat el programa Primer 3 de lliure accés *on line* (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>). En general els primers han de tenir entre 18 i 24 bases, sense estructures secundàries internes. Cal que tinguin entre 40-60% de G/C i que hi hagi una distribució equilibrada de dominis rics en G/C i A/T. No poden ser complementaris entre ells a l'extrem 3', ja que podrien formar dimers de primers. Finalment, han de tenir una temperatura de fusió (T_{melting}) similar per ambdós *primers* que permeti una temperatura d'anellament de 55-65°C.

En el cas de gens que tenen elevades homologies amb altres membres de la mateixa família, la selecció de *primers* es va fer en les regions amb menys homologia, que es van determinar utilitzant el programa d'alineament de seqüències Blast de la web de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A més, un cop seleccionats els *primers* es va comprovar, utilitzant el Blast, que les seqüències d'oligonucleòtids reconeixien únicament el gen d'interès.

En la **taula 2** s'adjunten les seqüències dels diferents gens utilitzades per a la selecció de *primers*, així com els *primers* utilitzats en la reacció de PCR.

Gen	Codi Genebank	Primer (5'-3')	Tamany amplicó
GAPDH	NM002046	Fw: TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC Rv: ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC	188 pb
TP53I3	NM004881	Fw: GTG CAC TTT GAC AAG CCG GGA GGA Rv: CAG CCT GGG TCA GGG TCA ATC CCT	346 pb
RRM2B	NM015713	Fw: CTC ATC GAG AAT GTT CAC TC Rv: CTG CCA TAA CTG CAA AAC GC	630 pb
FDXR	NM004110	Fw: GGA AAT TCC TGG TGA GGA GC Rw: CTG GAG ACC CAA GAA ATC CAC	385 pb
PPM1D	NM003620	Fw: GAG CAC TTG TGG GGT TTC ATC Rw: CCA CCA AGT CCT TCG ATT CG	347 pb
TP53INP1	NM033285	Fw: CCA TGC AAA CTG TTC CTG TT Rw: TCT CCC AGT ACA AGG AGC AG	403 pb
GADD45A	NM001924	Fw: GGA GGA AGT GCT CAG CAA AG Rw: GCA GGA TCC TCC CAT TGA GA	348 pb

Taula 2. Primers utilitzats en les reaccions de PCR semiquantitativa

6.3.3. Reacció de PCR estàndard

La reacció de PCR consta de diversos passos:

- **Desnaturalització:** Inicialment es fa una desnaturalització de 5 minuts a 95°C per tal de desnaturalitzar completament l'ADN. A més, cada cicle té un primer pas de desnaturalització que pot anar de 5 segons a 1 minut.
- **Unió dels primers (*annealing*):** La major part de les vegades la temperatura d'*annealing* ha de ser determinada empíricament. Aquest és un dels factors determinants en el disseny d'una PCR. Si la temperatura és massa alta no hi haurà unió, però si és massa baixa la unió inespecífica augmentarà enormement.
- **Extensió dels primers:** Per a fragments de fins a 3 kb l'extensió es duu a terme a 72°C. En general una extensió de 45 segons és suficient per a fragments de fins a 1 kb.
- **Nombre de cicles:** El nombre de cicles s'ha de determinar empíricament en funció de l'abundància del gen d'interès. En una PCR estàndard es pot treballar entre 25 i 40 cicles, tenint en compte que a mesura que augmenta el nombre de cicles s'acumulen productes no específics. En el cas de la PCR semiquantitativa el nombre de cicles és un factor determinant, tal i com es comentarà en el següent apartat.

6.4 PCR semiquantitativa

La tècnica de PCR a més d'utilitzar-se com una tècnica qualitativa per a analitzar la presència d'un gen d'interès es pot utilitzar com una tècnica quantitativa per a comparar l'abundància d'aquest gen entre diferents ADNc. Quan el que es realitza és una reacció de PCR estàndard en la que el producte d'amplificació es detecta mitjançant la tinció amb bromur d'etidi en un gel d'agarosa (apartat 6.4.2) es parla de PCR semiquantitativa.

Teòricament, existeix una relació quantitativa entre la quantitat de la seqüència diana inicial i la quantitat de producte de PCR a qualsevol cicle. Això és cert quan ens trobem a cicles baixos de la PCR, mentre que quan el nombre de cicles és massa alt aquesta relació desapareix. En la PCR semiquantitativa cal trobar el nombre de cicles i les condicions òptimes, en què per un costat hi ha prou amplificació per a ser detectada, però per altra banda l'augment de la quantitat de la seqüència diana és lineal.

En aquest cas també és necessari comparar l'expressió del gen d'interès amb l'expressió d'un control endogen. El control endogen ha de mantenir-se invariable entre les diferents condicions experimentals. Per al nostre estudi el gen escollit com a control endogen ha estat la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH).

Degut a la variabilitat intrínseca de cada reacció de PCR el protocol ideal per a la PCR semiquantitativa és l'amplificació en el mateix tub de reacció del gen d'interès i del control endogen. El problema que té aquest mètode és que normalment els gens utilitzats com a control endogen són molt abundants, de manera que és molt complicat trobar les condicions de linealitat pels dos gens alhora. En aquesta memòria no s'ha utilitzat aquesta aproximació, sinó que s'ha amplificat cada gen per separat. Tot i això per minimitzar la variabilitat de la tècnica cada mostra s'ha analitzat per duplicat.

6.4.1. Reacció de PCR

Un cop dissenyats els *primers* per a cada gen, es determina que aquests funcionen amb unes condicions de PCR estàndard. Si aquests funcionen correctament cal optimitzar les condicions de PCR per tal de trobar aquelles en què hi ha una relació lineal entre l'increment d'ADNc de partida i l'augment de producte d'amplificació. Generalment els paràmetres que es modifiquen són el nombre de cicles, la temperatura d'*annealing* i la concentració de *primers*.

Procediment:

Per tal de que la reacció de PCR sigui el més homogènia possible es prepara una barreja de reacció per a totes les mostres, tenint en compte que cada tub de reacció ha de contenir: tampó de l'enzim (sense $MgCl_2$), $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 10 mM (de cadascun), *primer forward* i *reverse* i 2.5 unitats de Taq polimerasa, en un volum de 47.5 μ l. La concentració de *primers* varia en funció del gen amplificant. En el nostre estudi tots els *primers* s'han utilitzat a 0.5 μ M, excepte la GAPDH que s'ha utilitzat a 0.3 μ M.

La barreja de reacció s'afegeix als tubs de PCR (dipositats en gel) i ràpidament s'hi addicionen 2.5 μ l d'ADNc diluït 20 cops. En el cas de la GADD45A, l'ADNc només es va diluir 5 cops.

El protocol d'amplificació utilitzat ha estat:

Pre-PCR	desnaturalització	94°C	5 minuts
PCR : N cicles (per cada gen)	desnaturalització	94°C	5 segons
	Unió dels primers	T _m (per cada gen)	30 segons
	Extensió	72°C	30 segons
Extensió final		72°C	7 minuts

A continuació es detallen les condicions de linealitat per a cadascun dels gens analitzats.

	GAPDH	TP53I3	RRM2B	FDXR	PPM1D	TP53INP1	GADD45A
Cicles	22	35	30	33	30	40	40
Tm	55°C	55°C	55°C	55°C	55°C	55°C	55°C

6.4.2. Electroforesi en gel d'agarosa no desnaturalitzant

Un cop finalitzada la reacció de PCR el producte d'amplificació es detecta en un gel d'agarosa no desnaturalitzant que separa els ADN en funció de la seva grandària. L'ADN es detecta per tinció amb bromur d'etidi, un potent agent mitogènic que s'intercala als àcids nucleics.

Reactius i material:

- Tampó TBE 10X: Tris base 0.89 M, àcid bòric 0.89 M i EDTA 0.02 M
- Tampó de càrrega: sacarosa 40% (p/v), cianol xilè 0.25%, blau de bromofenol 0.25%
- Agarosa
- Cubeta d'electroforesi (Gibco, Horizon 58) equipada amb sistema de voltatge
- Transiluminador UV TFW-20M (Vilber Lournat)

Procediment:

Es prepara una solució d'agarosa al 1-2 % (en funció de la mida de la banda) en tampó TBE 0.5X, es dissol en el microones i s'hi afegeix el bromur d'etidi a una concentració de 0.5 µg/µl. Un cop gelificat es corren de 5 a 10 µl del producte de PCR amb 1 µl de tampó de càrrega. Finalment, l'electroforesi s'observa en un transiluminador de llum ultravioleta. La radiació ultravioleta de 260 nm absorbida pels àcids nucleics es transmet al bromur d'etidi emetent com resultat fluorescència de color taronja de 590 nm que és proporcional a la quantitat d'àcid nucleic present.

En el cas de la PCR semiquantitativa es realitzen les densitometries de les imatges utilitzant el programa Phoretix 1D Gel Analysis.

