



FACULTAT
**DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA**

UVIC | UVIC·UCC

Treball de Fi de Grau Experimental

GENERACIÓ D'UN VECTOR VIRAL PER A SOBREEXPRESSAR VDR EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES

AINA XIMELIS BUJOSA

Grau en Biotecnologia

Tutora: Alba Casellas Comallonga

Co-tutora: Laia Vilà Prats

Vic, Juny de 2021

Agraïments

Tot i que encara em costa de creure, a la fi puc dir que estic arribant al final d'aquesta etapa. I no voldria acabar-la sense recordar tota la gent que m'ha ajudat a arribar fins aquí i que m'ha acompanyat durant aquest camí.

En primer lloc, vull agrair a l'Alba la seva confiança dipositada en mi, moltes gràcies per haver-me permès formar part del teu equip i ser la meva guia durant la realització d'aquest treball, has estat la millor tutora de TFG que hagués pogut tenir. També vull agrair a la Laia Vilà i a tot l'equip del CBATEG l'agradable estada que m'han fet passar, sempre ajudant-me en tot el que he necessitat i amb un molt bon ambient de treball.

M'agradaria també agrair a tota persona que m'ha ajudat durant la realització d'aquest treball, sobretot gràcies per tots els consells quan he estat nerviosa i estressada. Gràcies Marc per la teva ajuda i els ànims rebuts dia a dia als laboratoris. Iman, sense les teves bromes i la teva companyia tot hauria estat més pesat. També vull agrair a tots els companys i amics que m'han donat suport, m'han fet passar bons moments i m'han ajudat, ja no durant la realització del treball, sinó durant aquests cinc anys de carrera.

Així mateix, vull agrair de manera molt especial tot el suport rebut de part dels meus pares Guillem i Cati durant tota la meva vida. Sempre heu confiat en mi i m'heu deixat prendre les meves pròpies decisions, privant-vos de goigs perquè jo pogués, entre altres moltes coses, cursar aquest grau. Gràcies a ells, a la meva germana Marina i als meus abuelos Pau i Cati per haver aguantat les meves queixes i donar-me suport en tot moment. Gràcies també a la resta de la meva família per estar-hi sempre.

Vull donar les gràcies a en Kevin per acompanyar-me en aquest camí, en els moments bons i els dolents. Per la tolerància, la calma i l'ajuda durant els moments complicats, que han estat molts. Gràcies per estar sempre al meu costat.

Finalment, agrair al tribunal per l'atenció i el temps dipositat a l'hora de llegir i escoltar el meu treball.

Espero que us agradi a tots.

Resum

Títol: Generació d'un vector viral per a sobreexpressar VDR en les cèl·lules β pancreàtiques

Autora: Aina Ximelis Bujosa

Co-Tutores: Dra. Alba Casellas Comallonga (CIBER-CBATEG) i Dra. Laia Vilà Prats (CIBER-CBATEG)

Data: Juny de 2021

Paraules clau: *VDR, diabetis, plasmidi*

La vitamina D exerceix un gran nombre d'accions beneficioses, però necessita el seu receptor (*VDR*) per poder realitzar-les. La deficiència de vitamina D està associada a un augment en la incidència de diabetis i s'ha vist que individus diabètics presenten una disminució substancial en l'expressió de *VDR* en les cèl·lules beta (β) pancreàtiques, principals cèl·lules afectades en el procés diabètic. Això suggereix que aquest gen és un factor clau en la funció d'aquestes cèl·lules. Per tant, la pregunta és: si transferim el gen *Vdr* a les cèl·lules β , protegirem enfront de la diabetis? Així doncs, l'objectiu principal d'aquest estudi va ser la generació i producció d'un vector plasmidi per poder transferir i expressar el gen *Vdr* específicament en les cèl·lules β pancreàtiques. Els nostres resultats mostren que hem generat 2 variants plasmídiques que porten i expressen *VDR* de manera funcional. Això permetrà utilitzar aquests plasmidis en un futur per a generar vectors virals que s'injectaran en animals adults per a estudiar el paper de *VDR* en el desenvolupament diabètic.

Summary

Title: Generation of a viral vector to overexpress VDR in pancreatic β -cells

Author: Aina Ximelis Bujosa

Supervisor: Dra. Alba Casellas Comallonga(CIBER-CBATEG) i Dra. Laia Vilà Prats (CIBER-CBATEG)

Date: June, 2021

Keywords: *VDR, diabetes, plasmid*

Vitamin D needs its receptor (*VDR*) in order to perform a wide range of beneficial actions. Vitamin D deficiency is associated with an increased incidence of diabetes. Previous studies have shown that diabetic individuals have a substantial decrease in *VDR* expression in pancreatic β -cells, the main cells affected in a diabetic process. This suggests that this gene is a key factor in the function of the cells. Therefore, the question is: if the *Vdr* gene is transferred into the β -cells, will it protect against diabetes? Thus, the main objective of this study was to generate and produce a plasmid vector to transfer and express the *Vdr* gene specifically into pancreatic β -cells. Our results show that we have generated 2 plasmid variants that carry and express *VDR* in a functional manner. This will allow these plasmids to be used in the future to generate viral vectors that will be injected in adult mice to study the role of *VDR* in diabetes development.

Índex de Continguts

1. Introducció	1
1.1. Vitamina D.....	1
1.2. Receptor de Vitamina D (<i>VDR</i>).....	1
1.3. Diabetis	2
1.4. Vitamina D i prevenció de la diabetis de tipus 1	2
1.5. Vitamina D i prevenció de la diabetis de tipus 2	3
1.6. <i>VDR</i> i diabetis	3
1.7. Transferència gènica mitjançant vectors adenoassociats (AAV).....	4
1.8. Vectors Adenoassociats (AAV).....	4
2. Objectius	7
3. Metodologia	8
3.1. Tècniques bàsiques de manipulació del DNA	8
3.1.1. Adquisició dels plasmidis	8
3.1.2. Preparació dels plasmidis d'interès	8
3.1.2.1. Digestió del DNA plasmídic amb enzims de restricció	8
3.1.2.2. Separació i visualització dels productes resultants de la digestió.....	9
3.1.2.3. Extracció de les bandes d'interès de l'agarosa.....	9
3.1.2.4. Desfosforilació de fragments de DNA.....	10
3.1.2.5. Generació d'extrems roms de fragments de DNA.....	10
3.1.2.6. Construcció de molècules híbrides: lligació	11
3.2. Amplificació dels plasmidis d'interès.....	11
3.2.1. Transformació en cèl·lules competents	11
3.2.2. Amplificació i obtenció del DNA plasmídic	12
3.2.2.1. Amplificació a petita escala (Minipreparació).....	12
3.2.2.2. Amplificació a gran escala (Maxipreparació).....	12
3.3. Cèl·lules eucariotes en cultiu	13
3.3.1. Cèl·lules HEK 293.....	13
3.3.2. Transfecció de les cèl·lules en cultiu amb DNA plasmídic.....	13
3.3.3. Extracció d'RNA	13
3.3.4. Retrotranscripció.....	14
3.3.5. PCR quantitativa.....	14
3.3.6. Extracció de proteïnes.....	15

3.3.7.	Determinació de la concentració de proteïnes	16
3.3.8.	Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western Blot.....	16
3.3.8.1.	Electroforesi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	16
3.3.8.2.	Transferència de proteïnes a membranes	17
3.3.8.3.	Immunodetecció.....	17
3.4.	Anàlisi estadística	18
3.5.	Disseny de figures i esquemes	18
4.	Resultats	19
4.1.	Generació del plasmidi pAAV-RIP1- <i>VDR</i>	19
4.1.1.	Disseny del constructe	19
4.1.2.	Generació del genoma del vector viral	19
4.1.2.1.	Obtenció de l'insert.....	20
4.1.2.2.	Obtenció del vector <i>backbone</i>	21
4.2.	Obtenció del plasmidi pAAV- <i>RIP1-VDR</i>	22
4.2.1.	Preparació del DNA per a la lligació.....	22
4.2.2.	Lligació	24
4.3.	Anàlisi del plasmidi pAAV- <i>RIP1-VDR</i>	25
4.3.1.	Transformació.....	25
4.3.2.	Amplificació	25
4.3.3.	Comprovacions	25
4.3.3.1.	Comprovació del sentit de l'insert	25
4.3.3.2.	Comprovació de la conservació de les <i>ITR</i>	27
4.3.4.	Producció a “gran escala” del plasmidi pAAV- <i>RIP1-VDR</i>	28
4.3.4.1.	Transformació	28
4.3.4.2.	Precultiu en minipreparacions.....	29
4.3.4.3.	Cultiu en maxipreparacions	29
4.3.4.4.	Extracció de DNA de les maxipreparacions	30
4.3.4.5.	Comprovació de la presència de les <i>ITR</i>	30
4.4.	Anàlisi funcional del plasmidi pAAV- <i>RIP1-VDR</i>	31
4.4.1.	Transfecció del plasmidi en HEK293.....	31
4.4.2.	Anàlisi de l'expressió de mRNA de <i>Vdr</i> per qPCR.....	31
4.4.3.	Anàlisi de la proteïna VDR mitjançant <i>Western blot</i> (WB).....	32
5.	Discussió	33
6.	Conclusions	35
7.	Bibliografia	36

1. Introducció

1.1. Vitamina D

La vitamina D, a diferència d'altres vitamines, és produïda principalment pel propi cos, concretament a la pell. També es pot obtenir de forma inactiva a través del consum d'aliments, tot i que són molt pocs els que en contenen. Durant l'exposició a la llum solar, els rajos ultraviolats (290-315 nm) entren en contacte amb la pell i inicien la formació de la vitamina D₃ encara en conformació inactiva, el colecalciferol. Una vegada formada viatja fins al fetge i després als ronyons, on, després de successives transformacions, es converteix en la forma activa 1- α -25-dihidroxitamina D₃¹.

L'organització mundial de la salut (OMS) destaca que un 40% de la població europea presenta deficiència de vitamina D i un 13% una insuficiència severa². La deficiència de vitamina D està associada a un major risc de patir múltiples malalties i trastorns de salut: malalties cròniques, inflamatòries, al·lèrgies, càncers, infeccions, trastorns mentals, malalties neurodegeneratives i autoimmunes. Així mateix, la deficiència de vitamina D s'ha associat amb la diabetis, tant en individus amb diabetis tipus 1 (DT1) com en pacients amb resistència a la insulina i/o diabetis tipus 2 (DT2)^{3,4}.

1.2. Receptor de Vitamina D (*VDR*)

La vitamina D per exercir les seves accions ha d'unir-se al seu receptor anomenat receptor de la vitamina D (*VDR*). *VDR* és la porta d'entrada a la cèl·lula i l'interruptor necessari per a què la vitamina D pugui produir tots els seus efectes beneficiosos. *VDR* s'expressa a la majoria de les cèl·lules del nostre cos i, en resposta a la unió amb la vitamina D, inicia e indueix una sèrie de respostes cel·lulars. Clàssicament se li han atribuït funcions de regulació del genoma, un cop la vitamina D és unida al receptor en el citoplasma, aquest es transloca al nucli, activant i reprimint l'expressió gènica. Actualment, però, també se li atribueixen funcions no genòmiques i, en el desenvolupament d'aquestes funcions, el receptor no es troba en el nucli sinó situat proper a la membrana cel·lular.

Així doncs, tan important és que els nivells de vitamina D siguin els adequats com que *VDR* estigui disponible. De fet, alteracions com ara mutacions en el *VDR* s'han associat amb el risc de patir diabetis tipus 2 en diferents poblacions⁵. Així mateix, petites variacions de seqüència (*single*

nucleotide polymorphisms (SNP)) en el gen *VDR* també s'han relacionat amb un major risc de presentar DT1 ⁶.

1.3. Diabetis

La diabetis és un grup de malalties metabòliques caracteritzades per la presència de nivells elevats de glucosa en sang (hiperglucèmia) resultat de defectes en la secreció d'insulina, de l'acció d'aquesta, o d'ambdues al mateix temps (American Diabetes Association, ADA-2011). Una de les principals conseqüències de la hiperglucèmia crònica són els danys en els vasos sanguinis, i això fa que la diabetis sigui un factor de risc per moltes altres patologies com ara retinopaties, nefropaties, cardiopaties i disfuncions vasculars perifèriques entre d'altres ⁶. En el procés diabètic juguen un paper principal les cèl·lules productores d'insulina: les cèl·lules β pancreàtiques. La seva mort o la pèrdua de la seva funció són la causa de l'aparició de diabetis.

La diabetis es pot classificar en dos tipus segons la causa subjacent, DT1 i DT2. La DT1 és causada per la destrucció autoimmune de les cèl·lules β del pàncrees, fet que provoca una deficiència en la producció i secreció d'insulina. La DT1 representa entre el 5 i el 10% del total dels pacients diabètics (American Diabetes Association, ADA-2011). En canvi, la DT2 és causada per l'aparició d'una resistència a la insulina en els teixits perifèrics (principalment múscul esquelètic, teixit adipós i fetge) que a la llarga crea una secreció inapropiada d'insulina deguda a un esgotament per sobreproducció de les cèl·lules β del pàncrees. La DT2 representa entre el 90 i el 95% del total dels pacients diabètics (American Diabetes Association, ADA-2011).

En els últims anys s'ha observat un increment mundial en la prevalença de diabetis, i s'ha vist que va en paral·lel amb un creixement en la incidència del dèficit de vitamina D ².

1.4. Vitamina D i prevenció de la diabetis de tipus 1

Diversos estudis han confirmat que hi ha una associació entre baixos nivells de vitamina D i l'alta prevalença i aparició més primerenca de la DT1 ⁷. S'ha vist que administrant suplementes de vitamina D durant els primers anys de vida disminueix el risc de desenvolupar DT1, ja que les propietats immunomoduladores que té la vitamina D actuen de forma profilàctica/terapèutica en aquest tipus de diabetis ^{1,8}.

