



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA**

---

**ESTRATÈGIES GENÈTIQUES PER A LA  
INHIBICIÓ DE L'APOPTOSI EN CULTIUS  
*IN VITRO* D'HIBRIDOMES**

---

Programa de Doctorat de Biotecnologia  
SANDRA JUANOLA JOURNÉ

Bellaterra, gener de 2007

JORDI JOAN CAIRÓ BADILLO, professor titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JOAQUIM VIVES ARMENGOL, investigador contractat de l'empresa *Stem Cell Sciences* (UK),

CERTIFIQUEM:

Que la llicenciada Sandra Juanola Journé ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball que amb el títol de: *Estratègies genètiques per a la inhibició de l'apoptosi en cultius in vitro d'hibridomes*, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor.

I perquè en prenguem coneixement i tingui els efectes que corresponguin, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, gener de 2007

Jordi Joan Cairó Badillo

Joaquim Vives Armengol

## *Viatge a Ítaca*

*Quan surts per fer  
el viatge cap a Ítaca,  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences.  
Has de pregar que el camí sigui llarg,  
que siguin moltes les matinades  
que entraràs en un port  
que els teus ulls ignoraven,  
i vagis a ciutats  
per aprendre dels que saben.*

*Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.  
Has d'arribar-hi, és el teu destí,  
però no forçis gens la travessia.  
És preferible que duri molts anys,  
que siguis vell quan fondegis l'illa,  
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,  
sense esperar que et doni més riqueses.*

*Ítaca t'ha donat el bell viatge,  
sense ella no hauries sortit.  
I si la trobes pobre, no és que Ítaca  
t'hagi enganyat.  
Savi, com bé t'has fet,  
sabràs el que volen dir les Itagues.*

*Lluís Llach.*



*Apoptosis, the art of cell death*

Als meus pares i germans

# AGRAÏMENTS

# Agraïments

Tot i que semblava que mai arribaria a port, per fi he tirat l'ànchora i aquesta tesi és una realitat. Arribat al punt i final d'aquest treball només em queda expressar la més sincera gratitud a totes aquelles persones que d'una manera o altra han contribuït al desenvolupament d'aquest treball.

Primer de tot vull agrair molt sincerament a en Francesc Gòdia per haver-me permès formar part del seu grup de recerca i pel seu suport en tot allò que ha calgut.

Un enorme GRÀCIES per a en Jordi Cairó. La seva dedicació, el seu entusiasme i la seva paciència han estat decisius per dur a bon terme aquest treball. Li agraeixo l'orientació constant al llarg d'aquest treball i perquè sempre està disposat a donar-te un cop de mà i fins i tot, a venir al laboratori els caps de setmana quan hi havia un experiment en marxa. Per a mi ha estat tot un privilegi i una magnífica experiència tenir-lo com a director!

A en Quim Vives, per ser un bon company de laboratori i per tot el que he après treballant al seu costat. També li agraeixo haver estat el segon director d'aquesta tesi, gràcies pels consells!

A l'antic grup de Mabs ("Mabs Attacks"): a l'Albert Soley, en Martí Lecina, en Juli Rodríguez, en Jordi Gàlvez, en Jordi Farré, en Xavi Rubiralta i l'Enric Sarró, per ser bons companys de feina i pel bon ambient de treball que hi havia, recordo els dinars i cafès com a rialles constants. A tots els companys del Departament d'Enginyeria Química i especialment, a la Trinitat Suau (Gràcies per ser una amiga), l'Ernest Milian, en Luís Vidal, en Manuel Alarcón (algun dia visitaré Xile), a l'Òscar i en Toni Casablanca (Gràcies pel "training" en bioreactors).

A la Rosi Tello per la seva amabilitat i perquè sempre està disposada a donar-te un cop de mà.

A l'Eva, la Rosa i la gent del CID, per les estones tan agradables que he passat amb ells. Gràcies per la vostra simpatia.

També faig extensible la meva gratitud als que han vingut de passada al laboratori deixant un inoblidable record, la Paloma, la Janneke, en Jacob i la Silvana.

I finalment, als meus pares, a en Frederic i als "meus" bessonets, Stephane i Jeremie, pel seu suport incondicional i per ajudar-me a arribar on he arribat.

Espero no haver-me deixat ningú, si és així apunteu-vos-hi!

Moltes gràcies a tots!

# ÍNDEX

---

---

## RESUM

## INTRODUCCIÓ

### 1- Cultiu *in vitro* de cèl·lules animals

1.1- Importància del cultiu <i>in vitro</i> de cèl·lules animals.....	1
1.2- Problemàtica del cultiu <i>in vitro</i> de cèl·lules d'hibridoma.....	2
1.3- Mort cel·lular programada en l'hibridoma KB26.5.....	4
1.3.1- Característiques morfològiques i bioquímiques de l'apoptosi .....	4
1.3.2- Fases de l'apoptosi. Rutes bioquímiques de l'apoptosi. ....	7
1.3.2.1- Fase inductora.....	8
1.3.2.1.1- Inductors de l'apoptosi i les rutes metabòliques que segueixen en l'hibridoma KB26.5 .....	9
1.3.2.2- Fase transductora. ....	12
1.3.2.3- Fase efectora i de degradació.....	13
1.3.2.3.1- Identificació i paper de les Caspases en l'hibridoma KB26.5 .....	17
1.3.3- Membres de la família bcl-2. ....	20
1.3.3.1- Classificació.....	21
1.3.3.2- Localització subcel·lular.....	22
1.3.3.3- Regulació .....	24
1.3.3.4- Identificació de l'expressió de membres de la família del <i>bcl-2</i> en l'hibridoma KB26.5.....	26
1.4- Estratègies per inhibir l'apoptosi en els bioreactors .....	27

## OBJECTIUS

2- Objectius.....	29
-------------------	----

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 3- Modificació genètica de l'hibridoma KB 26.5

3.1- Diances per al bloqueig de l'apoptosi.....	32
3.2- Obtenció i clonació dels protectors endògens: <i>bcl-2</i> i <i>bcl-x<sub>L</sub></i> .....	33
3.2.1- Bcl-2.....	33
3.2.2- Bcl-x <sub>L</sub> .....	34
3.3- Inhibició de l'apoptosi per sobreexpressió dels gens <i>bcl-2</i> i <i>bcl-x<sub>L</sub></i> .....	35
3.4- Obtenció i clonació dels gens vírics: <i>bhrf-1</i> , <i>ksbcl-2</i> i <i>p35</i> .....	41
3.4.1- BHRF-1.....	43
3.4.2- KSBcl-2.....	44
3.4.3- P35.....	47
3.5- Inhibició de l'apoptosi per expressió dels gens <i>bhrf-1</i> , <i>ksbcl-2</i> i <i>p35</i> .....	48
3.6- Estabilitat de l'expressió de les construccions pcDNA3 en l'hibridoma: ús de vectors amb IRES. ....	54
3.7- Efecte de l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques sobre la producció d'anticòs.....	56
3.8- Valoració final.....	57

### 4- Estratègies de transfecció de l'hibridoma KB26.5

4.1- Mètodes de transferència gènica.....	60
4.2- Marcadors de transfecció i selecció.....	63
4.3- Estratègies de transfecció de l'hibridoma KB26.5.....	64
4.3.1- Vectors vírics: virus adenoassociats.....	64
4.3.2- Lipofecció.....	65
4.3.3- Electroporació.....	68
4.3.4- Coprecipitats Adenovirus-DNA.....	69
4.4- Valoració final.....	72

### 5- Estabilitat de l'expressió en l'hibridoma KB26.5

5.1- Ús de vectors amb IRES.....	73
5.2- Funcionalitat dels vectors bicistrònics.....	75
5.2.1- Vector <i>pegfp_IRES_neo</i> .....	76



5.2.2- Vector <i>pneo_IRES_egfp</i> .....	77
5.2.3- Transfecció dels vectors <i>pegfp_IRES_neo</i> i <i>pneo_IRES_egfp</i> en cèl·lules 293 N .....	79
5.3- Clonació dels gens antiapoptòtics en els vectors bicistrònics <i>pIRESneo</i> i <i>pIRESpuro2</i> .....	81
5.4- Estudis d'inhibició de l'apoptosi. Experiments de retorn de la viabilitat dels cultius .....	83
5.5- Estabilitat de l'expressió de les construccions bicistròniques en l'hibridoma KB26.5.....	91
5.6- Efecte de l'expressió de les construccions bicistròniques sobre la producció d'anticòs .....	93
5.7- Valoració final.....	95
<b>6- Cultius <i>in vitro</i> d'hibridomes modificats genèticament en sistemes en continu</b>	
6.1- Estratègies de cultiu per a cèl·lules animals .....	98
6.2- Cultiu en continu.....	103
6.3- Cultiu en perfusió .....	106
6.4- Valoració final.....	112

## CONCLUSIONS

### 7- Conclusions

7.1- Conclusions.....	115
-----------------------	-----

## MATERIALS I MÈTODES

### 8- Materials i mètodes

8.1- Material biològic.....	120
8.1.1- Línies cel·lulars .....	120
8.1.1.1- Línia cel·lular d'hibridoma KB26.5 .....	120

---

8.1.1.2- Línia cel·lular 293-N .....	120
8.1.2- Soques bacterianes .....	120
8.2- Medis de cultiu .....	121
8.2.1- Medi de cultiu per a les línies cel·lulars KB26.5 i 293-N .....	121
8.2.2- Medi de cultiu per a la soca bacteriana .....	123
8.2.2.1- Medi LB líquid .....	124
8.2.2.2- Medi LB sòlid .....	124
8.2.2.3- Medi selectiu .....	124
8.3- Manteniment del material biològic .....	125
8.3.1- Manteniment de les línies cel·lulars KB26.5 i 293-N .....	125
8.3.2- Manteniment de la soca bacteriana .....	126
8.4- Sistemes de cultiu.....	126
8.4.1- Sistemes de cultiu per a cèl·lules animals.....	126
8.4.1.1- Flascons de cultiu .....	126
8.4.1.2- Flascons de cultiu agitats o "Spinner flasks" .....	126
8.4.1.2.1- Cultiu en perfusió .....	127
8.4.1.2.2- Cultiu en continu .....	127
8.4.1.3- Plaques de cultiu de 6 i 12 pous .....	128
8.4.2- Sistemes de cultiu de la soca bacteriana .....	129
8.5- Recompte de cèl·lules animals .....	129
8.5.1- Concentració cel·lular i viabilitat cel·lular.....	130
8.6- Anàlisi de la glutamina i d'altres aminoàcids per HPLC.....	131
8.7- Determinació de la concentració de glucosa i lactat .....	132
8.8- Determinació de l'activitat de l'anticòs monoclonal.....	133
8.8.1- Congelació d'eritròcits.....	134
8.8.2- Descongelació d'eritròcits .....	134
8.8.3- Hemoaglutinació en placa.....	135
8.9- Plasmidis .....	137
8.9.1- pcDNA3 .....	137
8.9.2-pIRESneo i pIRESpuro2.....	138
8.9.3- pEYFP-C1 .....	139

---

8.9.4- pIRES2-EGFP .....	140
8.10- Extracció i purificació de material genètic .....	141
8.10.1- Extracció i purificació de DNA plasmídic .....	141
8.10.1.1- Minipreparacions de DNA plasmídic .....	141
8.10.1.2- Midipreparacions de DNA plasmídic .....	142
8.10.2- Extracció de DNA genòmic.....	143
8.10.3- Extracció de RNA <sub>TOTAL</sub> .....	144
8.11- Purificació i separació del material genètic.....	146
8.11.1- Separació del material genètic per electroforesi en gels d'agarosa.....	146
8.11.2- Purificació de bandes de DNA en gels d'agarosa.....	148
8.11.3- Quantificació de la concentració de DNA .....	149
8.12- Obtenció i amplificació enzimàtica del material genètic.....	150
8.12.1- Disseny dels encebadors .....	150
8.12.2- Amplificació per PCR.....	151
8.12.3- Amplificació per RT-PCR.....	153
8.13- Modificacions enzimàtiques del DNA.....	155
8.13.1- Restricció enzimàtica .....	155
8.13.2- Reompliment d'extrems .....	156
8.13.3- Desfosforilació del DNA .....	157
8.13.4- Lligació de fragments de DNA.....	158
8.13.5- TOPO Cloning Kit.....	159
8.14- Transformació.....	161
8.14.1- Preparació de cèl·lules competents. Mètode del clorur de calci.....	161
8.14.2- Transformació.....	162
8.15- Transfecció de cèl·lules animals.....	163
8.15.1- Lipofecció .....	163
8.15.2- Electroporació .....	165
8.15.3- Coprecipitats Adenovirus-DNA .....	166
8.15.4- Seguiment de la transfecció .....	167
8.16- Infecció de l'hibridoma KB26.5 amb virus adenoassociats.....	167
8.16.1-Determinació de l'activitat de la $\beta$ -galactosidasa .....	168

---

8.17- Tècniques de seguiment de l'apoptosi.....	169
8.17.1- Marcatge amb Anexina-V-Fluos i quantificació per citometria de flux.....	169
8.17.2- Visualització de l'apoptosi per microscòpia de fluorescència o microscòpia confocal.....	170
8.17.3- Visualització de la fragmentació del DNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.....	171
8.18- Estudi del cicle cel·lular de les cèl·lules d'hibridoma per citometria de flux ...	171

<b>REFERÈNCIES</b> .....	173
--------------------------	-----

<b>NOMENCLATURA</b> .....	203
---------------------------	-----

## **ANNEXOS**

<b>Annex I</b> .....	207
<b>Annex II</b> .....	210

# RESUM

---

## RESUM

En l'actualitat, la indústria farmacèutica utilitza la tecnologia basada en el cultiu *in vitro* de cèl·lules animals per a la producció de compostos d'elevat interès terapèutic i també, com a model biològic per assajar l'activitat de nous fàrmacs. Moltes empreses fan ús d'aquesta tecnologia ja que es tracta del sistema biològic més apropiat per obtenir proteïnes complexes. Tot i així, pel que fa l'ús de cèl·lules animals, existeixen una sèrie de limitacions importants, ja que s'ha comprovat que una gran part de les cèl·lules presents en aquests cultius moren per apoptosi.

La principal causa d'aquest tipus de mort és l'esgotament de determinats nutrients essencials o factors de creixement i l'acumulació de metabòlits tòxics per a la cèl·lula. L'apoptosi representa un greu inconvenient a nivell del cultiu *in vitro* en bioreactors, ja que disminueix dràsticament la viabilitat del cultiu i en conseqüència, la productivitat del bioreactor.

En el present treball, s'han utilitzat les eines que proporciona la biologia molecular per tal de modificar les cèl·lules, fent-les més resistents al procés d'apoptosi. L'objectiu final és aconseguir cèl·lules que mantinguin la viabilitat durant més temps, tot i que en el medi de cultiu es donin senyals per iniciar l'apoptosi. D'aquesta manera es milloraria la productivitat i l'eficiència d'aquests processos.

En aquesta tesi doctoral s'han proposat dues estratègies d'inhibició genètiques, una que consisteix en inhibir l'actuació de les Caspases, proteïnes claus en el procés d'apoptosi, i l'altra que es centra a nivell del mitocondri, punt on conflueixen els diferents senyals apoptòtics d'origen intracel·lular.

Entre els diferents gens assajats, els resultats més positius s'han obtingut amb la proteïna BHRF-1. En canvi, l'expressió de la proteïna P35 no ha permès protegir les

---

cèl·lules enfront l'apoptosi. Gràcies a l'expressió del gen *bhrf-1* és possible retardar la mort per apoptosi dels cultius cel·lulars, augmentant així la productivitat del procés, i garantir la supervivència de les cèl·lules sotmeses durant 72 hores a condicions inductores de l'apoptosi, ja sigui per raons accidentals o per situacions de limitació de nutrients o acumulació de metabòlits tòxics.

També s'ha observat que després d'un cert període de manteniment de la resembra, les cèl·lules transfectades perden la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi, ja que l'expressió del gen antiapoptòtic s'acaba silenciant. Per aquest motiu, es necessari l'ús de vectors que expressin el gen d'interès al llarg del temps. Els resultats obtinguts han demostrat que els vectors bicistrònics són una bona eina per modificar genèticament les cèl·lules animals ja que per una banda, permetent una integració adequada del fragment de DNA clonat i per l'altra que les modificacions genètiques realitzades perdurin al llarg de temps sense la necessitat d'exercir una selecció constant amb antibiòtic, aspecte molt important sobretot quan s'opera en bioreactors durant períodes molt llarg de temps i es treballa amb volums propis d'un bioreactor.

En els cultius en perfusió s'ha vist que l'expressió del gen antiapoptòtic *bhrf-1* permet reduir considerablement el nombre de cèl·lules mortes en el cultiu, tot mantenint la densitat de cèl·lules viables. Aquest fet és molt important, ja que es pot allargar la durada del cultiu i en conseqüència, augmentar els nivells de producció del procés. També s'ha observat que aquesta disminució de cèl·lules mortes coincideix amb un alentiment del cicle cel·lular dels híbridomes, suggerint que probablement la proteïna BHRF-1 actua directament sobre el cicle cel·lular i no sobre la via mitocondrial, ja que semblaria que, en condicions anòmales (limitació de nutrients), afavoreix l'entrada de les cèl·lules a l'estat de quiescència (fase G0), la qual cosa impediria l'activació de l'apoptosi.

# INTRODUCCIÓ



# CAPÍTOL 1

---

# 1-CULTIU *IN VITRO* DE CÈL·LULES ANIMALS

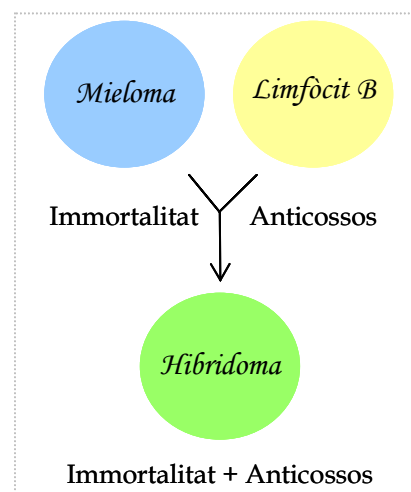
## 1.1- Importància del cultiu *in vitro* de cèl·lules animals

Les indústries Biotecnològiques utilitzen el cultiu *in vitro* de cèl·lules animals per obtenir proteïnes d'elevat interès econòmic com ara anticossos, interferons, hormones, factors de creixement, vacunes, etc [Werner, 1998]. Malgrat que les cèl·lules animals, a diferència dels bacteris, tenen uns requeriments nutricionals complexes, una baixa velocitat específica de creixement, una productivitat limitada i una alta sensibilitat als metabolits tòxics [Arathoon i Birch, 1986; MacDonald, 1990; Hesse i Wagner, 2000] són les úniques cèl·lules capaces de proporcionar proteïnes amb el plegament adequat i les modificacions posttraduccionalment necessàries per a la correcta funcionalitat de la proteïna. Avui en dia, les cèl·lules animals produeixen entre un 60-70% de les proteïnes recombinants farmacèutiques presents en el mercat. Una de les proteïnes recombinants que representa el major desenvolupament i impacte en l'àrea de la biotecnologia són els anticossos monoclonals, dels quals els terapèutics han experimentat un creixement excepcional del 48,1% entre l'any 2003 i 2004. L'any 2004 el mercat d'anticossos monoclonals va generar 10,3 bilions de dolars i s'espera que, en els propers 6 anys, la producció d'anticossos es tripliqui gràcies a l'obtenció d'anticossos monoclonals completament humans [Kim i col., 2005].

Donat que els anticossos monoclonals són eines poderoses en el camp de la diagnòsi i teràpia mèdica, en aquest treball s'han dirigit els esforços en millorar, mitjançant l'aplicació d'estratègies genètiques, els cultius *in vitro* d'hibridomes productors d'anticossos monoclonals.

Els hibridomes són cèl·lules animals obtingudes per la fusió d'un limfòcit B producteur d'un anticòs d'interès amb una cèl·lula de mieloma o limfòcit B cancerós, de manera que la cèl·lula resultant adquireix tant les propietats dels limfòcits per produir anticossos específics com la capacitat de reproduir-se indefinidament, aportada per les cèl·lules de mieloma (Fig.1.1).

Com que cada línia d'hibridoma es selecciona clònicament i prové d'un únic limfòcit B, en el cultiu *in vitro* d'hibridomes només es produirà un únic tipus d'anticòs anomenat anticòs monoclonal [Milstein, 1980; Kirkwood i Lewis, 1985]. La capacitat dels anticòs monoclonals per poder arribar a distingir entre proteïnes que difereixen tan sols en un únic aminoàcid i la possibilitat d'obtenir anticòs en estat pràcticament pur i en quantitat il·limitada, suposa un gran avenç en l'àrea de la bioquímica, biologia molecular i medicina [Yelton i Scharff, 1981; Price, 1987; Waldmann i col., 1991; Waldmann, 2003; Laffly i Sodoyer, 2005].



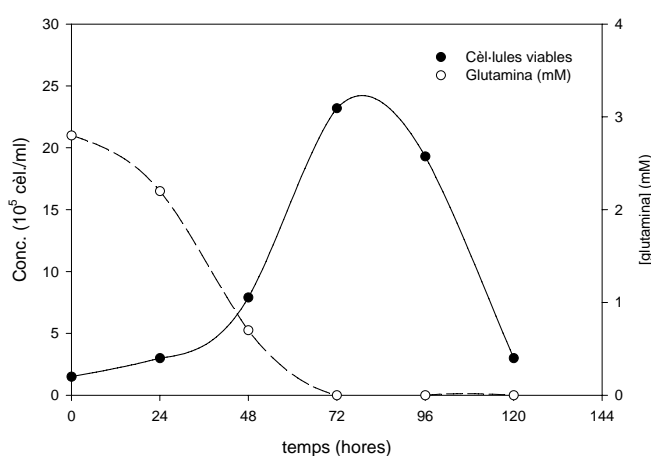
**Fig. 1.1-** Esquema del procés d'obtenció d'hibridomes productors d'anticòs monoclonals.

En aquest treball s'ha emprat com a model la línia cel·lular d'hibridoma KB26.5 productora d'anticòs monoclonal IgG<sub>3</sub> dirigit contra l'antigen A d'eritròcits humans, utilitzats en la determinació del grup sanguini del sistema ABO humà.

## 1.2- Problemàtica del cultiu "in vitro" de cèl·lules d'hibridoma

En el cultiu *in vitro* de cèl·lules d'hibridoma quan s'exhaureixen determinats nutrients essencials o factors de creixement, s'acumulen subproductes cel·lulars o es produeixen canvis en les condicions de cultiu, es provoca l'entrada de la població cel·lular en una fase irreversible de mort cel·lular anomenada apoptosi. L'apoptosi o mort cel·lular programada (PCD) és un mecanisme d'autodestrucció cel·lular controlat genèticament per les pròpies cèl·lules i que té lloc sota condicions fisiològiques normals i en resposta a una sèrie d'estímuls molt concrets [Kerr i col., 1972; Ameisen i col., 1998]. De fet, una gran fracció de les cèl·lules presents en els bioreactors participa activament en la seva pròpia mort [Al-Rubeai i Singh, 1998]. Fins l'any 1972, es creia que l'únic mecanisme de mort present en les cèl·lules eucariotes era la necrosi. La necrosi, a diferència de l'apoptosi, és un procés passiu i incontrolable que es dona quan la cèl·lula es troba exposada a condicions físico-químiques desfavorables (elevades temperatures, canvis sobtats de pH,...) [Cohen, 1998].

A la Fig. 1.2 es mostra el perfil de creixement de l'hibridoma KB26.5 en un cultiu en discontinu en medi òptim. Es pot veure com després de la fase de creixement exponencial i assolida la màxima densitat cel·lular hi ha una dràstica davallada de la viabilitat del cultiu que coincideix amb l'esgotament de la glutamina. Aquesta accentuada davallada és provocada per l'inici de l'apoptosi, la qual és induïda per l'exhauriment de la glutamina, fet també descrit en altres línies cel·lulars [Goswani i col., 1999; Tey i col., 2000]. En l'hibridoma, la glutamina és la principal font de nitrogen, així com a font alternativa de carboni i energia [Sanfeliu, 1995; Paredes, 1998].



**Fig. 1.2-** Corba de viabilitat de l'hibridoma KB26.5 i evolució de la concentració de glutamina en un cultiu en discontinu en medi DMEM 2%.

En els bioreactors, l'apoptosi és un factor crític ja que limita la durada del cultiu i representa una enorme pèrdua de rendibilitat en el procés d'obtenció del producte desitjat [Mercille i Massie, 1994]. Donada la naturalesa activa de la mort cel·lular en els processos de cultiu, actualment en les estratègies dirigides a incrementar la productivitat [Bailey, 1991; Paredes, 1998; Vives, 1999], s'inclouen mètodes per inhibir l'apoptosi ja sigui mitjançant el bloqueig de la permeabilització de la membrana mitocondrial [Pastorini i col., 1996], l'addició d'antioxidants o inhibidors de Caspases (veure apartat 1.3.2.3) [Chiou i White, 1998; Tintó i col., 2002; Sauerwald i col., 2003] o bé la modificació genètica de les cèl·lules amb gens antiapoptòtics [Mercille i col., 1999; Mastrangelo i col., 2000; Vives i col., 2003a]. De totes maneres, fins al moment actual, l'aplicació per separat de cadascuna d'aquestes estratègies únicament han permès retardar durant unes hores la mort per apoptosi dels cultius i en molts casos l'ús d'aquestes estratègies, com la d'inhibició química, en processos d'escala industrial és inviable econòmicament. Per aquest motiu, en aquest treball es planteja estudiar els

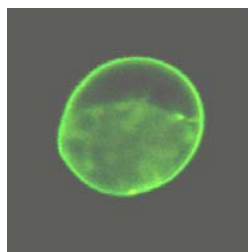
mecanismes d'inhibició de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5 i aplicar estratègies genètiques, viables a escala de bioreactor, adreçades a inhibir l'apoptosi.

### 1.3- Mort cel·lular programada en l'hibridoma KB26.5

#### 1.3.1- Característiques morfològiques i bioquímiques de l'apoptosi

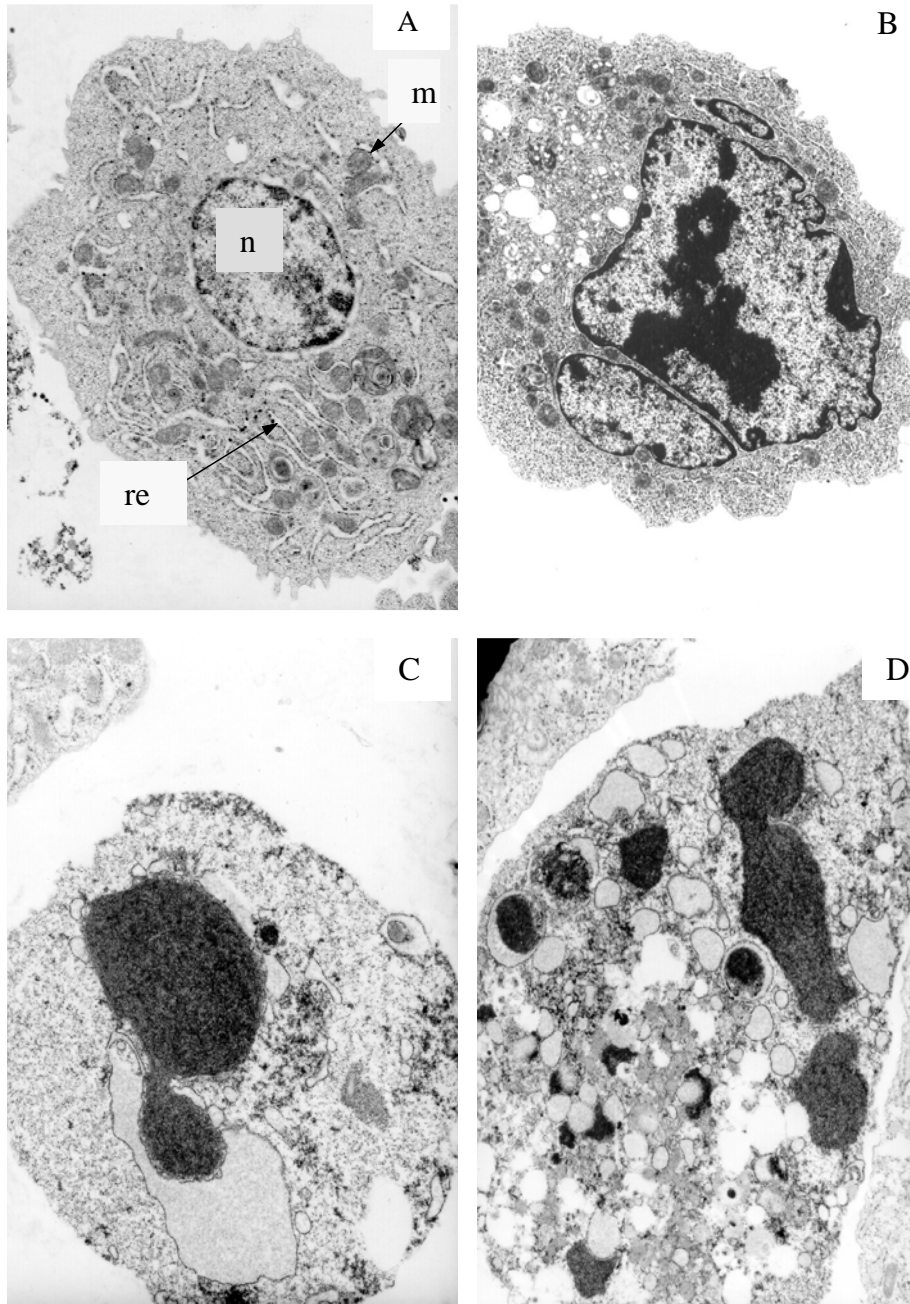
Les cèl·lules apoptòtiques pateixen una seqüenciació característica d'alteracions morfològiques i bioquímiques que promouen la destrucció dels bastiments cel·lulars i dels diferents orgànuls que afavoreixen les reaccions vitals en la cèl·lula [Cryns i Yuan, 1998; Wyllie i col., 1980; Mastrangelo i Betenbaugh, 1998].

Durant els estadis inicials de l'apoptosi, es pot observar en l'hibridoma la translocació de la fosfatidilserina, un fosfolípid present a la cara interna de la membrana cel·lular, que queda exposat a la cara externa (Fig. 1.3) [Blankenberg i col., 1998]. En condicions fisiològiques normals, aquest és un mecanisme de senyalització d'aquelles cèl·lules que han entrat en apoptosi.