6.5 PCR a temps real

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

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

6.5.1. Quantificació relativa de l'expressió gènica

Les reaccions de PCR a temps real venen caracteritzades pel cicle en què l'amplificació d'un determinat producte es detecta per primer cop enlloc de per la quantitat de producte acumulat després d'un determinat nombre de cicles. Quantes més còpies del gen d'interès es trobin a l'inici, abans es detectarà un increment significatiu de la fluorescència observada. En els primers cicles de la PCR hi ha pocs canvis en la fluorescència, és el que defineix una línia base. Un increment de la fluorescència per sobre de la línia base indica la detecció del producte de PCR acumulat. Empíricament es fixa un llindar (*threshold*) de fluorescència per sobre de la línia base. El paràmetre C_T (cicle llindar o *threshold cycle*) es defineix com el cicle en què la fluorescència supera el llindar fixat. Aquest és el paràmetre que permet fer la quantificació, quan menor sigui el valor de C_T major quantitat del gen d'interès hi ha a la mostra.

La PCR a temps real permet tant una quantificació absoluta del nombre de còpies de cada missatge com una quantificació relativa. En aquesta tesi doctoral es va optar per la utilització de la quantificació relativa, que es basa en la comparació de C_T . Es tracta d'una tècnica equivalent a la PCR semiquantitativa i que utilitza, per tant, un control endogen com a element normalitzador. La relació entre el C_T de la diana i el del control endogen proporciona un valor de C_T normalitzat (C_{TN}) de la diana, que serveix per a estandaritzar la quantitat de l'ARN o ADN afegit a la reacció. Per al nostre estudi s'han escollit dos controls endogens diferents en funció del tipus cel·lular analitzat. En el cas de la línia cel·lular MCF7 s'ha utilitzat el mateix control endogen que per a la PCR semiquantitativa, la GAPDH. En canvi, per a les cèl·lules derivades del sistema immunitari, tant per a les línies cel·lulars com per als cultius primaris, s'ha utilitzat la β -glucoronidasa (GUS), gen àmpliament utilitzat com a control endogen en aquests tipus cel·lulars.

Abans d'utilitzar el mètode de quantificació relativa per comparació de C_T cal realitzar un experiment de validació, per tal de demostrar que les eficiències d'amplificació de la diana i del control endogen són equivalents. Per tal de comprovar-ho s'amplifiquen dilucions seriades d'ADNc amb cadascuna de les dianes i del control endogen. Al representar el logaritme de la concentració inicial del motlle enfront la C_T , el pendent de la recta de la diana i del control endogen han de ser iguals, el que demostra que les eficiències dels dos sistemes són equivalents. En cas que no fossin paral·lels, seria impossible realitzar el mètode comparatiu i caldria treballar amb rectes estàndard per a cada placa.

6.5.2. Disseny dels primers i sondes

El disseny dels primers i sondes necessaris per a amplificar els transportadors de nucleòsids es va realitzar mitjançant el software Primer Express d'Applied Biosystems. Degut a l'homologia entre les diferents isoformes el disseny es va efectuar en les regions de menor homologia, determinades mitjançant l'anàlisi de les seqüències. Les seqüències utilitzades es mostren en la **taula 3**.

hENT1	5'-GCA AAG GAG AGG AGC CAA GA	5'-TTC ATT GGT GGG CTG AGA GTT
	FAM 5'-CAG GCA AAG AGG AAT CTG GAG TTT CAG TCT C-3' TAMRA	
hENT2	5'-CCC TGG ATC TTG ACC TGG AG	5'-GGT TTT CCT GGC TTC TGG G
	FAM 5'-AGG AGC CGG AAT CAG AGC CAG ATG A-3' TAMRA	
hCNT1	5'-TGA TTT CTT GGA AAG CCT GGA	5'-CTG CTC CTG ATC TCT GCG G
	FAM 5'-AAG GCC AGC TCC CTA GGA GTG ACT TGA G-3' TAMRA	
hCNT2	5'-AAG TAG AGC CTG AGG GAA GCA	5'-GCC CAG TCC ATC CCC C
	FAM 5'-AGG ACT GAC GCA CAA GGA CAC AGC C-3' TAMRA	
hCNT3	5'-GAG CTG TGC AAA GCA GGG A	5'-TGG AGA ATC CTG CTC AAC TGT G
	FAM 5'-CAC ACA AAC ACC AAA CAG GAT GAA GAA CAG G-3' TAMRA	

Taula 3. Primers i sondes per la detecció dels transportadors de nucleòsids per PCR a temps real

Per a la detecció dels gens utilitzats en la validació dels microarrays d'ADN, així com per als controls endògens s'han utilitzat primers i sondes predissenyats per Applied Biosystems (*Assay on Demand Gene Expression*), pel que no es disposa de la seqüència exacta. Les referències utilitzades per a cada gen són:

GEN	referència
p21/CDKN1A	Hs00355782_m1
FAS/TNFRSF6	Hs00163653_m1
AQP3	Hs00185020_m1
RPL3	Hs00167069_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
β -glucoronidasa	4310888E (<i>Pre-Developed TaqMan Assay Reagents</i>)

6.5.3. Paràmetres universals de PCR a temps real

Materials i reactius (Applied Biosystems):

- Aparell ABI PRISM 7700 Sequence Detection System
- Sondes TaqMan i *primers*
- TaqMan Universal PCR Master Mix
- ABI PRISM Optical Adhesive Cover Starter Pack
- ABI PRISM 96-well Optical Reaction Plate with Barcode

Procediment:

Cada reacció de PCR conté TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, *primers* i sonda i 2.5 µl d'ADNc en un volum final de 25 µl. Per a la detecció de GAPDH, p21, FAS, AQP3 i RPL3 l'ADNc utilitzat estava diluït 20 cops.

Per a l'amplificació de les diferents isoformes dels transportadors de nucleòsids es va utilitzar una concentració de sonda de 200 nM i de *primers* de 400 nM. Els *Assay on Demand Gene Expression* es presenten com una solució 20X on els *primers* i la sonda es troben ja a les concentracions òptimes d'utilització de manera que aquestes són desconegudes per l'usuari.

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

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

6.5.4. Anàlisi dels resultats pel mètode de comparació de C_T

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

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

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

on $\Delta C_T = C_T \text{ diana} - C_T \text{ control endogen}$

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ mostra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$

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

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

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

7. MICROARRAYS D'ADN

7.1. Introducció

L'estudi de l'expressió gènica en biologia molecular ha canviat significativament en els darrers anys, passant de l'anàlisi d'un únic gen a l'avaluació de l'expressió gènica del genoma complet. En aquest procés, la tecnologia d'arrays d'ADN, que permet l'anàlisi simultani de milers de gens en un únic experiment, hi ha tingut un paper important.

De manera similar a altres tècniques com el Northern, el *differential display* o l'anàlisi seriat d'expressió gènica (SAGE), els microarrays permeten la quantificació relativa de l'expressió gènica, amb l'avantatge d'analitzar centenars o milers de gens alhora. El concepte bàsic dels arrays és la immobilització de fragments coneguts d'ADN (sondes) en suports sòlids, amb la posterior unió de les seqüències complementaries d'aquests àcids nucleics presents en la mostra biològica d'interès.

7.1.1. Tipus de microarrays

Existeixen dos tipus principals de microarrays que es diferencien en funció del mètode de fabricació i de la natura de l'àcid nucleic immobilitzat, els microarrays d'ADN i els microarrays d'oligonucleòtids.

- Els microarrays d'oligonucleòtids es sintetitzen per fotolitografia, que consisteix en la síntesi *in situ* d'oligonucleòtids de 25 bases. En la síntesi es parteix d'una superfície de vidre coberta de quars amb un compost sensible a la llum que evita la unió del primer nucleòtid de la sonda. L'emascament litogràfic s'utilitza per a bloquejar o permetre la transmissió de la llum en localitzacions específiques del suport activant així el compost químic. A continuació la superfície s'incuba amb una solució que conté el nucleòtid d'interès que s'acoblarà només en aquelles regions on el vidre ha estat desprotegit per il·luminació. El nucleòtid presenta també un grup de protecció sensible a la llum, de

manera que el cicle es va repetint. Així, es van sintetitzant les sondes mitjançant cicles de química combinatòria. Aquesta tecnologia requereix una infraestructura molt sofisticada i la seva utilització, pel moment, està limitada a unes poques empreses especialitzades entre les que destaca Affymetrix.

- Els microarrays d'ADN es sintetitzen generalment per impressió de l'ADN en superfícies de vidre recobertes químicament per a permetre la unió de l'ADN. Aquesta unió pot ser iònica (amines o lisines) o covalent (epòxids o aldèhids). L'ADN utilitzat prové de productes de PCR, de 500 a 2500 bases, que són purificats per tal d'eliminar les sals, els primers i les proteïnes presents en la reacció de PCR. Cada punt de l'array, el que anomenarem sonda, es genera per la deposició de pocs nanolitres del producte purificat. En funció del mètode d'impressió utilitzat el diàmetre de la sonda varia entre 100 i 300 µm. En aquest tipus de microarrays es realitza una hibridació per competència entre la mostra d'interès i una de referència, marcades cadascuna amb un fluorocrom diferent (normalment Cy3 i Cy5).