En estudis fets en diferents poblacions mundials han trobat associació entre polimorfismes en el gen *VDR* (BsmI, ApaI, FoqI, TaqI) i la susceptibilitat de desenvolupar DT1. Això suggereix que

els polimorfismes en el gen *VDR* estan involucrats en el desenvolupament de la patogènesi de la DT1 interactuant els uns amb els altres juntament amb factors ambientals i fons genètics ètnics. Per altra banda, existeixen estudis que suggereixen que es pot aturar la progressió de la DT1 en models animals utilitzant anàlegs de la vitamina D, fins i tot un cop ja s'ha iniciat l'atac autoimmune ⁹.

1.5. Vitamina D i prevenció de la diabetis de tipus 2

S'han fet estudis sobre l'efecte que produeix el subministrament de suplementes de vitamina D en la glucèmia i la diabetis en pacients de DT2 donant resultats controvertits, en alguns casos presentant efectes beneficiosos i en altres no presentant cap mena d'efecte.

La prediabetis és un estadi primerenc de la malaltia on comença a haver-hi resistència a la insulina i que pot ser revertit. És en aquest estadi on els suplementes de vitamina D tenen un paper més prometedor ^{1,10}. Tot i això, hi ha una gran falta d'estudis que investiguin els efectes de complementar amb vitamina D la dieta dels individus amb més risc a patir diabetis i les conseqüències que tenen sobre *VDR*. Així doncs, estudiar el paper de *VDR* en el procés diabètic és essencial per la millora del coneixement de la vitamina D i els seus efectes.

1.6. *VDR* i diabetis

Per això, l'interruptor (*VDR*) que dóna llum a les accions de la vitamina D pot jugar un paper important en les cèl·lules β pancreàtiques tot i que encara hi ha ombres respecte al què fa i en com pot influir en la protecció contra el desenvolupament de la diabetis. S'ha vist que ratolins amb el gen suprimit de *Vdr* (*knock out*), i que per tant no expressen el gen, presenten intolerància a la glucosa i secreció deficient d'insulina, el que suggereix que *VDR* és un factor clau en la funció de les cèl·lules β ¹¹.

A més, un estudi previ fet pel grup de recerca on he realitzat aquest treball (CBATEG, Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica, UAB) va demostrar que la presència de *VDR* en els illots de ratolins models de DT1 i DT2 estava reduïda en els subjectes diabètics comparat amb els seus germans sans ¹². Fins i tot es va observar que la quantitat de *VDR* es correlacionava inversament amb la glucèmia i amb l'evolució de la malaltia. Per tant, es podria especular que aquesta reducció contribuïa significativament en el procés diabètic. Per aclarir aquesta hipòtesi es va induir la presència sostinguda de *VDR* en illots de ratolins transgènics i es va demostrar que la sobreexpressió de *VDR* en cèl·lules β d'aquests ratolins els protegia de desenvolupar diabetis.

Sembla que els nivells sostinguts de *VDR* en les cèl·lules β poden preservar la seva massa, la seva funció i protegir-les contra la diabetis.

Aquestes són dades experimentals observades en el laboratori i en ratolins transgènics, que ja posseeixen la sobreexpressió del gen de *VDR* des de l'estadi embrionari. Així doncs, la pregunta és: Si transferim el gen *Vdr* en ratolins adults sans, els protegirem enfront de la inducció de diabetis de forma experimental, és a dir, no es tornaran diabètics? És més, si transferim el gen *Vdr* a un animal que ja sigui diabètic, podrem revertir el procés?

1.7. Transferència gènica mitjançant vectors adenoassociats (AAV)

La transferència gènica es basa en introduir material genètic exogen en una cèl·lula diana per tal de modificar el seu genoma. Aquestes modificacions inclouen l'addició de nous gens, l'augment de la dosi gènica o la tecnologia *knockdown* per tal de reemplaçar gens alterats o per silenciar l'expressió de certs gens ^{13,14}. Per realitzar aquesta transferència es necessiten uns vehicles que ens permetin transportar la nostra seqüència terapèutica a la cèl·lula diana, també anomenats vectors. Es pot establir una classificació d'aquests vectors segons la seva naturalesa: Els virals i els no virals.

Els vectors no virals utilitzen les propietats fisicoquímiques del material genètic per transportar-lo a la cèl·lula diana. Alguns dels mètodes utilitzats són l'administració directa de DNA *despullat*, l'electrotransferència de DNA o l'encapsulació de DNA en liposomes o en polímers catiónics. Els vectors virals exploten la capacitat infectiva natural dels virus per entrar en una cèl·lula, transferir el seu material genètic en el nucli i expressar les seves proteïnes.

Els vectors adenoassociats (AAV) són virus que han patit alguna modificació del seu material genètic per tal que no puguin integrar-se o replicar-se en l'interior de les cèl·lules i al mateix temps codifiquen pel gen terapèutic d'interès. D'aquesta manera són utilitzats com a vehicles per transferir el material genètic desitjat a l'interior de les cèl·lules diana ¹⁵. A part d'eficaços, aquests vectors han mostrat ser molt segurs, per aquest motiu avui en dia aquest tipus de vectors són dels més utilitzats en el camp de la teràpia gènica ¹⁶.

1.8. Vectors Adenoassociats (AAV)

Els AAV es poden incloure en la família dels *Parvoviridae* i del gènere *Dependovirus*, ja que per tal de poder completar el seu cicle infectiu necessita la presència d'un virus auxiliar ^{17,18}.

Presenten una càpsida sense embolcall i el seu genoma està basat en una cadena senzilla de DNA (ssDNA) d'aproximadament 4,7 kb. Generalment, el seu genoma presenta tres regions funcionals, dos marcs oberts de lectura (*ORF*) anomenats *Rep* i *Cap* i a cada extrem les repeticions terminals invertides (*ITR*) (Figura 1). Les *ITR* no codifiquen per cap gen i la seva funció és principalment exercir com a origen de replicació i intervenir en la integració, escissió i empaquetament del genoma durant el cicle viral. En canvi, la regió *Rep* codifica per diferents proteïnes que permeten que es pugui dur a terme la infecció viral, mentre que la regió *Cap* codifica per les tres proteïnes que formen la càpsida ^{19,20}.

Actualment s'han descrit catorze serotips diferents d'AAV i cada un presenta un tropisme diferent. Aquest fet s'utilitza en teràpia gènica per tal de poder fer arribar el gen terapèutic a diferents teixits de forma selectiva segons quin serotip s'esculli ²¹.

Els vectors utilitzats per la transferència gènica, es coneixen com a vectors AAV recombinants (rAAV) i presenten tots els *ORF* del genoma viral substituïts per seqüències de DNA heteròleg que conté el constructe terapèutic flanquejat per *ITR* ²². D'aquesta manera aquests vectors poden empaquetar DNA exogen, però no replicar-se i, a més a més, com que no expressen cap gen viral són més difícils de ser reconeguts i destruïts pel sistema immunitari ¹⁶.

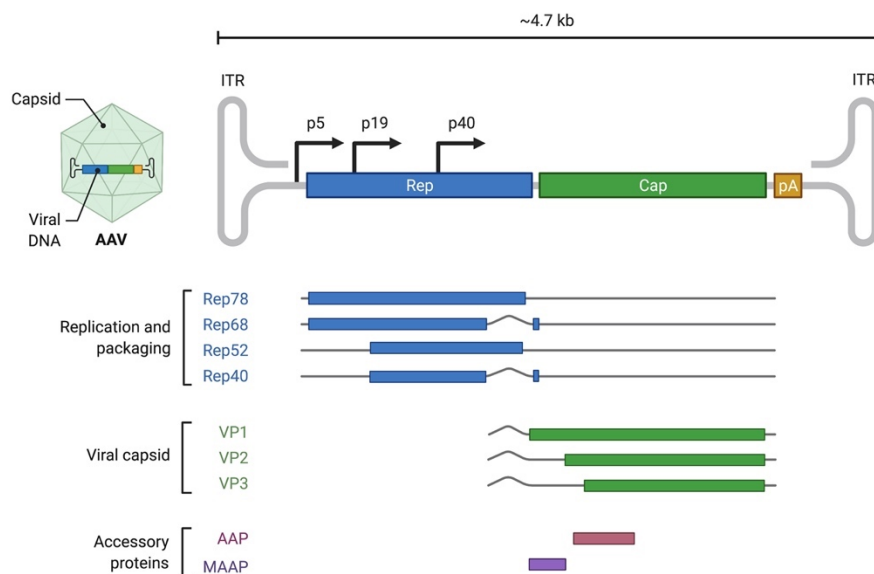


Figura 1 Genoma dels virus adenoassociats. Representació esquemàtica del genoma d'ADN de cadena simple d'un virus AAV. Les seqüències repeticions terminals invertides (*ITR*) es troben en els extrems. Gràcies al *splicing* alternatiu el gen *Rep* és capaç de codificar per quatre proteïnes no estructurals (*Rep78*, *Rep68*, *Rep 52* i *Rep40*) tot i tenir únicament dos promotors (*p5* i *p19*). El gen *Cap* codifica per tres proteïnes estructurals (*VP1*, *VP2* i *VEP3*) i la proteïna d'activació de l'assemblatge (*AAP*) tot i tenir un sol promotor (*p40*).

Per tal de poder generar en el laboratori els vectors rAAV que empaquetin les seqüències terapèutiques s'utilitza un sistema de triple transfecció. Cèl·lules HEK293 (línia cel·lular humana

de ronyó) en cultiu es cotransfecten amb tres plasmidis: un que conté el gen terapèutic flanquejat per les seqüències *ITR*, un altre que aporta els gens *Rep* i *Cap* del genoma de l'AAV sense les *ITR* i finalment un tercer plasmidi anomenat pAd-Helper que codifica pels gens del virus auxiliar necessari per a la replicació dels AAV. Els dos últims sempre són iguals per a qualsevol generació d'un vector terapèutic.

Per tant, el primer plasmidi anomenat pAAV-Transgene és el que generem nosaltres per introduir les seqüències terapèutiques, que en aquest estudi, és el gen de *Vdr*, com es pot observar a la figura 2.

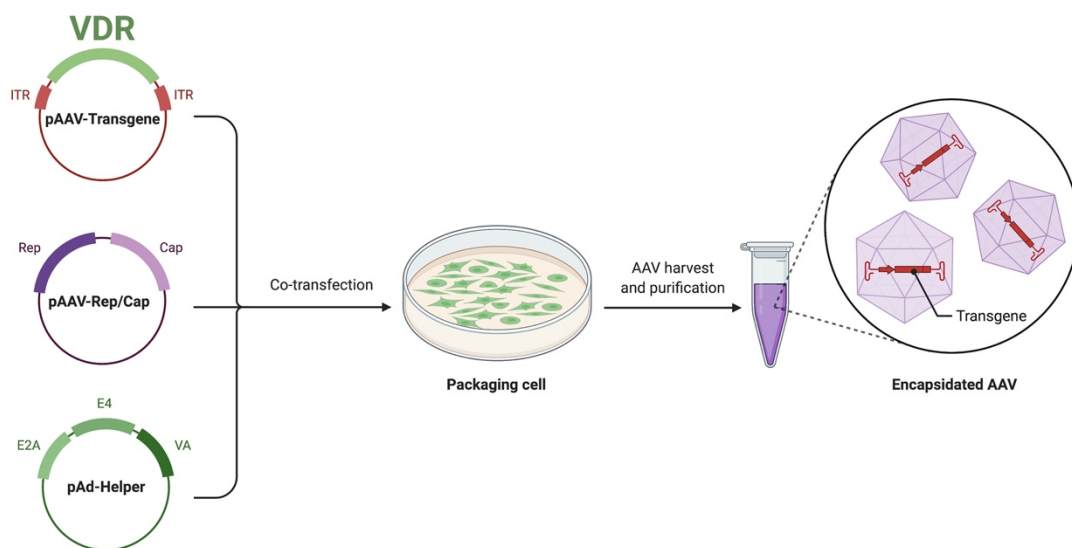


Figura 2 Producció dels AAV recombinants (rAAV) mitjançant triple transfecció: Per la producció de rAAV transfectem cèl·lules HEK293 amb tres plasmidis, el plasmidi transgen (pAAV-Transgene) que conté la nostra seqüència terapèutica (*Vdr*) flanquejada per les *ITR*, el plasmidi pAAV-REP/CAP que aporta les proteïnes virals codificades en *Rep* i *Cap*, i finalment el plasmidi pAd-Helper que codifica pels gens del virus auxiliar necessari per a la replicació dels AAV. Posteriorment les partícules víriques són purificades a partir del lisat cel·lular i del medi per tal d'obtenir el nombre més gran de partícules AAV plenes. La representació esquemàtica no està feta a escala.

En concret, aquest estudi es basa en la generació del plasmidi *pAAV-Transgene*, que posteriorment anirà a la planta de producció viral (CBATEG), on, mitjançant la triple transfecció, i amb els altres dos plasmidis, *pAAV-Rep/Cap* i *pAd-Helper*, es produiran les partícules virals que contindran la diana terapèutica de *Vdr* flanquejada per les *ITR*.