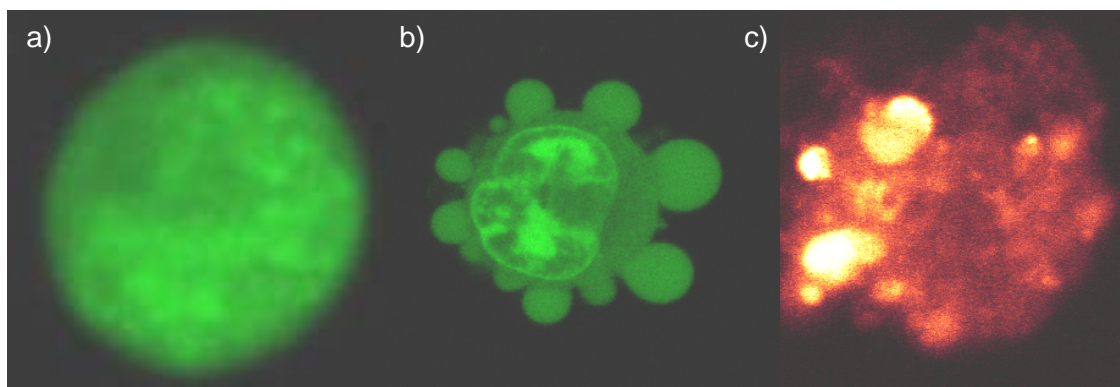
**Fig. 1.3-** Visualització per microscòpia confocal de la translocació de la fosfatidilserina en l'hibridoma KB26.5. L'halus verd que s'observa és el resultat de la unió de l'anexina amb la fosfatidilserina present en la cara externa de la membrana plasmàtica [Gabernet, 1999].

Després de la translocació de la fosfatidilserina, s'inicia el procés de condensació de la cromatina al voltant de l'embolcall nuclear, el citoesquelet es proteolitza i la membrana plasmàtica es comença a lobular (Fig. 1.4B). Finalment, es dona el trencament de l'embolcall nuclear (Fig. 1.4D) i la fragmentació cel·lular originant els cossos apoptòtics que contenen una part del material genètic, diferents orgànuls i estructures citoplasmàtiques. Aquests cossos apoptòtics pateixen necrosi secundària i s'acaben lisant tant en cultius *in vitro* com en bioreactors. En sistemes *in vivo* aquests cossos apoptòtics són fagocitats per macròfags o altres cèl·lules adjacents, sense que es produeixi cap mena de resposta inflamatòria [Tomei, 1991].



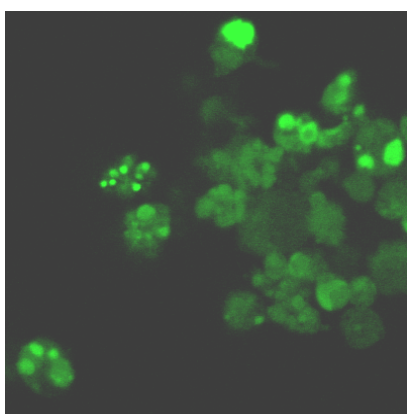
**Fig. 1.4-** Imatges de diferents morfologies cel·lulars d'hibridomes obtingudes per microscòpia electrònica de transmissió. A) Cèl·lula viable (n: nucli, m: mitocondri, re: reticle endoplasmàtic), B) Cèl·lula en una etapa inicial de l'apoptosi: condensació de la cromatina al llarg de l'embolcall nuclear; desestructuració del citoesquelet; el nucli es comença a lobular, i la cèl·lula es contrau; els mitocondris i el reticle endoplasmàtic de la cèl·lula romanen intactes, C) Cèl·lula en una etapa avançada de l'apoptosi: condensació total del material genètic, fragmentació del nucli i la desaparició dels orgànuls cel·lulars; D) Cèl·lula en una etapa terminal de l'apoptosi: el nucli s'ha dividit en varis fragments que, en molts casos, inclouen cromatina condensada. La cèl·lula pren una forma irregular que portarà a una posterior divisió en múltiples cossos apoptòtics [Tintó, 1999].

A la Fig. 1.5 s'observen els canvis morfològics esmentats anteriorment en un cultiu d'hibridomes KB26.5 mitjançant el marcatge amb taronja d'acridina i bromur d'etidi.



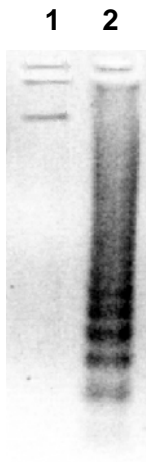
**Fig. 1.5-** Visualització per microscòpia confocal dels canvis morfològics soferts per la cèl·lula durant el procés d'apoptosi en un cultiu en discontinu de l'hibridoma KB26.5 en condicions de manca de glutamina. a) Cèl·lula viable. b) Cèl·lula que es comença a lobular, c) Formació de cossos apoptòtics i desestructuració de la membrana plasmàtica. [Tintó, 1999].

Durant estadis mitjanament avançats de l'execució del programa apoptòtic, es produeix l'activació d'unes endonucleases depenents dels ions  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  que tallen el DNA en les regions internucleosomals, originant fragments múltiples de 180 parells de bases [Sakahira i col., 1998]. Una tècnica que permet detectar la fragmentació del DNA és l'assaig enzimàtic TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) (Fig. 1.6), que consisteix a posar en contacte les cèl·lules amb un deoxinucleòtid marcat amb una molècula fluorescent, en aquest cas dUTP amb fluoresceïna, i una petita quantitat de l'enzim terminal transferasa.



**Fig. 1.6-** Imatge obtinguda per microscòpia confocal d'un cultiu d'hibridoma KB26.5 sotmès a l'assaig enzimàtic TUNEL. Es pot veure com les cèl·lules apoptòtiques queden marcades de color verd intens mentre que les cèl·lules viables únicament presenten una tènue fluorescència verda [Tintó, 1999].

Donat que el procés de fragmentació del DNA origina fragments de 180 parells de bases o d'una llargada amb un valor múltiple a aquest, també es pot veure aquest fenomen fent una electroforesi de DNA del material genètic de les cèl·lules (Fig. 1.7). Aquesta tècnica permet una visualització de l'apoptosi en la seva fase terminal.



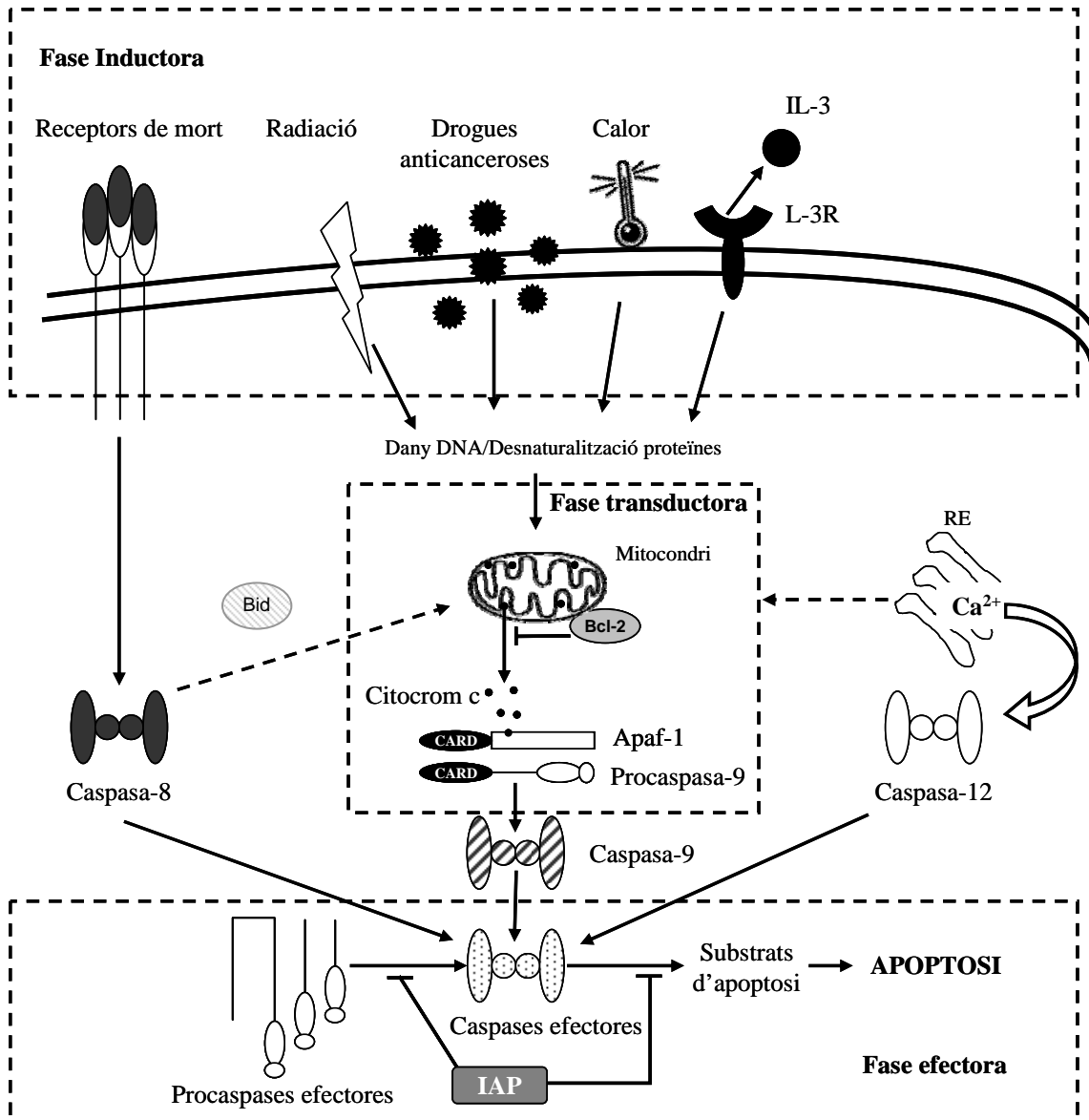
**Fig. 1.7-** Fotografia d'un gel d'agarosa en el qual s'han fet córrer dues mostres de material genètic extretes d'un cultiu d'hibridoma KB26.5. D'esquerra a dreta: 1) Cultiu en condicions òptimes, 2) Cultiu en condicions de manca de glutamina. En condicions de manca de glutamina s'observa la degradació del DNA amb l'aparició d'un conjunt de bandes corresponents a fragments petits de DNA (múltiples de 180 pb). En canvi, en condicions òptimes es veu el material genètic intacte [Gabernet, 1999].

Tots els canvis morfològics i bioquímics esmentats anteriorment són el resultat d'un procés molt regulat, que en funció de la naturalesa de l'estímul apoptòtic transcorre per diferents rutes bioquímiques intracel·lulars.

### 1.3.2- Fases de l'apoptosi. Rutes bioquímiques de l'apoptosi

El procés d'apoptosi es pot dividir en tres etapes que inclouen una *fase d'inducció*, que és heterogènia i depèn de l'estímul inductor de mort, una *fase transductora* comuna durant la qual la cèl·lula s'enfronta al fenomen prenent la decisió de viure o morir i una comuna *fase efectora i de degradació* en la qual la cèl·lula manifesta els canvis bioquímics i morfològics característics de les etapes finals de l'apoptosi (Fig. 1.8) [Jäättelä 1999, Slee i col., 1999].





**Fig. 1.8-** Representació esquemàtica de les fases de l'apoptosi i de les principals vies apoptòtiques en mamífers [Jäättelä, 1999 i Slee i col., 1999].

### 1.3.2.1- Fase inductora

Durant aquesta fase, la cèl·lula rep estímuls extracel·lulars o intracel·lulars inductors de l'apoptosi, que poden diferenciar-se en dos grups principals segons el mecanisme d'acció [Zimmermann i col., 2001; Ghobrial i col, 2005]: l'apoptosi induïda per receptors de mort (via extrínseca), els qual pertanyen a la superfamília de gens del TNF (Tumor Necrosis Factor) [Schmitz 2000; Ashkenazi, 2002] i l'apoptosi induïda a través de la via mitocondrial (via intrínseca) [Kuwana i Newmeyer, 2003; Green i Kroemer, 2004]. Aquestes dues vies activen la via de les Caspases (veure apartat 1.3.2.3) que condueix

a la generació d'un conjunt de subprogrames de mort cel·lular, la suma dels quals ocasiona l'eliminació física de la cèl·lula.

La via mitocondrial, a diferència de la via dels receptors letals, es desencadena en resposta a senyals d'estrès com ara les lesions en el DNA, les alteracions en el cicle cel·lular, la depleció de factors de creixement, la hipòxia, la radiació i les drogues citotòxiques. Aquesta multitud de senyals són detectades i integrades al mitocondri de la cèl·lula, on provoquen la permeabilització de la membrana mitocondrial i l'alliberament cap al citoplasma de molècules inductores de l'apoptosi [Antonsson, 2004; Sharpe i col., 2004, Ardjomande i Martinou, 2005; Spierings i col., 2005].

Diversos treballs han mostrat que aquestes dues vies apoptòtiques poden interactuar conjuntament per activar la via de les Caspases, a través del membre proapoptòtic Bid (veure apartat 1.3.3) [Li i col., 1998; Yin, 2006]. A més a més, també han revelat l'existència de vies alternatives a les anteriors, concretament pel que fa a l'activació de la Caspasa 12 [Nakagawa i col., 2000; Morishima i col., 2002; Zong i col., 2003], de la Caspasa 2 [Lassus i col., 2002] i de la Caspasa 4 [Hitomi i col., 2004]. Aquestes Caspases són activades a través dels senyals d'estrès procedents del reticle endoplasmàtic [Breckenridge i col., 2003].

En el present cas, donat que els híbridomes cultivats en els bioreactors es troben en un ambient on poden presentar-se baixos nivells de nutrients i factors de creixement, elevades concentracions de metabolits tòxics i estrès físic, la transmissió del senyal apoptòtic es dona a través de la via mitocondrial, la qual serà objecte d'estudi en aquest treball.

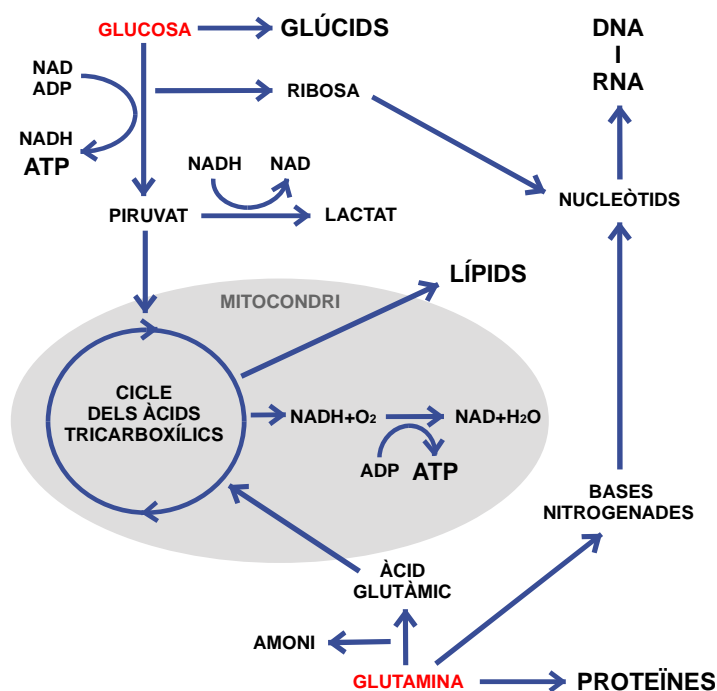
#### 1.3.2.1.1- Inductors de l'apoptosi i les rutes metabòliques que segueixen en l'híbridoma KB26.5

Diversos estudis realitzats sobre els principals inductors de l'apoptosi en cultius d'híbridomes revelen que l'eliminació de les principals fonts de carboni, nitrogen i energia de la cèl·lula com ara la glucosa i la glutamina, la limitació d'oxigen i l'absència dels factors de creixement presents en el sèrum indueixen l'apoptosi

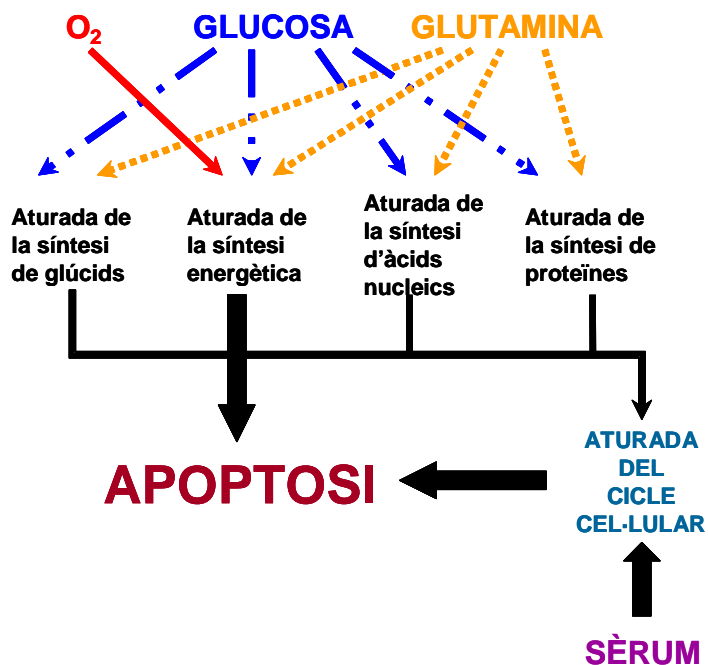
[Sanfeliu, 1995; Tintó, 1999]. Aquest fet sembla produir-se per la interrupció de les principals vies metabòliques de la cèl·lula, ja que tant la glucosa com la glutamina són imprescindibles a l'hora de nodrir d'energia la cèl·lula (ATP) o de sintetitzar els diferents components cel·lulars: glúcids, lípids, proteïnes i àcids nucleics (Fig. 1.9), i l'oxigen és necessari per a la síntesi energètica de la cèl·lula. No és estrany, doncs, que l'absència de glucosa, glutamina i oxigen desencadeni de manera molt ràpida i dràstica el procés de mort per apoptosi (Fig. 1.10). L'apoptosi és un procés actiu que precisa d'un cert consum energètic, la qual cosa fa pensar que en el moment d'exhaurir-se un nutrient, totes les reserves energètiques de les que disposa la cèl·lula, siguin dirigides a dur a terme el programa apoptòtic. En el cas de la manca de glucosa, la mort per apoptosi es donaria més ràpidament que en el cas de la glutamina i l'oxigen, ja que la cèl·lula no tindria la possibilitat de sintetitzar ATP a través de la degradació d'aquest sucre a lactat via glucòlisi.

Cal destacar també que, paral·lelament a l'execució de l'apoptosi, en condicions de manca de glutamina, glucosa, oxigen i sèrum, en l'hibridoma KB26.5 es dona l'aturada del cicle cel·lular a les fases G1 o S [Tintó, 1999]. Aquest fet és segurament conseqüència de les mateixes restriccions metabòliques que activen l'apoptosi en l'hibridoma, tot i que en el cas de la manca de sèrum, l'aturada del cicle cel·lular és la principal via iniciadora del procés apoptòtic (Fig. 1.10).

Dels diferents estímuls esmentats, en el cas dels cultius *in vitro* d'hibridomes, el factor apoptòtic que cal considerar és l'exhauriment d'algun dels nutrients essencials [Franek, 1995; Simpson i col., 1998]. Així és com es va evidenciar l'efecte de l'exhauriment de la glutamina en l'activació de l'apoptosi [Sanfeliu, 1995; Tintó, 1999].



**Fig. 1.9-** Esquema simplificat del metabolisme d'un híbridoma. La glucosa és la principal font de carboni i energia dels híbridomes, i la glutamina, és principal font de nitrogen, així com a font alternativa de carboni i energia [Paredes, 1998].

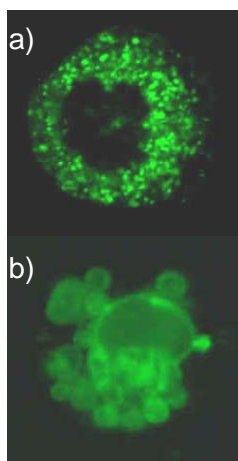


**Fig. 1.10-** Esquema de les principals rutes metabòliques implicades en el procés d'inducció de l'apoptosi en l'híbridoma KB26.5 [Tintó, 1999].

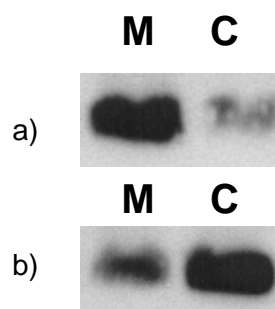
### 1.3.2.2- Fase transductora

El mitocondri té un paper central en la fase transductora de l'apoptosi ja que és el punt on conflueixen els diferents estímuls intracel·lulars [Green i Reed 1998; Desagher i Martinou, 2000; Kroemer, 2002; Armstrong, 2006b].

Els estímuls inductors de l'apoptosi originen en el mitocondri diverses alteracions com ara la pèrdua del potencial transmembrana  $\Delta\Psi_m$  (Fig. 1.11), el trencament de la cadena transportadora d'electrons i l'alliberament cap al citoplasma de diverses molècules essencials per a l'apoptosi presents a l'espai intermembrana del mitocondri [Garrido i Kroemer, 2004]. Algunes de les molècules alliberades inclouen el Citocrom c (Fig. 1.12), el Smac/Diablo i Omi/HTRA2 que antagonitzaran l'habilitat de les IAPs (*Inhibitor Apoptosis Protein*) d'inhibir les Caspases (veure apartat 1.3.2.3) [Du i col., 2000; Verhagen i col., 2000; Susuki i col., 2001], l'endonucleasa-G que ajudarà a la CAD (Desoxiribonucleasa Activada per Caspases) a la fragmentació del DNA [Li i col., 2001a; Widlak i Garrard, 2005], la flavoproteïna AIF (*Apoptosis-Induced Factor*), implicada en la condensació de la cromatina i en la degradació del DNA [Joza i col., 2001; Mate i col., 2002] i les procaspases 2, 9 i 3 (veure apartat 1.3.2.3) [Earnshaw i col., 1999; Susin i col., 1999].

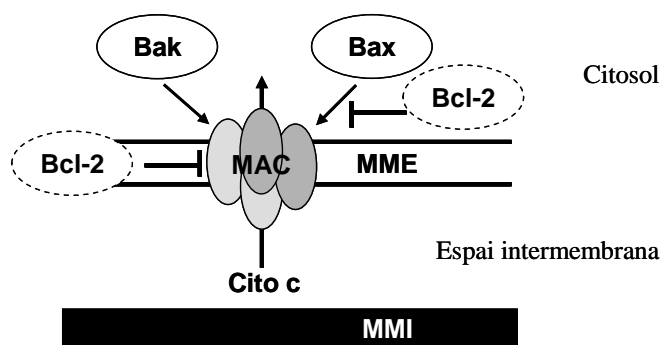


**Fig. 1.11-** Visualització per microscòpia confocal de diferents mostres de cultiu d'hibridomes: a) en condicions òptimes (48 hores) i b) en condicions de manca de glutamina (96 hores). La tinció d'aquests cultius amb Mito Tracker Green TM permet veure com a les 48 hores els mitocondris encara estan intactes ja que s'observa una fluorescència intensa. En canvi, a les 96 hores la cèl·lula està en un estat d'apoptosi molt avançat i la tinció dels mitocondris no es dona, només s'observa la fluorescència intrínseca de la cèl·lula. El reactiu MitoTracker Green TM porta conjugat un fluorocrom i s'uneix a la proteïna Citocrom Oxidasa (COX), present a la membrana dels mitocondris, que manté funcional la cadena transportadora d'electrons [Tintó, 1999].



**Fig. 1.12-** Visualització de l'alliberament del Citocrom c per Western Blot en la població cel·lular d'un cultiu en batch de l'hibridoma KB26.5: a) condicions òptimes i b) condicions de manca de glutamina. (M: extracte mitocondrial, C: extracte citoplasmàtic). Es pot observar com en condicions òptimes el Citocrom c es troba majoritàriament en l'extracte mitocondrial. En canvi, en condicions de manca de glutamina, s'observa una major quantitat de Citocrom c a l'extracte citoplasmàtic [Tintó, 1999].

El mecanisme pel qual s'indueix l'alliberament d'aquestes molècules del mitocondri és encara desconegut, però es creu que la formació d'un canal a la membrana mitocondrial externa anomenat MAC (*Mitochondrial Apoptosis-induced Channel*) seria el responsable d'aquest fenomen [Guo i col., 2004; Sharpe 2004; Spierings i col., 2005; Dejean i col., 2006; Green, 2006]. Fins fa poc temps, es pensava que les alteracions observades en el mitocondri i la sortida al citoplasma de les molècules transductores de l'apoptosi es produïen com a conseqüència de la creació d'un canal entre les dues membranes mitocondrials anomenat PTP (*Porus de Permeabilitat Transitòria*) [Fiore i col., 1998; Marzo i col., 1998; Gross i col., 1999; Halestrap i col., 2002]. Treballs recents han mostrat que l'obertura del PTP estaria més involucrat en la mort per necrosi que per apoptosi, ja que les cèl·lules deficientes en alguns dels components del PTP es moren igualment per apoptosi [Kokoszka i col., 2004; Nakagawa i col., 2005; Baines i col., 2005; Basso i col., 2005]. Per tant, la formació del MAC (Fig. 1.13) seria el model més acceptat actualment, i aquest canal estaria regulat pels membres de la família del Bcl-2 (veure apartat 1.3.3), els quals són un punt clau en la regulació de la fase transductora de l'apoptosi.



**Fig. 1.13-** Representació del canal mitocondrial induït per apoptosi (MAC) a la membrana mitocondrial externa (MME). Els membres proapoptòtics Bak i Bax formarien aquest canal i serien els responsables de l'alliberament del Citocrom c (Cito c), en canvi, el membre Bcl-2 impediria la formació d'aquest canal [Dejean i col., 2006].

### 1.3.2.3- Fase efectora i de degradació

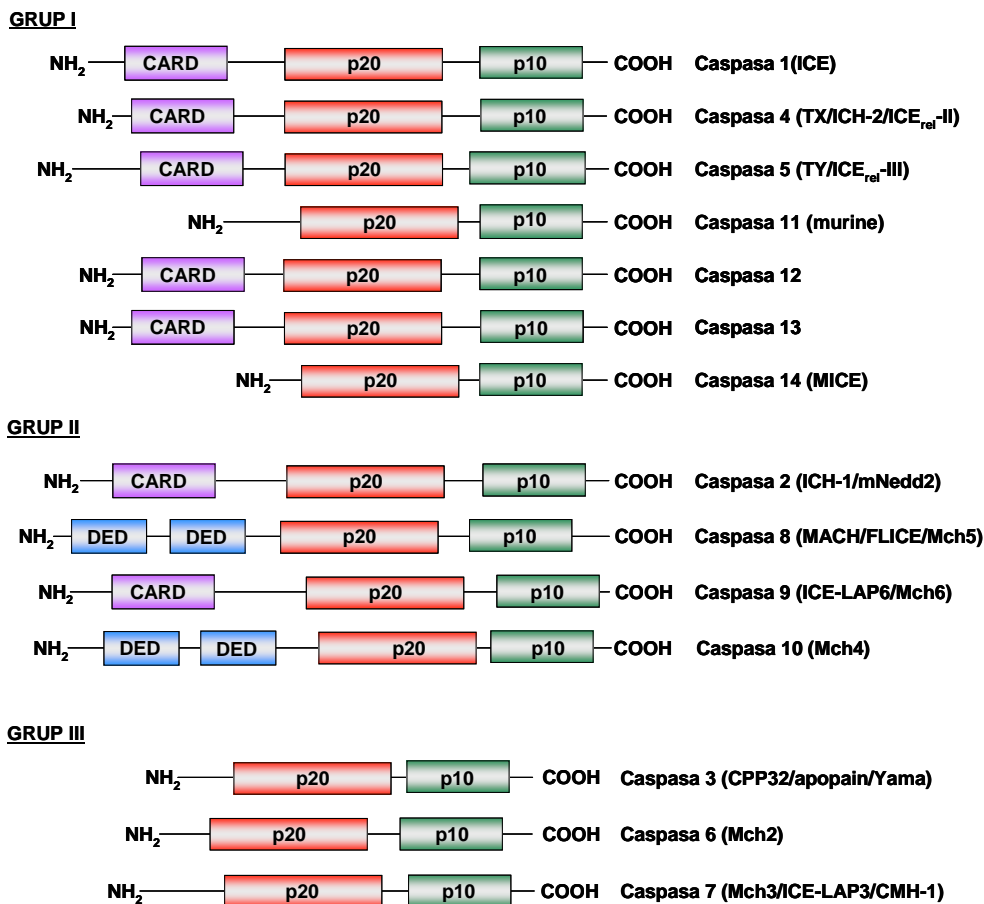
Molts dels canvis morfològics que es donen durant la fase efectora de l'apoptosi són produïts per un grup de cisteïnes proteases, les Caspases (*Cysteinyl-aspartate-specific proteinases*), que són activades específicament en les cèl·lules després d'un estímul proapoptòtic. Avui en dia, 14 Caspases diferents han estat clonades i parcialment

caracteritzades en mamífers, i la majoria han estat implicades en el procés d'apoptosi (Fig.1.14) [Thornberry i Lazebnik, 1998; Shi, 2002; Fan i col., 2005].

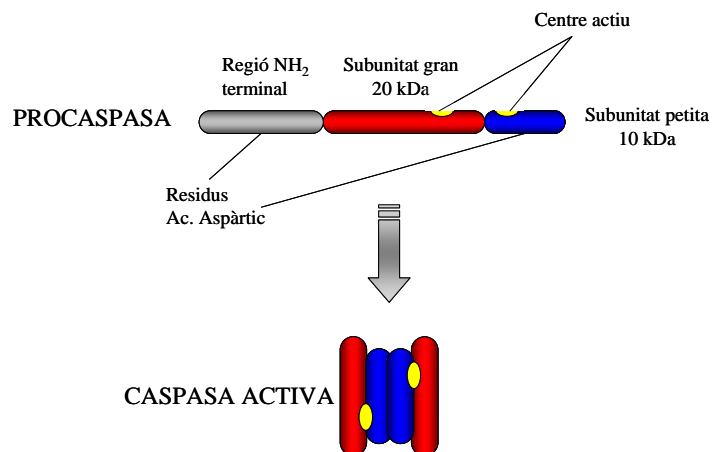
Les Caspases són unes proteases molt conservades en seqüència, estructura i especificitat de substrat. Aquestes proteïnes són expressades constitutivament per la cèl·lula en forma de proenzims inactius (30-50 kDa) ja que la capacitat hidrolítica d'aquestes proteases ha de ser molt controlada en la cèl·lula, per tal de minimitzar els possibles danys a d'altres proteïnes diferents de les seves dianes. Les Caspases estan constituïdes per un prodomini aminoterminal de mida variable, una subunitat gran de 20 kDa (p20), una subunitat petita de 10 kDa (p10) i una regió d'enllaç entre les dues subunitats flanquejada per residus d'àcid aspàrtic (Asp), que serà eliminada per autoproteòlisi o per altres membres de la família (Fig.1.14) [Nicholson, 1999; Hengartner, 2000; Degterev i col., 2003; Lavrik i col., 2005]. Les procaspases són activades per dos talls proteolítics, un entre el prodomini i la subunitat gran, i un altre entre la subunitat gran i la subunitat petita. Aquests talls proteolítics tenen lloc després d'un residu d'Asp. Les Caspases actives estan constituïdes per dos heterodímers p20/p10 que interactuen mitjançant les subunitats petites per formar un tetràmer amb dos llocs catalítics actius que funcionen independentment (Fig. 1.15).