7.1.2. Disseny experimental

Els microarrays són una tècnica potent per a la comparació de mostres d'ARN. El disseny experimental pot ser complex i depèn de múltiples factors, els més importants són:

- Quina qüestió biològica es pretén respondre?
- Quin tipus de mostres biològiques s'analitzaran?
- Quin tipus d'arrays s'utilitzaran?
- Quants duplicats tècnics i biològics són necessaris per a obtenir dades estadísticament significatives?

Tanmateix, tot experiment de microarray consta de diversos passos comuns (**Figura 1**):

1. Aïllament de l'ARN de les mostres biològiques.

2. Generació de les dianes marcades. Per a cada hibridació calen de 10 a 30 µg de diana marcada. En molts casos no es disposa de tanta quantitat de mostra, pel que és recomanable un primer pas d'amplificació de l'ARN (ARNa). A continuació s'efectua una retrotranscripció de l'ARNa amb l'objectiu d'obtenir les sondes d'ADN marcades fluorescentment.

3. Hibridació de les sondes marcades. El protocol d'hibridació utilitzat varia en funció de la longitud de les sondes, del tipus d'array, de la química d'immobilització utilitzada i del tipus de diana marcada.

4. Detecció del senyal i anàlisi de les dades. Els senyals dels microarrays es detecten per escaneig, utilitzant un lector de fluorescència. Aquests escàners porten associat un *software* que permet la identificació de les sondes individuals i la mesura de la intensitat de cadascuna. Les dades obtingudes han de ser normalitzades amb la finalitat d'ajustar les diferències d'intensitat. A partir d'aquí ja es poden calcular els canvis d'expressió de cada gen. L'elevada quantitat de dades que es generen fa necessària la utilització de diversos programes informàtics per tal de facilitar aquest procés.

5. Validació de les dades de l'array mitjançant tècniques alternatives.

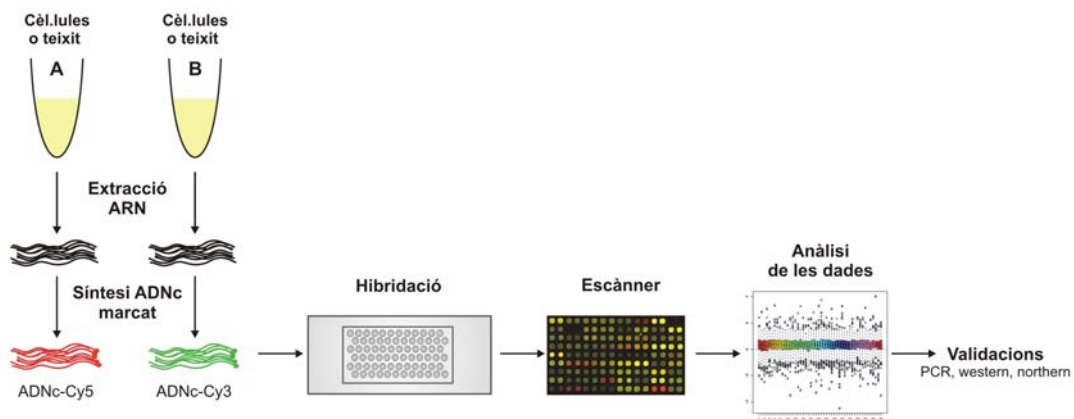


Figura 1. Esquema general d'un experiment de microarrays d'ADN

En aquesta tesi s'ha utilitzat l'OncoChip™ del CNIO. Es tracta d'un microarray d'ADN sintetitzat en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) especialment dissenyat per a l'anàlisi de gens importants en el càncer. Per aquest motiu tant el disseny experimental com els protocols utilitzats es van fer seguint recomanacions del Servei de Genòmica del CNIO.

7.2. Obtenció i amplificació de l'ARN

La puresa de l'ARN 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 de l'ADN marcat en la superfície dels arrays.

Per tal d'obtenir una extracció d'ARN òptima s'han de tenir en compte diversos factors. Tal com ja s'ha comentat prèviament, l'ARN és molt sensible a l'acció de les RNases, per tant cal utilitzar material lliure de RNases i treballar sempre amb guants. A més, a diferència del protocol detallat anteriorment, cal un protocol de precipitació per tal de purificar l'ARN i concentrar-lo per aplicacions posteriors. La resuspensió del precipitat purificat s'ha de realitzar en una solució lliure de RNases, amb un baix pH (pH=6-7) i que incorpori agents quelants, com el DEPC, per a protegir l'ARN de la degradació de les RNases. L'ARN s'ha d'emmagatzemar a -20°C, quan s'ha d'utilitzar en breu, o a -80°C per a temps llargs. Es recomana al·liquotar la solució per tal d'evitar congelacions i descongelacions successives.

7.2.1. Extracció de l'ARN

Materials i reactius:

- Kit Rneasy Mini (Quiagen)
- RNase-free DNase set (Quiagen)
- Etanol absolut i etanol 70% fred (-20°C)

- Acetat d'amoni 3 M
- Aigua-DEPC

Procediment:

Per a la extracció de l'ARN les cèl.lules MCF7 es van sembrar en flascons T-75. Un cop efectuats els tractaments corresponents es van tripsinitzar i centrifugar a 1200 rpm 4 minuts. Les cèl.lules es van congelar a -80°C fins al moment de l'extracció de l'ARN.

L'aïllament de l'ARN s'ha efectuat utilitzant el kit de Quiagen Rneasy Mini. Després del procés de lisi la mostra s'homogeneïtza amb força utilitzant xeringues d'1 ml amb agulles 23G. Aquest procés permet la fragmentació de l'ADN genòmic, que posteriorment s'eliminarà en els passos de purificació. L'aïllament s'ha realitzat utilitzant el protocol detallat en el *kit* comercial. A diferència del protocol descrit a l'apartat 6.1 aquest *kit* no incorpora el tractament amb DNasa. Per tal d'eliminar l'ADN que pugui haver quedat unit a la columna, la mostra, un cop unida a la columna, s'ha tractat amb DNasa I (RNase-free DNase set, Quiagen) durant 15 minuts. Malgrat que l'ADN contaminat no es marca fluorescentment, aquest pot actuar com a competidor en la unió a les sondes. Un cop finalitzat el temps d'incubació es renta la columna i s'elueix l'ARN en un volum de 60 µl d'aigua lliure de nucleases.

Per tal de purificar l'ARN obtingut es precipita afegint 0.1 volums d'acetat d'amoni 3M i 2 volums d'etanol absolut fred. La solució es manté a -80°C un mínim de 30 minuts o a -20°C tota la nit. Passat aquest temps es centrifuga 20 minuts a 4°C a 13000 r.p.m. El precipitat resultant es renta amb 500 µl d'etanol al 70°C fred i es centrifuga 5 minuts a 4°C a 13000 r.p.m. Finalment s'elimina l'etanol i el precipitat es deixa assecar 5 minuts a temperatura ambient. Un cop sec es resuspèn en un volum adequat d'aigua-DEPC (10-20 µl).

7.2.2. Comprovació de la qualitat de l'ARN

Tal com s'ha comentat prèviament la qualitat de l'ARN és un factor crític en els experiments de microarrays. Per aquest motiu abans de procedir amb els passos següents cal comprovar la qualitat de l'ARN obtingut, mitjançant la mesura espectrofotomètrica i l'electroforesi en gel d'agarosa.

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

Els àcids nucleics presenten un màxim d'absorció a 260 nm, mentre que les proteïnes, possibles contaminants d'una mostra d'àcids nucleics, presenten un màxim d'absorció a 280 nm. La relació entre les absorbàncies a les dues longituds d'ona proporciona informació tant de la integritat com de la puresa de la mostra. La relació òptima DO_{260}/DO_{280} es troba entre 1.7 i 2.0. Si aquesta relació és superior a 2.0 els àcids nucleics podrien estar degradats, mentre que si la relació és inferior a 1.7 indica una presència excessiva de proteïnes en la mostra. L'ARN pot tenir altres tipus de contaminacions, com els sucres que tenen un màxim d'absorció a 230 nm. Una relació

DO₂₆₀/DO₂₃₀ menor de 2 indica que la mostra té contaminació de sucres. Aquest tipus de contaminació és menys freqüent i només es dona en determinats teixits com el cervell.

Procediment:

Es dilueixen entre 0.5 i 3 µl de mostra, en funció de la concentració esperada, en 400 µl d'aigua tractada amb DEPC i es mesura l'absorbància a 260 i 280 nm en cubetes de quars. La relació DO₂₆₀/DO₂₈₀ indica la qualitat de l'ARN, mentre que l'absorbància a 260 nm dona la concentració d'àcids nucleics, utilitzant la fórmula detallada a continuació:

$$[\text{Àcid nucleic}]_{(\mu\text{g}/\mu\text{l})} = \frac{\text{D.O.}_{260\text{nm}}}{\varepsilon} \times \frac{(400 + X)\mu\text{l a la cubeta}}{X \mu\text{l mostra}}$$

on $\varepsilon = 25 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ per ARN i ADN de cadena senzilla

$\varepsilon = 20 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ per ADN de cadena doble

7.2.2.2. Integritat de l'ARN: electroforesi en gel d'agarosa

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

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

Solucions:

- Tampó de càrrega desnaturalitzant: glicerol 50%, EDTA 1 mM, blau de bromofenol 0.4 %, cianol xilè 0.4%

Procediment:

El protocol d'electroforesi en gel d'agarosa de l'ARN és el mateix que s'ha detallat per l'anàlisi dels productes de PCR en l'apartat 6.4.2. En aquest cas, però, s'utilitza un tampó de càrrega desnaturalitzant i les mostres d'ARN amb el tampó de càrrega es poden escalfar a 65°C durant 5 minuts i posar ràpidament en gel abans de carregar, per tal de desnaturalitzar els ARN presents en la mostra.