2. Objectius

La diabetis és una patologia que està esdevenint pandèmica i de la qual no n' existeix un tractament eficaç. S'ha descrit que hi ha una relació entre el dèficit de vitamina D i la incidència de la diabetis, i encara que habitualment es prescriguin suplementes de vitamina D per prevenir el desenvolupament de la malaltia, la resposta a aquests és molt variable i no dona resultats positius en tots els individus. Tot i això, un cop l'individu ha desenvolupat diabetis, no s'han observat millores substancials amb els suplementes de vitamina D. La vitamina D actua a través del seu propi receptor (*VDR*) que és expressat a la majoria de tipus cel·lulars de l'organisme i s'ha observat una disminució d'aquest en les cèl·lules β pancreàtiques d'individus diabètics. D'altra banda, s'ha vist que si es genera un animal transgènic que presenta sobreexpressió de *VDR* en les cèl·lules β , aquest no desenvolupa la malaltia. Així doncs, l'objectiu principal d'aquest estudi va ser la generació i producció d'un vector plasmidi per poder transferir i expressar el gen *Vdr* específicament a les cèl·lules β pancreàtiques.

Aquest objectiu principal es va dividir en els següents objectius específics:

- Obtenir i manipular totes les seqüències de DNA necessàries per a la generació del vector plasmidi que porta l'agent terapèutic, en el nostre cas *Vdr*, i un promotor específic de cèl·lula β pancreàtica.
- Generar el vector plasmidi a partir de la hibridació de les seqüències de DNA obtingudes.
- Comprovar que el vector plasmidi expressa el gen d'interès i, per tant, és funcional.

La finalitat de la generació del vector plasmidi és lliurar-lo a la planta de producció viral perquè ells en un futur, mitjançant el sistema de triple transfecció, acabin produint el vector viral i es pugui utilitzar per testar l'eficàcia terapèutica de *VDR* en un procés diabètic en animals adults.

3. Metodologia

3.1. Tècniques bàsiques de manipulació del DNA

3.1.1. Adquisició dels plasmidis

Els plasmidis utilitzats per la realització d'aquest estudi són: el plasmidi **pCMV-SPORT6-VDR**, obtingut de la casa comercial *Open Biosystems Inc. (Huntsville, EUA)* (ref. 3710866, GeneBank BC006716) i el plasmidi **pAAV-RIPI-GFP** (CBATEG, núm. 896) (Figura 3).

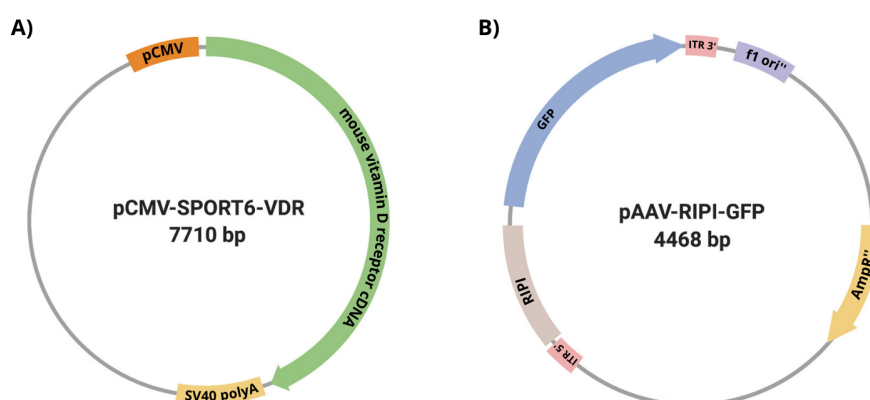


Figura 3 Esquema representatiu dels plasmidis utilitzats en aquest treball. A) Plasmidi pCMV-SPORT6-VDR i B) Plasmidi pAAV-RIPI-GFP.

3.1.2. Preparació dels plasmidis d'interès

3.1.2.1. Digestió del DNA plasmídic amb enzims de restricció

Per tal de manipular el DNA per poder crear el constructe d'interès s'utilitzen les endonucleases de restricció, enzims capaços de tallar el DNA en dianes específiques. Cada enzim de restricció requereix unes condicions de reacció específiques de pH, força iònica i temperatura. En cada cas es van seguir les instruccions de la casa comercial corresponent (*Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*). Veure taula 1 per una relació dels enzims de restricció i tampons utilitzats. En general, el DNA va ser digerit amb 0,5 unitats d'enzim per microgram (μg) de DNA en el tampó subministrat pel fabricant durant 1 hora a 37 °C, exceptuant *SmaI*, el qual té una temperatura òptima d'incubació de 30 °C. Quan el DNA s'havia de digerir amb 2 o més enzims de restricció, les digestions es portaren a terme conjuntament sempre tenint en compte que les condicions del tampó i temperatura fossin compatibles.

Taula 1 Relació dels enzims de restricció utilitzats amb els seus respectius buffers i temperatures.

Enzim de Restricció	Buffer	Temperatura
<i>EcoRV</i>	<i>Red</i>	37 °C
<i>EcoRI</i>	<i>Unique</i>	37 °C
<i>XhoI</i>	<i>Red</i>	37 °C
<i>SphI</i>	<i>Blue</i>	37 °C
<i>SalI</i>	<i>Orange</i>	37 °C
<i>AfeI</i>	<i>Orange</i>	37 °C
<i>SmaI</i>	<i>Tango</i>	30 °C
<i>AhdI</i>	<i>Unique</i>	37 °C

3.1.2.2. Separació i visualització dels productes resultants de la digestió

El gel d'electroforesi d'agarosa és el mètode estàndard utilitzat per separar, identificar i purificar els fragments de DNA. En aquest treball s'utilitzen gels d'agarosa a l'1%. La visualització del DNA en el gel s'ha aconseguit mitjançant l'addició de baixes concentracions de *Red Safe* (*iNtRON Biotechnology Inc.*) al gel (0,5 µg/mL), el qual s'intercala entre les dues cadenes del DNA. La presència de DNA es visualitza utilitzant llum ultraviolada (UV) de baixa longitud d'ona (310 nm) a través d'un transil·luminador i un sistema de càmeres (*Syngene*). Com a marcador de pes molecular de DNA s'ha utilitzat el *DNA ladder 1 kb* (*Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*).

Els gels d'agarosa es van preparar dissolent l'agarosa en tampó d'electroforesi 1x TAE (Tris-Acetate pH 8.3, 40 mM i EDTA 1mM) amb 0,5 µg/mL de *Red Safe*. Les mostres es van carregar al gel amb tampó de càrrega 1x (*Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*) i es van córrer amb el tampó d'electroforesi 1x TAE a 90 V durant 1 hora.

3.1.2.3. Extracció de les bandes d'interès de l'agarosa

En el cas de voler obtenir i purificar el fragment de DNA d'interès del gel d'agarosa es va utilitzar el *kit* comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (*Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*) seguint les instruccions del fabricant. El protocol pot veure's esquematitzat en la figura 4. Es va quantificar el DNA a l'espectrofotòmetre *Nanodrop 1000* (*Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*).

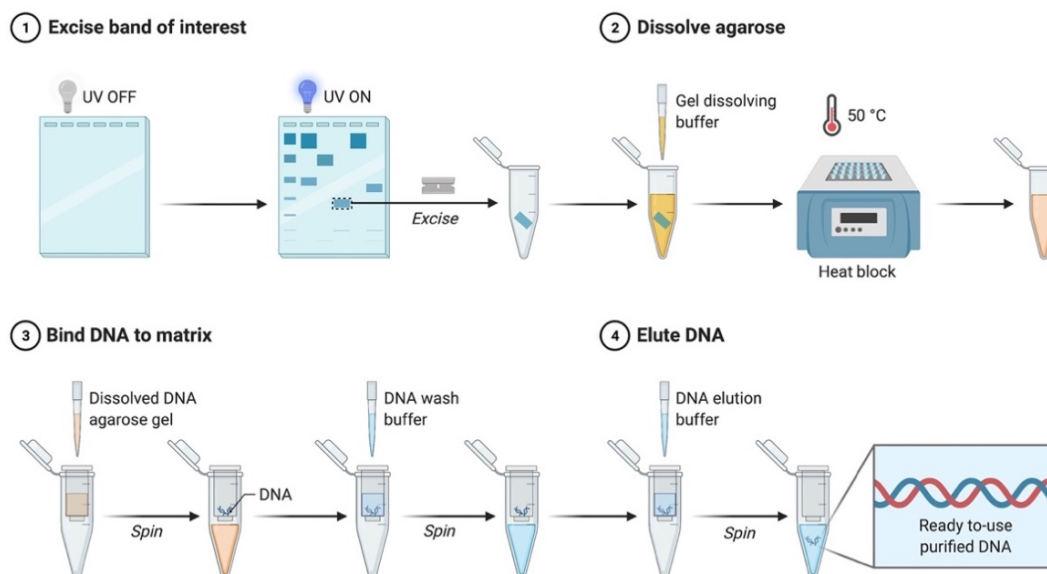


Figura 4 Esquema del protocol GeneJET™ Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

3.1.2.4. Desfosforilació de fragments de DNA

El DNA plasmídic pot tornar a religar. Aquest procés es pot evitar mitjançant l'eliminació dels residus fosfats de l'extrem 5' dels fragments tallats. Per a la desfosforilació s'utilitza 1 unitat de fosfatasa alcalina (*FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*) per μg de DNA en el tampó comercial 1x. La reacció de desfosforilació es du a terme durant 30 minuts a 37 °C. Posteriorment, s'inactiva l'enzim a 75 °C durant 10 minuts per evitar qualsevol interacció de la fosfatasa en la reacció de la lligació, tal com s'indica a les instruccions de la casa comercial.

3.1.2.5. Generació d'extrems roms de fragments de DNA

En els casos on l'acció de l'enzim de restricció deixa els extrems cohesius i es necessiten extrems roms pel clonatge, el fragment digerit es tracta amb l'enzim *Klenow DNA polimerasa I (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)*. En presència de la doble cadena de DNA i deoxinucleòtids trifosfats (dNTPs), la DNA polimerasa reomple l'extrem generat per l'enzim de restricció protuberant. La reacció de generació d'extrems roms es realitza durant 15 minuts a 37 °C. Posteriorment, s'inactiva l'enzim a 75 °C durant 10 minuts, com s'indica a les instruccions de la casa comercial.

3.1.2.6. Construcció de molècules híbrides: lligació

La lligació de fragments de DNA consisteix en la construcció de molècules híbrides de DNA a partir de diferents fragments lineals que es combinen formant un plasmidi circular. Es denomina “backbone” al fragment lineal que conté l’origen de replicació (ori) i la seqüència de DNA que conferirà resistència per un antibiòtic als bacteris que incorporin el plasmidi resultant de la lligació. En aquest treball, el *backbone* conté, a més, les seqüències necessàries per a l’encapsidació del DNA de cadena simple dins la partícula viral, les *ITR*. Per altra banda, es denomina insert al fragment lineal que porta el gen d’interès. Els fragments de DNA d’interès es barregen amb DNA lligasa del bacteriòfag T4 (*New England Biolabs*) i el tampó corresponent segons el protocol establert per la casa comercial. Les reaccions s’incuben durant tota la nit (O/N, de l’anglès *overnight*) a temperatura ambient.

3.2. Amplificació dels plasmidis d’interès

3.2.1. Transformació en cèl·lules competents

Els productes de la lligació poden ser introduïts en cèl·lules bacterianes competents a través d’un procés anomenat transformació. En aquest estudi s’han escollit dos mètodes per a portar a terme les transformacions seguint les instruccions de cada casa comercial: Veure taula 2 per a la relació dels mètodes, les soques que s’utilitzen i les respectives cases comercials.

Taula 2 Mètodes de transformació bacteriana utilitzats amb les respectives soques emprades.

Mètode	Soca cel·lular	Casa comercial
Xoc tèrmic	One Shot Stbl3	Thermo Fisher Scientific Inc., EUA
Electroporació	XI2 Blue	Thermo Fisher Scientific Inc., EUA

Per a la transformació bacteriana per xoc tèrmic es barregen 40 µL de cèl·lules *E. coli* Stbl3 competents (2×10^{10} cèl·lules/mL) i 3 µL (aproximadament 30 ng) de la reacció de lligació del DNA o de DNA control. La barreja s’incuba durant 30 minuts en gel, posteriorment a 42 °C en un bany maria durant 45 segons i, tot seguit, 2 minuts en gel per induir el xoc tèrmic. Per tal de fer créixer les cèl·lules competents un cop transformades, s’inoculen en medi SOC temperat i són incubades a 37 °C durant 1 hora a 225 rpm en un incubador amb agitació. Finalment es sembren en plaques amb medi LB i l’antibiòtic corresponent (ampicil·lina) i s’incuben novament O/N a 37 °C. Només s’observarà creixement d’aquelles colònies que hagin integrat el plasmidi d’interès i que, per tant, presentin resistència a l’ampicil·lina (AmpR).

En els casos on es segueix el mètode d'electroporació, es barregen 40 µL de cèl·lules *E. coli* X12 Blue competents (2×10^{10} cèl·lules/mL) i 1 µL (aproximadament 10 ng) de la reacció de lligació del DNA o de DNA control en cubetes d'electroporació prèviament refredades. Seguidament aquestes són introduïdes en l'electroporador (*Electroporator 2510, Eppendorf*) i sotmeses a un voltatge de 2500 V en dos cicles de pocs segons. S'afegeixen 200 µL d'LB a les cubetes homogeneïtzant bé les cèl·lules i d'aquest homogenat se n'agafen 20 µL. Es realitza una dilució 1/10 amb LB per seguidament sembrar en plaques amb el mateix medi (LB + Amp). Aquestes s'incuben *O/N* a 37 °C.