Cada centre actiu està format per seqüències de la subunitat gran i petita, que proveeixen els aminoàcids necessaris per al reconeixement dels substrats i la catàlisi [Earnshaw i col., 1999]. En canvi, el domini NH<sub>2</sub> terminal present en el proenzim, que pot variar en la seva seqüència i llargada en cadascuna de les caspases, juga un paper fonamental en la regulació de l'activitat proteolítica de l'enzim [Thornberry i Lazebnik, 1998]. Les Caspases inactives poden ser substrats de les actives, de manera que unes Caspases activen a altres seguint un ordre jeràrquic i una actuació en cascada [Slee i col., 1999]. Les Caspases s'han classificat segons la seva posició en la cascada proteolítica en Caspases iniciadores i Caspases efectores [Nuñez i col., 1998]. Les Caspases iniciadores deriven de precursors amb prodominis llargs (Caspases 2, 8, 9 i 10), contenen dominis DED (*Death Effector Domain*) o CARD (*Caspase Recruitment Domain*), i són les responsables d'interactuar amb els activadors específics de la ruta i d'activar les caspases efectores, les quals són derivades de precursors amb

prodrominis curts (Caspases 3, 6, 7) i contribueixen a l'execució de l'apoptosi [Degterev i col., 2003; Fuentes-Prior i Salvesen, 2004] (Fig.1.14).



**Fig. 1.14-** Classificació de la família de les Caspases segons la seva funció. Grup I: Caspases involucrades en els processos inflamatoris, Grup II: Caspases iniciadores de l'apoptosi, Grup III: Caspases efectores de l'apoptosi. La subunitat gran (20 KDa), la subunitat petita (10 KDa), els dominis DED i CARD hi són representats. Els noms alternatius d'aquestes Caspases estan entre parèntesi. De les 14 Caspases identificades en mamífers, les Caspases 1, 2, 3,6, 7, 8, 9 i 14 tenen homòlegs en ratolí i humans, les Caspases 4, 5, 10 i 13 humanes no tenen homòlegs coneguts en ratolí; de la mateixa manera que les Caspases 11 i 12 no tenen la seva equivalència en humans [Chang i Yang, 2000; Lavrik i col., 2005].



**Fig. 1.15-** Estructura de les procaspases, i procés d'activació mitjançant el trencament proteolític en residu Asp i posterior formació d'heterodímers i tetràmers.



Les Caspases juguen un paper actiu en l'evolució dels canvis morfològics que condueixen a la mort cel·lular i s'ha demostrat que actuen sobre més de 280 substrats [Fischer i col., 2003]. Un dels substrats de les Caspases és la nucleasa que talla l'ADN genòmic entre els nucleosomes. Aquesta nucleasa coneguda com CAD es troba en les cèl·lules normals inactiva ja que està acoblada amb una subunitat inhibidora, anomenada ICAD (Inhibidora Desoxiribonucleasa Activada per Caspases) [Nagata, 2000]. L'activació de la CAD es dona quan la Caspasa 3 actua sobre la subunitat inhibidora i allibera la CAD [Sakahira i col., 1998].

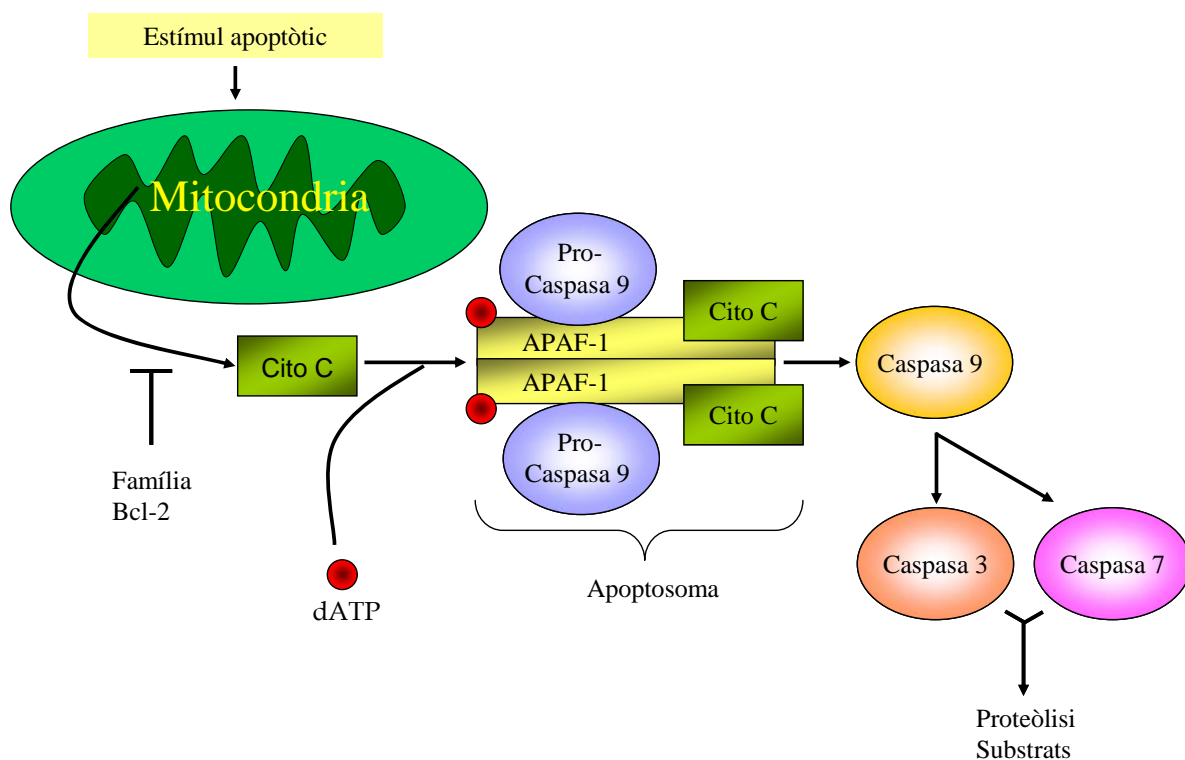
Altres efectes secundaris de l'activació de les Caspases són la proteòlisi de les làmines nuclears, que es tradueix en l'encongiment i la condensació nuclear [Rao i col., 1996; Buendia i col., 1999], el truncament de la quinasa 2 activada per p21 (PAK2), que permet la invaginació de la membrana cel·lular [Rudel i Bokoch, 1997], i la degradació de proteïnes del citoesquelet, com la fodrina i la gelsolina, que causen la pèrdua de la forma cel·lular [Kothakota i col., 1997]. Algunes de les proteïnes de la família de Bcl-2 (veure apartat 1.3.3), com són Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bax, Bad, Bib, i de les IAPs (Inhibitory Apoptosis Proteins), com XIAP i c-IAP-1, que regulen el procés d'apoptosi, també són substrat de les Caspases [Fischer i col., 2003].

Alguns estudis realitzats amb inhibidors químics de Caspases han evidenciat un mecanisme alternatiu pel qual les cèl·lules moren per apoptosi sense que la ruta de les Caspases estigui activada [Joza i col., 2001; Lockshin i Zakeri 2004; Kroemer i Martin, 2005]. Aquest nou procés apoptòtic encara no està dilucidat, però es creu que l'endonucleasa G, l'AIF i Omi/HtrA2 hi podrien estar implicats [Lorenzo i Susin, 2004; Donovan i Cotter, 2004; Bröker i col., 2005]. Es pensa que aquest tres factors són capaços d'induir els canvis apoptòtics en el nucli, com és la fragmentació del DNA, però que cap dels tres és capaç d'induir la resta de canvis morfològics i bioquímics característics de l'apoptosi. Encara no està clara la importància d'aquests tres factors en el procés d'apoptosi [Ekert i Vaux, 2005].

### 1.3.2.3.1- Identificació i paper de les Caspases en l'hibridoma KB26.5

En un cultiu *in vitro* de l'hibridoma KB26.5, en esgotar-se un nutrient essencial, com ara la glutamina, es genera un estímul apoptòtic intracel·lular que provoca a nivell del mitocondri, la sortida de diverses proteïnes com ara el Citocrom c, des de l'espai intermembrana mitocondrial cap al citoplasma. Quan s'allibera el Citocrom c cap al citoplasma, aquest passa a formar part d'un complex multiproteic anomenat apoptosoma. Aquest complex està format per la unió del Citocrom c amb l'Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*), que es troba inicialment en el citoplasma, i la procaspasa 9. En presència d'ATP la unió d'aquestes tres proteïnes indueix l'activació de la Caspasa 9 i la posterior acció catalítica d'aquesta sobre les Caspasa 3 i 7 que inicien la proteòlisi dels diferents substrats cel·lular (Fig. 1.16) [Cain i col., 2002, Acehan i col., 2002].

Les cèl·lules deficientes en Citocrom c [Li i col., 2000a], Apaf-1 [Yoshida i col., 1998] o Caspasa 9 [Kuida i col., 1998] presenten defectes en l'apoptosi en resposta a senyals interns.

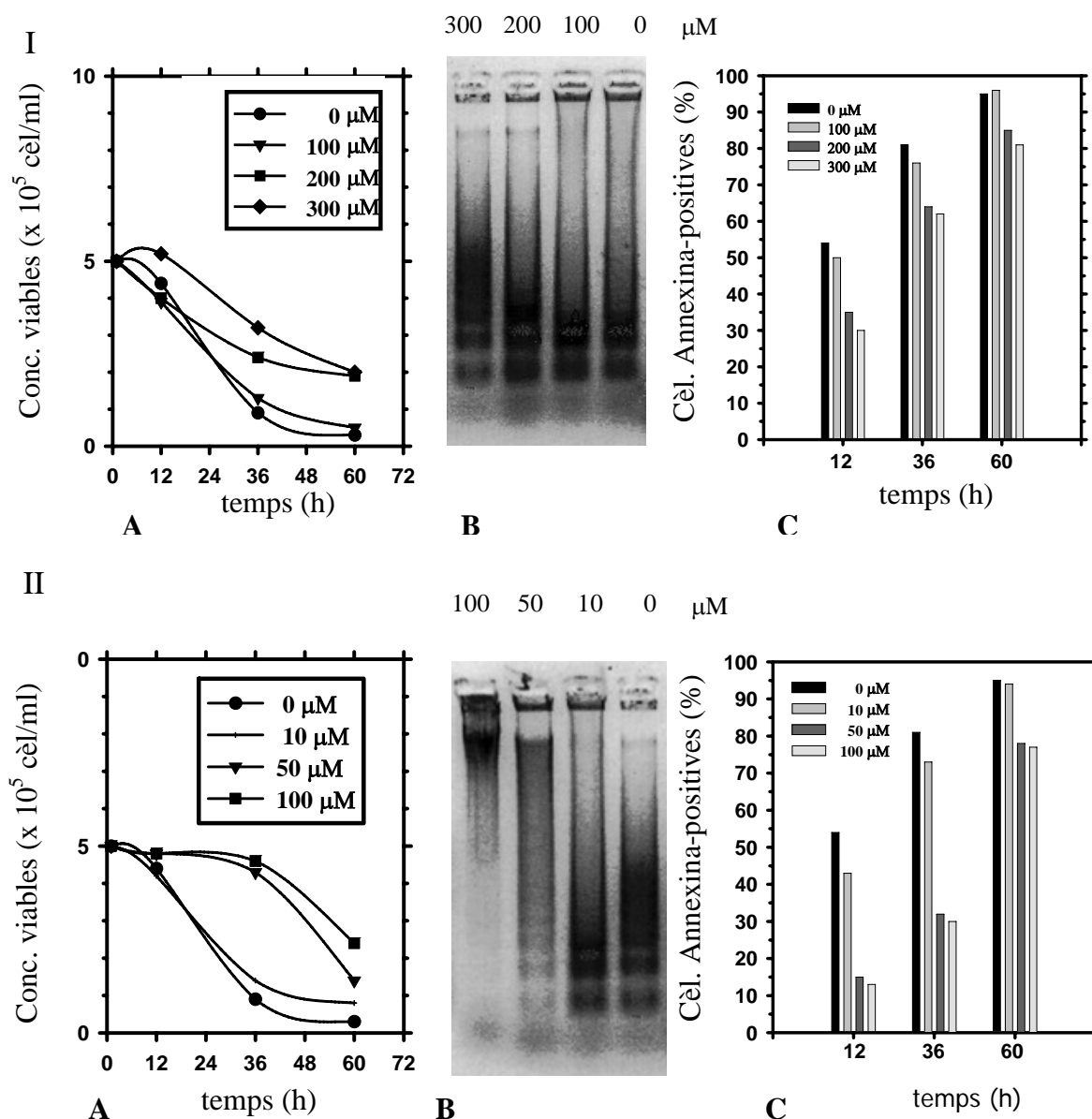


**Fig. 1.16-** representació esquemàtica dels esdeveniments que es donen en l'hibridoma KB26.5 una vegada activada la PCD per exhauriment de glutamina.

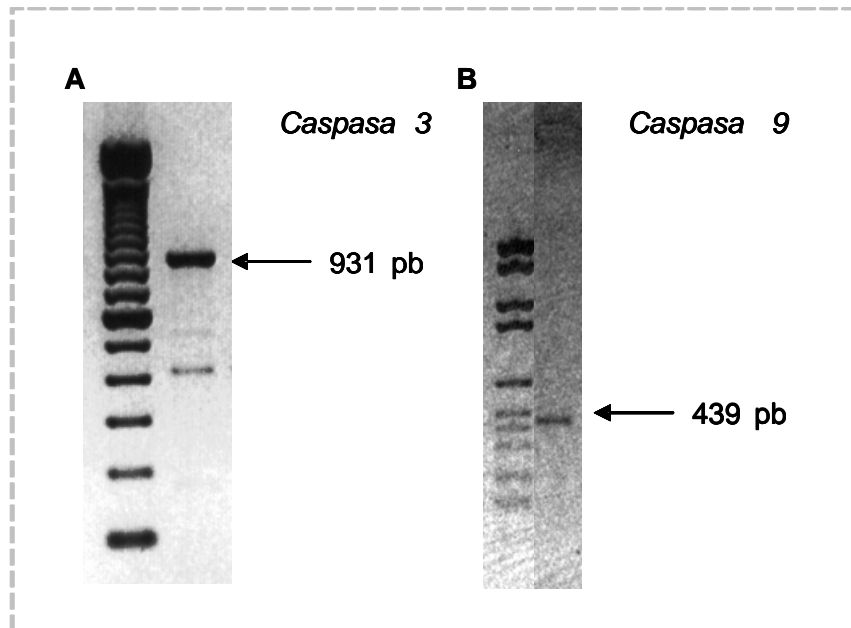
La importància real de les Caspases 9 i 3 dins del procés d'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5 ha pogut constatar-se mitjançant l'ús d'inhibidors peptídics d'aquestes Caspases, concretament, el z-VAD-fmk (N-benzioxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona) per la Caspasa 9 i el DEVD-cmk (Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-clorometilcetona) per la Caspasa 3 [Tintó i col., 2002]. Els resultats obtinguts amb l'ús d'aquests inhibidors químics semblen suggerir un paper principal de les Caspases 9 i 3 en el procés de mort per apoptosi de l'hibridoma KB26.5, ja que s'ha observat una inhibició de l'apoptosi del 70% i del 35% si s'actua contra la Caspasa 9 i 3 respectivament (Fig. 1.17). Aquests diferents percentatges d'inhibició reflecteixen que la Caspasa 9 és la proteasa iniciadora de la via de les Caspases. El fet que en el cas de la Caspasa 3 la inhibició de l'apoptosi hagi estat només del 35% indica que, efectivament, aquesta Caspasa és la responsable d'algunes de les alteracions que es donen en l'hibridoma, però com que es troba situada més avall que la Caspasa 9 en la jerarquia de les Caspases, només pot retardar l'aparició de l'apoptosi en períodes molt inicials del cultiu, ja que paral·lelament es dona l'activació d'altres caspases.

Altres experiments realitzats amb l'ús combinat d'aquests mateixos inhibidors han mostrat que és possible revertir el procés de mort cel·lular i que la Caspasa 9 activa directament la Caspasa 3, confirmant així, l'esquema de la Fig. 1.16 [Tintó i col., 2002]. El fet que, mitjançant l'ús d'inhibidors peptídics, sigui possible retardar l'aparició de l'apoptosi i revertir el procés de mort un cop aquest està activat, permet el disseny d'estratègies genètiques dirigides a inhibir l'apoptosi. No obstant, l'ús d'aquests inhibidors peptídics a nivell de bioreactor no és factible com a conseqüència del seu elevat cost. Per aquest motiu, actualment es planteja la sobreexpressió de proteïnes víriques inhibidores de les Caspases, les anomenades IAP inicialment caracteritzades en virus [Deveraux i Reed, 1999; Salvesen i Duckett 2002; Liston i col., 2003].

Donada la importància que se li atribueix a la Caspasa 3 i 9 en el procés d'apoptosi, es va comprovar la presència d'aquestes Caspases en mostres de RNA total de l'hibridoma KB26.5 (Fig. 1.18) [Vives, 2001].



**Fig.1.17-** Efecte de l'inhibidor z-VAD-fmk (I) i l'inhibidor DEVD-cmk (II) en el cultiu en discontinu de l'hibridoma KB 26.5 en condicions de manca de glutamina. **A.** Evolució de la concentració de cèl·lules viables **B.** Patró de degradació del DNA a les 60 h des de l'inici del cultiu. **C.** percentatge de cèl·lules que presenten la translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtinguts per citometria de flux. En el cas del z-VAD-fmk (inhibidor Caspasa 9) es pot observar com els cultius amb concentracions de z-VAD-fmk de 50 i 100  $\mu\text{M}$  mantenen el nombre de cèl·lules viables fins a les 36 hores des de l'inici del cultiu (I A) i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques en aquest temps és del 32% a 50  $\mu\text{M}$  i 30% a 100  $\mu\text{M}$  (I C). Per tant, hi ha una inhibició de l'apoptosi del 70% aproximadament. En el cas del DEVD-cmk (inhibidor Caspasa 3) a concentracions de 300 i 200  $\mu\text{M}$  a les 36 hores s'observa un 60 % i 65% respectivament de cèl·lules apoptòtiques, i una inhibició de l'apoptosi del 35% aproximadament (II C) [Tintó, 1999].



**Fig. 1.18-** Resultats obtinguts en l'aïllament per RT-PCR de la caspasa 3 i d'un fragment de la Caspasa 9 en l'hibridoma KB26.5. A) banda corresponent al cDNA de la Caspasa 3, obtingut per RT-PCR ( $T_h = 56-59\text{ }^\circ\text{C}$ ). També s'observa una segona banda d'aproximadament 400 pb, producte inespecífic de l'amplificació de la Caspasa 3. B) Les condicions d'amplificació de la Caspasa 9 han estat:  $T_h = 56-59\text{ }^\circ\text{C}$ . Únicament s'ha amplificat un fragment del cDNA donat que en el moment de dissenyar els encebadors només hi havia una seqüència parcial del mRNA al GenBank [Vives, 2001].

### 1.3.3- Membres de la família bcl-2

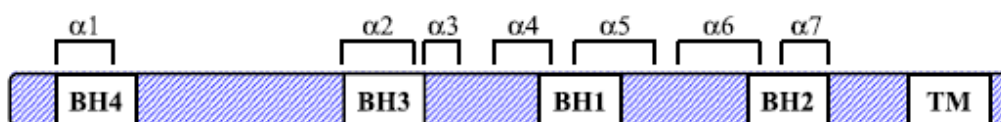
Els membres de la família Bcl-2 tenen un paper central en l'apoptosi procedent de la via mitocondrial ja que són els encarregats de regular l'alliberament cap al citoplasma dels factors proapoptòtics presents a l'espai intermembrana mitocondrial [Green i Reed, 1998; Cory i Adams, 2002; Skommer i col., 2006].

El fet que una cèl·lula hagi de morir o sobreviure està determinat en part per la família Bcl-2, que conté tant proteïnes antiapoptòtiques com proapoptòtiques. Els mecanismes pels quals aquestes proteïnes interactuen i decideixen el destí de la cèl·lula encara no han estat descrits *in vivo*. Indirectament, en estudis *in vitro*, s'ha establert que la seva expressió és crítica en la decisió entre la supervivència o la mort cel·lular [Muchmore i col., 1996; McDonnell i col., 1996].

El primer gen descobert de la família, el que li dóna el nom, va ser *bcl-2* (B-Cell Leukemia/Lymphoma-2) aïllat en limfomes fol·liculars de cèl·lules B com a resultat

de la translocació cromosòmica t(14;18). En aquestes cèl·lules, la translocació entre els cromosomes 18 i 14 produïa la sobreexpressió de la proteïna Bcl-2 augmentant la supervivència dels limfòcits B [Vaux i col., 1988]. Posteriorment, Bcl-2 fou identificat com l'homòleg del repressor de l'apoptosi ced-9 descrit a *Caenorhabditis elegans*.

Actualment, la família Bcl-2 està formada com a mínim per 30 membres que comparteixen uns dels dominis homòlegs anomenats BH (*Bcl Homology*) (Fig.1.19). Aquests dominis permeten als diferents membres interaccionar entre ells, per determinar si s'ha de desencadenar la cascada proteolítica de Caspases que conduirà a la mort cel·lular [Cory i col., 2003; Willis i col., 2003].



**Fig. 1.19-** Dominis BH de la proteïna Bcl-2. TM: domini transmembrana;  $\alpha 1$ -  $\alpha 7$ , regions hèlix alfa [Kirkin i col., 2004]. La presència d'hèlixs alfa en els dominis BH1, BH2 i BH3 permet que als membres antiapoptòtics i proapoptòtics interaccionin.

### 1.3.3.1-Classificació

Els membres de la família Bcl-2 poden classificar-se segons la seva funció i els seus dominis estructurals en (Fig 1.20):

- Membres antiapoptòtics com ara Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1, A1 (Bfl-1), Boo/Diva/Bcl-B, BHRF-1, Ks-Bcl-2, E1B-19K..., que exerceixen una activitat inhibidora de la mort cel·lular programada. En aquestes proteïnes repressores de l'apoptosi sempre es troben presents els dominis BH1 i BH2, excepte E1B-19K que només té el BH1, ja que són essencials per a la funció d'inhibició de l'apoptosi, i per a les interaccions d'aquestes proteïnes amb el domini BH3 de les proteïnes agonistes de la mort [Sedlak i col., 1995; Cory i col., 2003; Petros i col., 2004]. En els membres més semblants a la proteïna Bcl-2 es troben tots quatre dominis. El domini BH4 es troba en la regió aminoterminal i està involucrat en la interacció amb proteïnes reguladores de la mort no relacionades amb Bcl-2, com la proteïna quinasa Raf-1 [Wang i col., 1994], la fosfatasa calcineurina [Shibasaki i col., 1997] i Ced-4 [Huang i col., 1998] entre d'altres. Finalment, aquestes proteïnes també presenten un domini transmembrana

carboxiterminal que influeix en la seva localització intracel·lular [Kelekar i Thompson, 1998].

- Membres proapoptòtics com Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bid, Bik, Bim, Blk, Bnip3 i Bnip3L..., que exerceixen una activitat inductora de la mort. Aquestes proteïnes es poden classificar en dos grups, la subfamília Bax i la subfamília BH3. Aquestes dues subfamílies únicament requereixen el domini BH3 per portar a terme la seva funció [Chittenden i col., 1995], tot i que els membres de la subfamília Bax s'assemblen més als seus antagonistes antiapoptòtics ja que presenten els dominis BH1, BH2 i BH3. Amb l'excepció de Bad i Bid, tots els membres de la família presenten el domini transmembrana carboxiterminal [Kelekar i Thompson, 1998; Tsujimoto i Shimizu, 2000].

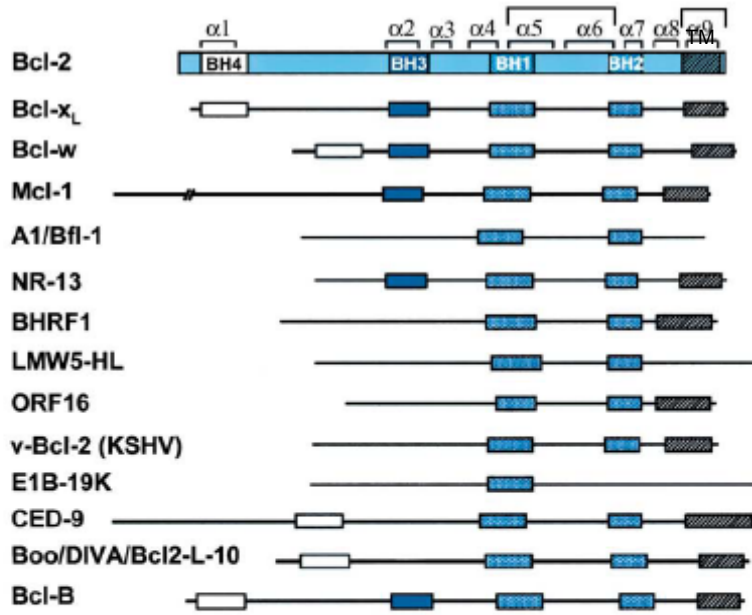
#### 1.3.3.2- Localització subcel·lular

La majoria dels membres de la família Bcl-2 tenen a l'extrem carboxi terminal una seqüència hidrofòbica de 16-19 residus, que és un domini transmembrana, important per al seu direccionament cap a diferents membranes intracel·lulars [Schinzel i col., 2004].

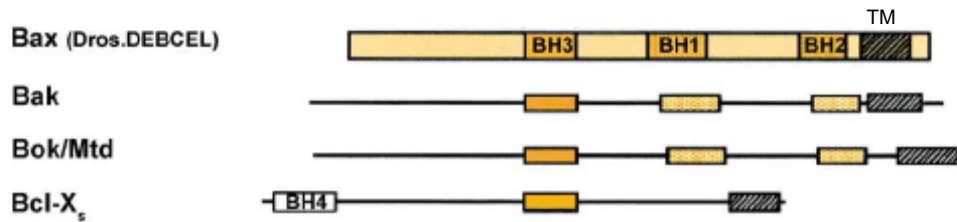
La proteïna Bcl-2 es localitza exclusivament a les membranes del mitocondri, a l'embolcall nuclear i al reticle endoplàsmic. Al mitocondri, Bcl-2 no està distribuït de manera difosa sinó que presenta una distribució desigual en els llocs de contacte entre la membrana mitocondrial externa i la interna [Monaghan i col., 1992; Krajewski i col., 1993; Lithgow i col., 1994]. Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w principalment es troben al mitocondri, mentre que els altres membres antiapoptòtics es solen trobar a la fracció citosòlica [Hsu i col., 1997; Hausmann i col., 2000].

Els membres proapoptòtics també difereixen en la seva localització. La proteïna Bak es troba associada a les membranes del reticle endoplàsmic i del mitocondri, i Bax sembla ser majoritàriament citosòlic [Wolter i col., 1997; Hsu i Youle, 1998; Griffiths i col., 1999]. Els membres proapoptòtics Bad i Bid, que no tenen la seqüència hidrofòbica d'ancoratge a la membrana, presenten una distribució citoplasmàtica difosa en absència de senyals de mort [Kelekar i Thompson, 1998].

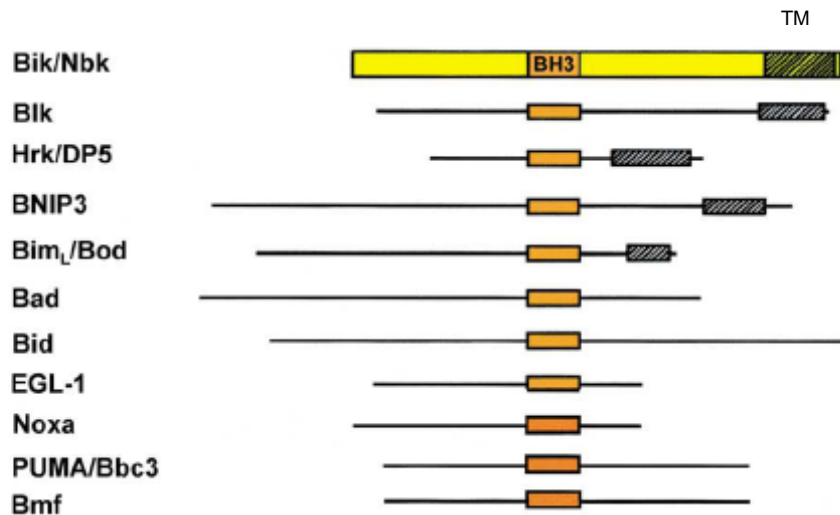
Antiapoptòtics



Proapoptòtics Subfamília Bax



Proapoptòtics Subfamília BH3

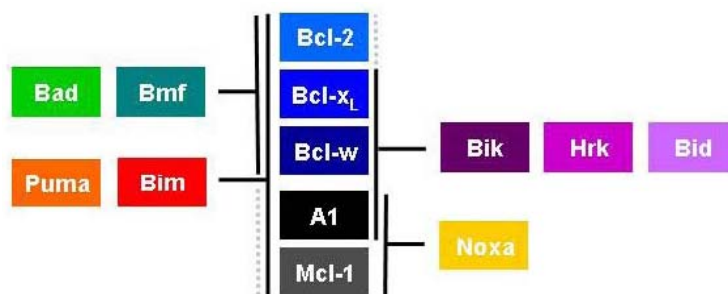


**Fig. 1.20-** Classificació de les proteïnes de la família Bcl-2 segons la seva funció i els seus dominis d'organització. Es mostra l'estructura general de les proteïnes, i s'identifiquen els dominis d'homologia de Bcl-2 (BH) i el domini transmembrana (TM) [Borner, 2003].



### 1.3.3.3- Regulació

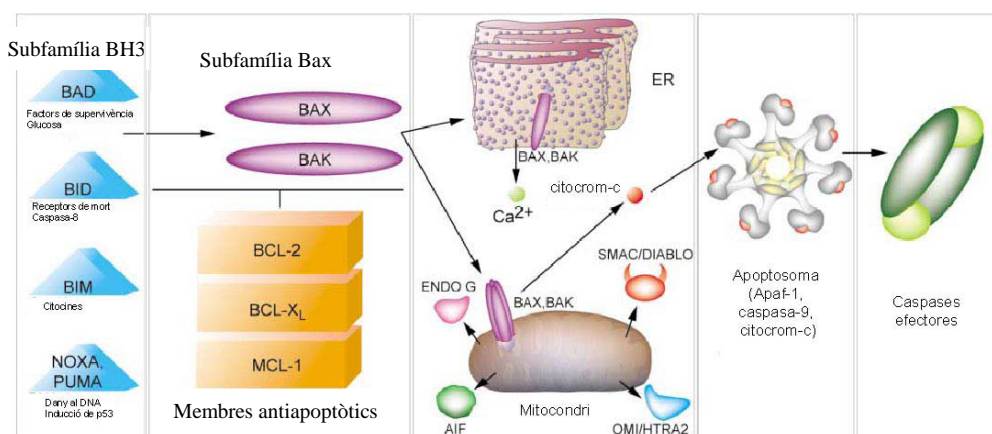
Una important característica dels membres de la família Bcl-2 és la seva habilitat per formar homodímers i heterodímers. Existeixen diferents models per explicar com interaccionen aquestes proteïnes entre elles i quina és la seva funció en la regulació de l'apoptosi. Actualment, es creu que els membres de la subfamília BH3 actuen com a sensors cel·lulars al capdamunt de la cascada que desencadenarà l'apoptosi, integrant els diferents senyals de mort, de dany intracel·lular o supervivència. Un cop aquests membres de la subfamília BH3 s'han activat, la majoria s'unirà a Bcl-2 o a altres membres antiapoptòtics per neutralitzar la seva funció de supervivència. Estudis recents han mostrat que els membres de la subfamília BH3 interaccionen de manera molt selectiva i específica amb els membres antiapoptòtics (Fig. 1.21) [Cory i col., 2003; Petros i col., 2004; Chen i col., 2005; Galonek i Hardwick, 2006].