7.2.3. Amplificació de l'ARN

Una limitació de la tècnica de microarrays és l'elevada quantitat d'ARN necessària per a la hibridació. Per a obtenir una fluorescència adequada calen de 50 a 200 µg d'ARN total o de 2 a 5 µg quan s'utilitza ARN missatger. Una alternativa per solucionar aquest problema és la producció de múltiples còpies d'ARN utilitzant ARN polimerases de fags, altament eficients.

El protocol utilitzat en aquesta memòria consta de dos passos (**Figura 2**). Inicialment es realitza una retrotranscripció de l'ARN utilitzant com a *primer* Oligo(dT)₁₂₋₁₈, de manera que només s'unirà a les cues de poli-A de l'ARNm. Aquest *primer* porta unit una seqüència d'ADN que conté el promotor T7, de manera que en un segon pas s'amplifica l'ARN a partir de l'ADNc sintetitzat mitjançant l'ARN polimerasa T7. Es tracta d'una amplificació lineal de l'ADNc a ARN sense afectar la abundància relativa. El procés d'amplificació permet incrementar fins a 2000 cops l'ARN de partida, tot i que la longitud dels fragments sintetitzats és menor.

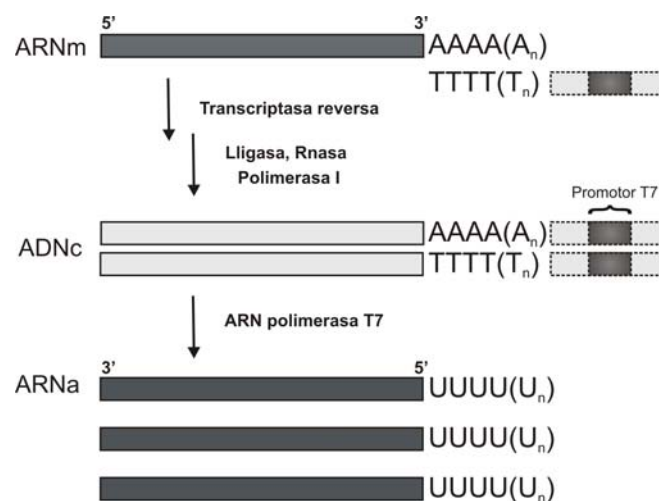


Figura 2. Esquema d'amplificació de l'ARN

Reactius:

- Oligo-T7-(dT)₂₄ (Ambion, Cat. 5710)
- RNasin ribonuclease Inhibitor (Promega)
- Kit SuperScript™ II RnaseH⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18064-022)
- dNTPs 10 mM
- *second strand buffer* (Invitrogen)
- ADN lligasa d'*E.coli*
- ADN polimerasa I d'*E.coli*
- RNasa H d'*E.coli*
- Tubs Phase Lock Gel Light (PLG; Eppendorf)
- Barreja fenol/cloroform (Ambion)

- Acetat d'amoni 3 M
- Etanol absolut i 70% (-20°C)
- Acrilamida lineal (Ambion, Cat. 9520)
- Megascript® T7 kit (Ambion, Cat. 1333)
- DNasa I
- Trizol (Gibco)
- Cloroform
- Isopropanol

Procediment

- Síntesi de la primera cadena d'ADNc. S'incuben 3 µg d'ARN amb 1 µl d'oligo-T7-(dT)₂₄ en un volum final de 5 µl, a 70°C durant 10 minuts. Mentre es fa la incubació es prepara una barreja que contingui per cada tub: 2 µl de *first strand buffer*, 1 µl de DTT 0.1 M, 0.5 µl de dNTPs (10mM) i 0.5 µl de RNasin. La barreja es precalenta 2 minuts a 42°C i s'hi afegeix 1 µl de la Transcriptasa Reversa Superscrip II. Un cop transcorreguts els 10 minuts d'incubació s'afegeix a cada tub 5 µl de la barreja que conté l'enzim i s'incuba a 42°C durant 1 hora.

- Síntesi de l'ADNc de cadena doble. En el tub en el que s'ha produït la síntesi de la primera cadena d'ADN s'afegeixen: 45 µl d'aigua lliure de RNases, 15 µl de *second strand buffer*, 1.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl d'ADN lligasa d'*E. Coli* (10 U/µl), 2 µl d'ADN polimerasa I (10 U/µl) i 0.5 µl de RNasa H (2 U/µl). És molt important mantenir tots els reactius en gel, ja que la lligasa i la polimerasa s'inactiven al superar la temperatura de 16°C. La reacció de síntesi té lloc a 16°C durant 2 hores.

- Purificació de l'ADNc de cadena doble. Un cop finalitzada la reacció s'afegeixen 75 µl d'aigua (lliure de RNases) i la barreja es col·loca en tubs PLG, que faciliten la separació de les fases, prèviament centrifugats. S'hi afegeixen 150 µl d'una barreja fenol/cloroform i es centrifugen els tubs durant 15 minuts a 4°C a 12000 r.p.m. La fase aquosa, que correspon al sobrenedant, es traspasa a un tub nou, s'hi afegeixen 75 µl d'acetat d'amoni 3 M i 375 µl d'etanol absolut fred i es deixa precipitant a -80°C durant 1 hora. Transcorregut aquest temps s'afegeix 1 µl d'acrilamida lineal (5 µg/µl) i es centrifuga 45 minuts a 4°C a 13000 r.p.m. L'acrilamida lineal és una substància inert que actua com a coprecipitant, facilitant la recuperació d'àcids nucleics durant la precipitació amb etanol. El *pellet* resultant es renta amb etanol fred al 70% i es torna a centrifugar 10 minuts. Finalment, s'elimina amb molta cura el sobrenedant, es deixa assecar el precipitat i es resuspèn en 9 µl d'aigua lliure de RNases.

- Amplificació mitjançant l'ARN polimerasa T7. Es prepara una barreja de reacció que conté 2 µl del tampó de la polimerasa i 2 µl de cada nucleòtid (ATP, CTP, GTP, UTP). Es barregen 10 µl de la barreja de reacció amb 8 µl de l'ADNc sintetitzat i s'hi afegeixen 2 µl de l'ARN polimerasa T7. La reacció es deixa procedir a 37°C durant 14 hores (com a màxim). Un cop finalitzada s'hi afegeix 1 µl de DNasa, per eliminar l'ADNc, i s'incuba 30 minuts a 37°C.

- **Purificació de l'ARN.** Es preparen tubs amb 1 ml de Trizol. Es passa la solució d'ARN al tub amb Trizol i es barreja pipetejant. S'hi afegeixen 200 µl de cloroform, es barreja per inversió i s'incuba 5 minuts a temperatura ambient. El tub es centrifuga 30 minuts a 4°C a 13000 r.p.m. i es recupera la fase aquosa. A continuació s'hi afegeixen 500 µl d'isopropanol, s'agita per inversió i es deixa precipitant 10 minuts a temperatura ambient. Transcorregut el temps de precipitació es centrifuga 40 minuts a 4°C a 13000 r.p.m. El precipitat resultant es deixa assecar i es resuspèn en 11 µl d'aigua (lliure de RNases).
- **Qualitat de l'ARN.** La qualitat de l'ARN obtingut es mesura per quantificació espectrofotomètrica, tal i com es detalla a l'apartat 7.2.2.1. També es pot córrer un gel d'agarosa, en aquest cas però, no s'observen les bandes ribosomals, ja que únicament s'ha amplificat ARN missatger, sinó que s'ha de veure una banda contínua. Si només es detecten bandes de pesos baixos significa que l'ARN està degradat.

7.3. Síntesi i marcatge de l'ADNc

L'anàlisi d'expressió utilitzant microarrays d'ADN es fa generalment per hibridació competitiva de dues dianes, la mostra d'interès i la mostra de referència, cadascuna marcada amb un fluorocrom específic. Al tractar-se d'un mètode de quantificació relativa un punt molt important del disseny experimental és l'elecció de la mostra de referència.

7.3.1. Control de referència

Existeix un elevat nombre possibilitats a l'hora d'escollir la mostra de referència que dependran del tipus d'experiment que es vol realitzar. L'opció més utilitzada és la comparació de totes les mostres a una mostra de referència comú. Aquest pot ser un control directe de l'experiment, com cèl.lules parentals, cèl.lules a temps 0 del tractament, cèl.lules sanes o fins i tot una barreja de mostres control. L'altra possibilitat és la utilització d'una referència universal, que és generalment una barreja d'ARN de diferents línies cel.lulars. L'avantatge d'aquest control és que al tractar-se d'ARNs comercials permeten la comparació entre diferents experiments de microarrays.