3.2.2. Amplificació i obtenció del DNA plasmídic

3.2.2.1. Amplificació a petita escala (Minipreparació)

Aquest procés consisteix a fer créixer les colònies obtingudes de les plaques sembrades per tal d'amplificar-les. Per fer-ho es piquen les colònies amb una punta i aquesta es submergeix en 3 mL de LB. Les minipreparacions s'incuben *O/N* a 37 °C amb una agitació de 225 rpm. Per a la posterior extracció del DNA dels bacteris crescuts s'utilitza el mètode de lisi alcalina descrit originalment per *Birnboim i Doli* (1979).

El mètode consisteix en la degradació de la paret bacteriana per l'acció de la liozima (Tris-HCl pH 8,0 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, Liozima 5 mg/mL, RNasa 100 mg/L) seguida d'una lisi alcalina (NaOH 0,2 M i SDS 1%) i una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i de les proteïnes desnaturalitzades per una solució concentrada d'acetat potàssic a pH àcid ($C_2H_3KO_2$ 3M, $C_2H_4O_2$ 2M). L'RNA bacterià es degrada mitjançant RNasa.

3.2.2.2. Amplificació a gran escala (Maxipreparació)

Per tal de facilitar el creixement dels bacteris a gran escala, cal fer un precreixement de 5 hores en minicultius (minipreparació) de 3 mL de LB a 37 °C. Un cop passades les hores, s'inoculen 500 µL del precultiu en un erlenmeyer amb 200 mL de LB i s'incuba *O/N* a 37 °C a 225 rpm. Aquest procés es realitza per obtenir majors quantitats de DNA.

Per a l'extracció del DNA s'utilitza el kit *GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*) que treballa amb columnes i utilitza una bomba de buit seguint les condicions del fabricant.

3.3. Cèl·lules eucariotes en cultiu

3.3.1. Cèl·lules HEK 293

Les cèl·lules *Human embryonic kidney cells 293* (HEK293) són cèl·lules embrionàries de ronyó humanes que s'utilitzen per a comprovar l'expressió *in vitro* dels plasmidis generats. A més, aquest tipus cel·lular és el que s'utilitza en la producció de vectors virals AAV. Les cèl·lules HEK293 es mantenen en medi de cultiu DMEM amb 2 mM de glutamina suplementat amb sèrum fetal boví (FBS) al 10% (inactivat per calor) en un incubador ajustat a 37 °C i al 5% de CO₂. Quan les cèl·lules arriben a tenir una confluència del 70% són tripsinitzades, i es plauegen en diferents dilucions per continuar amb el seu manteniment en cultiu fins a la seva utilització.

3.3.2. Transfecció de les cèl·lules en cultiu amb DNA plasmídic

Per a l'anàlisi de l'expressió *in vitro* del constructe obtingut, els plasmidis generats són transfectats en cèl·lules HEK293. La tècnica de transfecció amb lipofectamina (*Lipofectamina*TM2000, *Invitrogen*) es basa en la formació d'un complex hidrofòbic, lipofectamina-DNA, que afavoreix l'entrada del DNA a la cèl·lula. S'utilitza una proporció de 10 µL de lipofectamina (1 mg/mL) per 4 µg de DNA. Per a una transfecció òptima, les cèl·lules es transfecten quan estan al 70-80% de confluència i es cultiven durant 48 hores per a la posterior anàlisi d'aquestes.

3.3.3. Extracció d'RNA

Per a l'extracció d'RNA total de les cèl·lules en cultiu, es renta cada pou amb 1 mL de BPS. Seguidament es recullen les cèl·lules de cada pou en 350 µL de la solució RLT (*buffer* de lisi del kit comercial) i, seguint el protocol comercial de purificació d'RNA en columna de *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen, Invitrogen*), s'aïlla l'RNA total.

Totes les mostres es tracten en les columnes de purificació amb DNasaI (*RNase-Free DNase Set* proporcionat amb columnes, *Qiagen*) per tal d'eliminar el possible DNA contaminant i, després d'eliminar l'enzim amb el tampó subministrat pel fabricant, l'RNA s'elueix en 30 µL d'aigua *miliQ* lliure de RNases. Finalment, la concentració d'RNA obtingut es determina mitjançant el *Nanodrop 1000* (*Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*).

3.3.4. Retrotranscripció

Per tal de convertir l'mRNA a DNA de doble cadena i així poder-lo quantificar mitjançant qPCR, 1 µg d'RNA total va ser retrotranscrit a cDNA utilitzant el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)*, seguint les instruccions del fabricant. S'utilitzen oligo-dT i oligonucleòtids exohexàmers aleatoris com a *primers* en la reacció juntament amb la presència d'un inhibidor de RNases.

3.3.5. PCR quantitativa

La PCR quantitativa (qPCR) o *real-time PCR* ha esdevingut molt útil en l'anàlisi de l'expressió de mRNA de diversos gens. La qPCR s'ha realitzat en un LightCycler® 480 (*Roche*) utilitzant *LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)*. En la següent taula es mostren els diferents *primers* utilitzats per amplificar *Vdr* (gen d'interès) i el gen *housekeeping 36B4* per tal de normalitzar les amplificacions de les diferents mostres:

Taula 3 Primers utilitzats a la qPCR per l'anàlisi d'expressió en VDR.

Gen	Seqüència Forward (5' -3')	Seqüència Reverse (5' -3')
h36b4	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
mVDR	GCATCCAAAAGGTCATCGGC	AGCGCAACATGATCACCTCA

Cada reacció de qPCR (*LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche*) conté 10 µL de volum total de la reacció de polimerització resumida en la taula 4.

Taula 4 Reactius utilitzats en la qPCR per l'anàlisi de l'expressió de VDR amb un volum final de 10 µL.

Reacció SYBR Green	Volum
<i>SYBR Green LightCycler® 480 Probe Master</i>	5 µL
<i>Primer forward (10 µM)</i>	0.2 µL
<i>Primer reverse (10 µM)</i>	0.2 µL
H ₂ O Milli-Q	2.6 µL
cDNA (dil. 1/10)	2 µL

La reacció consisteix en 5 minuts a 95 °C per a una desnaturalització inicial i 45 cicles de 4 etapes: desnaturalització (10 segons a 95 °C), alineament (10 segons a 60 °C), elongació (10 segons a 72 °C) i 30 segons a 60 °C. Abans de refredar la reacció a 4 °C, es deixa 5 segons a 95 °C i 1 minut a 65 °C per determinar la temperatura de fusió.

S'utilitza el mètode *delta-delta-Ct* ($2 - \Delta\Delta Ct$) descrit per Livak ^{23,24} per quantificar l'expressió relativa dels gens d'interès. En aquest mètode àmpliament utilitzat, s'assumeix una duplicació òptima de cada cicle de qPCR amb una taxa d'amplificació del 100%. Amb aquest mètode, les Ct's (indica el nombre de cicles al qual la quantitat del gen diana d'interès és amplificat) del gen d'interès, tant en les mostres d'assaig com en les mostres de referència, són ajustades en relació a les Ct's del gen pel qual es normalitza (*housekeeping*) per cada una de les mostres. El valor resultant servirà per determinar la diferència d'expressió. La fórmula següent ens mostra un exemple, en aquest cas, per conèixer la diferència d'expressió del gen *VDR* entre una mostra (A), i una altra (B).

$$\text{Ràtio } A/B = (2^{Ct(A)36b40} / 2^{Ct(A)VDR1}) / (2^{Ct(B)36b40} / 2^{Ct(B)VDR1})$$

3.3.6. Extracció de proteïnes

Per fer una extracció del contingut proteic de les cèl·lules en cultiu es fa un primer rentat amb BPS i, posteriorment, es recuperen les cèl·lules de les plaques amb 1 mL de BPS. Després d'una centrifugació (15 minuts, 15000 rpm i 4 °C), el precipitat es resuspèn en 150 µL del tampó de lisi de proteïnes (50mM TRIS-HCl pH8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇). Immediatament abans d'utilitzar el tampó s'hi afegeix: un inhibidor de fosfatases, Ortovanadat (100 mg/mL) (*Merck KGaA, Darmstadt Germany*) i els inhibidors de proteases *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (una pastilla d'inhibidors per cada 50 mL de tampó) (*Merck KGaA, Darmstadt Germany*). Un cop homogeneïtzada la solució es centrifuga (15 minuts, 15.000 rpm, 4 °C) per eliminar restes cel·lulars i es recupera el sobrenedant, que és on hi haurà totes les proteïnes de les cèl·lules. A partir d'aquesta solució es determina la concentració de proteïnes de l'extracte mitjançant el mètode BCA. La resta d'extracte de proteïnes es guarda a -80 °C fins a la seva propera utilització.

3.3.7. Determinació de la concentració de proteïnes

Per tal de determinar la concentració de proteïnes dels diferents extractes s'utilitza el mètode de BCA (*BCA Protein Assay Reagent, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA*) seguint les instruccions de la casa comercial. Aquest mètode es basa en la reducció del Cu^{2+} en Cu^+ per la proteïna en un medi alcalí detectat per un canvi colorimètric altament sensible. Breument, es barregen els components del reactiu BCA en una proporció 1:50 i, per altra banda, es dilueixen les mostres (1:5) amb H_2O -*milliQ*. En una placa de 96 pous transparent s'afegeixen 10 μL de mostra amb 190 μL del reactiu de BCA a cada un dels pous, s'incuben 30 minuts a 37 °C i es realitza una lectura de l'absorbància a 565 nm. A partir de la comparació amb una recta patró, generada amb BSA (Albúmina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) i successives dilucions, es realitzen els càlculs per obtenir la concentració de proteïna de les mostres.

3.3.8. Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western Blot

3.3.8.1. Electroforesi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'anàlisi de l'expressió de proteïnes es realitza mitjançant l'electroforesi dels diferents extractes proteics en gels de poliacrilamida al 10% en presència de SDS. El gel de poliacrilamida, SDS-PAGE es forma a partir de la fusió de dos gels: El primer gel és el de compactació o *stacking*, el qual conté un 3.9% de poliacrilamida i conté els pous a on es dipositen les mostres. El segon, es tracta del gel separador o *resolving* amb un 10% de poliacrilamida i és on es dona la separació de les proteïnes segons la seva mida. Els diferents extractes proteics es descongelen en gel, i 15 μg de les proteïnes es barregen amb 1/4 volum de tampó de càrrega Laemli 4x (Tampó fosfat 20mM, Glicerol 20%, SDS 4%, 2- β -mercaptoetanol 2% i blau de bromofenol com a colorant). Un cop preparades les mostres, les proteïnes són desnaturalitzades a 95 °C durant 5 minuts i es carreguen al gel SDS-PAGE. El tampó utilitzat per a l'electroforesi és el següent: Tris base 5mM, Glicina 192mM, SDS 0.1% (pes/vol). L'electroforesi es realitza a 50 V mentre les mostres creuen el gel de compactació, i posteriorment a 35 mA quan les proteïnes ja es troben en el gel separador. En l'electroforesi s'utilitza el marcador de pes molecular per proteïnes *Spectra Multicolor Broad Range (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)*.

3.3.8.2. Transferència de proteïnes a membranes

L'electrotransferència de les proteïnes des del gel a les membranes de Polifluorur de vinilidè (PVDF) (*Merck KGaA, Darmstadt Germany*) es realitza activant prèviament les membranes. Per tal d'activar-les, es realitza una incubació d'aquestes durant 1 minut amb metanol, seguidament 5 minuts en aigua i finalment 15 minuts en la solució de transferència. Un cop activades, es procedeix al muntatge del "sandwich" compost per: la membrana de PVDF i el gel SDS-PAGE provinent de l'electroforesi conjuntament amb papers absorbents i unes esponges dins del casset de l'aparell *Transblot* (model 2051, *LKB/Pharmacia*). Tot el "sandwich" es fa córrer a 100 V durant 2 hores a 4 °C submergit en el tampó d'electrotransferència (Tris 25mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%).

3.3.8.3. Immunodetecció

Després de la transferència, les membranes es bloquegen amb TBS-T (Tris-HCl 25mM, NaCl 137mM, Tween20 0.1%) amb un 5% de llet desnatada a pH 7,4, o bé TBS-T amb un 5% de BSA, depenent del protocol de l'anticòs a utilitzar. El bloqueig es realitza durant 1 hora en agitació a temperatura ambient. Posteriorment, les membranes s'incuben amb els anticossos primaris diluïts en la mateixa solució utilitzada durant el bloqueig. La incubació es realitza novament en agitació suau a 4 °C *O/N*. L'endemà les membranes es renten amb TBS-T 0.1% (3 rentades de 5 minuts) i s'incuben durant 1 hora en agitació suau i a temperatura ambient, amb els corresponents anticossos secundaris conjugats amb la peroxidasa i amb les dilucions corresponents en la mateixa solució que s'havia utilitzat en el bloqueig. Veure taula 5 on es descriuen els anticossos utilitzats en aquest treball. Finalment les membranes es renten de nou amb TBS-T 0.1% (3 rentades de 5 minuts).

Taula 5 Anticossos utilitzats per a la immunodetecció.

Anticòs
<i>rat anti-mouse VDR (clone 9A7, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)</i>
<i>Anti-α-tubulin (ab4074, Abcam, Cambridge, UK)</i>
<i>goat anti-rat IgG-HRP (AP136P Merck KGaA, Darmstadt, Germany)</i>
<i>Polyclonal swine anti-rabbit (P0217, Dako, Santa Clara, EUA)</i>

La immunodetecció es realitza mitjançant el producte comercial ECL+ *Western Blotting analysis System* (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemanya) seguint el protocol del fabricant. La membrana tractada s'exposa en el film fotogràfic *High performance chemiluminescence film* (GE Healthcare Limited) per tal de visualitzar el senyal. Les bandes obtingudes es quantifiquen per densitometria i s'analitzen amb el programari *ImageJ*.