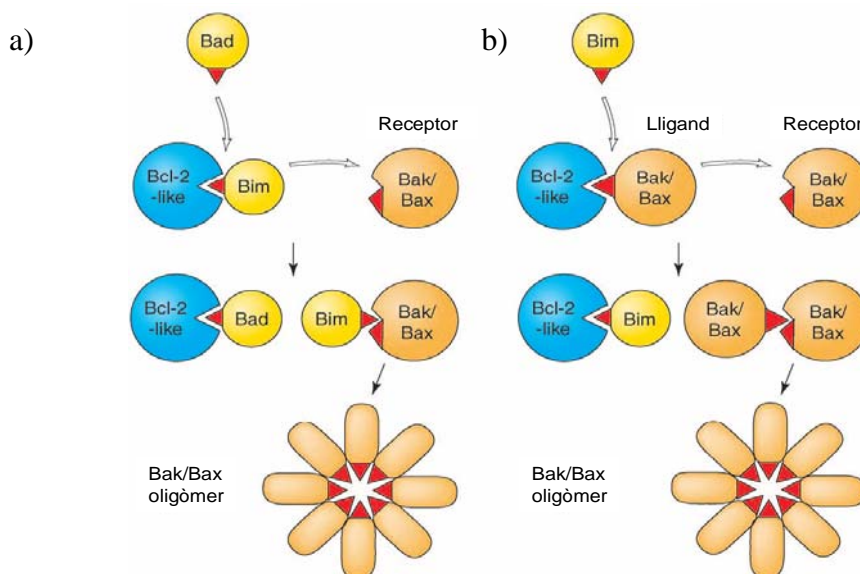
**Fig. 1.21-** Model proposat per explicar la diferent capacitat per induir la mort dels diferents membres de la subfamília BH3, com a conseqüència de les unions específiques amb els membres antiapoptòtics [Chen i col., 2005]. Els membres de la subfamília BH3, Bim i Puma són capaços d'unir-se amb una afinitat molt elevada als membres antiapoptòtics Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1 i Mcl-1, mentre que els altres membres de la subfamília BH3 tenen afinitats d'unió restringides a certs membres; Bad i Bmf semblen unir-se preferentment a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, i menys a A1 i Mcl-1, mentre que Noxa és molt selectiu per Mcl-1 i A1, i no sembla unir-se als altres membres antiapoptòtics assajats. Els membres Bik, Hrk i Bid s'uneixen preferentment a Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w i A1, i menys a Bcl-2 i Mcl-1 [Chen i col., 2005].

Tot i que els membres de la subfamília BH3 són decisius en la regulació de l'apoptosi, cap d'aquestes proteïnes pot desencadenar la mort cel·lular sense l'actuació dels membres de la subfamília Bax, que són essencials per a la via intrínseca de l'apoptosi [Cheng i col., 2001; Zong i col., 2001]. Sembla ser que els membres de la subfamília BH3 activarien les proteïnes Bax i Bak, les quals són responsables de la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i de la conseqüent alliberació cap al citoplasma del Citocrom c i altres factors proapoptòtics (Fig. 1.22). S'han proposat diferents models per explicar com les proteïnes de la subfamília BH3 activen els membres

proapoptòtics Bax i Bak (Fig.1.23) [Willis i Adams, 2005]. En el model proposat per Letai i els seus col·laboradors, les proteïnes de la subfamília BH3 encarregades d'activar Bax i Bak estan segrestades pels membres antiapoptòtics. Quan es dona un senyal d'estrès, aquestes proteïnes són alliberades per altres proteïnes d'aquesta mateixa subfamília per tal d'activar Bax i Bak (Fig.1.23a) [Letai i col., 2002]. Un segon model consistiria en què les proteïnes de la subfamília BH3 actuarien sobre la unió existent entre Bax o Bak i les proteïnes antiapoptòtiques, provocant l'alliberament de Bax o Bak (Fig. 1.23b).



**Fig. 1.22-** Regulació de la sortida del Citocrom c mediada pels diferents membres de la família Bcl-2. Els membres de la subfamília BH3 actuarien com a sensors de les diferents alteracions cel·lulars. Aquestes proteïnes interactuarien i inhibirien els diferents membres antiapoptòtics, possibilitant l'alliberament dels factors proapoptòtics del mitocondri regulat per Bax i Bak, que desencadenarà la formació de l'apoptosoma i la conseqüent activació de la via de les Caspases [Danial i Korsmeyer, 2004].



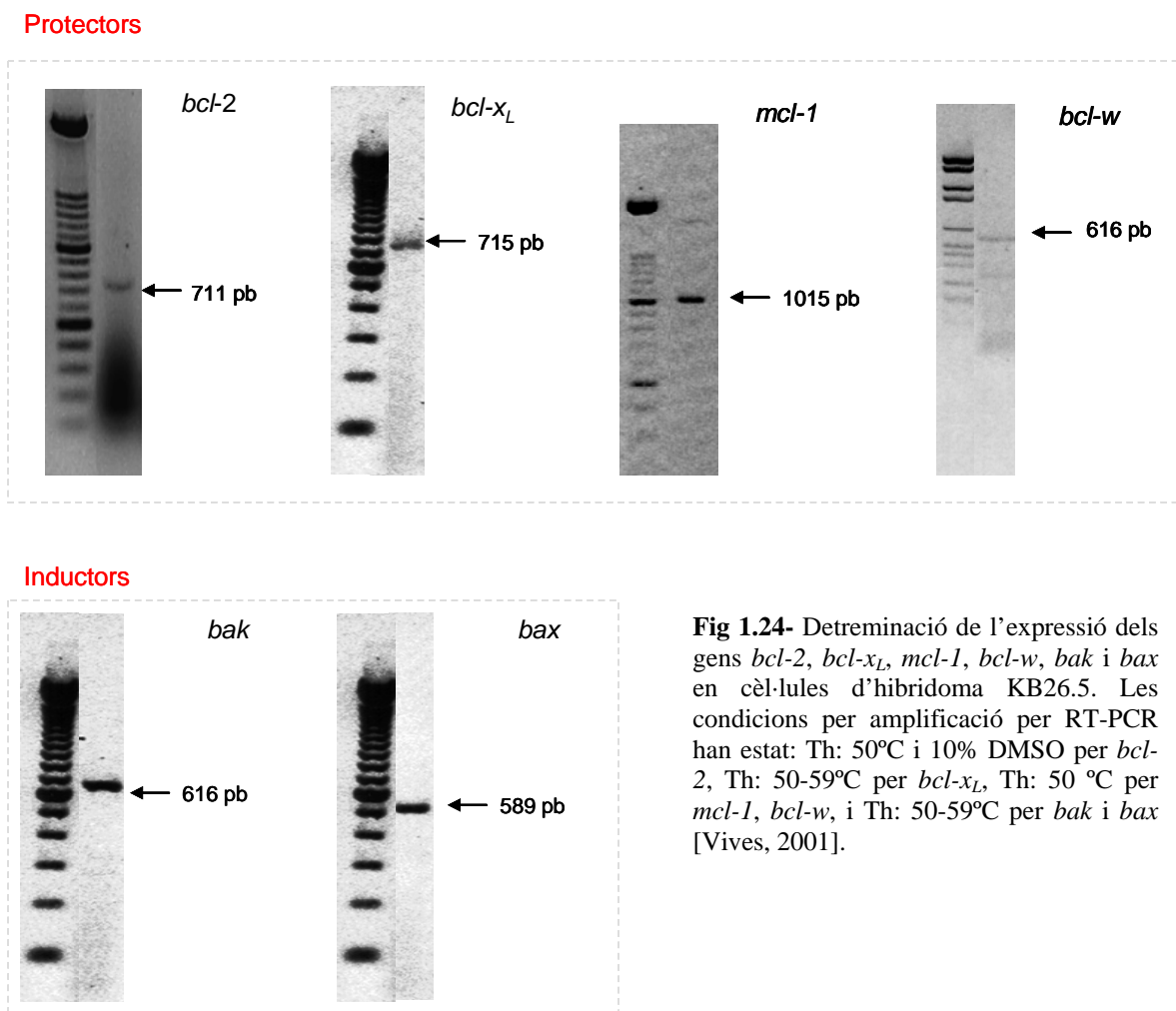
**Fig. 1.23-** Models d'activació de Bax i Bak. a) Bim forma heterodímers amb una proteïna antiapoptòtica. Quan es genera un estímul apoptòtic, Bad s'uneix fortament al membre antiapoptòtic i allibera Bim, el qual provocarà l'oligomerització de Bax o Bak. b) Bax o Bak forma heterodímers amb els membres antiapoptòtics. Enfront un senyal d'estrès, Bim s'unirà al membre antiapoptòtic desplaçant Bax o Bak [Willis i Adams, 2005].

Tot i els diferents models proposats, els mecanismes pels quals els membres de la família Bcl-2 regulen l'apoptosi són encara força desconeguts, però el que sí que es pot afirmar és que la proporció relativa existent entre les concentracions de factors antiapoptòtics i proapoptòtics és crítica pel destí de la cèl·lula.

#### 1.3.3.4- Identificació de l'expressió de membres de la família del *bcl-2* en l'hibridoma KB 26.5

Tal i com s'ha explicat en l'apartat anterior, l'inici de la PCD en els cultius *in vitro* de cèl·lules animals depèn dels nivells d'expressió dels gens protectors i promotors de l'apoptosi.

Per tal de conèixer millor a nivell molecular els gens de la família *bcl-2* implicats en el procés de mort cel·lular en l'hibridoma KB26.5 es van identificar els membres pro- i antiapoptòtics (Fig. 1.24) [vives, 2001].



Tot i la presència dels membres protectors de l'apoptosi, com ara el Bcl-2, el Bcl-x<sub>L</sub>, el Bcl-w i el Mcl-1, els híbridomes quan són cultivats en condicions inductores de l'apoptosi, ja sigui per raons accidentals o per limitacions físiques de subministrament de nutrients, factors de creixement i oxigen, inicien la mort cel·lular programada. Per tal de retardar l'inici de l'etapa de mort cel·lular i aconseguir d'aquesta manera allargar la durada del cultiu, una possible via d'actuació seria sobreexpressar alguns dels gens inhibidors o inhibir alguns dels gens activadors de l'apoptosi expressats en l'híbridoma KB26.5.

En aquest treball es planteja la sobreexpressió dels gens cel·lulars *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>*, com a alternativa per mantenir la viabilitat dels cultius d'híbridomes durant més temps i aconseguir augmentar considerablement la producció d'anticòs monoclonal.

#### **1.4. Estratègies per inhibir l'apoptosi en els bioreactors**

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'apoptosi representa un greu inconvenient a nivell del cultiu *in vitro* en bioreactors, ja que disminueix dràsticament la viabilitat del cultiu i representa una enorme pèrdua de rendibilitat en el procés d'obtenció del producte desitjat. Per aquest motiu, s'intenten desenvolupar diferents estratègies que permetin inhibir o retardar l'aparició de l'apoptosi, i que per tant ajudin a allargar la durada dels cultius i millorin la productivitat del procés tecnològic.

Per tal de millorar la productivitat del cultiu es pot escollir una estratègia de cultiu diferent al cultiu en discontinu, com per exemple el cultiu en perfusió. El cultiu en perfusió és un sistema de cultiu on la població cel·lular es troba retinguda a l'interior del bioreactor, de manera que es realitza un recanvi constant del medi que permet obtenir sempre una concentració de nutrients suficient per garantir la supervivència de les cèl·lules, evitar l'acumulació de subproductes cel·lulars i assolir uns nivells de producció més eficients del producte d'interès. De totes maneres aquest sistema no garanteix que les cèl·lules no acabin entrant en apoptosi [Tintó, 1999]. Una altra alternativa seria reformular el medi de cultiu amb la finalitat d'evitar un consum desmesurat de nutrients i una producció excessiva de subproductes tòxics del metabolisme que conduiria a l'apoptosi [Soley, 2002].

Una altra possibilitat per inhibir la mort per apoptosi en els cultius cel·lulars és la utilització de determinades substàncies químiques, com els inhibidors peptídics de Caspases [Tintó, 1999]. La seva aplicació però resulta poc aconsellable en cultius en bioreactors on s'utilitza grans volums de medi, ja que poques quantitats d'aquestes molècules tenen un cost econòmic molt elevat.

Una última estratègia per actuar sobre la PCD és la introducció de modificacions genètiques en la cèl·lula. Per una banda existeix la possibilitat de sobreexpressar alguns dels gens inhibidors de la família Bcl-2 [Vives i col., 2003b], i per l'altra expressar proteïnes víriques inhibidores de l'apoptosi com la proteïna CrmA del poxvirus [Zhou i col. 1997] o la p35 de baculovirus [Bump i col. 1995].

Aquesta tesi doctoral es centra en aquesta darrera estratègia. Per una banda, es pretén modificar genèticament les cèl·lules d'hibridoma per fer-les més resistents a l'apoptosi, i d'aquesta manera perllongar la viabilitat del cultiu, i en conseqüència millorar la productivitat del bioprocés. Per altra banda, es vol que les modificacions genètiques realitzades perdurin al llarg del temps, és a dir, que l'expressió del gen introduït es mantingui al llarg de tot el bioprocés. Actualment, es sap que els nivells d'expressió dels gens transfectats es perden en funció del nombre de resembres realitzades [Hauser i Wagner, 1997]. Per aquest motiu, es necessari l'ús de vectors que expressin el gen d'interès al llarg del temps. Una possibilitat per garantir l'estabilització del missatge genètic és l'ús de vectors multicistrònics, els quals permeten la transcripció conjunta i consecutiva del gen d'interès i del marcador de selecció en el mateix missatge. Aquests tipus de vectors, així com el sistema de transfecció emprat per introduir efectivament aquests vectors en l'hibridoma KB26.5, han estat també objecte d'estudi.

**OBJECTIUS**

---

# CAPÍTOL 2

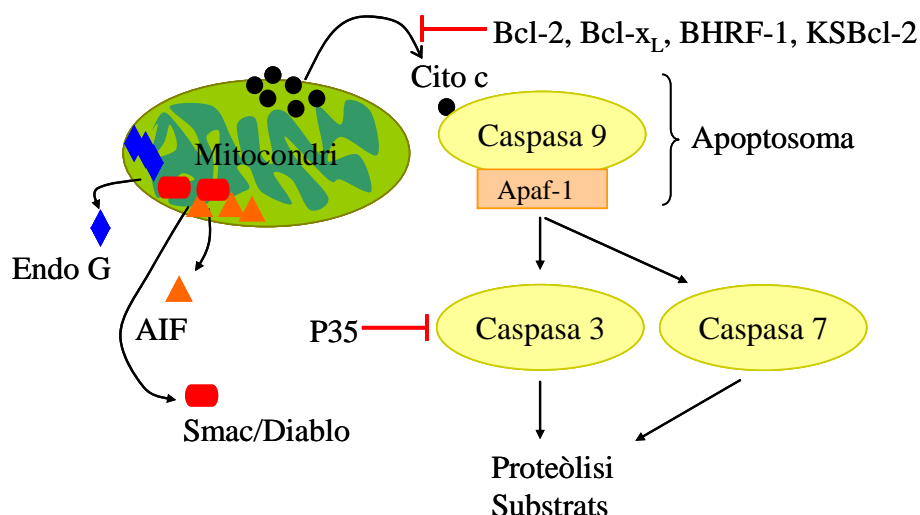
---

## 2-OBJECTIUS

Tal i com s'ha comentat en el capítol anterior, l'activació de l'apoptosi en els cultius *in vitro* d'hibridomes representa un greu inconvenient ja que disminueix dràsticament la viabilitat del cultiu i en conseqüència, la productivitat del bioreactor, conduint, en el cas dels processos continus, a la possible pèrdua de tot el cultiu. Aquest tipus de mort en l'hibridoma KB26.5 es desenvolupa per una sèrie de vies bioquímiques que desencadenen la sortida del Citocrom c de l'espai intermembrana mitocondrial al citoplasma, provocant l'activació de la cascada proteolítica de les Caspases. Treballs previs realitzats en l'hibridoma KB26.5 amb inhibidors peptídics específics de Caspases van mostrar que era possible retardar l'apoptosi i revertir el procés de mort un cop aquest havia estat activat. No obstant, l'ús d'aquests inhibidors químics a nivell de bioreactor no és factible com a conseqüència del seu elevat cost. Per aquest motiu, en la present tesi es pretén retardar l'aparició de l'apoptosi aplicant estratègies d'inhibició genètica sobre els membres iniciadors de la ruta de les Caspases i, principalment, a nivell de l'alliberament del Citocrom c del mitocondri, donat que és el punt previ a l'activació de les Caspases. Concretament, s'ha optat per sobreexpressar el gen víric *p35* que inhibeix específicament la Caspasa-3 i els gens cel·lulars *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* i els seus homòlegs vírics *bhrf-1* i *ksbcl-2*, els quals eviten la sortida del Citocrom c i la posterior formació de l'apoptosoma (Fig. 2.1).

En una primera fase d'aquest treball, s'ha decidit avaluar l'efecte d'aquests gens mitjançant l'ús del procediment de cultiu més simple, el cultiu en discontinu i la fase de mort cel·lular programada s'ha induït mitjançant l'exhauriment d'un nutrient essencial, que en aquest cas és la glutamina. En una segona fase, s'ha optat per veure la importància de les modificacions genètiques realitzades, cultivant els hibridomes modificats en diferents sistemes de cultiu, concretament, en un cultiu en continu i en un cultiu en perfusió.





**Fig. 2.1-** Nivells d'actuació de les proteïnes de la família Bcl-2 i de la proteïna vírica P35 en el procés de mort cel·lular programada de l'hibridoma KB26.5.

El pla de treball que es planteja és el següent:

- Obtenció i clonació de gens inhibidors de l'apoptosi d'origen endogen com ara el *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* i víric com ara *bhrf-1* (virus Epstein-Barr), *ksbcl-2* (herpevirus humà HHV8) i *p35* (baculovirus) en vectors d'expressió de cèl·lules animals per a la seva posterior transfecció en cèl·lules d'hibridoma KB26.5.
- Realització de transfeccions i obtenció de transfectants amb els gens *bcl-2*, *bcl-x<sub>L</sub>*, *bhrf-1*, *ksbcl-2* i *p35* per tal de veure l'efecte d'aquests gens sobre la PCD i realitzar estudis de recuperació de cultius sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant diferents períodes de temps.
- Posada a punt i optimització de diferents sistemes de transfecció de l'hibridoma KB26.5. Selecció del mètode de transfecció més adequat.
- Creació de línies cel·lulars robustes i estables al llarg del temps mitjançant la utilització de vectors bicistrònics. Estudis d'estabilitat temporal.
- Realització de cultius en discontinu, en continu i en perfusió per tal d'avaluar la resistència a l'apoptosi dels transfectants obtinguts. En aquests tres tipus de

cultius la mort cel·lular programada es dona com a conseqüència de la limitació d'alguns dels nutrients del medi de cultiu, ja sigui per limitacions físiques del sistema com elevades concentracions cel·lulars assolides o per causes accidentals com l'aturada de l'alimentació del sistema.

- Determinació de l'efecte de l'expressió del gens antiapoptòtics sobre la producció d'anticossos monoclonals i sobre el cicle cel·lular.

# RESULTATS I DISCUSSIÓ

---

# CAPÍTOL 3

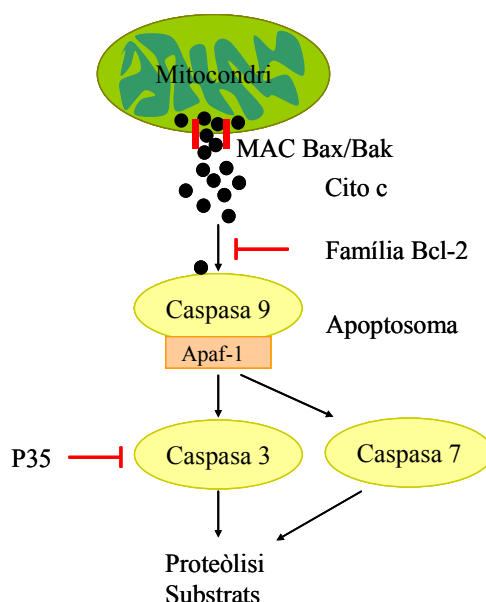
---

## 3-MODIFICACIÓ GENÈTICA DE L'HIBRIDOMA KB26.5

### 3.1- Diances per al bloqueig de l'apoptosi

Treballs anteriors realitzats en l'hibridoma KB26.5, descrits en la introducció d'aquest treball, van permetre identificar les causes i el possible mecanisme pel qual aquestes cèl·lules en cultiu entraven en la fase de mort cel·lular i a la vegada, conèixer quines eren les possibles dianes per aplicar una estratègia d'inhibició genètica dirigida a protegir les cèl·lules de la mort per apoptosi [Tintó, 1999; Vives, 2001].

Gràcies al coneixement exhaustiu de la via mitocondrial i de la importància de la inhibició de la via de les Caspases en les seves etapes preliminars, en aquest treball es van utilitzar dues estratègies genètiques, una que consisteix en inhibir l'actuació de la Caspasa 3, mitjançant l'expressió de la proteïna inhibidora P35 i l'altra que es centra a nivell de l'alliberament del Citocrom c del mitocondri, sobreexpressant gens de la família Bcl-2.



**Fig. 3.1-** Nivells d'actuació de les proteïnes de la família Bcl-2 i de la proteïna vírica P35 en el procés de mort cel·lular programada de l'hibridoma KB26.5. Els membres proapoptòtics Bax i Bak formarien el canal mitocondrial induït per apoptosi en la membrana mitocondrial externa (MAC).

Com s'ha comentat en la introducció, els membres de la família Bcl-2 desenvolupen un paper fonamental en el procés apoptòtic ja que el balanç entre les concentracions de les proteïnes antiapoptòtiques i proapoptòtiques que componen aquesta família determina la supervivència cel·lular. Dels diferents gens antiapoptòtics descrits en la bibliografia s'ha optat per l'expressió dels gens cel·lulars *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>*. Els gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* han estat provats amb anterioritat en cèl·lules d'hibridoma productores de MAbs i s'han confirmat com a bons inhibidors de la mort cel·lular programada [Simpson i col., 1998; Charbonneau i col., 2003; Jung i col., 2002; Wang i col., 2004; Peterson i Servinsky, 2005].

Per sobreexpressar els gens esmentats anteriorment es va procedir a la clonació d'aquests gens en un vector d'expressió de cèl·lules animals per tal de modificar la cèl·lula hoste amb el DNA recombinant produït.

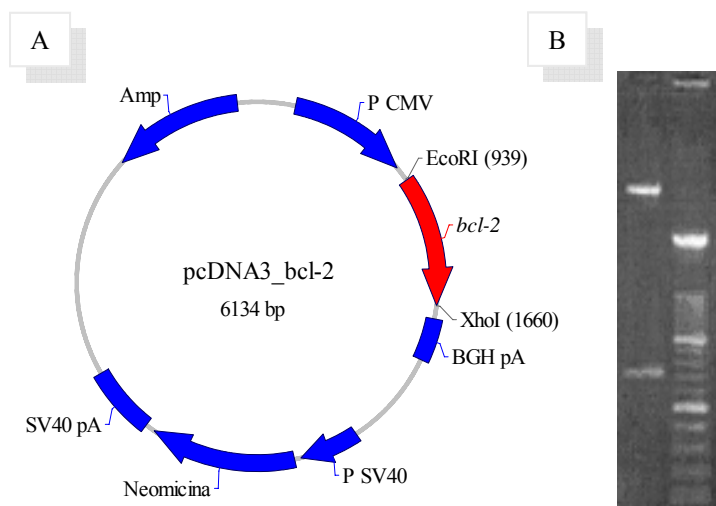
### **3.2- Obtenció i clonació dels protectors endògens: *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>***

Per sobreexpressar els gens cel·lulars *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* es va procedir a l'obtenció i clonació d'aquests gens en el vector d'expressió pcDNA3.

#### **3.2.1- Bcl-2**

El gen *bcl-2* (B-Cell Leukaemia/Lymphoma-2) humà codifica per una proteïna de 26 KDa que presenta múltiples mRNA codificant per diferents isoformes proteïques amb dominis transmembrana. En ratolins s'ha mostrat l'existència de només dos mRNA generats a partir d'un gen compost de dos exons separats per més de 15 kb. Aquest gen per processament alternatiu dona lloc a dues isoformes, la isoforma  $\alpha$  (236 aa) la qual conté una cua hidrofòbica per l'ancoratge a la membrana i que sembla essencial per la funció antiapoptòtica i la isoforma  $\beta$  (199 aa) [Negrini i col., 1987]. L'activitat de la proteïna Bcl-2 ve regulada per mecanismes de fosforilació i desfosforilació [Ito i col., 1997; Klumpp i Kriegelstein, 2002; Tamura i col., 2004] i la seva funció la du a terme en una gran varietat de cèl·lules a on regula la permeabilitat de la membrana mitocondrial externa evitant l'alliberació del citocrom C [Hockenbery i col., 1990; Murphy i col., 2005; Lucken-Ardjomande i Martinou, 2005a; Armstrong, 2006].

El gen *bcl-2* emprat en aquest treball és humà i fou cedit pel Burnham Institute, la Jolla (USA) (Annex I). Amb aquest gen es va dur a terme una clonació orientada en extrems cohesius *EcoRI/XhoI* en el vector d'expressió pcDNA3 (Fig. 3.2). Les tècniques i metodologies emprades per realitzar aquesta clonació estan descrites en el capítol 8 de materials i mètodes.



**Fig. 3.2-** A) Representació gràfica de la construcció pcDNA3\_*bcl-2*. B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret d'una de les colònies transformades amb la construcció pcDNA3\_*bcl-2*. El marcador emprat va ser el XIV (Annex II). Es pot observar la banda corresponent al vector pcDNA3 (5413 pb) i al gen *bcl-2* (721 pb).

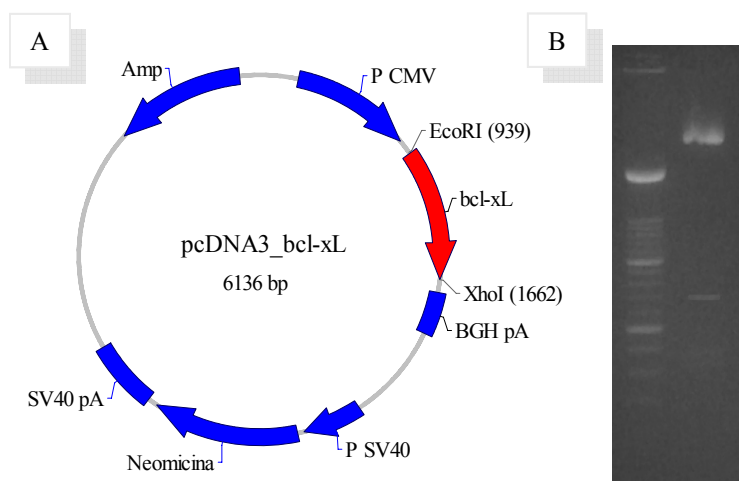
### 3.2.2- Bcl-x<sub>L</sub>

El Bcl-X és una proteïna reguladora de la mort cel·lular per apoptosi. El processament alternatiu del transcrit primari del gen *bcl-x* origina dos productes, una forma llarga (L) i una altra curta (S). La proteïna produïda per la forma llarga, *bcl-x<sub>L</sub>* de 233 aa té un 44% d'homologia i una distribució cel·lular similar al gen *bcl-2*, el que suggereix que ambdues proteïnes funcionen de forma similar, inhibint la mort cel·lular. En canvi, el producte derivat de la forma curta Bcl-x<sub>S</sub> de 170 aa, antagonitza l'acció de les dues anteriors i és un potent activador de l'apoptosi [Boise i col., 1993; Zamzami i col., 1998; Kirkin i col., 2004]. Bcl-x<sub>L</sub> protegeix les cèl·lules de l'apoptosi regulant l'exportació d'ATP del mitocondri i impeding l'activació de proteïnes proapoptòtiques [Vander Heiden i col., 2000; Lucken-Ardjomande i Martinou, 2005a; Willis i Adams, 2005].

El gen *bcl-x<sub>L</sub>* es va obtenir per RT-PCR a partir del RNA total de l'hibridoma KB26.5 (apartats 8.12.1, 8.12.3). Per dur a terme la RT-PCR, es van dissenyar els encebadors a partir de la seqüència coneguda del gen *bcl-x<sub>L</sub>* (Annex I) extreta de les bases de dades disponibles en el NCBI (National Center for Biotechnology Information). En la

RT-PCR la temperatura a la qual es va dur a terme la síntesi del cDNA va ser de 50°C i la temperatura d'hibridació va ser de 50°C.

La barreja de DNA polimerases utilitzades en la reacció de RT-PCR es caracteritza per afegir adenines en els extrems 3' dels fragments amplificats, de manera que sense cap tractament previ dels extrems, els fragments es poden clonar en vectors modificats amb extrems protuberants amb timines. Per aquest motiu, es va fer servir el pCR2.1-TOPO Kit (Invitrogen) (apartat 8.13.5) per clonar el producte de la RT-PCR en un vector d'expressió de cèl·lules animals anomenat pCR2.1-TOPO. Per tal d'alliberar el gen *bcl-x<sub>L</sub>* de la construcció pCR2.1-TOPO\_*bcl-x<sub>L</sub>*, es va tallar aquesta construcció i el vector pcDNA3 amb els enzims de restricció *EcoRI* i *XhoI*. En el cas de la construcció pCR2.1-TOPO\_*bcl-x<sub>L</sub>*, les dianes de restricció d'aquests enzims es troben a banda i banda del gen i provenen dels encebadors utilitzats en les reaccions d'amplificació del DNA. El fragment de DNA que es va obtenir tenia els extrems cohesius i estava preparat per ser clonat directament en el vector pcDNA3 amb els extrems cohesius complementaris (Fig. 3.3).



**Fig. 3.3-** A) Representació gràfica de la construcció pcDNA3\_*bcl-x<sub>L</sub>*. B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret d'una de les colònies transformades amb la construcció pcDNA3\_*bcl-x<sub>L</sub>*. El marcador emprat va ser el XIV (Annex II). Es pot observar la banda corresponent al vector pcDNA3 (5413 pb) i al gen *bcl-x<sub>L</sub>* (723 pb).