En aquesta memòria s'ha utilitzat com a mostra de referència un control universal (*Universal Human Reference RNA*, Stratagene, Cat. 740000). Aquest ARN està format per quantitats equivalents d'ARN de 10 línies cel.lulars humanes derivades d'adenocarcinoma de glàndula mamària, hepatoblastoma, adenocarcinoma de cèrvix, carcinoma embrional de testicle, glioblastoma, melanoma, liposarcoma, limfoma histiocític, leucèmia limfoblàstica de cèl.lules T i mieloma de cèl.lules B. L'ARN va ser tractat seguint el protocol comercial i posteriorment es va amplificar tal i com es detalla a l'apartat 7.2.3. per tal d'obtenir un ARN comparable a les mostres problema.

7.3.2. Fluorocroms

Existeixen diferents tipus de marcatge de l'ADNc. El més comú, i el que s'ha utilitzat en aquest memòria, és el marcatge directe, que consisteix en la utilització dels fluorocroms Cy3 i Cy5 conjugats a un nucleòtid, generalment dUTP.

El principal problema del mètode directe és que els fluorocroms utilitzats són compostos relativament grans, pel que és necessari l'ús de retrotranscriptases amb una elevada eficàcia. 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'altra fent el marcatge invers.

7.3.3. Preparació de l'ADNc fluorescent a partir d'ARN amplificat

Reactius:

- Hexanucleòtids aleatoris (Promega C1181)
- Kit SuperScript™ II RnaseH⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18064-022)
- dNTPs
- FluoroLink Cy5-dUTP (Amersham, PA55022)
- FluoroLink Cy3-dUTP (Amersham, PA53022)
- RNasin ribonuclease Inhibitor (Promega, N2115)
- NaOH i HCl 0.1 N
- Human COT-1 DNA (Invitrogen, 15279-011)
- CyScribe™GFX™ Purification Kit (Amersham, 27-9606-01)
- Acetat d'amoni 3 M
- Etanol absolut i 70% (-20°C)
- Microarray hibridation buffer, SlideHyb#1 (Ambion, 8861)
- RNA_{polyA} (Sigma, P9403)
- Yeast tRNA (Invitrogen, 15401-011)

Procediment:

- Reacció de retrotranscripció. Per a cada hibridació prevista es preparen dos tubs, un amb la mostra problema i l'altra amb la mostra de referència, on s'afegeixen 3 µg de l'ARN amplificat i 3 µl d'hexanucleòtids aleatoris (1.5 µg) en un volum de 13 µl. L'ARN es desnatura 10 minuts a 70°C. Passat el temps, els tubs es col·loquen ràpidament en gel i es deixen refredar.

Mentre es realitza la incubació es preparen dues barreges de reacció, una per a Cy5 i l'altra per a Cy3, que contenen (per cada tub): 5 µl de *first-strand buffer*, 2.5 µl DTT (0.1 M), 0.5 µl dNTPs 50X, 1.5 µl de Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (10 mM), 0.75µl RNasin (40 U/µl) i 1.25 µl SuperScript II (200 U/µl). La barreja de dNTPs s'ha preparat prèviament a una concentració d'us 50X i està formada per dATP 25 mM, dCTP 25 mM, dGTP 25 mM i dTTP 5 mM. La concentració de dTTP és menor per a corregir la quantitat de d'UTP marcat que s'hi afegeix.

Un cop les mostres desnaturalitzades s'han refredat, s'afegeixen 11.5 µl de cada barreja Cy3 o Cy5 a les seves respectives mostres d'ARN en funció del marcatge previst i s'incuben 2 hores a 37°C.

- Degradació de l'ARN motlle. Afegir 12.5 µl de NaOH 0.1 N a cada tub i incubar a 70°C durant 10 minuts. Un cop finalitzada la degradació, el pH es neutralitza afegint 12.5 µl de HCl 0.1 N.
- Purificació de la mostra marcada. La purificació es realitza utilitzant les columnes GFX d'Amersham i seguint el protocol detallat en el *kit* comercial. Un cop finalitzat el procés l'ADN s'elueix en 60 µl de tampó d'elució. La recuperació de l'ADNc unit a la columna pot incrementar-se si el tampó d'elució s'escalfa a 65°C.
- Precipitació de la mostra marcada. Els ADNc (marcats amb Cy3 i Cy5) que van a hibridar-se junts es combinen en un mateix tub i s'afegeixen 20 µl de l'agent bloquejant *Human COT-1 DNA* (1 µg/µl). La mostra es deixa precipitant 1 hora a -80°C després d'afegir 0.1 volums d'acetat sòdic 3 M i 2.5 volums d'etanol absolut fred. Finalitzat el procés, es centrifuguen els tubs *ependorf* a velocitat màxima durant 15 minuts a 4°C, s'elimina exhaustivament el sobrenedant i es deixa assecar el precipitat 5 minuts a temperatura ambient. El color del precipitat obtingut indica si el marcatge ha estat homogeni. Una incorporació eficient dels dos fluorocroms ha de donar un *pellet* de color lila, mentre que un excés de Cy3 dona un *pellet* rosat i un excés de Cy5 un *pellet* blavós. A no ser que s'observi un gran excés d'un dels fluorocroms es continua endavant amb el procés d'hibridació, ja que les diferències de marcatge es corregiran en el procés de normalització, que es detalla en l'apartat 7.6.

Finalment l'ADN purificat es resuspèn en 42 µl d'*Ambion SlideHyb Hybridation Buffer*. El tampó és força viscos, per tant, per a evitar la formació de bombolles l'ADN es dissol en un bany a 55°C 5 minuts, sense pipetejar ni vortejar. Un cop dissolt s'afegeixen 2 µl d'agents bloquejants (barreja d'ARN_{polyA} 5 µg/µl i ARN_t de llevat 2 µg/µl). Just abans d'aplicar l'ADN en el microarray es desnaturalitza durant 3 minuts a 95°C.

7.4. Hibridació amb microarrays

Tal com s'ha comentat prèviament, el protocol d'hibridació que cal utilitzar varia en funció del tipus d'array i de mostres utilitzades. Per tant és necessari un procés previ per tal de posar a punt les condicions òptimes d'hibridació, on el paràmetre més important és la temperatura d'hibridació. En el cas concret de l'array utilitzat, l'OncoChip™ del CNIO, el protocol d'hibridació ja havia estat posat a punt pel Servei de Genòmica del CNIO.

7.4.1. OncoChip™

L'OncoChip™ del CNIO és un microarray d'ADN especialment dissenyat per a l'anàlisi de gens involucrats en el càncer. En aquesta tesi s'ha utilitzat la versió 2.0 formada per 11,500 clons d'ADNc que corresponen a 9300 gens col.locats en un total de 27,648 sondes. Els clons estan impresos com a mínim per duplicat en una superfície de vidre de 25x75 cm².

Els gens que comprenen l'OncoChip es poden classificar en diferents grups en funció del criteri de selecció que s'ha seguit. El primer grup de gens, que correspon aproximadament a un 40% del total, està format per gens amb una funció molecular coneguda, en processos com l'apoptosi, l'angiogènesi, l'adhesió, etc. Un percentatge similar està format per gens específics de teixit (tant normals com neoplàsics), seleccionats pel seu patró d'activació en diferents teixits. La resta són un grup de marcadors de localització citogenètica, d'interès per a estudis d'associació de malalties amb regions cromosòmiques que puguin patir alteracions. D'aquesta manera, es disposa d'un marcador per a cada megabase de distància cromosòmica. Finalment, hi ha controls negatius i positius. Els controls positius són una llista de 68 gens *housekeeping* amb una expressió, teòricament, similar en tots els teixits i estats. Els controls negatius són un petit grup de gens d'altres espècies, com *E.coli* o *Arabidopsis thaliana*. Addicionalment, també hi ha punts amb aigua, tampó o controls negatius de PCR. La llista de gens es pot trobar a: <http://bioinfo.cnio.es/data/oncochip>.

7.4.2. Hibridació en l'OncoChip™

Material:

- cambra de buit
- forn d'hibridació o incubador (a la T d'hibridació)
- Hybri-slips 22x60mm (Sigma, Z37.027-4)
- Cambres d'hibridació (Corning, 2551)
- Caixes opaques per a porta-objectes (Shandon, 1001362)
- Cistelles i recipients per a la tinció de cubre-objectes

Solucions:

- SSC 20X: 175g NaCl + 88g citrat sòdic en 1 litre. pH=7 (amb HCl 1N)
- Solució de pre-hibridació: SSC 4X + SDS 0.1% + BSA 0.002%
- Tampó de rentat 1: SSC 2X + SDS 0.5%
- Tampó de rentat 2: SSC 0.5X + SDS 0.5%

En la preparació de les solucions amb SSC és important afegir primer l'aigua per evitar que el SSC precipiti. Un cop preparades les solucions de rentat s'escalfen a la temperatura d'hibridació fins al moment de la utilització.

Procediment:

- Rentat dels vidres. Els vidres es renten dos cops durant 5 minuts amb SDS 0.1% en agitació suau en un agitador orbital. Un cop finalitzats els rentats s'elimina el SDS amb aigua. El rentat té com objectiu evitar els "cometes" després de la hibridació.
- Desnaturalització de les sondes. Es deixen els vidres en un bany amb aigua bullint durant 2 minuts (en el microones). Després d'esbandir-se amb aigua a temperatura ambient s'introdueixen en tubs de plàstic de 50 ml i s'assequen per centrifugació 5 minuts

a 800g. S'ha d'anar en compte de col·locar els vidres amb l'etiqueta del codi de barres cap avall, per tal d'evitar que amb la centrifugació la cola de l'etiqueta vagi sobre les sondes.