3.4. Anàlisi estadística

Les anàlisis estadístiques de les dades d'aquest treball s'han fet amb el programa Excel. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm error estàndard de la mitja (*SEM*). La comparació estadística es realitza mitjançant el *test t* de *Student*. Les diferències es consideren estadísticament significatives amb * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.5. Disseny de figures i esquemes

El disseny de tots els esquemes i figures que apareixen en el treball ha està realitzat amb *BioRender.com*. Les anotacions amb bandes o fletxes de les fotografies dels gels han estat realitzades amb *Canva.com*. Les gràfiques s'han fet amb Excel.

4. Resultats

Per tal de poder mantenir uns nivells d'expressió de *VDR* elevats en les cèl·lules β pancreàtiques durant el procés diabètic, en aquest estudi ens vam plantejar generar un vector viral (AAV) per a sobre expressar el gen *VDR* a les cèl·lules β del pàncrees d'animals adults.

4.1. Generació del plasmidi pAAV-RIP1-*VDR*

4.1.1. Disseny del constructe

L'objectiu era generar un constructe amb el que *VDR* s'expressés únicament en les cèl·lules β pancreàtiques, per tant, era important escollir un promotor d'expressió específic per a aquestes cèl·lules. En el nostre cas vam escollir el promotor del gen 1 de la insulina de rata (*RIP1*), específic de les cèl·lules β dels illots de *Langerhans*, ja que aquestes són les úniques que produeixen insulina. Val a dir que també hi ha nivells d'expressió molt baixos al cervell, la retina i el timus²⁵. Com s'ha comentat anteriorment, els AAV tenen la limitació en la capacitat d'encapsidació del DNA dins la partícula viral²⁶. Per tal d'optimitzar i aconseguir l'èxit en el procés d'encapsidació, era important escollir només la seqüència codificant del gen *Vdr* de ratolí, obviant els introns.

Partint d'aquests punts vam dissenyar el següent constructe:

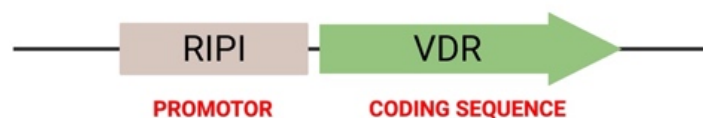


Figura 5 Representació del constructe dissenyat, on apareix el promotor del gen 1 de la insulina de rata (*RIP1*) precedint la seqüència codificant del nostre gen d'interès, el gen del receptor de la vitamina D de ratolí (*Vdr*).

4.1.2. Generació del genoma del vector viral

Per tal de generar el vector viral hem de construir un genoma artificial que contingui necessàriament: el gen d'interès i el promotor, en aquest cas *Vdr* i *RIP1* respectivament, i totes les seqüències reguladores pròpies del virus, és a dir, les *ITR*.

4.1.2.1. Obtenció de l'insert

En primer lloc ens vam centrar en l'obtenció de l'insert, és a dir, el nostre fragment d'interès, que consistia en la part codificant del gen murí de *Vdr*. Per maximitzar les possibilitats d'èxit, donada la limitació que tenen els AAV respecte a la capacitat d'encapsidar el DNA dins la partícula viral, es van dissenyar dues variants de l'insert a partir del plasmidi comercial pCMV-SPORT6-*VDR*: 1) que contenia tota la part codificant del gen (cDNA), al que anomenarem variant 1, i 2) un altre al que li vam treure 238 parells de bases (bp, de l'anglès *base pairs*) de la part final, situats entre la 3'UTR i la cua de *polyA* del gen de *Vdr*, que aparentment no afectarien l'expressió del gen. A aquest segon plasmidi el vam anomenar variant 2.

Per tal d'obtenir ambdós plasmidis, es van haver de digerir amb enzims de restricció diferents. En el cas de la variant 1, es va digerir el plasmidi pCMV-SPORT6-*VDR* amb els enzims de restricció *EcoRV* i *XhoI* (Figura 6A), obtenint així un fragment de 4352 bp i un altre de 3358 bp, aquest últim corresponent al cDNA sencer de *Vdr*.

Per separar les bandes resultants de la digestió es van fer córrer en un gel d'agarosa i es va tallar la banda corresponent a l'insert (Figura 6B). Per tal d'aïllar el DNA de l'agarosa, aquest va ser tractat amb el kit comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (*Fermentas*) obtenint-ne la quantitat suficient per procedir en la resta del procés del clonatge, com s'explica en la metodologia.

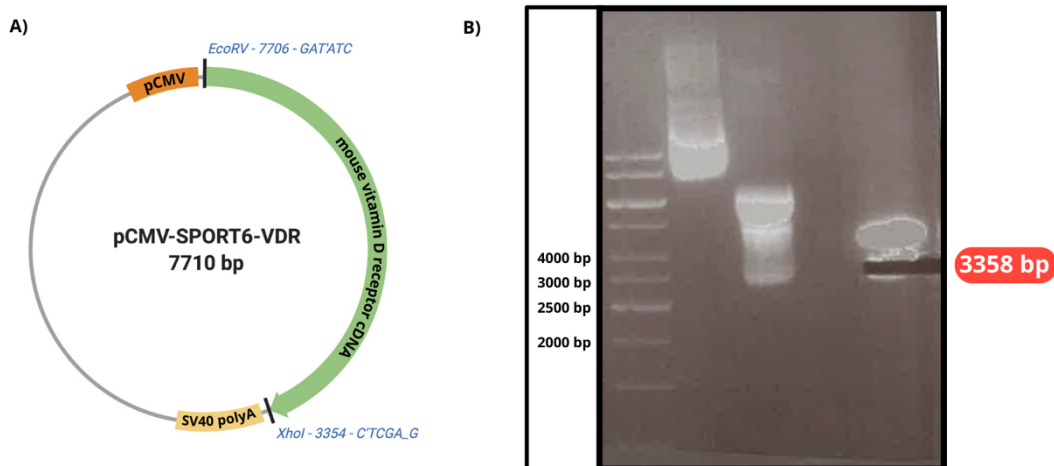


Figura 6 Obtenció de la variant 1 de l'insert: (A) Esquema del plasmidi del qual es va obtenir la variant 1 de l'insert, on es representen les dianes de restricció (B) Imatge del gel d'agarosa amb la banda corresponent al nostre fragment d'interès extreta del gel.

Per altra banda, per a l'obtenció de la variant 2 de l'insert, es va digerir el mateix plasmidi comercial (pCMV-SPORT6-*VDR*) amb l'enzim de restricció *EcoRI*, el qual realitza dos talls a les posicions 7694 i 3096 com s'indica a la figura 7A. Es van obtenir 2 fragments d'aquesta digestió: un fragment de 4598 bp i un de 3112 bp. Aquest segon corresponia a l'insert, i es va tallar i aïllar de l'agarosa seguint el mateix procediment que amb la variant 1 (Figura 7B).

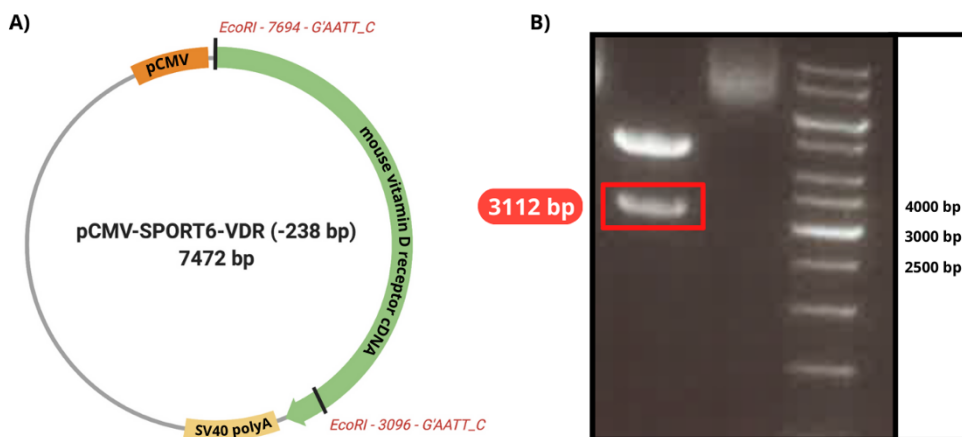


Figura 7 Obtenció de la variant 2 de l'insert: (A) Esquema del plasmidi del que es va obtenir la variant 2 de l'insert, on es representen les dianes de restricció (B) Imatge del gel d'agarosa amb la banda corresponent al nostre fragment d'interès marcada amb un requadre.

4.1.2.2. Obtenció del vector *backbone*

Seguidament vam procedir a obtenir el *backbone*, és a dir, la bastida del nostre vector viral, que era necessari que contingués el promotor escollit (*RIP1*) i les seqüències reguladores d'encapsidació del genoma viral (*ITR*).

Per a la generació d'aquest *backbone* es va escollir el plasmidi pAAV-*RIP1-GFP*, que disposa de les *ITR* i el promotor *RIP1*. En aquest cas sabem que el plasmidi és funcional (dades no publicades) i no necessitem testar-lo abans. Només ens calia eliminar el fragment corresponent al gen *GFP*, per a posteriorment substituir-lo pel del gen *Vdr*. Per aconseguir-ho es va digerir el plasmidi amb l'enzim de restricció *EcoRV*, ja que les seves dianes coincidien amb els extrems de *GFP*, com es pot observar en la figura 8A, obtenint així dos fragments de 3686 bp i 782 bp. Posteriorment el fragment de DNA corresponent al *backbone*, el de 3686 bp, es va tallar i es va

aïllar (Figura 8B) seguint el mateix procediment explicat anteriorment amb les variants 1 i 2 dels inserts.

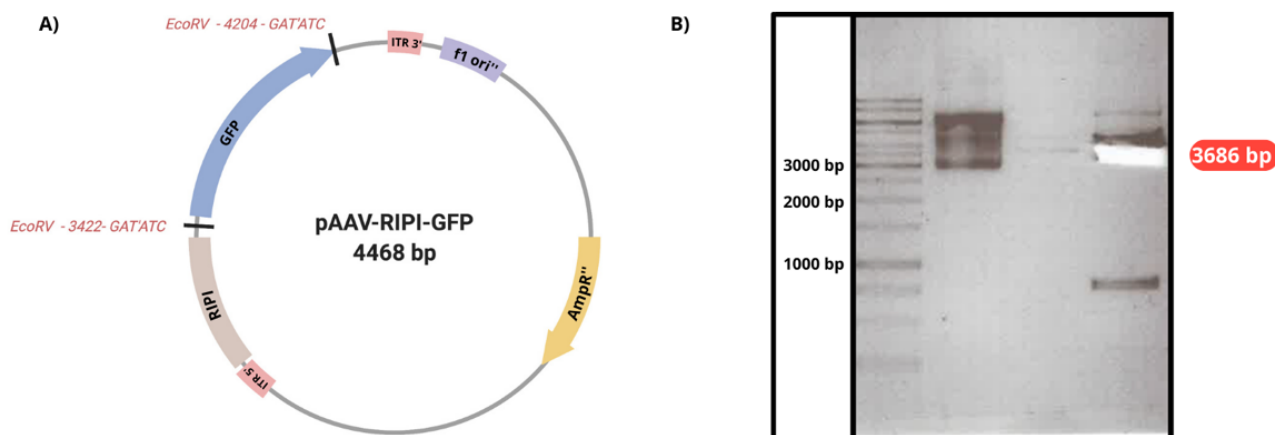


Figura 8 Obtenció del backbone: (A) Esquema del plasmidi del que es va obtenir el backbone del nostre plasmidi, on es representen les dianes de restricció (B) Imatge del gel d'agarosa amb la banda corresponent al nostre fragment d'interès extreta del gel.

4.2. Obtenció del plasmidi pAAV-RIPi-VDR

Un cop obtingudes les dues seqüències que han de formar part del plasmidi pAAV-RIPi-VDR, era necessari ajuntar els dos fragments (*backbone* i insert) per obtenir el plasmidi final, és a dir, lligar-los.

4.2.1. Preparació del DNA per a la lligació

Per tenir èxit en el procés de lligació calia assegurar-nos que el *backbone* no pogués lligar-se amb ell mateix. Per aconseguir-ho, van desfosforilar-se els extrems d'aquest, afavorint així la lligació amb l'insert (Figura 9).

Per altra banda, els extrems dels fragments a lligar han de ser compatibles, i en el nostre cas no ho eren, ja que les variants dels inserts i el *backbone* tenien extrems diferents (Taula 6, Figura 10). Per tal de reomplir aquests extrems cohesius amb nucleòtids i convertir-los a extrems roms perquè puguin lligar amb el *backbone*, aquests fragments de DNA van ser tractats amb la polimerasa *Klenow*, obtenint, finalment, els extrems de tots els fragments iguals i compatibles.

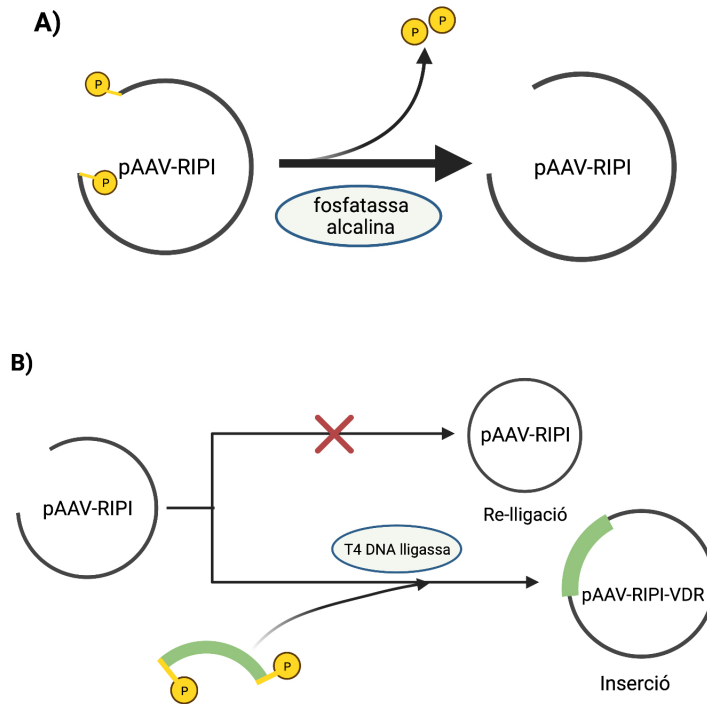


Figura 9 Preparació del backbone per a la lligació. A) Es van desfosforil·lar els extrems del backbone amb l'enzim fosfatasa alcalina, de manera que B) així impediem que el vector es lligués amb ell mateix i afavoríem la lligació amb el nostre insert.