### 3.3- Inhibició de l'apoptosi per sobreexpressió dels gens *bcl-2* i *Bcl-x<sub>L</sub>*

Les construccions plasmídiques pcDNA3\_*bcl-2* i pcDNA3\_*bcl-x<sub>L</sub>* es van transfectar a l'hibridoma KB26.5 (apartat 8.15.1). Per obtenir els clons es va haver de fer diferents tandes de transfecció, ja que tot i optimitzar el mètode de transfecció, l'eficiència de transfecció de l'hibridoma era molt baixa, de l'ordre de 1 %.

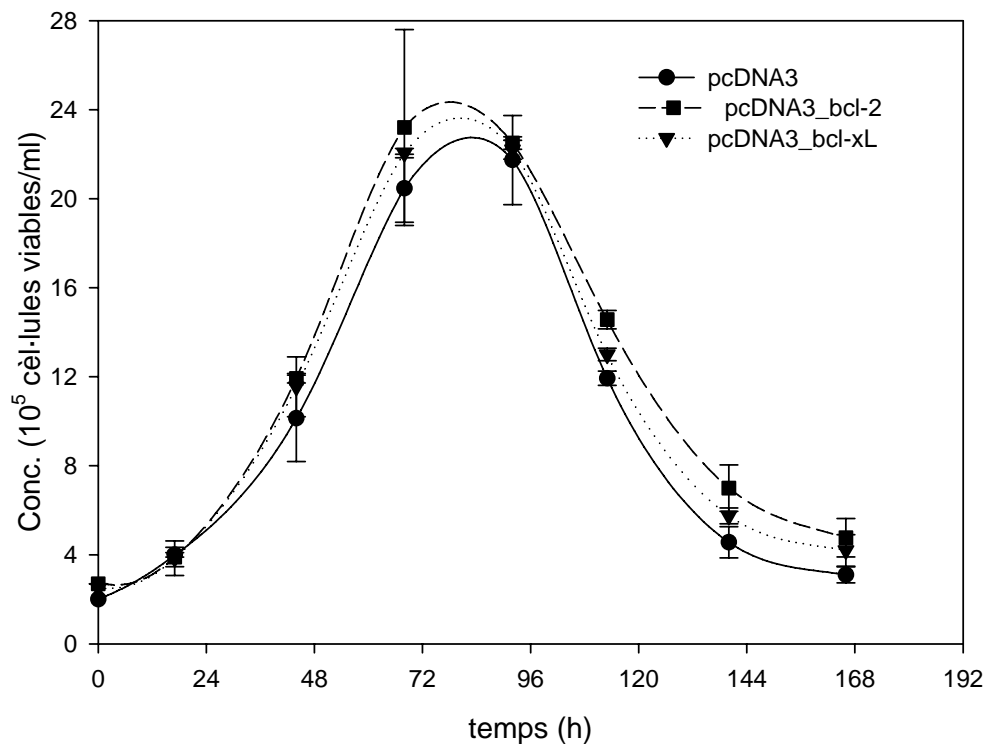


Per comprovar l'efecte protector contra l'apoptosi dels gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* es van realitzar tot un seguit d'experiments utilitzant, com a control, cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3 buit, ja que aquest vector no conté cap gen d'interès i no confereix a la cèl·lula cap avantatge enfront l'apoptosi.

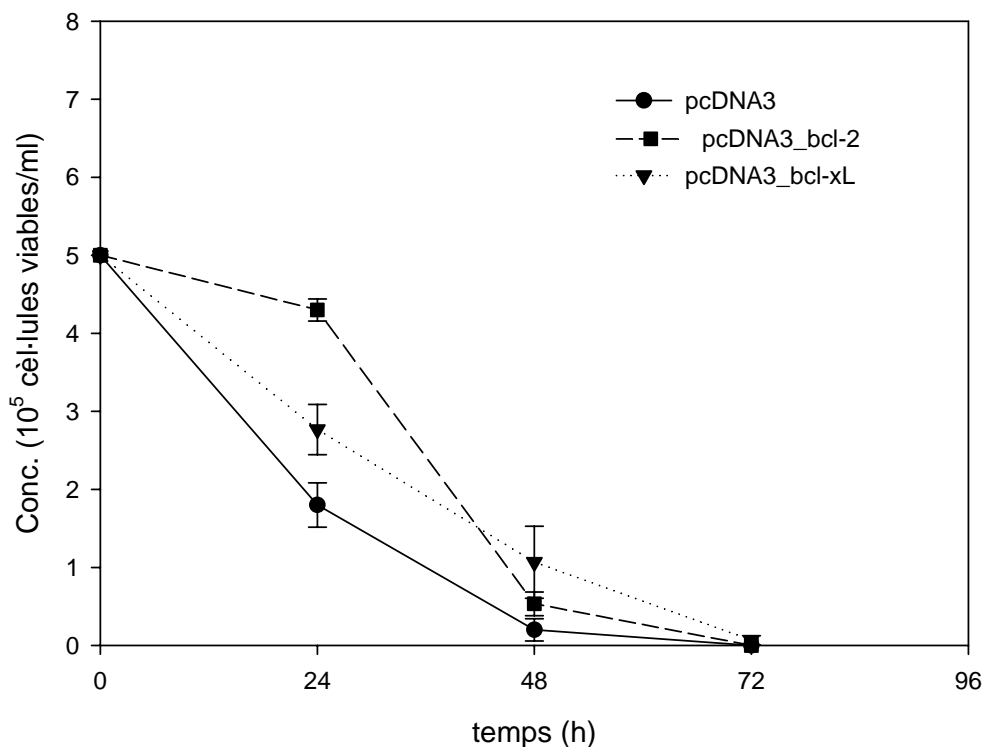
Es va determinar el perfil de creixement dels transfectants pcDNA3\_*bcl-2*, pcDNA3\_*bcl-x<sub>L</sub>* i pcDNA3, fent un seguiment, al llarg del temps, de la població cel·lular en un medi DMEM al 4% FCS i amb 3 mg/ml G418. Com es pot apreciar a la Fig. 3.4, les cèl·lules que han incorporat el gen *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* presenten un creixement lleugerament més elevat i un descens en el nombre de viables més lent que les cèl·lules transfectades amb pcDNA3, gràcies als efectes protectors d'aquests gens.

Per tal de complementar els resultats obtinguts, es va estudiar l'efecte protector d'aquests gens en condicions d'exhauriment de glutamina. Les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_*bcl-2*, les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_*bcl-x<sub>L</sub>* i les cèl·lules control es van cultivar en flascons no agitats amb 10 ml de medi DMEM al 4% FCS, 3 mg/ml de G418 i sense glutamina. L'experiment es va realitzar per triplicat i es van agafar mostres al llarg del temps, per tal de fer el seguiment de la concentració de cèl·lules viables per microscopia òptica i determinar, per citometria de flux, el percentatge de cèl·lules annexina positives presents en els cultius. El marcatge amb annexina permet identificar aquelles cèl·lules que han iniciat el procés apoptòtic.

A la Fig. 3.5 es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables en els tres cultius assajat. Es pot observar com els cultius amb les cèl·lules transfectades amb els gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* pateixen un descens del nombre de cèl·lules viables molt més lent que el cultiu control, ja que a les 24 hores el cultiu control, el cultiu amb el gen *bcl-2* i el cultiu amb el gen *bcl-x<sub>L</sub>* presenten aproximadament una disminució en el nombre de cèl·lules viables del 68%, 12% i 44% respectivament. També es pot veure com a partir de les 48 hores el nombre de cèl·lules viables ha disminuït molt en els tres cultius, concretament hi ha un 2% de cèl·lules vives en el cultiu control, un 14% en el cultiu transfectat amb el *bcl-2* i un 21% en el cultiu transfectat amb el *bcl-x<sub>L</sub>*. A les 72 hores no resten pràcticament cèl·lules viables ni en el cultiu control ni en els cultius amb els transfectants Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>.

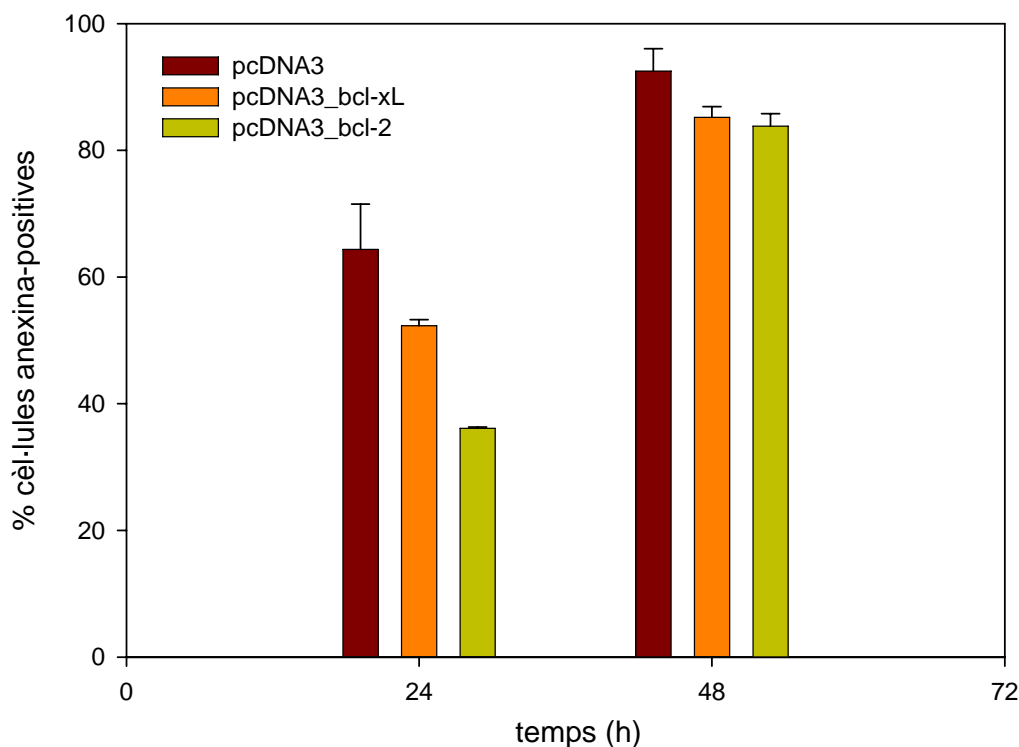


**Fig. 3.4-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3 *bcl-2*, pcDNA3 *bcl-xL* i pcDNA3 en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS i 3 mg/ml de G418.



**Fig. 3.5-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3 *bcl-2*, pcDNA3 *bcl-xL* i pcDNA3 en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS, 3 mg/ml G418 sense glutamina.

Al comprovar el percentatge de cèl·lules annexina positives present en els diferents cultius (Fig. 3.6) es pot apreciar com a les 24 hores i a les 48 hores el cultiu amb els gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* tenen un percentatge de cèl·lules annexina positives inferior al cultiu control. Aquesta diferència és més evident a les 24 h ja que aproximadament el 64% de les cèl·lules del cultiu control són apoptòtiques, mentre que els cultius amb els gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* presenten un 36% i 52% de cèl·lules apoptòtiques respectivament.

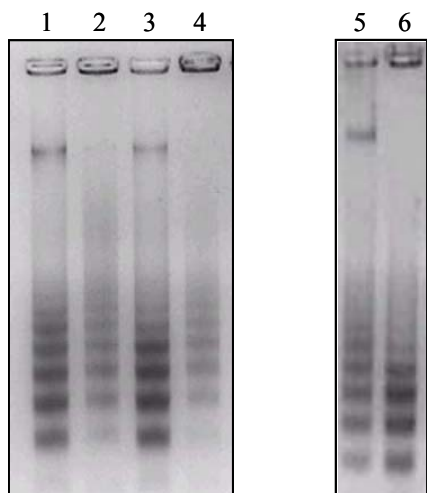


**Fig. 3.6-** Evolució del percentatge de cèl·lules annexina positives presents en els cultius transfectats construcció pcDNA3\_ *bcl-2*, pcDNA3\_ *bcl-x<sub>L</sub>* i pcDNA3 en medi DMEM 4% FCS, 3 mg/ml G418 sense glutamina.

Per tant, aquests resultats confirmen el retard de l'apoptosi que pateixen les cèl·lules transfectades amb els gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>*.

Com s'ha comentat en la introducció (capítol 1) en estadis mitjanament avançats de l'apoptosi es produeix el processament endonucleotídic del DNA. Per tal de visualitzar aquest fenomen es va extreure a les 24 i a les 48 hores el DNA genòmic dels tres cultius anteriors sotmesos a condicions d'exhauriment de glutamina. A la Fig. 3.7 es pot observar com els diferents cultius presenten el típic patró de degradació del DNA de les cèl·lules apoptòtiques. En el cas dels cultius transfectats

amb els gens antiapoptòtics aquesta visible fragmentació es deu, probablement, a la barreja existent entre cèl·lules que expressen els nivells òptims del gen protector amb cèl·lules que únicament expressen la resistència a l'antibiòtic present al medi, pel fet d'estar treballant amb poblacions clonals enlloc de clons individuals.



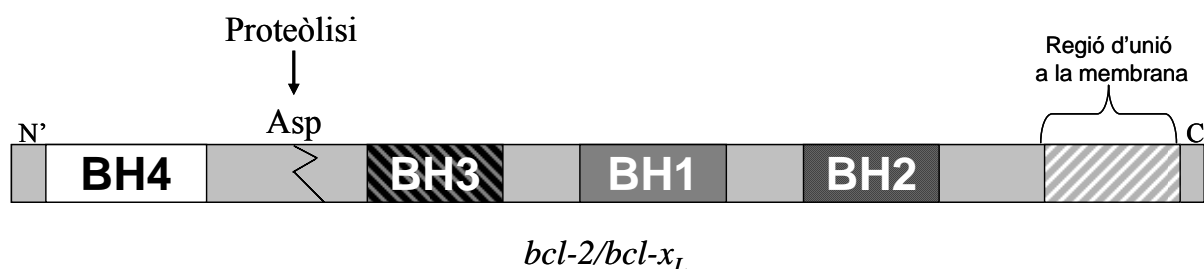
**Fig. 3.7-** Visualització de la fragmentació del DNA. Fotografia de dos gels d'agarosa en els quals s'ha fet migrar mostres extretes dels diferents cultius en medi DMEM 4% FCS, 3 mg/ml G418, sense glutamina: 1- transfectant pcDNA3 a les 24 hores, 2- transfectant pcDNA3 a les 48 hores, 3- transfectant pcDNA3\_ *bcl-2* a les 24 hores 4- transfectant pcDNA3\_ *bcl-2* a les 48 hores 5- transfectant pcDNA3\_ *bcl-x<sub>L</sub>* a les 24 hores, 6- transfectant pcDNA3\_ *bcl-x<sub>L</sub>* a les 48 hores. En tots els cultius a les 24 hores encara queda DNA genòmic intacte.

També, es va voler determinar fins a quin punt l'efecte protector dels gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* podia permetre la recuperació de la viabilitat del cultiu després de determinats períodes de condicions desfavorables, com ara la manca de glutamina. Per aquest motiu, es va preparar un experiment amb els tres cultius anteriors en medi sense glutamina que, després de diferents intervals de temps (12, 24 i 48 hores), es tornaven a cultivar amb glutamina i s'observava si la viabilitat es recuperava de nou. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 3.1. Com es pot apreciar en aquesta taula, les cèl·lules que han incorporat el gen *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* es recuperen fins a les 24 hores d'estar sotmesos a condicions de manca de glutamina, mentre que el cultiu control no ho fa. Aquest fet és molt important, ja que si es produeix qualsevol pertorbació en el bioreactor que indueixi l'apoptosi, és possible recuperar el cultiu aproximadament 24 hores després d'haver-se produït l'alteració. En canvi, en una població cel·lular no modificada genèticament, la recuperació del cultiu només és possible fins a 12 hores després d'haver-se induït l'apoptosi.

**Taula 3.1-** Recuperació de la viabilitat de les mostres extretes a diferents intervals de temps dels tres cultius assajats: (+) cultiu que creix en medi amb glutamina (cultiu recuperat), (-) cultiu que es mor en medi amb glutamina (cultiu no recuperat).

Cultius	Temps (hores)		
	12	24	48
Cèl·lules transfectades pcDNA3 <i>bcl-2</i>	+	+	-
Cèl·lules transfectades pcDNA3 <i>bcl-x<sub>L</sub></i>	+	+	-
Cèl·lules transfectades pcDNA3	+	-	-

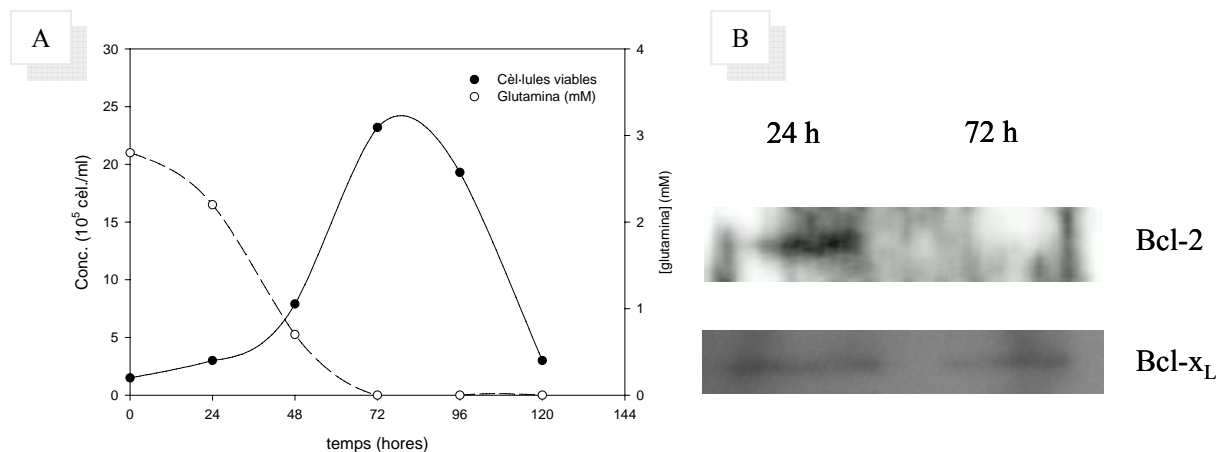
En determinades condicions, les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> poden ser convertides en proteïnes proapoptòtiques mitjançant un tall proteolític per part de les Caspases en el seu domini N-terminal (Fig. 3.8) [Cheng i col., 1997a; Clem i col., 1998; Kirsch i col., 1999; Basanez i col., 2001; Jonas i col., 2004]. Aquest fet podria explicar perquè a les 48 i 72 hores de cultiu (Fig. 3.5) no resten pràcticament cèl·lules viables en el cultiu amb els transfectants del Bcl-2 i el Bcl-x<sub>L</sub>. Estudis previs de transferència *Western* realitzats en cultius en discontinu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 van permetre confirmar aquest fet pel que fa a la proteïna Bcl-2. En canvi, per a la proteïna Bcl-x<sub>L</sub> no es va observar aquesta proteòlisi (Fig. 3.9) [Juanola, 2001; Vives, 2001].



**Fig. 3.8-** Representació esquemàtica del gen *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>*. Es mostra la posició del residu Asp diana de la Caspasa 3 en la regió compresa entre els dominis BH3 i BH4 [Polster, 2004].

Donat que la proteïna Bcl-2 i possiblement Bcl-x<sub>L</sub> poden promoure l'apoptosi quan són tallades per les Caspases, es va considerar interessant la possibilitat d'expressar homòlegs d'aquestes proteïnes que no poguessin generar activitat proapoptòtica com ara les proteïnes víriques BHRF-1 i KSBcl-2 [Bellows i col., 2000; Hardwick i Bellows, 2003; Polster i col., 2004]. Aquestes dues proteïnes en comparació amb les proteïnes cel·lulars Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> no han estat gaire estudiades [Vives i col., 2003b] i per aquest motiu, es va voler comprovar si eren una bona alternativa per inhibir l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5. També es va voler expressar l'inhibidor víric de la Caspasa 3, la proteïna P35 de baculovirus (Taula 3.2), per tal de reproduir els efectes dels inhibidors químics de

les Caspases (z-VAD-fmk i DEVD-cmk) que, en treballs anteriors han permès protegir i recuperar el cultius en condicions inductores de mort per supressió de nutrients [Tintó, 1999] (apartat 1.3.2.3.1).



**Fig. 3.9-** A) Corba de viabilitat de l'hibridoma KB26.5 i evolució de la concentració de glutamina en un cultiu en discontinu en medi DMEM 2% FCS. B) Fotografia realitzada del *Western Blot* per detectar la presència de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> en l'hibridoma KB26.5 en condicions òptimes (24 h) i en condicions de manca de glutamina (72h). Com es pot observar en el revelat de la membrana, a les 24 h, on la majoria de cèl·lules són viables, s'observa una banda corresponent a la proteïna Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>. En canvi, en els cultius on s'ha induït l'apoptosi (72 h) només s'observa banda en el cas de la proteïna Bcl-x<sub>L</sub>. La proteòlisi de la proteïna Bcl-2 per la Caspasa 3 en el residu Asp<sup>34</sup> podria explicar el fet que no s'observi cap banda a les 72 hores, ja que l'anticòs no reconeix la proteïna tallada [Juanola, 2001; Vives, 2001].

**Taula 3.2-** Constants d'inhibició ( $K_{obs}/l$  en  $M^{-1}S^{-1}$ ) de les proteïnes víriques CrmA i P35 inhibidores de Caspases. Valors de  $K_{obs}/l < 10^4$  són considerats fisiològicament no significatius i nd significa efecte no determinat. Es pot veure que la proteïna P35 és la opció més interessant per inhibir l'apoptosi a nivell de la via mitocondrial (Taula modificada de Stennicke i col., 2002).

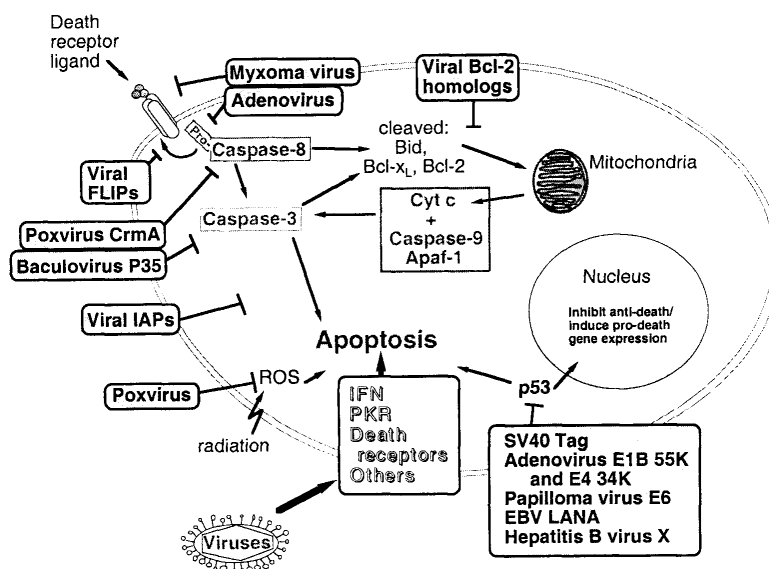
Caspasa	P35 ( $K_{obs}/l$ )	CrmA ( $K_{obs}/l$ )
1	$8 \times 10^3$	$2 \times 10^7$
3	$7 \times 10^5$	200
6	$1 \times 10^5$	440
7	$1 \times 10^5$	<10
8	$6 \times 10^4$	$9 \times 10^4$
9	nd	$1 \times 10^5$
10	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^3$

### 3.4- Obtenció i clonació dels gens vírics: *bhrf-1*, *ksbcl-2* i *p35*

Els virus són paràsits intracel·lulars obligats que necessiten la maquinària de la cèl·lula hoste per propagar-se. La capacitat dels virus per replicar-se i persistir depèn de la interacció dels virus amb els mecanismes de defensa antiviral de la cèl·lula hoste. Un mecanisme innat que desenvolupa la cèl·lula hoste per evitar la propagació

dels virus és l'apoptosi de les cèl·lules infectades [Koyama i col., 1998; Everett i Fadden, 1999]. En aquestes situacions, els virus expressen proteïnes repressores de la resposta de mort [Chacón-Salinas i Sánchez-Cruz, 2000; Hardwick i Bellows, 2003; Boya i col., 2004; White, 2006]. Aquestes proteïnes víriques sintetitzades tenen com a objectiu les vies responsables de regular l'apoptosi, assegurant així la formació de més virus i la consegüent infecció de cèl·lules veïnes (Fig. 3.10) [Hardwick, 2001; Irusta i col., 2003].

Alguns herpesvirus, adenovirus, baculorivirus, el virus de la febre porcina, el virus Epstein-Barr, sintetitzen proteïnes similars a determinats repressors cel·lulars de l'apoptosi [Henderson i col., 1993; Farrow, 1995; Revilla, 1997; Cheng, 1997b]. També existeixen virus capaços de sintetitzar proteïnes que inhibeixen l'acció de les Caspases, com és el cas d'alguns poxvirus [Zhou i col., 1997; Zhou i col., 1998b] (Taula 3.3).



**Fig. 3.10-** Esquema del nivell d'actuació dels virus en el procés de mort cel·lular programada [Hardwick, 2001].

**Taula 3.3-** Exemple de proteïnes víriques inhibidores de l'apoptosi.

Proteïnes víriques	Procedència
E1B-19K	Adenovirus E1B
P35, Gaps	Baculovirus
CrmA	Poxvirus
BHRF-1, LMP-1	Virus d'Epstein-Barr
LMW5-HL	Virus de la febre porcina africana
RF16, KS-Bcl-2	Herpesvirus

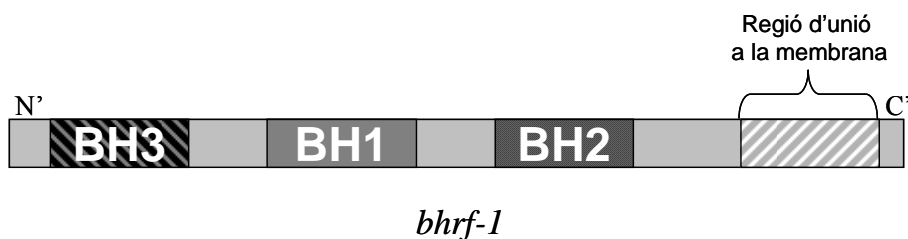
En aquest treball els dos membres vírics homòlegs a la proteïna Bcl-2 escollits van ser el BHRF-1 del virus Epstein-Barr i el KSBcl-2 de l'herpesvirus humà HHV8. També es va triar la proteïna P35 de baculovirus inhibidora de Caspases.

### 3.4.1-BHRF-1

El virus d'Epstein-Barr (VEB) és un herpesvirus humà del tipus 4, responsable, entre d'altres malalties, del limfoma de Burkitt (Càncer dels limfòcits B) [Young et al., 1999]. Aquest virus és capaç de mantenir la població cel·lular infectada mitjançant la inhibició de l'apoptosi. Una de les proteïnes del virus VEB implicada en aquest procés és la BHRF-1 (*BamHI rightward reading frame 1*), expressada en la fase primerenca del cicle lític per permetre la multiplicació del virus [Henderson i col., 1993].

El gen *bhrf-1* és altament conservat en tots els virus d'Epstein Barr aïllats [Khanim i col., 1997] i s'ha demostrat que suprimeix la permeabilització de la membrana mitocondrial i l'apoptosi induïda per una gran varietat d'estímuls com ara senyals procedents dels receptors de mort, infeccions virals i dany al DNA [Tarodi i col., 1994; Foghsgaard i Jaattela, 1997; Kawanishi, 1997; Kawanishi i col., 2002].

La seqüència del gen *bhrf-1* presenta un 38% d'homologia amb el gen *bcl-2* humà i té tres dominis conservats BH, BH1-BH3 i un domini transmembrana en la regió C-terminal que li permetrà el seu ancoratge a les membranes intracel·lulars (Fig. 3.11) [Huang i col., 2003]. L'estructura tridimensional de la proteïna BHRF-1 ha estat descrita recentment i presenta diferències estructurals significatives respecte a altres membres de la família Bcl-2. En els estudis realitzats per Huang i els seus col·laboradors, s'ha vist que BHRF-1 a diferència de Bcl-x<sub>L</sub> i KSBcl-2 no té el solc d'unió hidrofòbic responsable de la interacció entre el membres antiapoptòtics i el domini BH3 de les proteïnes proapoptòtiques i que tampoc és capaç de formar heterodímers amb les proteïnes proapoptòtiques, Bak, Bax, Bik, i Bad per neutralitzar la seva funció, suggerint que el seu mecanisme d'acció és diferent de Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> i que pot escapar a la regulació negativa d'aquestes proteïnes [Huang i col., 2003].

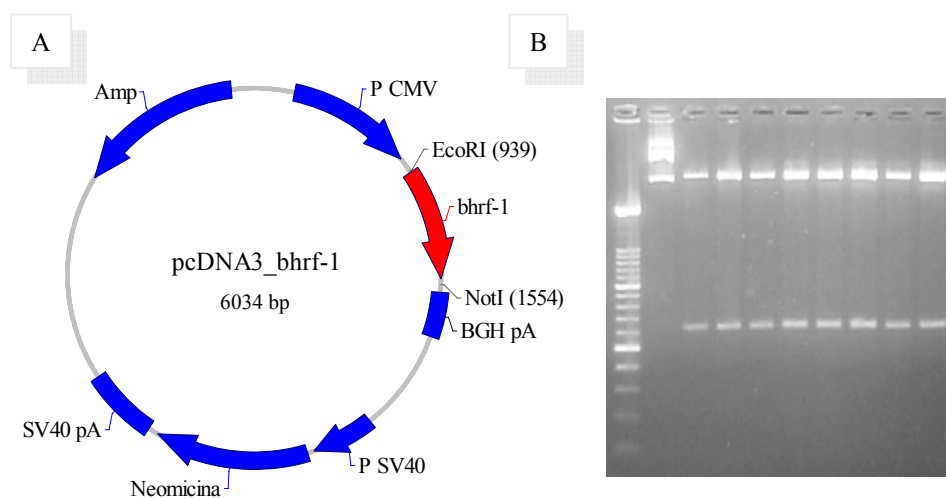


**Fig. 3.11-** Representació esquemàtica del gen *bhrf-1* amb els seus tres dominis conservats, BH1, BH2 i BH3 i el domini transmembrana.



El gen *bhrf-1* emprat en aquest treball es va obtenir de la línia cel·lular Raji (cedida pel Dep. d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona) que prové d'un limfoma de Burkitt. Per tal d'obtenir el gen *bhrf-1* es va realitzar una RT-PCR a partir d'una extracció del RNA total de cèl·lules Raji (apartat 8.12.3).

A l'Annex I es mostra la seqüència del gen *bhrf-1* extreta del NCBI i l'apartat 8.12.1 del capítol de materials i mètodes, els oligonucleòtids emprats com encebadors per amplificar el mRNA d'aquest gen. La temperatura a la qual es va dur a terme la síntesi del cDNA va ser de 50°C i la temperatura d'hibridació va ser de 55°C. El producte obtingut de la RT-PCR va ser subclonar en el vector pCR2.1-TOPO (apartat 8.13.5) per posteriorment clonar-lo en el vector pcDNA3 entre les dianes *EcoRI* i *NotI* del MCS (Fig. 3.12).