- **Pre-hibridació.** Els vidres s'incuben amb la solució de pre-hibridació durant 45-60 minuts a 65°C. Un cop finalitzat el temps s'esbandeixen amb aigua a temperatura ambient i es torna a repetir el procés de desnaturalització de les sondes.

Els passos detallats fins ara es poden realitzar en paral·lel amb el marcatge de les mostres (apartat 7.3.3.) de forma que s'arribi al pas d'hibridació un cop finalitzi el marcatge de les sondes.

- **Hibridació.** La mostra marcada, obtinguda en l'apartat 7.3.3., es diposita amb molta cura sobre la cara impresa de l'array. Per evitar una distribució heterogènia de la mostra en la superfície de l'array es recomana dipositar la barreja en varies zones de l'àrea impresa del vidre. Ràpidament per prevenir l'evaporació i la precipitació de la solució d'hibridació, però a la vegada amb cura perquè aquesta no es desbordi i apareguin bombolles, es col·loca el cubre (*Hybri-slips*) sobre la superfície impresa. El vidre es diposita en la seva cambra d'hibridació, en la que prèviament s'han omplert els pous amb aigua (12.5 µl) per evitar l'evaporació, i es segella. La hibridació es realitza a 42°C durant 15-20 hores.

- **Rentats.** Durant els rentats és molt important prevenir l'assecat dels vidres per evitar un elevat soroll de fons. A més, és convenient fer els rentats protegint els vidres de la llum, pel que es recomana protegir els recipients amb paper d'alumini. Un cop finalitzada la hibridació s'obre amb molta cura la cambra d'hibridació i es treu el cubre submergeint el microarray en 50 ml del tampó 1 de rentat (pre-calentat a 42°C). Es fa un primer rentat de 15 minuts amb uns 600 ml de tampó 1. Els primers 10 minuts es fan a l'estufa a 42°C i els darrers 5 en un agitador orbital a temperatura ambient. Els 15 minuts de rentat es repeteixen dos cops més amb tampó 1 nou. A continuació es fan tres rentats amb el tampó 2 de la mateixa manera que els rentats anteriors. Un cop finalitzats els rentats els vidres s'assequen per centrifugació a 800g durant 5 minuts i es guarden en recipients protegits de la llum. A partir d'aquest moment ja es poden escanear.

7.5. Anàlisi de les imatges i extracció de les dades

Una vegada finalitzada la hibridació cal convertir la diferent unió dels ADN als microarrays en valors numèrics amb els que poder treballar. A partir d'aquest moment finalitza la feina de laboratori i comença l'anàlisi informàtica de les dades.

7.5.1. Escanneig

L'escaneig del microarray, on s'ha hibridat una barreja d'una mostra control i una problema cadascuna marcada amb un fluorocrom diferent (Cy3 i Cy5), permet determinar la unió de les mostres a cada sonda. En aquesta memòria els arrays s'han escanear utilitzant l'escàner Scanarray 5000 XL (GSI Lumonics), en el Servei de Biotecnologia del CNIO.

El fluorocrom Cy3 té un màxim d'absorció a 550 nm i un màxim d'emissió a 570 nm, emetent una fluorescència de color verd. Mentre que Cy5 presenta un màxim d'absorció a 649 nm, un màxim d'emissió a 670 nm i una fluorescència de color vermell. En ajuntar les dues fluorescències s'observa que cada sonda presenta un color o un altre en funció de si el gen de la sonda s'expressa més en una mostra que en una altra. De manera que si la mostra marcada amb Cy3 té major expressió que la marcada amb Cy5 la sonda es veurà verda, en cas contrari es veurà vermella i si les dues mostres tenen el mateix nivell d'expressió d'aquell gen la sonda es veurà groga (**Figura 3**).

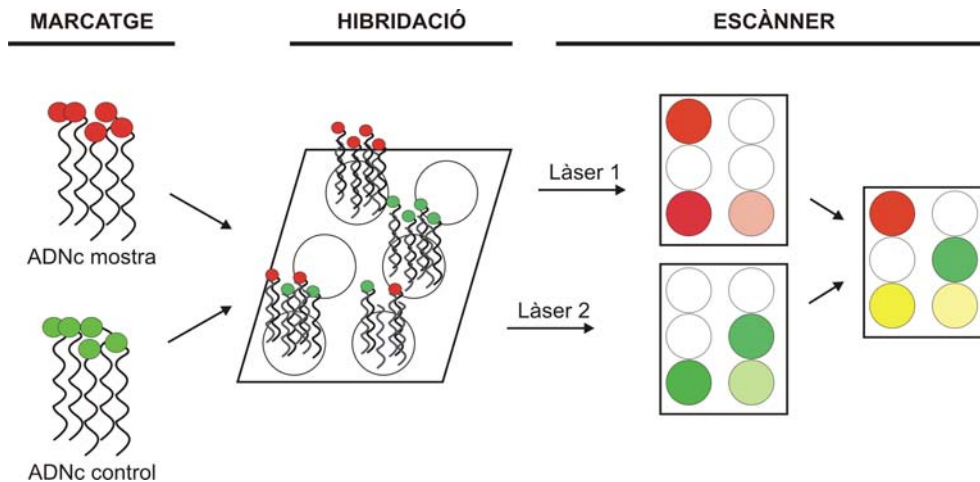


Figura 3. Esquema de les imatges obtingudes en un microarray

Malgrat que el que interessa és una superposició de la fluorescència dels dos fluorocroms, la detecció de la fluorescència emesa es fa per a cada fluorocrom per separat, obtenint d'aquesta manera dues imatges, una per Cy3 i l'altra per Cy5 que s'analitzen de manera conjunta posteriorment. En l'adquisició de les imatges és important arribar a uns valors d'intensitat del làser i del voltatge que donin unes intensitats raonables, el que suposa un compromís entre els punts de baixa intensitat i els saturats.

7.5.2. Quantificació: GenePix

Com s'ha comentat prèviament, una vegada escanejats els arrays s'obtenen dues imatges, corresponents als fluorocroms Cy3 i Cy5. Aquestes imatges han de ser analitzades per a identificar i quantificar la fluorescència de cada sonda. Generalment els escàners proporcionen alhora softwares per al processat de les imatges. En el nostre cas s'ha utilitzat el programa GenePix 4.0 (Axon Instruments, Inc.)

El primer pas per a processar les imatges escanejades consisteix en assignar les coordenades per a cada sonda. Després d'obrir les imatges corresponents a Cy3 i Cy5 alhora, es crea una plantilla de l'array que localitza totes les sondes. L'OncoChip vs 2.0 està format per 4 columnes x 12 files de blocs, on cada bloc té 24 x 24 sondes. El que fa un total de 27,648 sondes. El programa ajusta automàticament els blocs a les sondes, però

no ho fa de manera molt exacta, pel que s'ha de comprovar manualment els punts que estan mal ajustats i eliminar aquells que no donen una imatge correcta, bé per una mala impressió o bé per una mala hibridació (**Figura 4**).

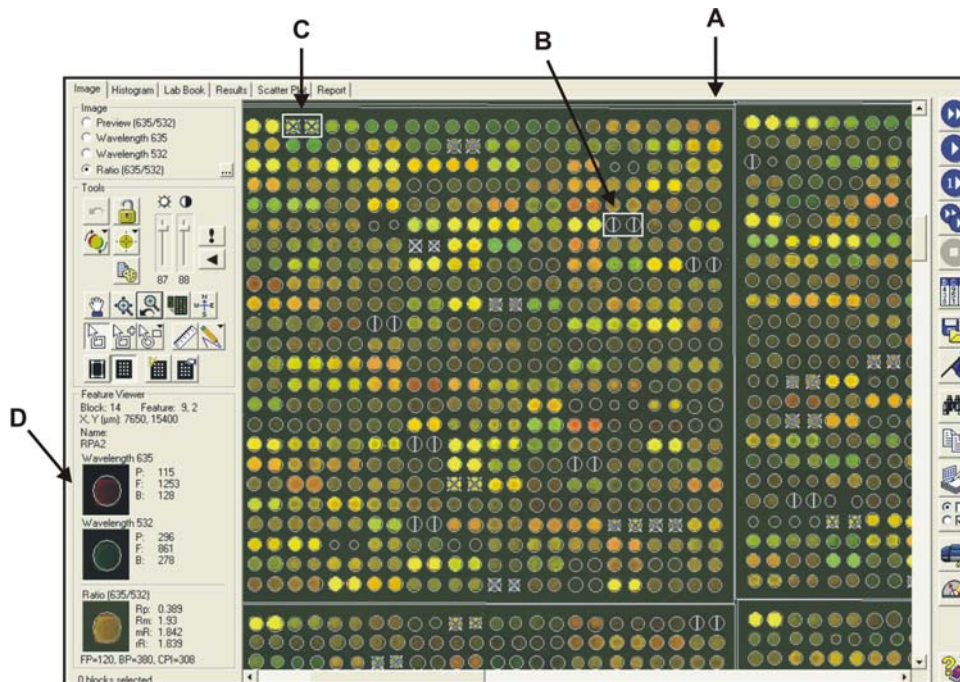


Figura 4. Imatge del GenePix. **A.** Plantilla d'un bloc format per 24 x 24 sondes. **B.** Punts eliminats automàticament pel programa per la baixa intensitat de marcatge en els dos canals ("no trobats"). **C.** Punts eliminats manualment perquè la imatge no és correcta. **D.** Imatge en els dos canals i la superposició de les dues imatges d'un punt concret.