Taula 6 Representació de les dianes i extrems dels plasmidis generats com a producte de les digestions.

Fragment de DNA	Enzim de restricció	Extrems que genera	Representació de les dianes
<i>Backbone</i>	<i>EcoRV</i>	Roms	5'... GATATC... 3'... CTATAG...
Variant 1 (Insert)	<i>EcoRV</i>	Roms	5'... GATATC... 3'... CTATAG...
	<i>XhoI</i>	Cohesius	5'... CTCGAG... 3'... GAGCTC...
Variant 2 (Insert)	<i>EcoRI</i>	Cohesius	5'... GAATTC... 3'... CTTAAG...

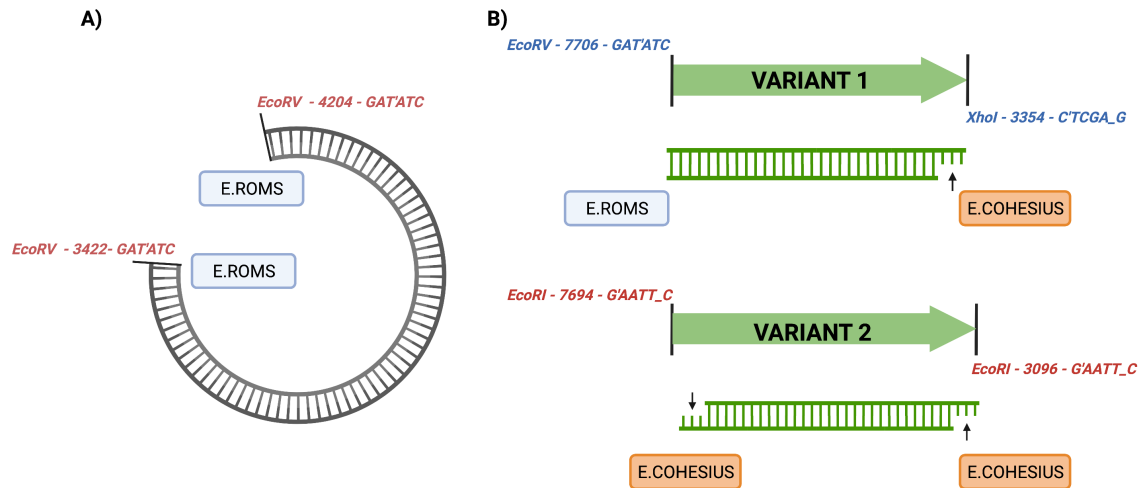


Figura 10 Esquema dels extrems que es generen com a producte de les digestions amb els enzims de restricció utilitzats. Com es pot observar, no són compatibles, ja que A) el backbone ha estat digerit amb *EcoRV* i genera extrems roms, i B) les 2 variants tenen extrems roms i cohesius dependent de l'enzim que hagi digerit aquell fragment.

4.2.2. Lligació

Un cop els fragments de DNA es van desfosforilar i tenien extrems compatibles, es va procedir a la seva lligació. Els fragments van ser incubats *O/N* a temperatura ambient amb *T4 DNA* lligassa. Un cop la lligació ja s'havia realitzat, esperàvem obtenir 2 plasmidis: 1) que contenia la variant 1 de l'insert, al que anomenarem a partir d'ara plasmidi 1, i 2) el que havia integrat la variant 2 de l'insert, que l'anomenarem plasmidi 2. Els dos contenien el promotor d'interès, *RIPi* i les seqüències *ITR*, com es pot observar en la figura 11.

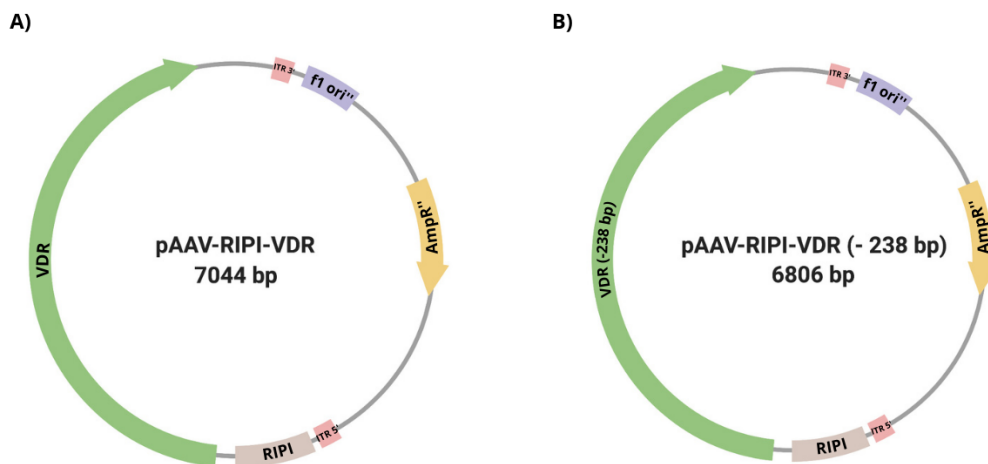


Figura 11 Representació dels dos plasmidis obtinguts: A) Plasmidi 1, que ha integrat el cDNA sencer de *Vdr* (7044 bp), B) plasmidi que ha integrat la variant 2 de l'insert, és a dir, el cDNA al que li falten els últims 238 bp (6806 bp).

4.3. Anàlisi del plasmidi pAAV-RIPI-VDR

Podria ser que durant la lligació el fragment d'interès s'hagués lligat en el sentit contrari al que ens interessa, o que s'hagués perdut alguna de les seqüències indispensables perquè el plasmidi sigui funcional. Per tal d'analitzar que els plasmidis produïts s'han lligat correctament, és a dir, en el sentit correcte i amb totes les seqüències corresponents necessitem tenir suficient quantitat de DNA.

4.3.1. Transformació

Per tal d'obtenir quantitats suficients dels plasmidis, cultius de bacteris es van transformar amb les lligacions. En aquest cas es van utilitzar cultius bacterians d'*E. coli* stb13 competents. El mètode òptim per transformar aquesta soca és el xoc tèrmic, explicat a la metodologia.

Seguidament es va procedir a la seva sembra en plaques de petri que contenien medi LB amb ampicil·lina, per poder fer posteriorment una selecció per resistència a aquest antibiòtic. D'aquesta manera només poden créixer els bacteris que han integrat els nostres plasmidis, que contenen el gen de resistència a l'ampicil·lina (AmpR), com s'indica en la figura 11. Després d'una incubació *O/N* a 37 °C es va obtenir un bon nombre de colònies, tant del plasmidi 1 com del 2. D'aquestes se'n van escollir 10 de cada variant per seguir amb el procés d'amplificació.

4.3.2. Amplificació

Les colònies seleccionades es van posar a créixer en 3 mL de LB (minipreparacions) per tal d'amplificar-les. Es va extreure el DNA de les minipreparacions resultants seguint el protocol indicat a materials i mètodes.

4.3.3. Comprovacions

4.3.3.1. Comprovació del sentit de l'insert

Per tal de comprovar que els nostres plasmidis havien integrat els seus respectius inserts correctament, és a dir, en el sentit correcte del gen, es van realitzar digestions de comprovació utilitzant enzims de restricció apropiats. Això ho vam aconseguir buscant un enzim de restricció que tingués 2 dianes en el plasmidi, una situada a dins del gen, a prop del principi o del final, i

l'altra diana situada a fora de la seqüència del gen. D'aquesta manera, podíem diferenciar fàcilment si la lligació era correcta o no, ja que sortrien bandes d'unes mides molt diferents al córrer les digestions en el gel d'agarosa.

Així doncs, el DNA del plasmidi 1 va ser digerit amb *SphI* que, com s'observa a la figura 12, les seves dianes estan situades en les posicions que ens interessa. Podem observar en la figura 12A que si l'insert lligava en el sentit correcte, l'enzim hauria digerit per unes dianes les quals donarien unes bandes de 436 bp i 6608 bp. Si lligava en el sentit contrari al que ens interessava (Figura 12B), els fragments resultants haurien de ser de 3376 bp i 3668 bp.

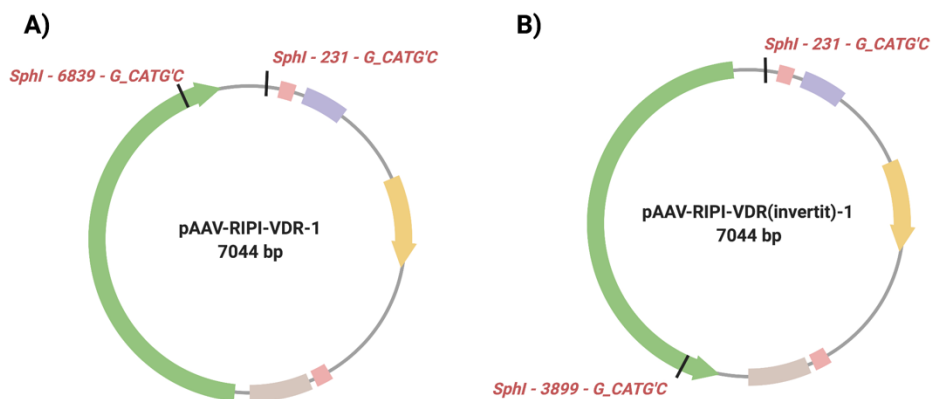


Figura 12 Esquema de les possibles integracions de la variant 1 de l'insert on es poden observar les dianes de *SphI*. A) Inserció correcta en el sentit d'interès, B) inserció incorrecta, en sentit invers.

El plasmidi 2 va ser digerit amb *AfeI* i *Sall*, que, novament, estan situats en les posicions clau per determinar el sentit en el qual s'ha lligat l'insert. Així doncs, com mostra la figura 13A si la inserció era correcta, la digestió hauria donat unes bandes de 200 bp i 6606 bp. Si lligava en el sentit contrari, els fragments resultants haurien de ser de 3280 bp i 3526 bp (Figura 13B).

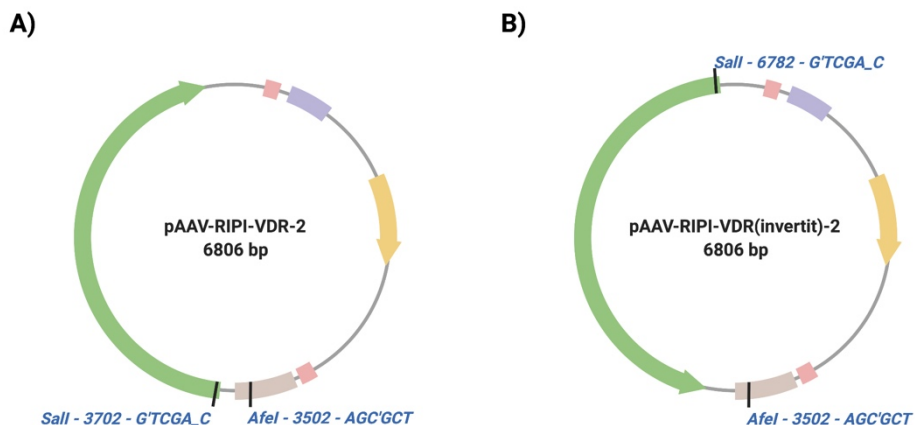


Figura 13 Esquema de les possibles integracions de la variant 2 de l'insert on es poden observar les dianes de *SphI*. A) Inserció correcta en el sentit d'interès, B) inserció incorrecta, en sentit invers.

Després de realitzar les respectives digestions, vam procedir a córrer un gel d'agarosa per tal de veure els productes d'aquestes (Figura 14). Van sortir 2 minipreparacions "bones" per cada plasmidi, és a dir, lligades en el sentit que ens interessa: la 1 i la 6 en el cas del plasmidi 1 i la 2 i la 5 en el cas del plasmidi 2.