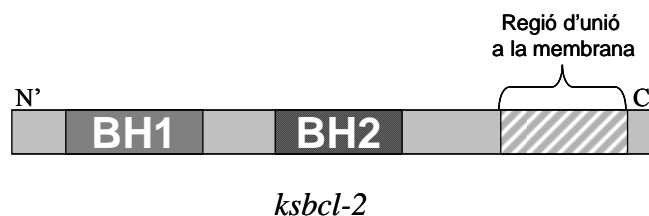
**Fig. 3.12-** A) Representació gràfica de la construcció pcDNA3\_ *bhrf-1* B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret de diferents colònies transformades amb la construcció pcDNA3\_ *bhrf-1*. El marcador emprat va ser el XIV (Annex II). Es pot observar la banda corresponent al vector pcDNA3 (5419 pb) i al gen *bhrf-1* (615 pb).

### 3.4.2-KSBcl-2

L'herpesvirus 8 humà (HHV8) és un virus associat al Sarcoma de Kaposi (KS) que és un càncer que es desenvolupa als malalts de SIDA [Chang i col., 1994; Cathomas, 2000; Ensoli i col., 2001]. En el genoma de l'herpesvirus es troba un gen que codifica per una proteïna homòloga a Bcl-2, anomenat *ksbcl-2* [Sarid i col., 1997; Cheng i col., 1997b]. Al igual que la proteïna BHRF-1, s'expressa en la fase primerenca del cicle lític i pot inhibir l'apoptosi produïda per una gran varietat d'estímuls [Cheng i col., 1997b; Ojala i col., 1999].

La seqüència del *ksbcl-2* presenta un 19% d'homologia amb el gen *bhrf-1*, un 15% d'homologia amb *bcl-2* i un 17% d'homologia amb *bcl-xL* i presenta dos dominis conservats BH1 i BH2 i un domini transmembrana en la regió C-terminal que li permetrà el seu ancoratge a les membranes intracel·lulars (Fig. 3.13) [Cheng i col., 1997b].

Una característica interessant de la proteïna KSBcl-2 és que no pot heterodimeritzar amb Bax o Bak, així aquesta proteïna podria escapar de la regulació negativa d'aquestes proteïnes [Cheng i col., 1997b]. Al igual que KSBcl-2, la proteïna vírica BHRF-1 tampoc pot dur a terme aquesta heterodimerització, suggerint que ambdues proteïnes podrien tenir un mecanisme similar d'actuació.



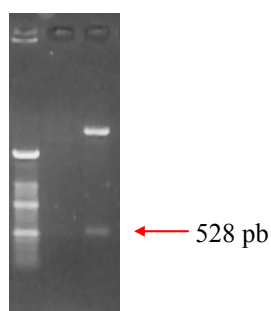
**Fig. 3.13-** Representació esquemàtica del gen *ksbcl-2* amb els seus dos dominis conservats, BH1 i BH2 i el domini transmembrana.

El gen *ksbcl-2* va ser cedit per la Dra. J. Marie Hardwick (John Hopkins Hospital, Baltimore) i es trobava inserit dins del vector pSG5 (Stratagene).

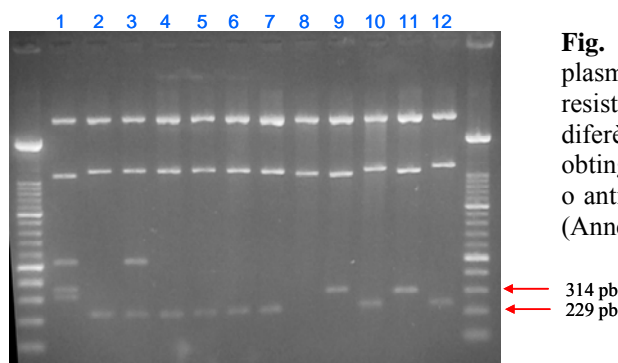
Per alliberar el gen víric de la construcció pSG5\_ksbcl-2 i clonar-lo al vector pcDNA3, es va tallar aquesta construcció amb l'enzim de restricció *BglIII* (Fig. 3.14) i es va dur a terme una clonació amb extrems roms. Per realitzar aquesta clonació, els extrems cohesius del gen *ksbcl-2* es van transformar en extrems roms mitjançant l'enzim T4 DNA polimerasa (apartat 8.13.2) i el plasmidi pcDNA3 es va linearitzar amb l'enzim *EcoRV* el qual origina extrems roms preparats per unir-se a l'insert. Abans de fer la lligació, els extrems del vector pcDNA3 es van desfosforilar amb l'enzim fosfatasa alcalina per evitar possibles relligacions del vector amb ell mateix (apartat 8.13.3).

Quan es duen a terme clonacions no orientades amb extrems roms, les construccions obtingudes en la reacció de lligació poden haver incorporat l'insert orientat de forma incorrecta respecte el promotor del vector. Per tant, comprovar aquesta orientació és un pas necessari en el procés de clonació ja que si l'insert està mal orientat aquest no s'expressarà correctament. Per comprovar si l'orientació del gen *ksbcl-2* era la

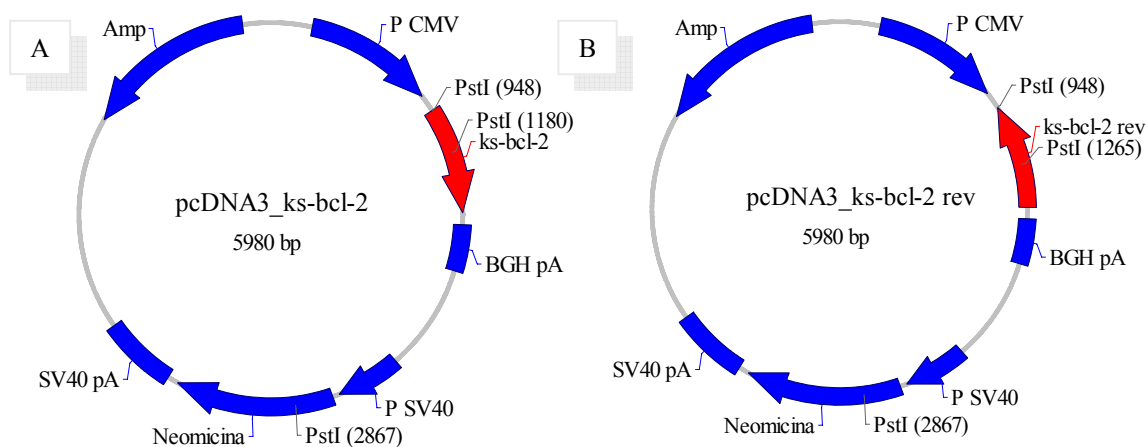
correcta, es va cercar una diana única de restricció en el plasmidi i una diana única de restricció en l'insert. D'aquesta forma, en la digestió s'obtenen dos fragments de diferent longitud que, en comparar-los amb la longitud dels fragments esperats, permeten determinar l'orientació de l'insert. Per determinar l'orientació de les colònies obtingudes es va extreure el DNA plasmídic dels bacteris (apartat 8.10.1.1) i posteriorment es va tallar amb l'enzim *PstI* (Fig. 3.15). A la Fig. 3.16 es mostra el mapa de restricció de les construccions plasmídiques obtingudes quan el gen *ksbcl-2* es troba amb orientació sentit o antisentit. A la taula 3.4 s'indica la longitud dels fragments de restricció obtinguts en cada cas.



**Fig. 3.14-** Fotografia del gel agarosa on s'observa banda corresponent al gen *ksbcl-2* (528 pb) després de digerir la construcció pSG5\_ksbcl-2 amb l'enzim de restricció *Bgl II*. El marcador de pes molecular utilitzat és el XIV (Annex II).



**Fig. 3.15-** Patró de restricció del DNA plasmídic extret de 12 colònies ampicil·lina resistents obtingudes. Es pot observar les diferències de grandària dels fragments obtinguts en colònies amb construccions sentit o antisentit. El marcador emprat va ser el XIV (Annex II). La colònia escollida va ser la 2.



**Fig. 3.16-** Representació gràfica del les construccions plasmídiques del gen *ksbcl-2* amb les seves dues possibles orientacions: sentit (A) i antisentit (B).

**Taula 3.4-** Longitud dels fragments esperats al tallar amb enzims de restricció la construcció en sentit o antisentit del gen *ksbcl-2*.

Construcció	Orientació	Fragments esperats (pb)
pcDNA3_ksbcl-2( <i>PstI</i> )	Sentit	229 / 1687 / 4064
	Antisentit	314 / 1602 / 4064

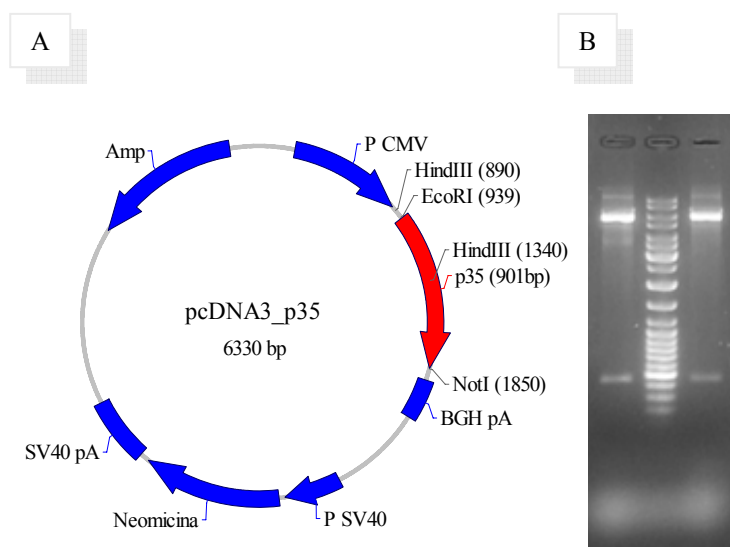
### 3.4.3- P35

Molts virus han desenvolupat mecanismes que eviten el suïcidi de les seves cèl·lules hoste codificant per proteïnes que interfereixen en l'activació de les Caspases, com és el cas de Baculovirus AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) que codifica per una proteïna antiapoptòtica anomenada P35 [Clem i Miller, 1994; Sahdev i col., 2003, Wang i col. 2003; Nathaniel i col., 2004; Ranjan i col., 2004]. S'ha mostrat que la proteïna P35 és capaç d'inhibir diverses proteases de la família de les Caspases, actuant sobre les Caspases 6, 7, 8 i preferentment sobre la Caspasa 3 (veure Taula 3.2, apartat 3.3) [Bump i col., 1995; Riedl i col., 2001; Clem, 2001; Stennicke i col., 2002]. Les Caspases 3, 6 i 7 desenvolupen un paper molt important en el procés d'apoptosi, ja que són les responsables de la degradació de diferents substrats citoplasmàtics i nuclears que conduiran a la desestructuració de tota la maquinària cel·lular (veure apartat 1.3.2.3, capítol introducció). La Caspasa 8, en canvi, és una proteasa encarregada de transmetre el senyal apoptòtic en la fase inicial de l'apoptosi induïda via receptors de membrana.

P35 inhibeix l'apoptosi en una gran varietat d'organismes, en insectes, nemàtodes, ratolins i humans [Hay i col., 1994; Xue i Horvitz, 1995; Clem, 2001; Tomioka i col., 2002]. L'estudi de l'estructura cristal·litzada del complex P35-Caspasa 8 va permetre veure com es dona la interacció entre aquestes dues proteïnes i d'aquesta manera, entreveure el possible mecanisme d'actuació de la proteïna P35. El residu Asp87 de la proteïna P35 interaccionaria amb el centre actiu de la Caspasa formant un complex estable P35-Caspasa unit covalentment [Zhou i col., 1998b; Riedl i col., 2001; Xu i col., 2001].

El gen *p35* va ser obtingut mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (apartat 8.12.2) utilitzant com a DNA motlle el genoma viral de baculovirus (cedit per la Dra. Carmen Vela de INGENASA, Madrid). Els reactius i la metodologia

emprada són els indicats per l'enzim *Gentaq-DNA polimerasa* (Progenetic). Per dur a terme la PCR, es van dissenyar els encebadors a partir de la seqüència coneguda del gen *p35* (Annex I) extreta de les bases de dades disponibles en el NCBI. En la PCR la temperatura d'hibridació va ser de 60°C i es va fer ús de l'enzim *GenTaq* com a polimerasa termoestable. L'enzim *GenTaq* es caracteritza per afegir adenines en els extrems 3' dels fragments amplificats, de manera que sense cap tractament previ dels extrems, el fragment obtingut es va subclonar en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) (apartat 8.13.5), per posteriorment clonar-lo en el vector pcDNA3 entre les dianes de restricció *EcoRI* i *NotI* seguint la mateixa estratègia que els gens anteriors (Fig. 3.17).



**Fig. 3.17-** A) Representació gràfica de la construcció pcDNA3\_p35. B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret de dues les colònies transformades amb la construcció pcDNA3\_p35. El marcador emprat va ser el GeneRuler™ (Annex II). Es pot observar les dues bandes esperades al tallar el DNA amb l'enzim *HindIII*, una de 5880 pb i una de 450 pb.

Una vegada obtingudes les colònies amb les construccions plasmídiques pcDNA3\_p35, pcDNA3\_bhrf-1 i pcDNA3\_ksbcl-2, es va extreure d'aquestes colònies grans quantitats de DNA plasmídic d'elevada puresa (apartat 8.10.1.2) per tal de transfectar les cèl·lules d'hibridoma KB26.5.

### 3.5- Inhibició de l'apoptosi per expressió dels gens *bhrf-1*, *ksbcl-2* i *p35*

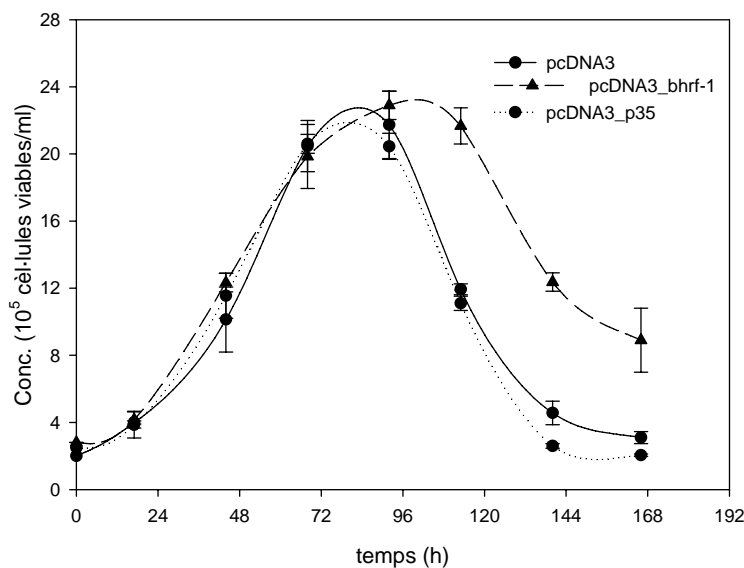
Les construccions plasmídiques pcDNA3\_bhrf-1, pcDNA3\_ksbcl-2 i pcDNA3\_p35 es van transfectar a l'hibridoma KB26.5 tal i com s'explica en l'apartat 8.15.1. Per obtenir els clons es va haver de realitzar diverses tandes de transfecció com a conseqüència de la baixa eficiència de transfecció que presenten les cèl·lules d'hibridoma. Al llarg d'aquest treball, la problemàtica que suposava la baixa eficiència de transfecció de

l'hibridoma era un gran inconvenient i es van posar a punt un seguit de tècniques per millorar la transferència de material genètic a l'hibridoma KB26.5 (veure capítol 4).

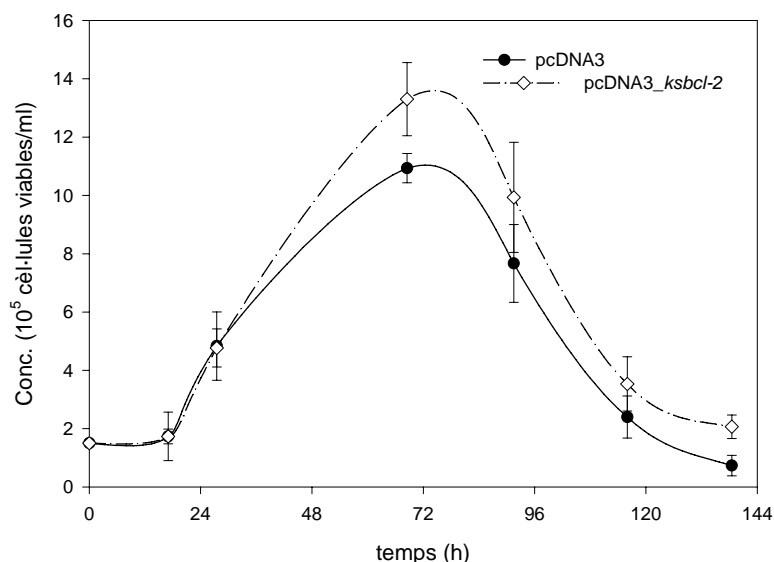
Per comprovar l'efecte protector del gens *bhrf-1*, *ksbcl-2* i *p35*, es van realitzar tot un seguit d'experiments amb els cultius següents:

1. Cultiu amb les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_*bhrf-1*.
2. Cultiu amb cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_*ksbcl-2*.
3. Cultiu amb cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_*p35*.
4. Cultiu control amb cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3. Aquest control només permet veure l'expressió correcte del plasmidi pcDNA3 ja que no confereix a la cèl·lula cap avantatge enfront l'apoptosi.

Es va determinar el perfil de creixement dels diferents cultius fent un seguiment, al llarg del temps, de la població cel·lular en un medi DMEM al 4% FCS i amb 3 mg/ml de G418. Com es pot apreciar a la Fig. 3.18 i 3.19, les cèl·lules que han incorporat els gens *bhrf-1* i *ksbcl-2*, presenten un creixement més elevat i un descens en el nombre de viables més lent que les cèl·lules transfectades amb pcDNA3 i pcDNA3\_*p35*, gràcies als efectes protectors d'aquest gens. En el cas de la proteïna P35 no s'observa cap millora.



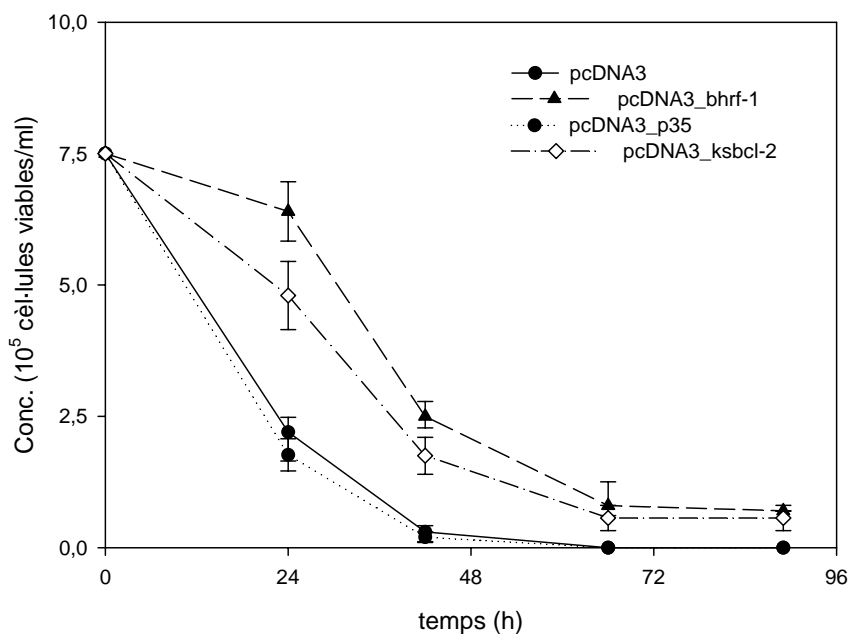
**Fig. 3.18-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_*bhrf-1*, pcDNA3\_*p35* i pcDNA3 en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS i 3 mg/ml de G418.



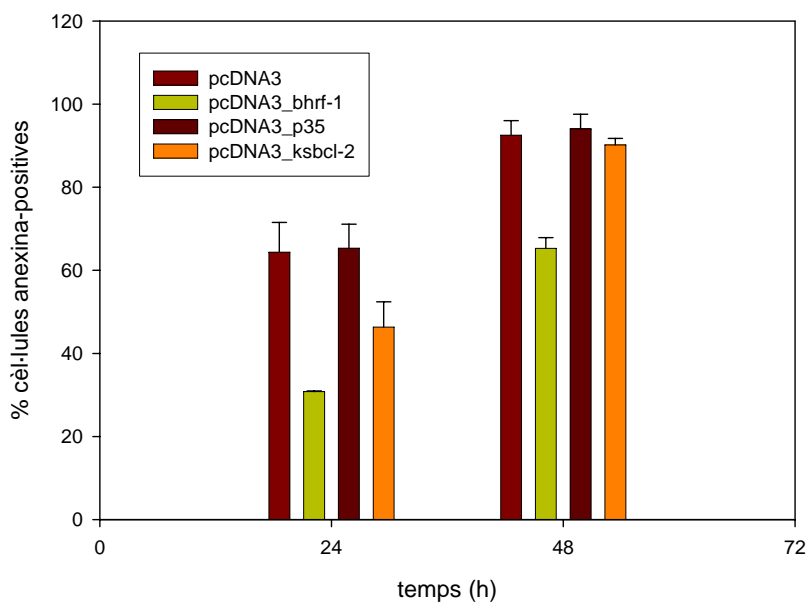
**Fig. 3.19-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_ksbcl-2 i pcDNA3 en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS i 3 mg/ml de G418.

Per corroborar els resultats obtinguts, els diferents transfectants es van cultivar en flascons no agitats amb 10 ml de medi DMEM amb un 4% FCS, 3 mg/ml G418 sense glutamina i un inòcul inicial de  $7.5 \times 10^5$  cèl·lules/ml. L'experiment es va realitzar per triplicat i es van agafar mostres cada 24 hores per tal de fer el seguiment de la concentració de cèl·lules viables, l'anàlisi per citometria de flux del percentatge de cèl·lules annexina positives i la visualització de la fragmentació del DNA en gels agarosa. A la Fig. 3.20 es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables obtinguda en els quatre cultius. Es pot veure com el cultiu control i les cèl·lules transfectades amb el gen *p35* pateixen un dràstica davallada en el nombre de cèl·lules viables mentre que en els altres dos cultius aquesta disminució és molt més lenta. També es pot veure com a les 42 hores de cultiu, els únics cultius que mantenen la viabilitat és el dels transfectants del gen *bhrf-1* i el dels transfectants del gen *ksbcl-2*. A les 24 i 48 hores, els cultius dels transfectants tant del *ksbcl-2* com del *bhrf-1* mostren un percentatge de cèl·lules annexina positives inferior al cultiu control i al cultiu amb els transfectants del *p35* (Fig. 3.21). Aquesta diferència és més evident a les 24 hores ja que el cultiu amb el gen *bhrf-1* presenta aproximadament un 31% de cèl·lules apoptòtiques i el cultiu amb el gen *ksbcl-2* té un 46%, mentre que el cultiu control i el transfectat amb el gen *p35* presenten un 64% i 65% de cèl·lules apoptòtiques respectivament. A les 48 hores tots els cultius, excepte el cultiu amb els

transfectants del gen *bhrf-1*, presenten aproximadament un percentatge superior al 90% de cèl·lules anexina positives, indicant que en els cultius queden poques cèl·lules viables. En el cas del cultiu amb el gen *bhrf-1* només el 65% de les cèl·lules són apoptòtiques, mostrant un clar efecte protector del gen *bhrf-1*.



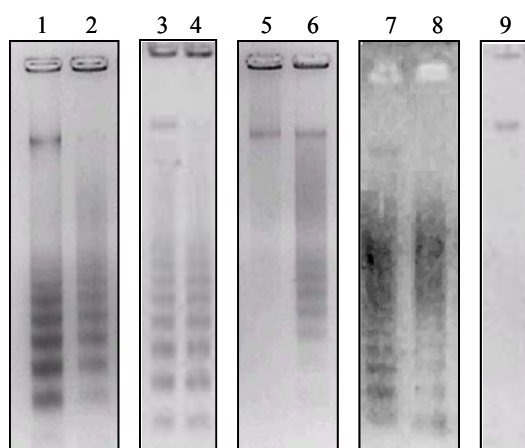
**Fig. 3.20-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb la construcció *pcDNA3\_bhrf-1*, *pcDNA3\_ksbcl-2*, *pcDNA3\_p35* i *pcDNA3* en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS, 3 mg/ml G418 sense glutamina.



**Fig. 3.21-** Evolució del percentatge de cèl·lules anexina positives presents en els cultius transfectats amb la construcció *pcDNA3\_bhrf-1*, *pcDNA3\_ksbcl-2*, *pcDNA3\_p35* i *pcDNA3* en medi DMEM 4% FCS, 3 mg/ml G418 sense glutamina.



A l'observar el resultat de l'electroforesi del DNA extret dels diferents cultius a les 24 i 48 hores després d'haver-se iniciat l'experiment (Fig. 3.22) es pot veure com tots els cultius excepte el que expressa el gen *bhrf-1* presenten a les 24 hores una clara fragmentació del DNA en patró d'escala, sense que es pugui apreciar cap diferència significativa entre ells. A les 48 hores tots els cultius tenen tot el DNA genòmic fragmentat excepte el del *bhrf-1* que encara conserva DNA intacte, mostrant de nou la capacitat protectora del gen *bhrf-1*.



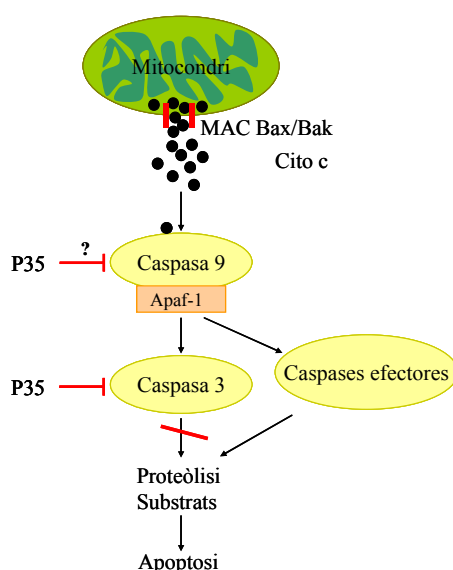
**Fig. 3.22-** Visualització de la fragmentació del DNA. Fotografia de gels d'agarosa en els quals s'ha fet migrar mostres de material genètic extretes dels diferents cultius en medi DMEM 4% FCS, 3 mg/ml G418, sense glutamina: 1- transfectant pcDNA3 a les 24 hores, 2- transfectant pcDNA3 a les 48 hores, 3- transfectant pcDNA3\_p35 a les 24 hores, 4- transfectant pcDNA3\_p35 a les 48 hores, 5- transfectant pcDNA3\_bhrf-1 a les 24 hores, 6- transfectant pcDNA3\_bhrf-1 a les 48 hores, 7- transfectant pcDNA3\_ksbcl-2 a les 24 hores, 8- transfectant pcDNA3\_ksbcl-2 a les 48 hores. El carril 9 és un cultiu control en medi amb glutamina.

També, es va voler determinar fins a quin punt la inhibició d'aquestes proteïnes podia permetre la recuperació de la viabilitat dels cultius després de determinats períodes de condicions desfavorables. Per aquest motiu es va preparar un experiment amb els diferents transfectants cultivats en medi sense glutamina que després de diferents intervals de temps (12, 24, 48 i 72 h) es tornaven a cultivar amb glutamina i s'observava si la seva viabilitat es recuperava de nou. Els resultats obtinguts mostraven que tant els transfectants que expressen el *ksbcl-2* com els que expressen el *bhrf-1* es recuperen fins a les 48 hores de cultiu en condicions inductores de l'apoptosi, la qual cosa no esdevé amb els transfectants que contenen el vector pcDNA3 buit i els que expressen el gen *p35* (Taula 3.5). Aquest fet és molt important, ja que si es produeix qualsevol pertorbació en el bioreactor que indueixi l'apoptosi és possible recuperar els cultius que expressin el gen *bhrf-1* o el *ksbcl-2* aproximadament 48 hores després d'haver-se produït l'alteració. En canvi, en una població no modificada genèticament, la recuperació del cultiu només és possible fins a 12 hores després d'haver-se induït l'apoptosi.

**Taula 3.5-** Recuperació de la viabilitat de les mostres extretes a diferents intervals de temps dels dos cultius assajats: (+) cultiu que creix en medi amb glutamina (cultiu recuperat), (-) cultiu que es mor en medi amb glutamina (cultiu no recuperat).

Cultius	Temps (hores)			
	12	24	48	72
Cèl·lules transfectades <i>ks-bcl-2</i>	+	+	+	-
Cèl·lules transfectades <i>bhrf-1</i>	+	+	+	-
Cèl·lules transfectades <i>p35</i>	+	-	-	-
Cèl·lules transfectades pcDNA3	+	-	-	-

Tots aquests resultats permeten concloure que tant les cèl·lules transfectades amb el gen *ksbcl-2* com les transfectades amb el gen *bhrf-1* aconseguen retardar l'aparició de l'apoptosi, però les que expressen el gen *bhrf-1* ho fan de forma més efectiva. En el cas del cultiu amb cèl·lules transfectades amb el gen *p35*, la proteïna P35 no protegeix les cèl·lules d'hibridoma enfront l'apoptosi ja que es comporta de forma similar al cultiu control. De totes maneres, l'expressió d'aquest gen no evitaria la sortida del Citocrom c al citoplasma i es desconeix l'efecte que té sobre la Caspasa 9. En l'etapa inicial del procés apoptòtic, la Caspasa 9 és la proteasa responsable de la propagació del senyal apoptòtic a les Caspases efectores, i segurament en aquest cas, tot i la presència de la proteïna inhibidora P35, la Caspasa 9 acaba activant diferents Caspases efectores que iniciaran una cascada proteolítica on, de manera progressiva s'aniran activant i destruint diferents enzims i proteïnes estructurals que conduiran a la mort cel·lular (Fig. 3.23).



**Fig. 3.23-** Esquema hipotètic de l'evolució del procés apoptòtic en cèl·lules d'hibridoma KB26.5 transfectades amb el gen víric *p35*.

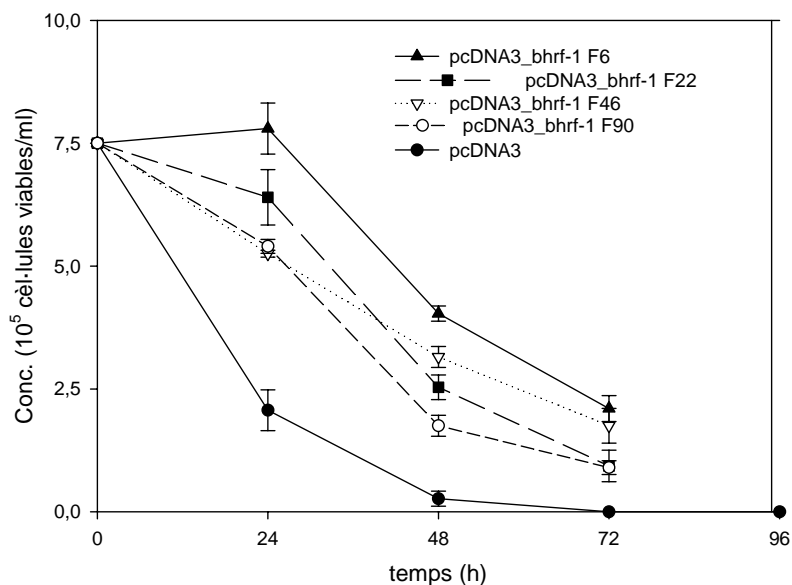
Així doncs, semblaria que una actuació genètica a nivell de l'alliberament del Citocrom c seria la manera més efectiva per inhibir l'apoptosi, sent el gen *bhrf-1* el millor candidat per a la creació de soques modificades genèticament per a la producció d'anticossos monoclonals. A nivell de bioreactor, la possibilitat d'usar cèl·lules modificades genèticament resistents a l'apoptosi representa una millora important en el procés d'obtenció del producte desitjat, ja que s'evitaria l'enorme pèrdua de rendibilitat que es dona quan, ja sigui per raons accidentals o per limitacions físiques de subministrament de nutrients, factors de creixement i oxigen, les cèl·lules es veuen sotmeses a condicions inductores de l'apoptosi.