El segon pas de l'anàlisi de les imatges és la segmentació, que consisteix en identificar quins *pixels* corresponen al punt (*foreground*) i quins són soroll de fons (*background*). L'ajustament del fons és necessari perquè la mesura de les intensitats de cada punt inclou una contribució deguda a les hibridacions no específiques de la mostra. El procediment més utilitzat per a eliminar el soroll de fons consisteix en restar la intensitat de fluorescència mesurada al voltant del punt, deixant una regió de 2 pixels al voltant del punt, que no es considera ni intensitat de la sonda ni soroll de fons (**Figura 5**).

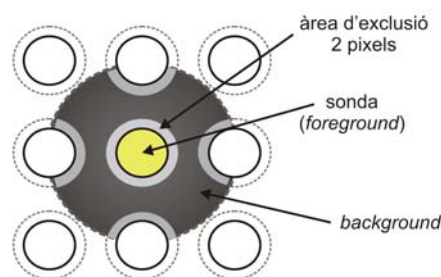


Figura 5. Esquema del background les sondes

7.6. Normalització: DN MAD

Un cop analitzades les imatges el *software* genera per a cada array una base de dades que inclou la intensitat de les sondes i el seu soroll de fons, per a cada fluorocrom. Tanmateix encara són dades amb les que no es pot treballar, perquè les intensitats Cy3 i Cy5, corresponents a la mostra d'interès i al control, es troben per separat. A més, és necessari un procés de normalització dels valors, ja que les diferents eficiències en el procés de marcatge i en la detecció de la fluorescència dels dos canals, així com, les diferències en la quantitat inicial d'ARNm o problemes en la manipulació de les mostres causen desviacions sistemàtiques de les mesures. Per aquest motiu, els valors d'intensitat pels canals verd i vermell han de ser normalitzats abans de procedir amb l'anàlisi.

El procés de normalització es basa en l'existència d'algun punt de referència. Aquesta referència pot ser externa, quan s'utilitzen *spikes*, que són sondes d'altres organismes o específiques d'ARNs sintètics que s'afegeixen en el moment del marcatge. La utilització d'una referència interna es basa en l'assumpció de que la majoria de gens no canvien de manera diferencial i que el nombre de gens que augmenten els seus nivells d'expressió és similar al nombre de gens que els disminueixen. Per tant, assumint que la quantitat d'ARNm afegida és la mateixa, la intensitat total dels canals verd i vermell han de ser iguals. Aquesta és l'aproximació més senzilla, però n'hi ha d'altres, com per exemple utilitzar com a valors normalitzadors els gens *housekeeping*, l'expressió dels quals teòricament no canvia. Una vegada escollit el mètode de normalització és important utilitzar el mateix mètode per a tots els arrays.

Malgrat que el programa GenePix 4.0 permet també la normalització de les dades, en aquesta memòria s'ha utilitzat el programa de normalització DN MAD (<http://dnmad.bioinfo.cnio.es>) (Vaquerizas et al., 2004) creat en la Unitat de Bioinformàtica del CNIO. Aquest mètode utilitza la majoria de gens per a la normalització, assumint per tant que la majoria de gens no s'expressen de manera diferencial i que el nombre de gens que augmenten i disminueixen els nivells d'expressió són similars.

Procediment:

Una vegada finalitzat l'anàlisi de les imatges en el GenePix es crea un arxiu de text de cada array que contingui:

- les dades de localització del punt (bloc, columna, fila)
- nom del gen
- número d'identificació del gen (ID)
- mitjana del *foreground* 635 (vermell)
- mediana del *background* 635
- mitjana del *foreground* 532 (verd)
- mediana del *background* 532

El programa permet introduir l'arxiu de tots els arrays alhora. A continuació, es trien les opcions de normalització:

- Utilitzar flags. Els *flags* són aquells punts que s'han marcat com no correctes en el GenePix. La utilització de *flags* implica que aquests valors no s'utilitzin en el procés de normalització. Els punts que s'exclouen de la normalització normalment són punts que tampoc es volen utilitzar per a posteriors anàlisis. Si aquest és el cas, el programa permet convertir aquests punts en NA (valors perduts) en l'arxiu final.

- Utilitzar subtracció del background. Si es tria aquesta opció, que és el més freqüent, es resta a la intensitat del punt (*foreground*) la mitjana del fons (*background*). Si no, el valor utilitzat és directament la intensitat del punt que proporciona el GenePix.

Un cop escollides les opcions de normalització el programa genera un full de text amb tots els arrays normalitzats. D'aquesta manera es disminueix en gran mesura el nombre de dades que es manipula, ja que es passa de tenir un full de text per cada array amb el *foreground* i el *background* per cada canal a un full de text amb una única columna per array. A més, els valors venen donats en logaritme en base 2. L'avantatge d'utilitzar aquesta transformació és que els increments i repressions en l'expressió tenen una escala simètrica. Per exemple, abans de la transformació un canvi en un factor de 4 era 4 per increments i 0.25 per disminucions, mentre que després de la normalització el factors són 2 i -2 respectivament.

El programa proporciona a més tres tipus de representacions dels arrays abans i després de normalitzar. Addicionalment, de cada array mostra les imatges de tots els blocs, el que pot permetre la detecció d'arrays o regions de l'array danyats.

7.7. Processat de les dades

Els càlculs que es realitzen, amb els valors normalitzats, varien en funció del disseny experimental. En el nostre cas es van relativitzar les diferents condicions al control de cèl.lules sense tractar, ja que fins ara estaven referides al control universal.

Malgrat que s'ha disminuït considerablement el nombre de dades amb el que es treballa, el full de càlcul continua tenint tantes files com sondes hi havia a l'array, és a dir 27,648. Cal doncs, un programa que permeti l'anàlisi d'aquestes dades per tal d'obtenir l'objectiu, una llista de gens que canvien el seu nivell d'expressió degut al tractament. Existeixen diversos programes que permeten fer aquest tipus de càlculs. En el nostre cas s'ha utilitzat un programa de processat de dades creat en la Unitat de Bioinformàtica del CNIO (<http://gepas.bioinfo.cnio.es/cgi-bin/preprocess>).

El programa té varies aplicacions:

1. Càlcul de logaritme en base 2. S'ha de tenir en compte que el DNMD ja fa el logaritme de les dades, per tant si s'utilitza directament les dades procedents de la normalització no s'ha d'utilitzar aquesta opció.

2. Eliminar els duplicats inconsistents. El microarray utilitzat té tots els ADNc com a mínim per duplicat. El programa detecta aquells punts que tenen el mateix nom i elimina els que tenen un màxim de distància, és a dir, una discrepància massa gran, que marca l'usuari, generalment 1 (en log2).

3. Unir replicats. Una vegada eliminats aquells replicats inconsistents es fa la mitjana o la mediana.

4. Filtrar els valors perduts. En el GenePix s'han eliminat aquells punts que no eren correctes. Si s'han utilitzat arrays impresos de manera consecutiva i el problema era una mala impressió segurament s'hauran eliminat en la majoria d'arrays hibridats. Un excés de valors perduts pot produir problemes en el posterior anàlisi de dades. Per aquest motiu és recomanable eliminar aquells gens que no tenen com a mínim un 70% dels valors.

5. "Imputar" els valors perduts. A part d'eliminar els gens que tenen massa valors perduts també es pot intentar trobar els valors que falten, ja que hi ha programes d'anàlisis posteriors no permeten espais buits. Hi ha diversos mètodes:

- omplir tots els buits amb un 0
- omplir el buit amb la mitjana dels valors d'aquell gen
- omplir el buit amb la mediana dels valors d'aquell gen
- utilitzar el valor KNN. Aquest mètode busca gens que segueixen un patró similar al gen al que es vol imputar el valor i utilitza com a dada el promig dels valors dels gens que ha trobat. El nombre de gens que s'analitza el marca l'usuari (generalment s'utilitzen 15). Aquest mètode és el millor dels quatre, però requereix tenir suficients patrons complets per a trobar patrons similars al gen d'interès.