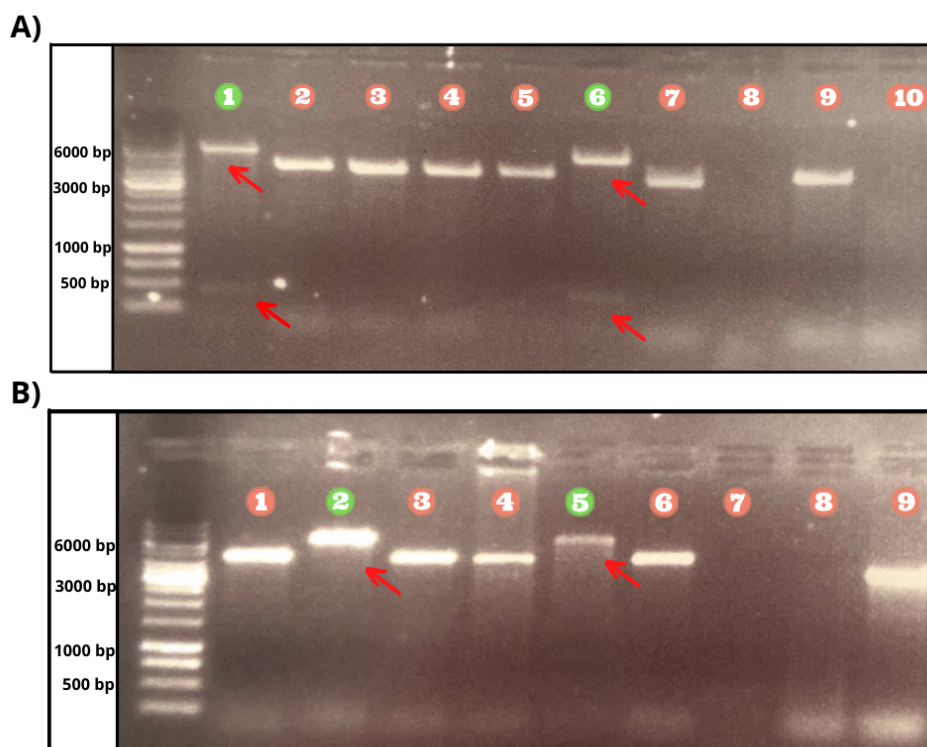


Figura 14 Fotografies dels gels d'agarosa A) Digestions del plasmidi 1 amb *SphI* on es poden veure les bandes correctes senyalades amb una fletxa en les minipreparacions 1 i 6 (marcades en verd) B) Digestions del plasmidi 2 amb *AfeI* i *Sall* on es poden veure les bandes correctes senyalades amb una fletxa en les minipreparacions 2 i 5.

4.3.3.2. Comprovació de la conservació de les *ITR*

Una de les comprovacions que sempre cal fer a banda de la inserció correcta de l'insert, és comprovar que no hi havia hagut cap alteració en les seqüències *ITR*. En el procés d'amplificació és probable que hi hagi alteracions en aquestes seqüències, per tant ens hem d'assegurar que no s'hagin perdut. Només es van comprovar la presència d'aquestes en les minipreparacions que havien lligat l'insert en el sentit correcte en la comprovació anterior.

Es van seleccionar 2 enzims de restricció les dianes dels quals estan situades en la seqüència de les *ITR* (Figura 15). Així doncs es van realitzar 2 digestions diferents: 1) amb *SmaI* i 2) amb *AhdI*.

SmaI realitzava 6 talls al plasmidi 1, quedant-nos per tant, amb fragments d' 11, 11, 1846, 2499, 2681 bp en el cas que les *ITR* s'haguessin conservat bé. Referent a la digestió amb *AhdI*,

aquest enzim tallava el nostre plasmidi 1 3 cops, deixant uns fragments de 963, 1773 i 4312 bp en el cas d'haver-se conservat les dianes de les *ITR*.

En el cas del plasmidi 2 les bandes resultants haurien de ser de: 11,11, 632, 1226, 2241, 2681 bp en el cas que es mantinguessin les seqüències després de la digestió amb *SmaI* i uns fragments de 963 1773 i 4066 bp en el cas de la digestió que vam realitzar amb *AhdI*.

El producte de les digestions de les 2 variants plasmídiques es pot visualitzar en la figura 15, on es pot observar que 3 de les 4 preparacions plasmídiques conservaven les *ITR*: la 1, la 2 i la 6.

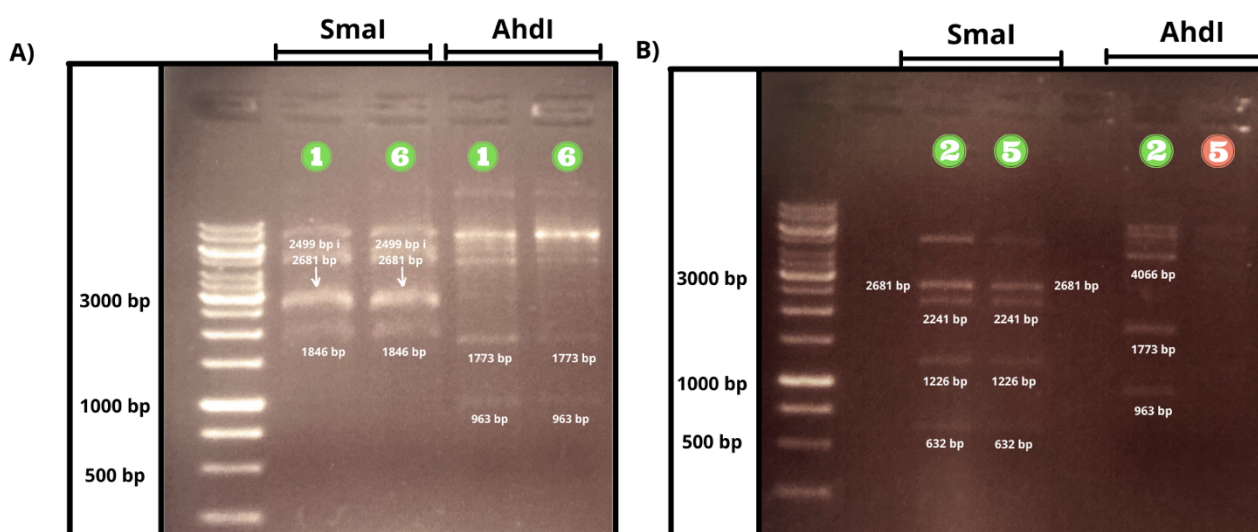


Figura 15 Fotografia del gels resultants de les digestions de comprovació de la presència de les *ITR* relatives al A) plasmidi 1 i B) plasmidi 2. En aquesta fotografia podem observar que una de les digestions de la minipreparació 5 no es veu. Creiem que no vam carregar mostra i, per tant, no es va digerir res.

4.3.4. Producció a “gran escala” del plasmidi pAAV-*RIP1-VDR*

4.3.4.1. Transformació

Per al procés de producció del vector viral és necessari tenir una gran quantitat de DNA. Per aquest motiu, un cop seleccionades les minipreparacions correctes es va procedir a la producció a gran escala del DNA plasmídic.

Per aconseguir-ho, vam tornar a transformar, però aquest cop electroporant una soca d' *E. coli* X12 Blue, per afavorir l'entrada del plasmidi pAAV-*RIP1-VDR* (de les dues variants). Després d'haver realitzat l'electroporació tal com s'indica en la metodologia, es va procedir a la sembra dels bacteris en plaques de petri que contenien LB i ampil·lina per poder fer una

selecció, de la mateixa manera que s'ha explicat abans. Després d'una incubació *O/N* a 37 °C es van seleccionar diverses colònies de cada variant per assegurar l'èxit d'amplificació.

4.3.4.2. Precultiu en minipreparacions

Per tal de facilitar el creixement a gran escala calia fer un precreixement, que consistia en la incubació durant 5 hores de minicultius (minipreparacions) de 3 mL de LB a 37 °C , abans de passar a una producció més gran amb 200 mL de LB (maxipreparació).

4.3.4.3. Cultiu en maxipreparacions

Una minipreparació de cada variant plasmídica es va transferir a un erlenmeyer amb 200 mL de LB per facilitar el creixement i, consegüentment, l'amplificació d'aquesta a gran escala. Aquests es van incubar *O/N* a 37 °C.

Després de la nit de creixement calia comprovar el grau de turbidesa del cultiu (indicador del nombre de bacteris crescuts). Per tal de fer-ho, es va fer una dilució 1/10 amb volum final de 500 µL i es van mirar les absorbàncies a 600 nm. Aquesta dada és important per un futur rendiment en la producció dels vectors virals. Les longituds d'ona (OD) han d'estar per sota de 0,5. En el nostre cas, es van obtenir les absorbàncies mostrades en la taula 7.

Taula 7 Absorbàncies obtingudes després de la incubació de les maxipreparacions a 600 nm. És important que no superin els 0,5 OD per un futur bon rendiment en la producció dels vectors virals.

Maxipreparació	Absorbància (600 nm)
Plasmidi 1 - Minipreparació 1	0,396
Plasmidi 1 - Minipreparació 6	0,328
Plasmidi 2 - Minipreparació 2	0,404

4.3.4.4. Extracció de DNA de les maxipreparacions

Per tal d'aïllar el DNA de les maxipreparacions, es va procedir a realitzar una extracció de DNA seguint les instruccions del kit comercial *GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit*. Es van obtenir les concentracions de DNA suficients per seguir el procés de producció viral (Taula 8).

Taula 8 Concentracions de DNA obtingudes després de l'extracció amb el kit comercial *GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit*, mesurades amb el *Nanodrop 1000*.

Mostra DNA	Concentració (ng/ μ L)
Plasmidi 1 - 1	889,5
Plasmidi 1 - 6	881,3
Plasmidi 2 - 2	804,2

4.3.4.5. Comprovació de la presència de les *ITR*

L'últim pas abans de la producció viral va ser comprovar que en la producció a gran escala se seguien conservant les seqüències *ITR*. Per tant, de la mateixa manera que anteriorment, vam digerir el DNA obtingut del punt anterior amb *SmaI* i *AhdI*. Després de les digestions vam poder comprovar que les 3 mostres conservaven les *ITR*, com s'observa a la figura 16.

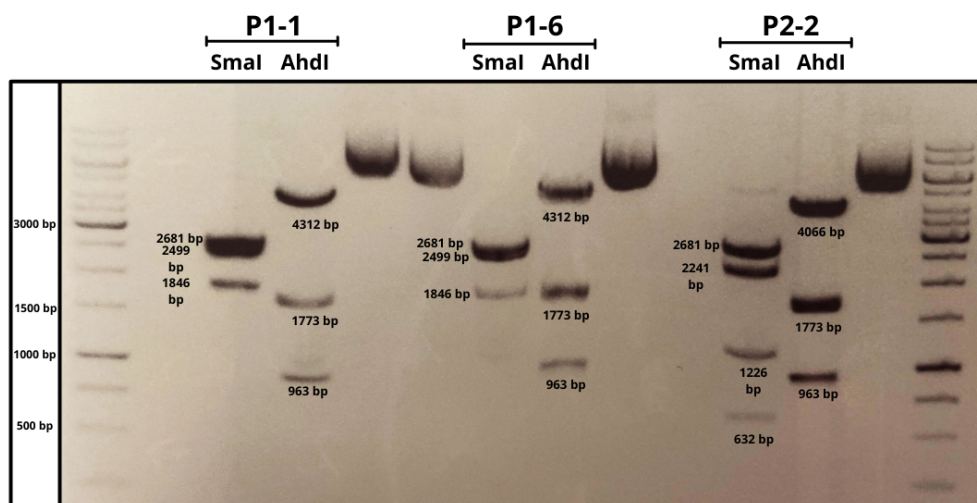


Figura 16 Fotografia del gel d'agarosa obtingut després de córrer les digestions per comprovar la presència de les *ITR*.

4.4. Anàlisi funcional del plasmidi pAAV-RIPI-VDR

Un cop vam obtenir quantitats de DNA plasmídic suficients, calia comprovar la funcionalitat dels constructes abans de procedir a la producció del vector viral. Això és necessari ja que sabem que el procés de producció viral és molt car i costós.

4.4.1. Transfecció del plasmidi en HEK293

Per tal de portar a terme aquestes comprovacions funcionals es van transfectar cèl·lules HEK293 amb cadascuna de les variants plasmídiques i, passades 48 hores, es va procedir a l'anàlisi de l'expressió del gen de *Vdr* i també a determinar els seus nivells proteics.

4.4.2. Anàlisi de l'expressió de mRNA de *Vdr* per qPCR

En primer lloc es va analitzar la presència de mRNA de *Vdr* mitjançant una PCR quantitativa (qPCR).

Es va observar que les cèl·lules transfectades tant amb el plasmidi 1 com amb el plasmidi 2 presentaven nivells elevats de *Vdr* comparant amb les cèl·lules no transfectades (null). Curiosament, les cèl·lules que han integrat el plasmidi 2 presenten nivells d'expressió més alts que les que han integrat el plasmidi 1, com es pot observar a la figura 17.

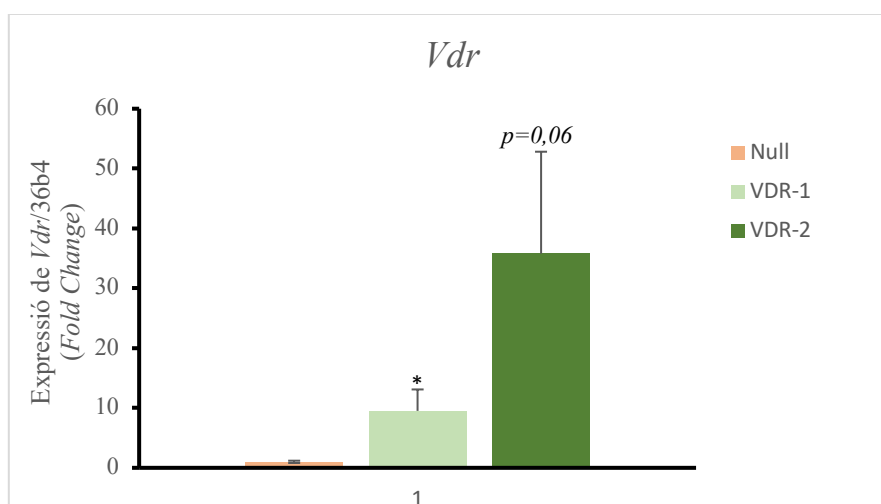


Figura 17 Nivells d'expressió de *Vdr*: Representació gràfica dels nivells d'expressió respecte les cèl·lules no transfectades (Fold Change). Prova T: $p < 0,05$ * vs null.