### **3.6- Estabilitat de l'expressió de les construccions pcDNA3 en l'hibridoma: ús de vectors amb IRES**

Després d'un cert període de manteniment de la resembra, les cèl·lules transfectades perden la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi, ja que l'expressió dels gen d'interès s'acaba silenciament [Hauser i Wagner 1997]. El plasmidi pcDNA3 es caracteritza per ser un vector convencional que conté un promotor per a la síntesi del marcador de selecció i un altre promotor per a l'obtenció de la proteïna d'interès. El fet de tenir dos promotors independents, fa que la cèl·lula que ha incorporat el vector deixi d'expressar, al llarg del temps, el gen que no li proporciona cap avantatge selectiu.

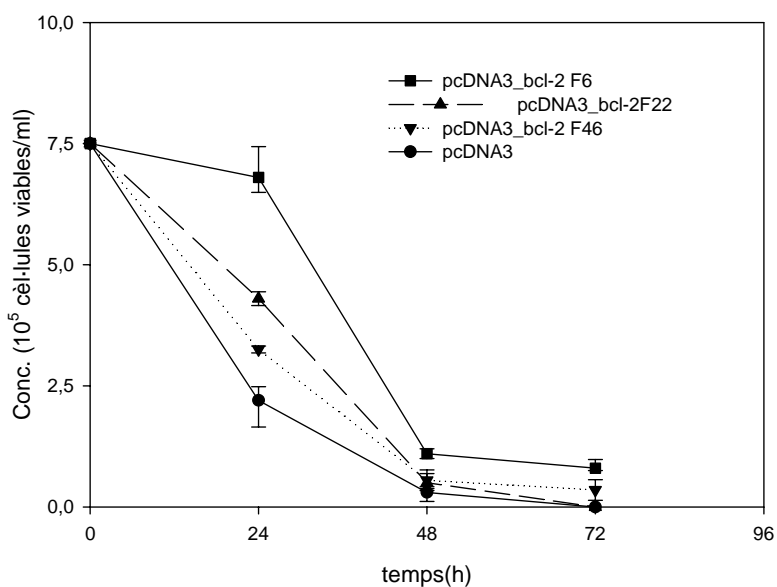
En aquest cas es va voler verificar si les cèl·lules transfectades amb les construccions pcDNA3\_*bhrf-1* i pcDNA3\_*bcl-2* deixaven d'expressar el gen antiapoptòtic ja que no li conferia cap avantatge selectiu. Per aquest motiu, al llarg de les resembres d'aquests cultius es va fer un seguiment de la viabilitat del cultiu quan aquests eren exposats de nou a condicions inductores de l'apoptosi.

A la Fig. 3.24 es mostra l'evolució del cultiu transfectat amb el gen *bhrf-1* al cap de 6, 22, 46 i 90 resembres després d'haver obtingut els clons. Es pot observar com al llarg del temps, els transfectants van perdent la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi i que el descens en el nombre de viables és més pronunciat al cap de 90 resembres, cosa que confirma la pèrdua de l'expressió del gen *bhrf-1*.



**Fig. 3.24-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf-1* en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS, 3 mg/ml de G418 sense glutamina al cap de 6, 22, 46 i 90 resembres després d'haver obtingut els transfectants.

A la Fig. 3.25 mostra l'evolució del cultiu que ha incorporat el gen *bcl-2* als 6, 22 i 90 resembres després d'haver obtingut els transfectants. Es pot observar com al llarg del temps, també els transfectants del gen *bcl-2* van perdent la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi i que el descens en el nombre de viables és més pronunciat al cap de 90 resembres, la qual cosa corrobora el silenciament del gen *bcl-2*.



**Fig. 3.25-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf-1* en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS, 3 mg/ml de G418 sense glutamina al cap de 6, 22 i 46 resembres després d'haver obtingut els clons.

La pèrdua d'expressió del gen d'interès fa que els esforços s'hagin de dirigir cap a la utilització de plasmidis que permetin l'expressió estable dels gens transfectats al llarg del temps. Per aquest motiu, és fonamental treballar amb plasmidis multicistrònics que garanteixin l'expressió simultània tant del marcador de selecció com del gen d'interès [Rees i col., 1996; Gurtu i col., 1996]. Al capítol 5 d'aquest treball es mostra els resultats obtinguts amb aquest tipus de vectors.

### **3.7- Efecte de l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques sobre la producció d'anticòs**

Un cop conegut l'efecte protector dels gens cel·lulars i vírics en el procés d'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5 es va voler veure quina influència tenia l'expressió d'aquestes proteïnes sobre la producció d'anticòs. Així doncs, es va realitzar un experiment amb les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_ *bhrf-1* que és la que ha donat millors resultats i amb les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3\_ *bcl-2*. Com a control es va utilitzar les cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3. Els diferents cultius es van fer créixer en flascons no agitat amb 10 ml de medi DMEM al 4% FCS i 3 mg/ml de G418. Es va agafar mostra a les 68 i 96 hores després de l'inici del cultiu per analitzar l'activitat de l'anticòs monoclonal mitjançant el test d'hemoaglutinació en placa (veure apartat 8.8). Al realitzar l'anàlisi, es va veure que en el mateix interval de temps, els tres cultius assajats hemoaglutinaven a la mateixa dilució, és a dir, a les 68 hores i a les 96 hores tots ells aglutinaven a la dilució 1/32x70/100 i 1/64 respectivament, mostrant que els diferents cultius presentaven una activitat d'anticòs monoclonal similar. Tenint en compte el nombre de cèl·lules vives a les 68 i 96 hores, i la quantitat d'anticòs monoclonal obtinguda fent una estimació aproximada entre l'activitat i la quantitat (Taula 3.6), es va observar que a les 96 hores, el cultiu control presentava una producció específica més elevada, concretament de 3.1 respecte 2.7 i 2.4 dels cultius transfectats amb els gens *bcl-2* i *bhrf-1* respectivament (Taula 3.6). Tot i així, aquesta lleugera diferència podria explicar-se pel fet que a les 96 hores les cèl·lules d'hibridoma pateixen apoptosi i es comencen a llsar, alliberant tot el seu contingut a l'exterior, mentre que les cèl·lules que incorporen els gens antiapoptòtics romanen

intactes, motiu pel qual s'observa més producció específica en el cultiu control [Mohan i Lyddiatt, 1991].

**Taula 3.6-** Concentració d'anticòs monoclonal, concentració cel·lular, i producció específica d'anticòs per cèl·lula (Pesp.) a les 68 i 96 hores de cultiu. Per calcular la quantitat d'anticòs monoclonal es suposa que una dilució 1/64 equival a 30 µg/ml d'anticòs monoclonal i que per tant, una dilució 1/32x70/100 equival a 24 µg/ml d'anticòs monoclonal.

Cultius	Temps (hores)					
	68 hores			96 hores		
	Conc. MAbs (µg/ml)	Conc. Cel. (cèls/ml)	Pesp. (µg/cèls)	Conc. MAbs (µg/ml)	Conc. Cel. (cèls/ml)	Pesp. (µg/Cèls)
Cèl·lules transfectades <i>bcl-2</i>	24	16.5	1.5	30	11.1	2.7
Cèl·lules transfectades <i>bhrf-1</i>	24	15.4	1.6	30	12.4	2.4
Cèl·lules transfectades pcDNA3	24	14.5	1.7	30	9.6	3.1

### 3.8- Valoració final

A partir dels resultats obtinguts s'ha vist que l'aplicació d'una estratègia d'inhibició genètica dirigida a un punt previ a la inducció de la via de les Caspases permet retardar la mort dels cultius. En cultius en discontinu s'ha pogut comprovar que, en condicions d'exhauriment de glutamina, les cèl·lules d'hibridoma que expressen els gens cel·lulars i vírics de la família Bcl-2 pateixen un descens en el nombre de viables més lent que les cèl·lules d'hibridoma no modificades genèticament, evidenciant el clar efecte protector d'aquests gens. Tot i així, si s'observen les dades obtingudes amb els diferents gens antiapoptòtics, els gens vírics *bhrf-1* i *ksbcl-2* han mostrat ser més efectius que els gens cel·lulars *bcl-2* i *bcl-xL* ja que permeten recuperar la viabilitat de cultius que han estat sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant 48 hores, mentre que els gens cel·lulars només ho permeten fins a les 24 hores. Les característiques que presenten els gens vírics *bhrf-1* i *ksbcl-2* respecte els gens cel·lulars *bcl-2* i *bcl-xL* podrien explicar aquest fet. Per una banda els gens cel·lulars poden arribar a exercir una funció proapoptòtica quan són proteolitzats per les Caspases, mentre que els gens vírics no poden ser tallats per les Caspases ni dur a terme aquesta funció proapoptòtica, i per l'altra, a diferència dels gens cel·lulars,

*bhrf-1* i *ksbcl-2* no poden heterodimeritzar amb les proteïnes inductores de l'apoptosi Bax o Bak, suggerint que poden escapar a la regulació negativa d'aquestes proteïnes. Si es compara els experiments de viabilitat en condicions d'exhauriment de glutamina, la fragmentació del DNA i el nombre de cèl·lules annexina positives del cultiu d'hibridomes transfectats amb el gen *bhrf-1* i del cultiu d'hibridomes transfectats amb el gen *ksbcl-2* també es pot veure que la proteïna BHRF-1 és la millor inhibidora. En altres estudis s'ha vist que BHRF-1, a diferència de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i KSBcl-2, no té el solc d'unió hidrofòbic responsable de la interacció entre el membre antiapoptòtic i el domini BH3 de les proteïnes proapoptòtiques, suggerint que pot fugir de la regulació negativa de les proteïnes proapoptòtiques [Huang i col., 2003]. Molt probablement, l'absència del solc hidrofòbic de la proteïna BHRF-1 explicaria el resultat tan positiu obtingut amb aquesta proteïna.

En aquest treball també s'ha pogut constatar que l'actuació genètica de la proteïna P35 sobre les Caspases 3, 6 i 7 no ha permès inhibir l'apoptosi. Molt probablement en aquest punt d'actuació es necessitaria l'acció conjunta de diferents inhibidors, ja que la proteïna P35 no evitaria l'alliberament del Citocrom c del mitocondri ni l'activació de la Caspasa 9, i segurament, que aquesta Caspasa transmet el senyal apoptòtic a diferents Caspases efectores que executaran el programa apoptòtic.

A nivell de bioreactor, l'ús d'hibridomes modificats genèticament amb gens antiapoptòtics representa una millora important en el procés d'obtenció d'anticossos, ja que es garanteix la supervivència de les cèl·lules i en conseqüència, es poden assolir un nivells de producció més eficients del producte d'interès. Tot i així, quan es treballa en cultius en discontinu, les cèl·lules sempre acaben engegant el procés d'apoptosi ja que, inevitablement al llarg del temps, en el medi de cultiu s'esgotaran determinats nutrients essencials per a la cèl·lula o s'acumularan metabolits tòxics. Per aquest motiu, és fonamental veure el comportament dels hibridomes modificats genèticament en cultius en continu, i concretament, en cultius en perfusió, ja que són sistemes en continu amb retenció cel·lular que garanteixen la presència constant dels diferents nutrients essencials per a la cèl·lula i aconsegueixen eliminar els diferents subproductes cel·lulars que podrien esdevenir tòxics, permetent allargar la durada del cultiu i obtenir productivitats molt més grans que les obtingudes en cultius en

discontinuu. De totes maneres, l'elevada densitat cel·lular assolida en aquests tipus de cultiu, provoca la limitació de nutrients i oxigen que conduiran a la mort per apoptosi de les cèl·lules, per tant, és important veure l'efecte dels gens antiapoptòtics en aquest tipus de sistema (veure capítol 6).

A més a més, quan es treballa en processos de cultiu llargs, es necessari que les modificacions genètiques realitzades perdurin al llarg del temps, cosa que no succeeix amb l'ús de vectors convencionals, tipus pcDNA3. Els experiments d'estabilitat temporal de les construccions pcDNA3 han posat de manifest que al llarg de les resembres les cèl·lules perden la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi. Per solventar aquest problema una tentativa ha estat l'ús de vectors bicistrònics, els resultats dels quals estan explicats al capítol 5 d'aquest treball.

Un entrebanc important que ha sorgit al llarg d'aquest treball, és la baixa l'eficiència transfecció que presenta l'hibridoma KB26.5. Per aquest motiu, per millorar la transferència del material genètic a les cèl·lules d'hibridoma s'ha provat diferents mètodes de transfecció, els resultats dels quals es descriuen i es discuteixen en el capítol següent (capítol 4).



# CAPÍTOL 4

---

## 4-ESTRATÈGIES DE TRANSFECCIÓ DE L'HIBRIDOMA KB26.5

### 4.1- Mètodes de transferència gènica

La introducció de material genètic a les cèl·lules animals requereix de sistemes de transferència eficients ja que, en general, només una fracció de la població cel·lular incorpora el DNA transferit. Els principals sistemes de transferència gènica es poden classificar en dos grups, els mètodes fisicoquímics i els vectors vírics [Li i Ma, 2001b; Lundstrom, 2003; Rozalén i col., 2003; Nguyen i Ferry, 2004; Ohlfest i col., 2005; Verma i Weitzman, 2005; Kaneda i Tabata, 2006]. Els mètodes fisicoquímics (Taula 4.1) van ser els primers en desenvolupar-se i en aquests mètodes el DNA exogen està inserit en un plasmidi. Aquests sistemes presenten un seguit d'avantatges respecte els vectors vírics: són fàcils de preparar, no tenen limitacions pel que fa a la mida del fragment de DNA a transferir i són poc tòxics. No obstant, en general presenten una eficiència de transfecció menor a la dels vectors vírics.

En la transferència mediada per virus es substitueixen determinats gens indispensables per a la replicació del virus pel gen d'interès, de manera que el virus conservi la capacitat infectiva però sigui incapaç de replicar-se. La mida del gen a transferir dependrà de la mida del virus i dels gens que puguin ser substituïts. Òbviament, aquest fet constitueix un factor limitant a l'hora d'inserir les seqüències gèniques d'interès. Tot i així, actualment, els vectors vírics (Taula 4.2) són la manera més efectiva de transferir material genètic ja que posseeixen una elevada eficiència de transducció que en alguns casos pot arribar a prop del 100% [Rossi i col., 2003; Pellinen i col., 2004; Girard i col., 2005, Ghosh i col., 2006; Yanez-munoz i col., 2006]. Una altra característica que fa especialment atractiu l'ús d'aquests vectors, concretament en el cas dels retrovirus, és el fet que permeten una expressió sostinguda de la proteïna d'interès al llarg del temps ja que el gen exogen s'integra establement en el genoma de la cèl·lula hoste [Ray i col., 1998; Puppy i col., 2004; Sugiyama i col., 2005]. L'estabilització de l'expressió

del gen d'interès és fonamental ja que tal i com s'ha descrit en el capítol 3 d'aquest treball, l'expressió dels gens antiapoptòtics es perd al llarg de les diferents generacions cel·lulars. Aquesta pèrdua d'expressió és una qüestió important per resoldre i a la que es dedica una important atenció en aquesta memòria (veure Capítol 5).

**Taula 4.1-**Principals mètodes fisicoquímics de transferència gènica.

<b>Mètodes de transferència gènica</b>
<b>Físics:</b>
- Electroporació [Rols i col., 1992; Golzio i col., 2002] - Bombardeig de partícules [Yang i col., 1990; Williams i col., 1991; Li i Ma, 2001b] - Injecció directa de DNA nu [Wolff i col., 1990; Li i Huang, 2000b]
<b>Químics:</b>
- Precipitació amb fosfat càlcic/ DEAE-dextran [Al Moslih i Dubes, 1973; Kato i col., 1986, Chen i Okayama, 1987] - Sistemes lipídics (lipoplexes (Lípids + DNA)) [Felgner i col., 1987; Brisson i Huang, 1999, Duzgunes i col., 2003] - Polímers (Poliplexes (polímer catiónic+DNA), polímers com polilisina, polietilenamina (PEI), dendrímers...) [Pack i col., 2005; Putnam, 2006; Tiera i col., 2006] - Conjugats moleculars i proteïnes quimèriques recombinants* [Hart i col., 1995; Cristiano, 2002; Aris, 2003; Aris i Villaverde, 2004] - Precipitats DNA-adenovirus [Lee and Welsh, 1999]

\*Són una nova generació de vectors per transportar el DNA específicament a un tipus de cèl·lula diana i tenen diferents dominis funcionals conjugats químicament. Entre els més destacats es troba: 1) un lligand que dirigeix la transferència a una cèl·lula específica, 2) un domini d'unió a àcids nucleics, 3) un àcid nucleic portador del transgèn d'interès (plasmidi), 4) altres dominis que potencien la transferència gènica, com pot ser una seqüència de localització nuclear o un agent lític d'endosomes que propiciï l'alliberament del DNA al citoplasma cel·lular després de l'endocitosi.

**Taula 4.2-**Vectors vírics de transferència gènica.

<b>Característica del sistema de transferència</b>	<b>Adenovirus</b>	<b>Virus adenoassociats</b>	<b>Retrovirus</b>	<b>Herpesvirus</b>	<b>Alfavirus</b>
Mida màxima del gen transferit	30-35 Kb	4-4.5 Kb	7-8 Kb	40-50 Kb	5 Kb
Concentració (partícules víriques/ml)	10 <sup>11</sup> -10 <sup>12</sup>	10 <sup>11</sup> -10 <sup>12</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>
Localització intracel·lular del vector	Episomal	Episomal o en presència del gen <i>rep</i> integrat en el cromosoma 19 del genoma de l'hoste	Integrat en el genoma de l'hoste	Episomal de forma estable	Episomal
Expressió	Transitòria	Transitòria o estable	Estable	Transitòria	Transitòria

(Continuació Taula 4.2)

Característica del sistema de transferència	Adenovirus	Virus adenoassociats	Retrovirus	Herpesvirus	Alfavirus
Avantatges	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poden infectar cèl·lules en repòs i en divisió.</li> <li>- Títols elevats</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilitat integració específica en el genoma de l'hoste.</li> <li>- Infecten cèl·lules en repòs i en divisió</li> <li>- títols elevats</li> <li>- No són patògens en humans</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expressió estable després de la integració</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevada capacitat per transportar gens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infecten cèl·lules en repòs i en divisió</li> </ul>
Desavantatges	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibles vectors competents en replicació.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poca capacitat per transportar gens.</li> <li>- Pèrdua de la capacitat d'integració dirigida sense el gen <i>rep</i>.</li> <li>- Possibles vectors competents en replicació.</li> <li>- Infecten determinats tipus cel·lulars.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Només poden infectar cèl·lules en divisió (excepte els lentivirus).</li> <li>- Integració en el genoma a l'atzar.</li> <li>- Possibles vectors competents en replicació.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibles vectors competents en replicació.</li> <li>- Adequats per cèl·lules del sistema nerviós.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poca capacitat per transportar gens.</li> <li>- Possibles vectors competents en replicació.</li> </ul>

Taula modificada de Aris.A, 2003.

En aquest treball s'han provat diferents mètodes fisicoquímics (lipofecció, electroporació i coprecipitats adenovirus-DNA) i els virus adenoassociats com a vector víric. Per motius de seguretat es va descartar l'ús d'adenovirus, herpesvirus, alfavirus i retrovirus com a eines de transferència gènica ja que l'objectiu d'aquest treball és sobreexpressar gens antiapoptòtics o oncògens i, a diferència dels virus adenoassociats, aquests virus són responsables de malalties en humans. La creació d'un virus recombinant capaç d'infectar humans i transportador d'un oncogen seria massa perillós, tenint en compte que sempre existeix un cert risc de recombinació i formació de partícules competents en replicació. És per això, que la manipulació

d'aquests vectors s'ha de realitzar sempre en instal·lacions adequades als seus requeriments de seguretat i amb un procediment metodològic acurat per a la prevenció de possibles riscos relacionats amb la salut del personal investigador. En funció del grau de perillositat del microorganisme que es manipula en un laboratori es defineixen uns nivells de bioseguretat que cal assolir. Els nivells de bioseguretat (BL) fan referència als requisits de contenció que han de complir els laboratoris, els quals estan establerts pel Real Decret 664/1997. Segons el risc biològic s'estableixen 4 nivells de contenció (de mínima a màxima): BL1, BL2, BL3 i BL4. En el present cas per manipular adenovirus, herpesvirus, alfavirus i retrovirus modificats genèticament amb oncògens, el nivell de bioseguretat hauria de ser com a mínim de 3.

#### **4.2- Marcadors de transfecció i selecció**

En els primers experiments de transfecció de cèl·lules animals amb DNA viral, les cèl·lules transfectades podien ser reconegudes gràcies a la manifestació d'una nova activitat biològica adquirida com ara la producció de partícules virals. Actualment, com a marcadors de selecció d'aplicació general es pot utilitzar qualsevol gen que expressi una activitat detectable, com per exemple el gen que codifica per la GFP (*Green Fluorescent Protein*). L'ús d'aquest marcador de transfecció permet detectar la ubicació del DNA transferit i l'expressió específica en els diferents tipus cel·lulars. També, s'han desenvolupats marcadors de selecció que impedeixen el creixement de les cèl·lules del cultiu que no resulten transfectades. Alguns d'ells basen el seu mecanisme en la complementació de mutacions. Per exemple, existeixen algunes línies cel·lulars (CHO mutants) que no duen l'enzim dihidrofolat-reductasa (DHFR). L'enzim DHFR és el responsable de la síntesi del tetrahidrofolat, molècula que, a la vegada, és el substrat de molts compostos. Aquestes cèl·lules DHFR<sup>-</sup> només poden créixer en medis suplementats amb glicocola, timidina i purines. La transfecció d'aquestes cèl·lules mutants amb un DNA que contingui l'enzim DHFR originarà clons capaços de créixer en medis sense suplement [Xiong, i col., 2005].

Per altra banda, també s'han generat marcadors de transfecció capaços d'actuar sobre cèl·lules normals, no mutants, sempre que en el medi de cultiu hi hagi algun compost

que aturi el creixement cel·lular, com és el cas del marcador *neo<sup>R</sup>*. En aquest cas, només les cèl·lules que incorporin aquest marcador podran créixer en un medi amb G418, un antibiòtic que bloqueja la síntesi de proteïnes.

En aquesta treball, per avaluar l'eficiència dels diferents mètodes de transfecció assajats, es va utilitzar com a marcador de selecció la proteïna GFP i EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescence protein*).

### 4.3- Estratègies de transfecció de l'hibridoma KB26.5

L'eficiència de la transferència gènica, l'expressió i l'estabilitat d'un gen no només depèn del sistema de transfecció escollit sinó també de la línia cel·lular emprada. En general, només una fracció de la població cel·lular incorpora el DNA exogen i el percentatge de cèl·lules modificades varia en funció de l'estat del cultiu. Per tant, és necessari millorar el màxim el rendiment de la transferència gènica.

#### 4.3.1- Vectors vírics: virus adenoassociats

Tal i com s'ha comentat anteriorment, els vectors vírics constitueixen els sistemes més eficients per transferir seqüències de DNA d'interès, ja que posseeixen una elevada eficiència de transducció que en alguns casos pot arribar al 100%. Tot i així, existeixen importants limitacions pel que fa l'ús d'aquests vectors, sobretot per qüestions de seguretat, ja que sempre existeix la possibilitat que virus deficients en replicació pateixin processos de recombinació amb virus salvatges reconstituïnt-se la seva capacitat de proliferar. És per això que la manipulació d'aquests vectors s'ha de realitzar sempre en instal·lacions específiques de seguretat.

Els virus adenoassociats (AAV) presenten unes característiques determinades que els fan especialment adequats com a vectors de transferència gènica (veure Taula 4.2: avantatges). Donat que no se'ls ha associat a cap patologia en humans, podrien ser una bona alternativa per transferir gens antiapoptòtics.

Una de les limitacions d'aquests virus és que infecten determinats tipus cel·lulars. Per tant, és essencial comprovar si infecten l'hibridoma KB26.5.

Per aquest motiu, es van infectar cultius de cèl·lules d'hibridoma amb el virus AAV-CMV-GFP a diferents MOI (1, 10 i 50) (veure apartat 8.16). Aquest virus adenoassociat va ser cedit pel CBATEG (Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)) i du com a marcador la proteïna GFP. A l'observar al microscopi confocal les mostres de cèl·lules d'hibridoma infectades no es va veure cap cèl·lula que emetés fluorescència. Per tant, aquest tipus de virus no infectava l'hibridoma KB26.5.

Com a conseqüència del resultat obtingut, es va realitzar el mateix experiment amb un altre tipus de virus adenoassociat, el AAV2-CMV-(nls)LacZ (veure apartat 8.16). Aquest virus també fou preparat pel CBATEG, però a diferència de l'anterior és un altre serotip i du com a marcador el gen *lacZ* que codifica per la proteïna  $\beta$ -galactosidasa. Per tant, les cèl·lules que expressi l'enzim  $\beta$ -galactosidasa podran ser detectades a través de l'assaig  $\beta$ -galactosidasa (apartat 8.16.1). En aquest cas, el resultat obtingut també va ser negatiu. Aquest virus adenoassociat tampoc infectava l'hibridoma KB 26.5.

Com que l'hibridoma KB26.5 no disposava dels receptors específics per als virus adenoassociats, es va descartar l'ús d'aquests virus per transferir gens exògens, i es van provar mètodes de transfecció fisicoquímics, els resultats del quals es detallen a continuació.

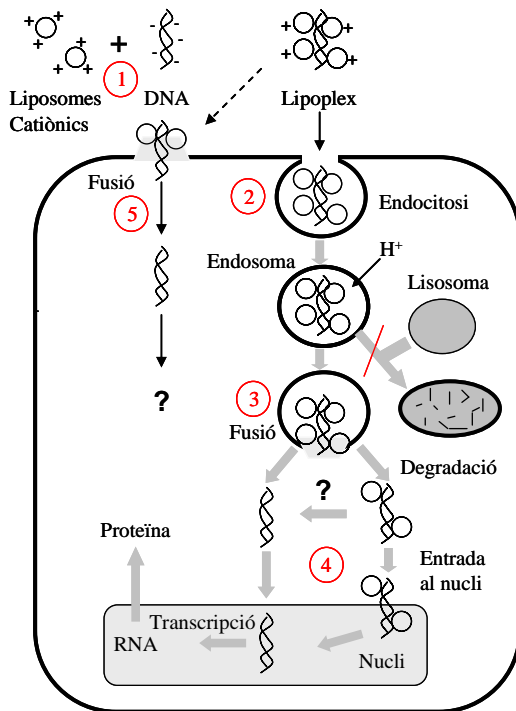
#### 4.3.2-Lipofecció

La lipofecció és un mètode de transfecció que es basa en la formació de complexos entre els liposomes catiónics i el DNA. Aquests complexos anomenats lipoplexes [Felgner i col., 1997] tenen una elevada afinitat per la membrana plasmàtica, protegeixen el DNA davant de forces físiques i de l'acció de degradació enzimàtica i permeten l'entrada del DNA al citosol.

La formació d'aquests lipoplexes es dona a través d'interaccions electrostàtiques entre la superfície carregada positivament del liposoma amb els fosfats carregats negativament de la molècula de DNA [Felgner i col., 1987; Gershon i col., 1993; Smith i col., 1993; Almofti i col., 2003]. La càrrega neta resultant d'aquesta unió ha de ser lleugerament positiva de manera que propiciï la interacció amb les membranes

cel·lulars carregades negativament. Es creu que una vegada aquest complex interacciona amb les membranes plasmàtiques, el lipoplex és endocitat i posteriorment, encapsulat en vesícules intracel·lulars que duren el DNA al nucli on s'expressarà [Coonrod i Li, 1997; Martin i col., 2005; De Laporte i col., 2006; Khalil i col., 2006]. Tot i així, hi ha alguns estudis que indiquen que el complex pot penetrar directament la membrana plasmàtica [Li i Huang, 2000b] (Fig 4.1).

Es creu que la incorporació de lípids fusogènics en la fórmula de liposomes com ara el lípid neutre DOPE (*Dioleoyl phosphatidylethanolamine*), estimularia l'alliberament del DNA de l'endosoma [Farhood i col., 1995]. S'ha descrit que en ambients àcids, com el dels endosomes, aquest lípid pateix un canvi conformacional que desestabilitzaria la membrana endosomal. També, s'ha especulat que alguns lípids catiónics com el DC-colesterol poden provocar l'alliberament del DNA quan assoleixen un estat totalment carregat en l'ambient àcidic que hi ha en l'endosoma [Li i Ma, 2001b].



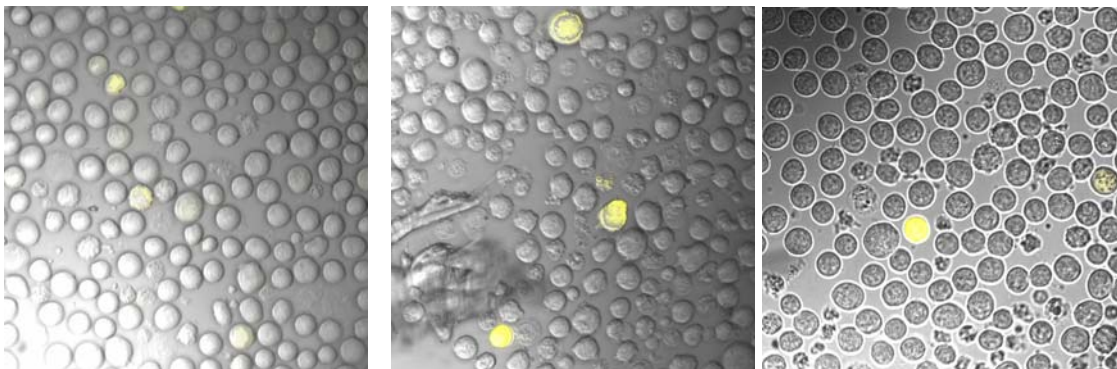
**Fig. 4.1-** Representació de les diferents etapes de la lipofecció: 1- Condensació del DNA mitjançant la formació del lipoplex (DNA+liposoma), 2- Invaginació de la membrana cel·lular i consegüent formació d'una vesícula intracel·lular anomenada endosoma que conté el complex, 3- Alliberament del DNA de l'endosoma per evitar la seva degradació en els lisosomes. El pH àcid de l'interior de l'endosoma (pH:5-6) provoca la fusió entre la membrana del liposoma i la de l'endosoma. 4- Travessament de la membrana nuclear i posterior expressió del gen d'interès, 5- Via alternativa en la qual el lipoplex travessa directament la bicapa lipídica per fusió [Modificat de Khalil i col., 2006].