6. Filtrar patrons plans. És desitjable eliminar aquells gens que segueixen un patró pla, és a dir, que la seva expressió no varia, ja que no es pot distingir el senyal del soroll de fons. A més, si no es filtren els patrons plans la llista de gens que s'obté en l'anàlisi podria continuar essent massa complexa d'analitzar. Hi ha diferents funcions per filtrar els patrons plans depenent del que es consideri com a pla:

- càlcul de la desviació estàndard
- càlcul del RMS, que indica com s'allunyen els patrons del 0
- càlculs del nombre de pics: es defineixen uns llindars al voltant de zero i es detecta quants gens surten d'aquests llindars. El llindar es dona en logaritme en base 2, per tant, un llindar d'1 correspondria a un augment del doble o una disminució de la meitat en l'expressió del gen. Per exemple, si s'escull com a llindar 1 i com a pic 2, s'obtidrien aquells gens que varien com a mínim en dues condicions en un valor d'1

7. Eliminar els gens desconeguts. Aquesta opció es pot utilitzar quan l'usuari està interessat en un tipus de gens concrets. En aquest cas s'introdueix un arxiu amb la llista de gens d'interès i el programa elimina els gens que no estan en aquella llista.

8. Estandardització de patrons. Aquesta opció s'utilitza per a convertir tots els patrons de dades en valors amb un mateix rang, per a facilitar la comparació. Només s'utilitza quan es volen calcular correlacions amb un programa de *clusters* que només mesura

distàncies euclídees. Consisteix en restar la mitja del patró a cada valor i dividir el resultat per la desviació estàndard.

Les opcions de processat varien en funció de la posterior anàlisi de les dades, principalment quan es volen fer anàlisis d'agrupacions (*clustering*), ja que cada procediment requereix uns patrons determinats, tal i com es comentarà en el següent apartat. Tanmateix, el processat de les dades pot proporcionar una llista de gens d'interès, que varien el seu nivell d'expressió en unes condicions determinades. Aquests gens poden ser analitzats directament de manera individual, si el nombre és reduït, o bé es poden utilitzar programes que faciliten la interpretació de les dades o que donen una informació sobre el tipus i funció dels gens escollits. Tant el programa de processat com els programes que es detallaran a continuació es troben agrupats i connectats entre ells en GEPAS (*Gene Expression Profile Analysis Suite*). Es tracta d'una eina generada per la Unitat de Bioinformàtica del CNIO (Herrero et al., 2003) que facilita l'anàlisi dels microarrays d'ADN al connectar via *web* diversos programes d'anàlisi d'arrays (<http://gepas.bioinfo.cnio.es>).

7.8. Procediments de *clustering*

Els procediments d'agrupament o *clustering*, possiblement l'eina informàtica més utilitzada en l'anàlisi de dades dels microarrays, s'utilitzen per a trobar gens amb un mateix patró d'expressió o per agrupar condicions experimentals. En principi, se suposa que gens que comparteixen una mateixa funció biològica es comportaran de la mateixa manera. Per a trobar aquestes relacions entre gens, el primer és saber quan es pot considerar que dos gens es comporten igual, pel que cal definir una distància entre patrons.

Les diferents funcions de **distància** es poden agrupar en dos grans grups: les distàncies euclídees i les basades en correlacions. Les primeres es basen en diferències absolutes, mentre que les segones es fixen en les tendències. Si s'utilitza una distància euclídea, s'obtenen gens en els que els seus nivells de transcripció són similars, mentre que si s'utilitzen correlacions, s'ajunten els gens 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 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 o condicions. Els mètodes més utilitzats són els no supervisats, que en funció de com s'agrupen les dades es poden dividir en agrupacions jeràrquiques o no jeràrquiques, segons generin una classificació basada en forma d'arbre binari o donin informació de possibles relacions jeràrquiques entre les dades. En la **figura 6** es mostren els diferents tipus de *clustering* i les representacions que generen.

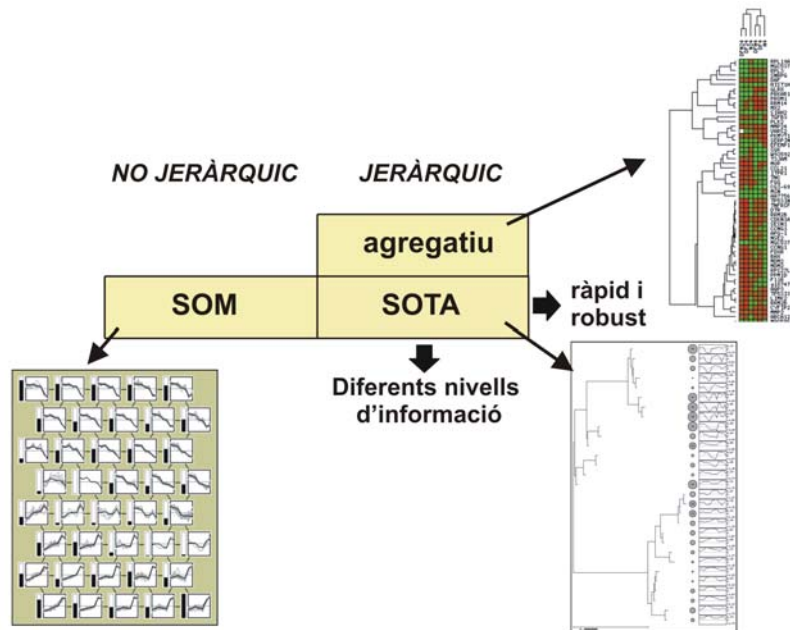


Figura 6. Tipus de clusters

El **mètode jeràrquic agregatiu** comença ajuntant els dos gens amb el patró d'expressió més similar i els substitueix pel patró promig. D'aquesta manera va ajuntant els patrons d'expressió fins que construeix la jerarquia completa. Al final del procediment les dades es representen en forma d'arbre binari on els gens amb els patrons més similars es troben junts. El mètode permet l'agrupament dels gens o de les condicions, o ambdues alhora, tant mitjançant distàncies euclídees com basades en correlacions.

Els mètodes de *clustering* estàndards són poc robusts quan s'apliquen a milers de gens, a més, al produir la partició completa de les dades la interpretació dels resultats pot ser confosa. Com alternativa s'utilitzen xarxes neurals, com el **SOM** (*Self-Organizing Maps*), que són més adients per a l'agrupament de gran quantitat de dades ja que no parteixen completament totes les dades. El mètode SOM es basa en distàncies euclídees i proporciona xarxes bidimensionals hexagonals o rectangulars amb tants nodes com l'usuari indiqui. Aquest és un dels inconvenients del mètode, ja que l'usuari marca des de l'inici el nombre de *clusters* que s'obtindran. És important filtrar els patrons plans i estandaritzar-los, perquè si són els predominants ocuparan tota la xarxa.

El **SOTA** (*Self-Organizing Tree Algorithm*) és un altre xarxa neural, que a diferència del SOM té els nodes en forma d'arbre binari. És un mètode divisiu, que parteix del promig de les dades i va separant els diferents patrons pas a pas. En créixer de dalt a baix es pot aturar el creixement on es vulgui, el que determinarà el nombre de *clusters* (Herrero et al., 2001).

La següent taula resumeix les avantatges i desavantatges dels mètodes descrits (Taula 4).

	Mètode jeràrquic agregatiu	SOM	SOTA
Topologia i creixement	Arbre jeràrquic	Hexagonal o rectangular	Arbre jeràrquic
	Agregatiu (de baix a dalt)	Mida marcada des del començament	Divisiu (de dalt a baix)
	Tants clusters com dades		Ajustable per l'usuari
Robust davant el soroll	No	Si	Si
Clustering proporcional	Si	No	Si
Possibilitat d'obtenir <i>clusters</i> a diferents nivells jeràrquics	No	No	Si
Proporciona el valor promig dels patrons en cada <i>cluster</i>	No	Si	Si
Comportament davant un elevat nombre de dades	No eficient	Eficient	Molt eficient

Taula 4. Avantatges i inconvenients dels diferents mètodes de cluster.

7.9. Interpretació de les dades

L'objectiu final després del processat de les dades o de les anàlisis de clustering és l'obtenció d'informació i característiques biològiques comuns dels grups de gens d'interès. Aquesta anàlisi no es pot fer manualment gen per gen, ja que la quantitat de gens que s'analitzen és generalment massa gran per a utilitzar els mètodes tradicionals. Existeixen diversos programes que faciliten aquestes anàlisis, la majoria dels quals utilitzen el termes de *Gene Ontology*.

Gene Ontology (GO) és un projecte col·laboratiu amb l'objectiu de 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 (*ontologies*) són la funció molecular, el procés biològic i el component cel·lular. Un producte gènic pot tenir més d'una funció molecular i pot ser utilitzat en un o més processos biològics, fins i tot, podria estar associat amb més d'un component cel·lular. Un cop escollit un *ontology* específic (funció, procés o component) existeixen dins de cada grup fins a 5 nivells descriptius.

En aquesta memòria s'han utilitzat els programes desenvolupats en la Unitat de Bioinformàtica del CNIO que es troben dins de l'eina GEPAS, anteriorment esmentada (<http://gepas.bioinfo.cnio.es>). L'avantatge d'aquesta eina és que els arxius generats després del pre-processat, de l'anàlisi de clusters o, fins i tot, clusters concrets es poden

enviar directament a aquests programes. Les principals aplicacions que ofereix el GEPAS són:

- FatiGO (*Fast transference of information using Gene Ontology*). <http://www.fatigo.org>
- FatiWise: Extensió del FatiGO per motius InterPro, vies KEGG i Swisprot. <http://fatiwise.bioinfo.cnio.es>