Així doncs, després d'haver transfectat les cèl·lules i analitzar els nivells de mRNA de *Vdr* es va observar que els constructes dissenyats eren funcionals.

4.4.3. Anàlisi de la proteïna VDR mitjançant *Western blot* (WB)

Per tal de determinar si el mRNA era traduït, es van analitzar els nivells proteics de VDR mitjançant *western blot*. Com es pot observar a la figura 18, l'expressió de la proteïna estava incrementada en les cèl·lules transfectades respecte a les no transfectades.

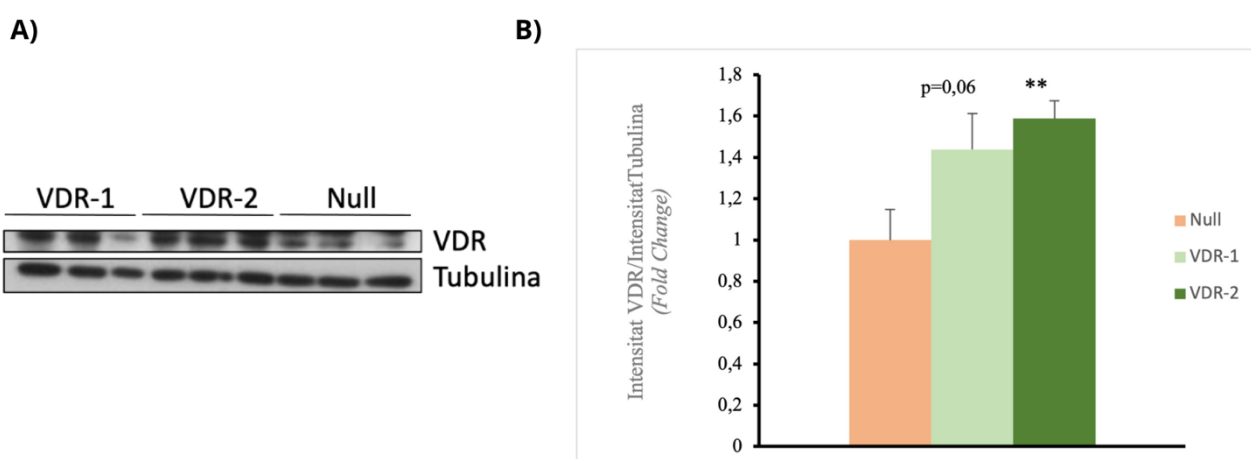


Figura 18 Nivells proteics de VDR per western blot A) Anàlisi de la presència de la proteïna VDR i com a control de càrrega s'analitza la presència de tubulina. B) Representació gràfica de la quantificació dels nivells proteics respecte les cèl·lules no transfectades (Fold Change). Prova T: $p < 0,01$ ** vs null.

Aquests resultats corroboraven els obtinguts amb l'anàlisi de l'RNA que les cèl·lules transfectades produïen *VDR* de manera funcional.

5. Discussió

El dèficit de vitamina D que està sofrint aproximadament la meitat de la població mundial està associat a un major risc a patir múltiples malalties i trastorns de salut. Aquesta deficiència s'ha vinculat directament amb risc a desenvolupar diabetis ²⁷.

S'ha descrit que la vitamina D a través del seu receptor (*VDR*) té efectes beneficiosos sobre la funcionalitat de la cèl·lula β pancreàtica ²⁸. En concret, resultats previs del grup de recerca on he fet aquest treball demostren que les cèl·lules β tant de pacients diabètics com de models murins de diabetis presenten nivells molts baixos de *Vdr*. A més, també han observat que evitant la baixada dels nivells del receptor mitjançant la sobreexpressió transgènica de *Vdr* específicament en les cèl·lules β , protegeix als animals de desenvolupar diabetis ²⁹.

D'altra banda, és sabut que els vectors virals són una gran eina per introduir material genètic exogen en una cèl·lula diana per tal de modificar el seu genoma ^{13,14}, per exemple, l'augment de la dosi gènica. Així doncs, ens hem plantejat el disseny d'un vector viral que porti el gen *Vdr* sota el promotor del gen de la insulina (*RIP1*) per a què pugui ser expressat en la cèl·lula β pancreàtica en qualsevol moment de la seva vida. És important remarcar aquest punt per aclarir el motiu de la realització del vector viral. El motiu és que no se sap amb certesa si la protecció que presenten els ratolins transgènics enfront la diabetis és deguda al fet que aquests animals ja porten el gen sobreexpressat des de l'estadi embrionari. Per tant, ens vam preguntar si l'efecte seria el mateix quan la sobreexpressió de *Vdr* es produís en un individu adult. L'objectiu doncs de fer el vector viral seria poder transferir *Vdr* a les cèl·lules β d'un animal adult i determinar si aquest també estaria protegit enfront del desenvolupament d'un procés diabètic, tal com es va observar en els animals transgènics. Per altra banda, també ens permetria estudiar si la transfecció d'aquest vector viral a un animal ja diabètic ens permetria revertir aquest procés, i per tant curar-lo.

En primer lloc es va estudiar el disseny del constructe que s'havia de fer per poder dirigir el gen *Vdr* directament a les cèl·lules que es veuen afectades, i per tant on s'origina el procés diabètic. Aquestes són concretament les cèl·lules β pancreàtiques, que són les úniques cèl·lules del cos capaces de produir insulina. Per tant, una bona manera de dirigir l'expressió exclusivament a les cèl·lules β seria escollint el promotor de la insulina (*RIP1* del anglès *rat insulin promoter*), tal com ja s'ha fet en estudis previs i ha demostrat que restringeix l'expressió del transgen a les cèl·lules β ³⁰.

S'ha descrit que els AAV tenen una limitació en la capacitat d'encapsidar el DNA dins la partícula viral (4,7 kb) ²⁶, per tant, ens havíem d'assegurar d'introduir la seqüència de *Vdr* indispensable perquè el gen pogués expressar-se. Donat que *Vdr* es força gran vam decidir seguir

2 estratègies, d'on van sortir resultants 2 plasmidis finals. Els dos contenien les seqüències *ITR* necessàries per a l'encapsidació del genoma de l'AAV, l'origen de replicació, el promotor RIPI i el gen de resistència a l'ampicil·lina. La diferència entre els dos plasmidis és que un contenia la seqüència codificant completa del gen *Vdr* i l'altre contenia la seqüència codificant, però li faltaven 238 bp de la part final, entre la 3'UTR i la cua de polyA, per tal de reduir la mida i assegurar més èxit en la producció del vector viral.

Curiosament, com s'ha observat als resultats, el plasmidi que conté el gen al qual li falten aquests 238 bp mostra més expressió en cèl·lules transfectades que el plasmidi que conté la seqüència completa. Pot ser que la pèrdua d'aquests parells de bases aportin més estabilitat a l'RNA i per això veiem més expressió. També és possible que en aquests parells de bases eliminats es trobés una diana d'un microRNA, i la seva eliminació comporti un augment en l'estabilitat del RNA de *Vdr*.

Aquestes proves cel·lulars, concretament en cèl·lules HEK293 es realitzen per verificar que el plasmidi que hem generat i produït és funcional. Els resultats obtinguts en els estudis fets amb les cèl·lules revelen que les cèl·lules transfectades amb aquests plasmidis mostren més expressió, tant a nivell d'RNA com en l'àmbit proteic de VDR. S'han de realitzar aquestes proves ja que el procés de producció viral és molt car i molt costós, i no tindria sentit generar un vector viral amb un plasmidi no funcional. En principi, la millor manera que teníem d'avaluar l'eficàcia dels plasmidis hauria estat testar-los en una línia cel·lular pròpia de cèl·lula B, com serien les cèl·lules INS1 (Línia cel·lular d'insulinoma de rata). Aquestes cèl·lules, però, es transfecten molt malament i per aquest motiu es van realitzar els estudis amb les cèl·lules HEK293, que tot i ser de ronyó presenten patrons de diversos tipus cel·lulars i per tant són capaces d'expressar gens no propis.

La generació d'aquests plasmidis aporta al centre de recerca CBATEG una eina molt útil per poder transferir el gen *Vdr* en la cèl·lula β d'un individu en qualsevol moment de la seva vida, i, per tant, poder estudiar el paper de *Vdr* com a agent terapèutic en la protecció i/o curació de la diabetis.

6. Conclusions

1. S'ha dissenyat un constructe que conté la seqüència codificant del gen *Vdr* sota el promotor *RPI* per dirigir la seva expressió a les cèl·lules β pancreàtiques.
2. S'ha decidit seguir dues estratègies de clonació: 1) Utilitzant la seqüència codificant sencera de *Vdr* com a insert (variant 1) i 2) Utilitzant la seqüència codificant de *Vdr* a la que li falten 238 bp (variant 2).
3. S'han obtingut les seqüències de DNA que contenen tots els elements necessaris per a la generació del vector plasmidi: inserts (variant 1 i 2) i *backbone*.
4. Les seqüències obtingues han estat manipulades per afavorir i optimitzar la lligació.
5. S'han obtingut 2 plasmidis: Un que conté la variant 1 de l'insert i l'altre que conté la variant 2.
6. A partir de cultius bacterians, s'han amplificat els 2 plasmidis per produir-ne grans quantitats.
7. S'ha observat que durant el procés de clonatge els plasmidis no han perdut cap seqüència essencial per a la futura producció del vector viral.
8. Els plasmidis produïts s'han analitzat per qPCR i western blot per comprovar la seva funcionalitat i expressió. Les cèl·lules transfectades amb els plasmidis expressen nivells superiors de VDR tant pel que fa a l'RNA com a la proteïna respecte a les cèl·lules no transfectades.
9. S'ha observat que el plasmidi 2, el que porta l'insert amb -238 bp, presenta una major expressió que el plasmidi 1.

7. Bibliografia

1. Grammatiki, M., Rapti, E., Karras, S., Ajjan, R. A. & Kotsa, K. Vitamin D and diabetes mellitus: Causal or casual association? *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **18**, 227–241 (2017).
2. Amrein, K. *et al.* Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *European Journal of Clinical Nutrition* **74**, 1498–1513 (2020).
3. Hyppönen, E., Boucher, B. J., Berry, D. J. & Power, C. 25-Hydroxyvitamin D, IGF-1, and Metabolic Syndrome at 45 Years of Age: A Cross-Sectional Study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes* **57**, 298–305 (2008).
4. Dong, J.-Y. *et al.* Vitamin D Intake and Risk of Type 1 Diabetes: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients* **5**, 3551–3562 (2013).
5. Bid, H. K. *et al.* Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. *Indian J Med Sci* **63**, 187–194 (2009).
6. Wood, J. R. *et al.* Vitamin D status in youth with type 1 and type 2 diabetes enrolled in the Pediatric Diabetes Consortium (PDC) is not worse than in youth without diabetes. *Pediatr Diabetes* **17**, 584–591 (2016).
7. Takiishi, T., Gysemans, C., Bouillon, R. & Mathieu, C. Vitamin D and Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **39**, 419–446 (2010).
8. Mathieu, C., Gysemans, C., Giulietti, A. & Bouillon, R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* **48**, 1247–1257 (2005).
9. Luong, K. vinh quoc, Nguyen, L. T. H. & Nguyen, D. N. P. The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **21**, 338–346 (2005).
10. Mitri, J., Muraru, M. D. & Pittas, A. G. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* **65**, 1005–1015 (2011).

11. Zeitz, U. *et al.* Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *The FASEB Journal* **17**, 509–511 (2003).
12. CASELLAS, A. Vitamin D Receptor overexpression in β -cells ameliorates diabetes in mice. *Diabetes* (2020) doi:10.2337/db19-0757.
13. Anderson, W. F. Human gene therapy. *Nature* **392**, 25–30 (1998).
14. Naldini, L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* **526**, 351–360 (2015).
15. Nayerossadat, N., Maedeh, T. & Ali, P. A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research* **1**, 27 (2012).
16. Mingozzi, F. & High, K. A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12**, 341–355 (2011).
17. Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D. & Rose, J. A. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* **40**, 241–247 (1981).
18. Casto, B. C., Atchison, R. W. & Hammon, W. M. Studies on the relationship between adeno-associated virus type I (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures and its effect on helper adenovirus. *Virology* **32**, 52–59 (1967).
19. Lisowski, L., Tay, S. S. & Alexander, I. E. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **24**, 59–67 (2015).
20. Kotterman, M. A. & Schaffer, D. V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* **15**, 445–451 (2014).
21. Michelfelder, S. & Trepel, M. Adeno-associated viral vectors and their redirection to cell-type specific receptors. *Adv Genet* **67**, 29–60 (2009).
22. Hirata, R. K. & Russell, D. W. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol* **74**, 4612–4620 (2000).
23. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
24. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).

25. Pugliese, A. *et al.* The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* **15**, 293–297 (1997).
26. Akil, O. Dual and triple AAV delivery of large therapeutic gene sequences into the inner ear. *Hear Res* **394**, 107912 (2020).
27. Mathieu, C. Vitamin D and diabetes: Where do we stand? *Diabetes Res. Clin. Pract.* **108**, 201–209 (2015).
28. Leung, P. S. The Potential Protective Action of Vitamin D in Hepatic Insulin Resistance and Pancreatic Islet Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients* **8**, 147 (2016).
29. Morró, M. *et al.* Vitamin D Receptor Overexpression in β -Cells Ameliorates Diabetes in Mice. *Diabetes* **69**, 927–939 (2020).
30. Agudo, J. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor–Mediated Islet Hypervascularization and Inflammation Contribute to Progressive Reduction of β -Cell Mass. *Diabetes* **61**, 2851–2861 (2012).