En l'actualitat existeixen un gran nombre de lípids sintètics que s'usen en la lipofecció, entre ells hi ha el DMRIE-C (Life technologies) que s'ha utilitzat en aquest treball (veure apartat 8.15.1). El reactiu de transfecció DMRIE-C està compost per lípids catiónics i neutres que formaran els liposomes, els quals s'uniran al DNA a transferir.



Per tal d'obtenir elevades eficiències de transfecció cal optimitzar la quantitat de reactiu DMRIE-C, la quantitat de DNA plasmídic i el temps d'incubació del complex format pel reactiu DMRIE-C amb el DNA plasmídic. La proporció entre els dos components del complex és crítica ja que afecta la càrrega neta del complex i com a conseqüència, l'eficiència de transfecció.

Per dur a terme l'optimització d'aquests paràmetres, es van transfectar les cèl·lules KB26.5 amb el plasmidi pEYFP-c1 (veure apartat 8.9.3 i 8.15.1). Aquest plasmidi du el gen que codifica per la proteïna EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescence protein*) que al ser excitada a una longitud d'ona de 513 nm emet fluorescència groga (a  $\lambda=527$  nm). Per tant, aquelles cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi podran ser detectades per microscòpia de fluorescència o confocal (Fig. 4.2). L'eficiència de transfecció obtinguda era de l'ordre  $2.9 \% \pm 0.85$ . A la Taula 4.3 es mostren les condicions òptimes per dur a terme les transfeccions.



**Fig. 4.2-** Imatges obtingudes per microscòpia confocal (LEICA TCS 4D) després de transfectar un cultiu d'hibridomes amb el reactiu DMRIE-C. Les cèl·lules grogues són les que expressen la proteïna EYFP. També es veuen cèl·lules danyades i cèl·lules mortes.

**Taula 4.3-** Paràmetres optimitzats en el procés de transfecció amb el vector pEYFP-c1.

Paràmetre	Rang	Valor òptim
Reactiu DMRIE-C	2-12 $\mu$ l	8 $\mu$ l
DNA plasmídic	1-4 $\mu$ g	4 $\mu$ g
Temps DMRIE-C / DNA	15-45 min	45 min

Malgrat optimitzar la relació entre la quantitat de DNA i el reactiu DMRIE-C, l'eficiència de transfecció obtinguda era molt baixa. En el procés de lipofecció, el DNA per tal que pugui ser expressat en el nucli ha de superar dues barreres, la membrana citoplasmàtica i la translocació del DNA plasmídic des dels endosomes al citoplasma. Aquest recorregut és força complex (veure anterior Fig. 4.1), i segurament, poques

molècules de DNA aconseguir atènyer el nucli, motiu pel qual hi ha molt poques cèl·lules que expressin la EYFP. Davant la impossibilitat d'aconseguir un elevat nivell de transferència gènica amb la lipofecció, es va decidir provar un mètode físic basat en l'aplicació de pulsos elèctrics, l'electroporació.

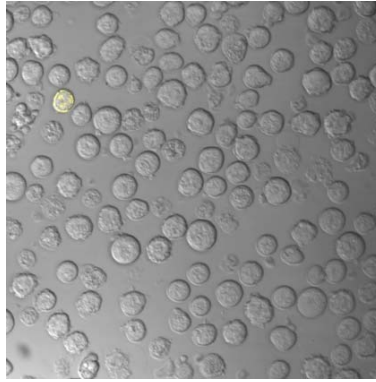
#### 4.3.3- Electroporació

L'electroporació és una tècnica que es basa en l'aplicació d'un camp elèctric a les cèl·lules durant un període curt de temps per permeabilitzar la membrana plasmàtica i permetre la introducció del DNA [Andreason i Evans, 1988; Chang i Reese, 1990; Gehl, 2003]. La permeabilització dels fosfolípids depèn bàsicament del nombre, la intensitat i la duració dels pulsos elèctrics [Johnson-Saliba i Jans, 2001]. S'ha demostrat que la presència del plasmidi en l'ambient cel·lular en el moment de l'aplicació dels pulsos elèctrics és crítica en la transferència gènica. Aquesta tècnica és fàcil i permet la introducció de plasmidis sense limitació pel que fa a la mida del DNA. Tot i així, el principal inconvenient de l'electroporació és que és un mètode agressiu per a cèl·lules ja que moltes d'elles no poden suportar el xoc elèctric. Per tant, és fonamental optimitzar el procés en funció del camp elèctric utilitzat i la quantitat de DNA emprada per intentar buscar el millor equilibri entre les condicions que assegurin l'entrada del DNA a l'interior de les cèl·lules i les que mantinguin el nombre de cèl·lules viables.

Per optimitzar el procés d'electroporació es van provar diferents quantitats de DNA (pEYFP-c1), diferents voltatges i diferent nombre de pulsos (Taula 4.4) (veure apartat 8.15.2). L'eficiència de transfecció obtinguda en el millor dels casos era baixa de l'ordre 0.85 %  $\pm$  0.071 i la viabilitat cel·lular després d'electroporar era d'un 50% de cèl·lules vives (Fig 4.3).

**Taula 4.4-** Paràmetres optimitzats en el procés d'electroporació amb pEYFP-c1.

Paràmetre	Rang	Valor òptim
DNA plasmídic	5-20 $\mu$ g	5 $\mu$ g
Nombre de pulsos	1-3	2
Voltatge	100-300V	200V



**Fig. 4.3-** Imatge obtinguda per microscòpia confocal (LEICA TCS 4D) després d'electroporar un cultiu d'hibridomes amb el vector pEYFP-c1. Les cèl·lules grogues són les que expressen la proteïna EYFP. També s'observen cèl·lules danyades i cèl·lules mortes.

En aquest cas l'eficiència de transfecció obtinguda era encara més baixa que la de la lipofecció. Segurament, després de la despolarització de la membrana plasmàtica, moltes cèl·lules sofreixen danys irreparables i moren, motiu pel qual s'observava una reducció del 50% de la viabilitat cel·lular. Pel que fa a les cèl·lules vives restants en el cultiu, menys del 1% de les cèl·lules havien incorporat el plasmidi.

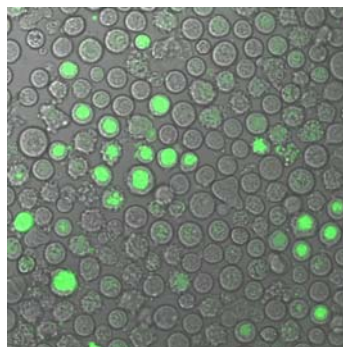
Donada la baixa eficiència de transferència gènica dels dos mètodes anteriors, es va decidir provar un sistema de transfecció que combina el mètode clàssic del fosfat càlcic amb la capacitat natural dels adenovirus per infectar un gran ventall de cèl·lules animals [Lee i Welsh, 1999].

#### 4.3.4- Coprecipitats Adenovirus-DNA

El mètode del fosfat càlcic va ser un dels primers mètodes utilitzats per transferir el DNA a l'interior de les cèl·lules. Aquesta tècnica es basa en l'obtenció de precipitats entre el clorur de calci i el DNA en una solució salina de fosfats. En aquesta solució el clorur de calci i el DNA formen uns agregats que són endocitats per la cèl·lula. Aparentment l'agregat amb calci protegeix el DNA de la degradació per les nucleases cel·lulars. El principal desavantatge d'aquest mètode és la baixa eficiència de transfecció observada en moltes línies cel·lulars. L'any 1999, els treballs de Lee i Welsh van mostrar que la incorporació d'adenovirus en aquests precipitats incrementava l'expressió del gen d'interès, i per tant, l'eficiència de transfecció. Es creu que les proteïnes de la càpsida de l'adenovirus faciliten l'alliberament del DNA plasmídic de l'endosoma i la seva entrada al nucli [Greber i col., 1993; Greber i col., 1994].

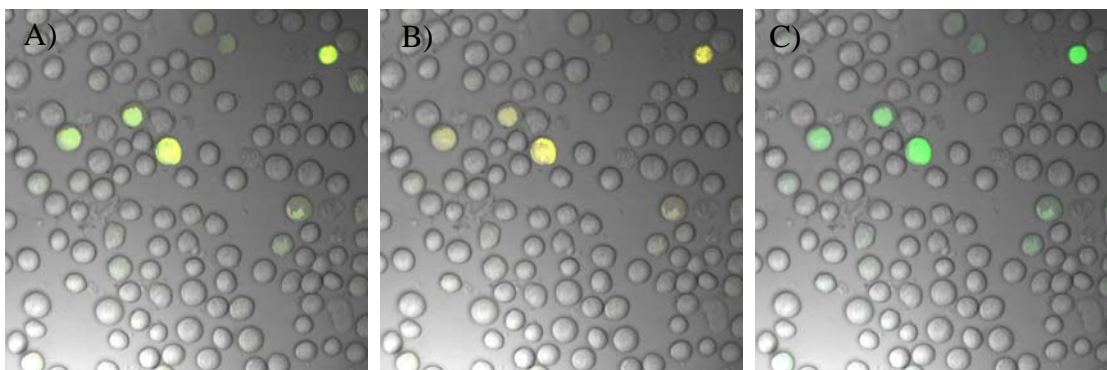
Per tal de comprovar l'eficàcia d'aquest sistema de transfecció en l'hibridoma KB 26.5, es va utilitzar el plasmidi pEYFP-c1 com a DNA exogen i l'adenovirus recombinant Ad2-CMV-GFP. Aquest adenovirus va ser preparat pel CBATEG (UAB) i du com a marcador la proteïna GFP que al ser excitada a una longitud d'ona de 488 nm emet fluorescència verda (a  $\lambda=507$  nm). Per tant, aquelles cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi i/o el virus podran ser detectades per microscòpia de fluorescència o confocal.

El procediment metodològic emprat per a la formació i transfecció dels precipitats pEFYP-c1:CaPi:Ad2-CMV-GFP està descrit en l'apartat 8.15.3 del capítol de materials i mètodes. Paral·lelament, per comprovar la capacitat d'infecció de l'adenovirus Ad2-CMV-GFP es va infectar un cultiu d'hibridomes (Fig. 4.4). L'eficiència de transducció obtinguda en aquest cas era d'aproximadament 60-70%. Aquest resultat corrobora el fet que els adenovirus són una bona eina per introduir una seqüència de DNA desitjada a la cèl·lula. L'inconvenient més gran que presenta l'adenovirus rau en la complicació del seu disseny i construcció. Les estratègies de disseny per a la formació d'adenovirus recombinants consisteixen en eliminar i substituir fragments específics del genoma per crear partícules víriques capaces d'infectar però no de replicar-se, aspecte fonamental per ser utilitzats per transferir material genètic. Normalment, s'elimina la regió E1 de l'adenovirus que codifica per les proteïnes responsables de la replicació del virus i es substitueix pel gen d'interès [Graham i Prevec , 1995; Davis i col., 2001]. La creació d'adenovirus que incorporin en el seu genoma gens antiapoptòtics (o oncògens) resulta una opció molt atractiva, però requereix d'una infraestructura específica de la que no es disposa en el laboratori on s'ha realitzat aquest treball.



**Fig. 4.4-** Imatge obtinguda per microscòpia confocal (LEICA TCS 4D) després d'infectar un cultiu d'hibridomes amb l'adenovirus Ad2-CMV-GFP a una MOI (Multiplicity of infection): 5. Es pot observar diferents nivells d'expressió de la proteïna GFP.

A la Fig. 4.5 es mostren diferents imatges obtingudes a l'irradiar amb llum ultraviolada les cèl·lules transfectades amb els precipitats pEYFP-c1:CaPi:Ad2-CMV-GFP. Com es pot veure, totes les cèl·lules que expressen la proteïna GFP del virus també expressen la proteïna EYFP. Aquest resultat va fer pensar que ambdues proteïnes s'expressaven en cadascuna de les cèl·lules transfectades i que, per tant, l'adenovirus augmentava l'eficiència de transfecció, tot i que el mecanisme pel qual aquest fet succeeix encara no està clar. L'eficiència de transfecció obtinguda amb els precipitats pEYFP-c1:CaPi:Ad2-CMV-GFP era de l'ordre  $8.0 \% \pm 1.41$ .



**Fig. 4.5-** Imatges obtingudes per microscòpia confocal (LEICA TCS 4D) després de transfectar un cultiu d'hibridomes amb els precipitats pEYFP-c1:CaPi:Ad2-CMV-GFP. A) Cèl·lules que expressen la EYFP i la GFP B) Cèl·lules que expressen la EYFP C) Cèl·lules que expressen la GFP.

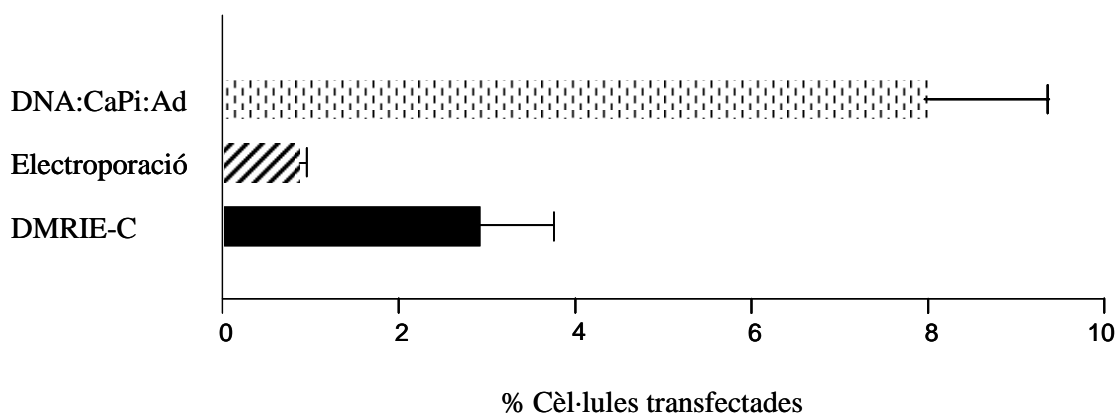
També existeixen altres estratègies de transfecció similars a la formació de coprecipitats adenovirus-DNA, en les quals els adenovirus estan units covalentment o mitjançant interaccions electrostàtiques a complexos DNA:liposoma [Cotten i col., 1992; Curiel i col., 1992; Wagner, 1992; Yoshimura i col. 1993, Baker i col., 1997; Meunier-Durmort i col., 1997; Dunphy i col., 1999]. Però, en el present cas, l'avantatge d'usar el fosfat calci respecte els liposomes és que en l'interior àcid de l'endosoma es dissocia més ràpidament el complex DNA:CaPi que no pas el complex DNA:Liposoma [Lee i Welsh, 1999]. Aquest motiu també podria explicar perquè la lipofecció no va funcionar tan bé, ja que com s'ha descrit en altres treballs quan el DNA està unit al liposoma, no es transcriu ni es tradueix [Zabner i col., 1995; Xu i Szoka, 1996].

A més, aquest sistema en comparació a l'electroporació no és agressiu ni produeixen danys irreparables a les cèl·lules. Per tant, tot i que no s'assoleixi una eficiència de transfecció molt elevada, soluciona el problema de la transfecció de l'hibridoma KB26.5.

#### 4.4- Valoració final

A partir dels resultats anteriors s'ha vist que la transfecció pot arribar a ser un procés complicat i poc eficient, i que independentment del mètode utilitzat, hi ha línies cel·lulars que es resisteixen a ser transfectades, com és el cas de l'hibridoma KB26.5. El factor més determinant en l'eficàcia de transfecció és, se'ns dubte, el tipus cel·lular utilitzat, el qual pot influir molt en el rendiment del procés de transfecció. Normalment, un mètode de transfecció que funciona molt bé sobre un tipus cel·lular pot fer-ho molt malament sobre un altre, la qual cosa obliga a ajustar acuradament les condicions del mètode per a cada tipus cel·lular. Malgrat optimitzar els paràmetres de transfecció dels mètodes de lipofecció i electroporació, les eficiències de transfecció assolides en aquests sistemes han estat molt baixes, de l'ordre d'un 2.9% i 0.85% respectivament, mostrant que l'hibridoma és una línia cel·lular molt difícil de transfectar (Fig. 4.6). Tot i així, la incorporació d'adenovirus al mètode clàssic del fosfat càlcic (coprecipitats adenovirus-DNA) ha permès obtenir una eficiència de transfecció del 8%, resultat molt positiu sobretot quan es tracta d'una línia cel·lular tan difícil de transfectar (Fig. 4.6).

Per aquest motiu, al llarg d'aquest treball l'estratègia de transfecció emprada va ser la de la formació dels coprecipitats adenovirus-DNA.



**Fig. 4.6-** Percentatge de cèl·lules transfectades per lipofecció, electroporació i formació de precipitats DNA:CaPi:Ad. Per quantificar les cèl·lules transfectades es va realitzar un recompte de diferents camps de cada mostra per microscòpia confocal.

# CAPÍTOL 5

---

## 5-ESTABILITAT DE L'EXPRESSIÓ EN L'HIBRIDOMA KB26.5

### 5.1- Ús de vectors amb IRES

La introducció i l'expressió de gens en les cèl·lules animals és sovint un procés difícil i poc eficient, ja que moltes línies cel·lulars presenten una baixa eficiència de transfecció així com una pèrdua decreixent en el nivell d'expressió del gen d'interès al llarg de les resembres (veure apartat 3.6 capítol 3).

Els mètodes estàndards usats per inserir gens en una cèl·lula animal es basen en transfectar les línies cel·lulars amb vectors que contenen un promotor per a la síntesi del marcador de selecció i un altre promotor per a l'obtenció de la proteïna d'interès (Fig. 5.1A). El fet de tenir dos promotors independents fa que aquelles cèl·lules que deixin d'expressar el gen inserit i només expressin el marcador de selecció tinguin un avantatge selectiu respecte la resta de la població que sí l'expressa. Per aquest motiu, es pot arribar a observar en les cèl·lules animals una pèrdua d'expressió del gen d'interès [Hauser i Wagner, 1997].

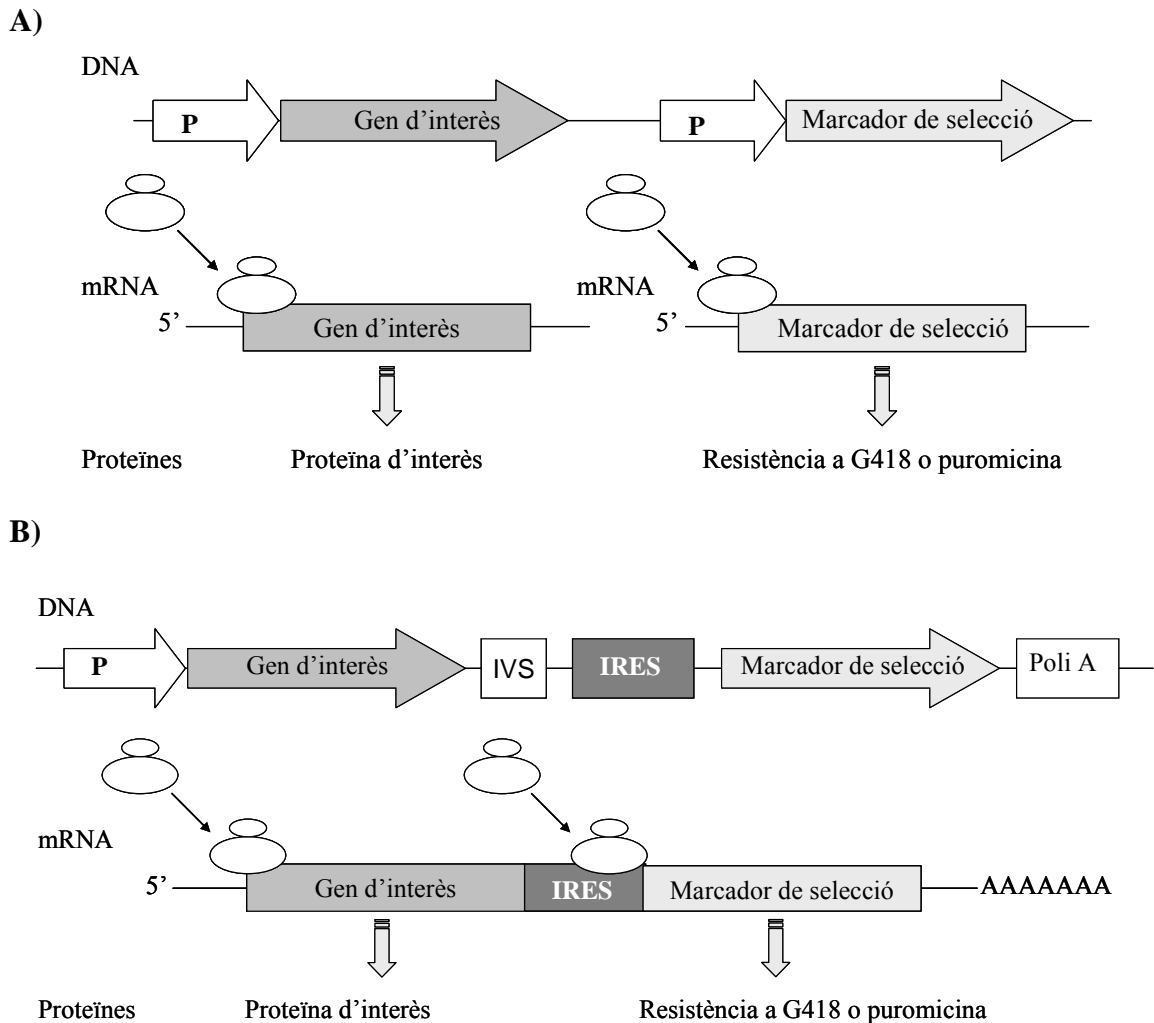
Per evitar aquesta pèrdua d'expressió existeixen uns vectors amb IRES (*Internal Ribosomal Entry Sites*) que es caracteritzen per generar RNAs missatgers bicistrònics. Aquests RNAs missatgers contenen un gen que confereix resistència a un antibiòtic i el gen d'interès separats per una seqüència IRES, la qual permet la traducció simultània del marcador de selecció i del gen d'interès (Fig. 5.1B) [Rees i col., 1996]. D'aquesta manera, s'assegura que la cèl·lula que sobrevisqui en el medi de selecció sempre expressi de manera inequívoca el gen d'interès, la qual cosa no succeeix amb l'ús dels vectors convencionals.

A més, la utilització d'aquests vectors bicistrònics elimina la necessitat de rastrejar un gran nombre de colònies per buscar el clon funcional, tasca sovint molt laboriosa i



que consumeix molt de temps, ja que en aquest cas, tot els clons obtinguts expressen el gen d'interès [Gurtu i col., 1996].

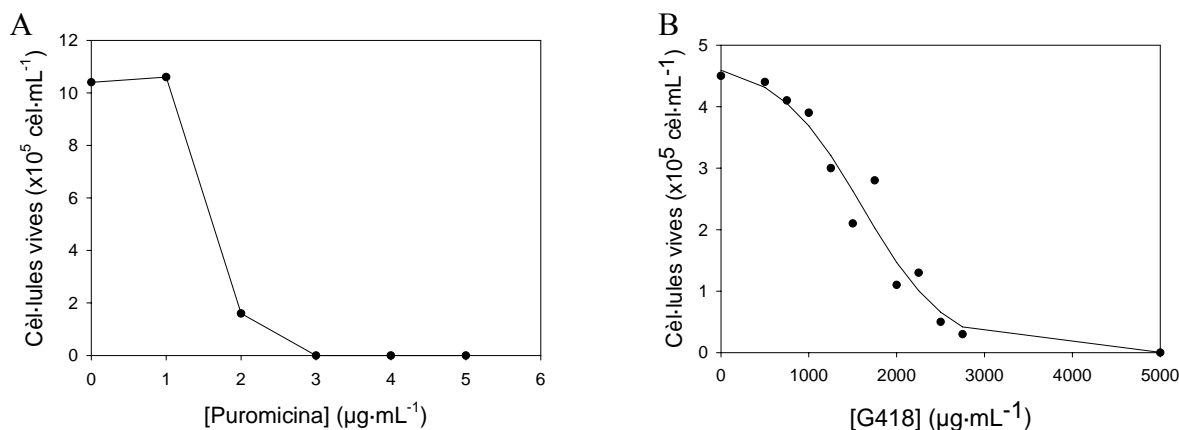
Per tant, es proposa aquest sistema per a la creació de línies cel·lulars que expressin establement els gens antiapoptòtics al llarg del temps.



**Fig. 5.1-** Diagrama esquemàtic del procés de traducció d'un vector convencional tipus pcDNA3 (A) i d'un vector bicistrònic (B). L'IRES permet la traducció simultània de la proteïna d'interès i del marcador de selecció a partir del mateix mRNA.

Per establir l'expressió dels gens antiapoptòtics en l'hibridoma KB26.5 es van emprar els vectors bicistrònics pIRESneo (Clontech) i el pIRESpuro2 (Clontech) que duen com a marcador de selecció la resistència a la G418 i a la puromicina respectivament. Per tant, en teoria, aquelles cèl·lules que hagin incorporat aquests plasmidis seran resistents a la G418 i a la puromicina. La puromicina, a diferència de la G418, és un antibiòtic d'efecte ràpid i accelera molt l'obtenció de transfectants ja que les cèl·lules que no han incorporat el plasmidi es moren en un interval molt curt

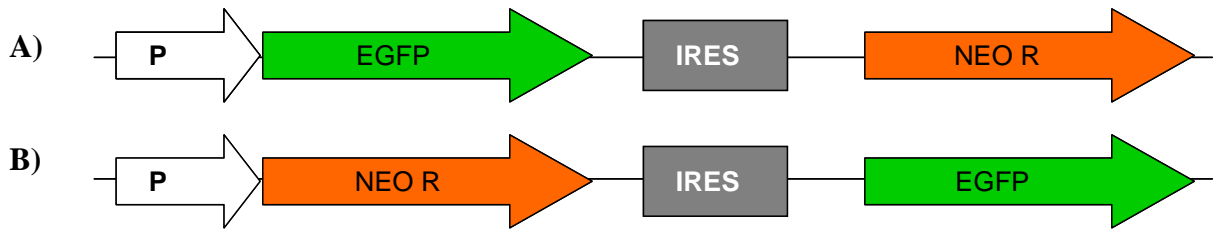
de temps (2-3 dies respecte les 2-3 setmanes necessàries quan es treballa amb l'antibiòtic G418). Les concentracions de puromicina i G418 necessàries per seleccionar les cèl·lules d'hibridoma que han incorporat els vectors bicistrònics es van determinar experimentalment, sent de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  per a la puromicina i de 3  $\text{mg}/\text{l}$  per a la G418 (Fig.5.2.).



**Fig. 5.2-** Corbes de mort de cultius d'hibridoma KB26.5 incubats en medis que contenen concentracions gradualment més elevades de (A) puromicina i (B) neomicina. Les dades han estat preses a les 48 hores de l'inici del cultiu.

## 5.2- Funcionalitat dels vectors bicistrònics

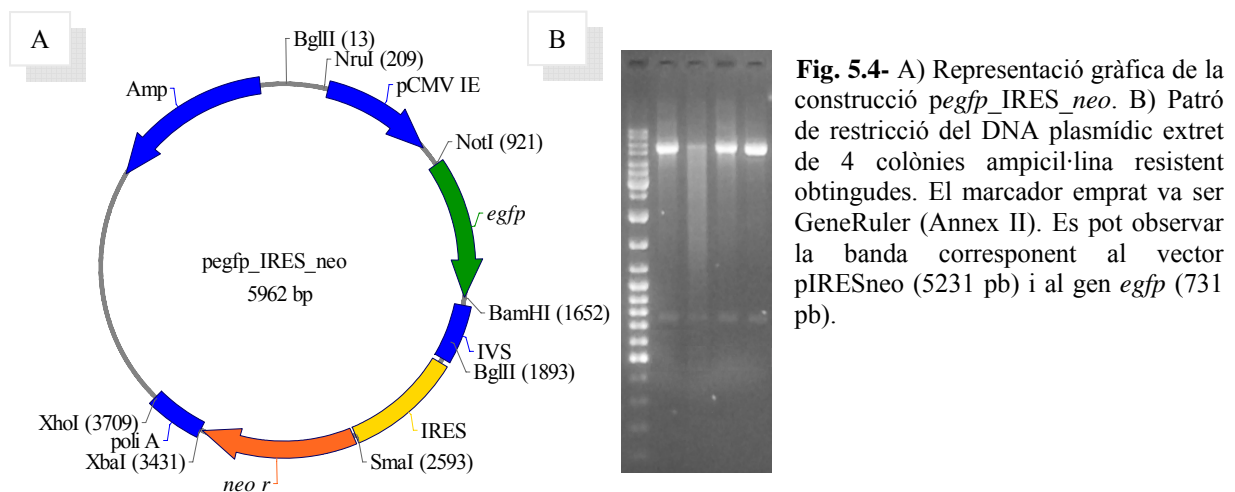
Malgrat els avantatges que proporcionen els vectors bicistrònics, s'ha descrit en altres treballs que els gens situats a banda i banda de l'element IRES poden presentar diferents nivells d'expressió. Normalment el gen transcrit davant de la seqüència IRES s'expressa més eficientment que el gen situat al darrera, ja que semblaria que la traducció iniciada a partir de l'estructura CAP del primer gen seria més efectiva que la realitzada a partir de l'element IRES per expressar el segon gen [Zhou i col., 1998a; Mizuguchi i col. 2000]. A més, també és possible que l'expressió del gen situat davant de l'IRES impedeixi la traducció del gen localitzat al darrera. Per aquest motiu, es va decidir comprovar la funcionalitat d'aquests vectors generant dues construccions bicistròniques en les quals s'alternava la posició del gen *egfp* (*enhanced green fluorescent protein*) i del gen *neo<sup>r</sup>* respecte la seqüència IRES (Fig. 5.3). Es va utilitzar el gen *egfp* perquè és un marcador de fàcil determinació.



**Fig. 5.3-** Construccions bicistròniques proposades per estudiar la funcionalitat de l'IRES: A) *pegfp\_IRES\_neo*, B) *pneo\_IRES\_egfp*.

### 5.2.1- *pegfp\_IRES\_neo*

La construcció *pegfp\_IRES\_neo* es va originar clonant el gen *egfp* en el *Multiple Cloning Site* (MCS) del vector pIRESneo. El gen *egfp* es va obtenir per PCR utilitzant el vector pIRES2-EGFP com a DNA motlle. A l'Annex I es mostra la seqüència del gen *egfp* i a l'apartat 8.12.1 els oligonucleòtids emprats com a encebadors per amplificar aquest gen. La temperatura a la qual es va dur la hibridació va ser de 50°C. El producte de la PCR es va subclonar en el vector PCR2.1-TOPO (apartat 8.13.5) per posteriorment clonar-lo en el vector pIRESneo entre les dianes *NotI* i *BamHI* del MCS (Fig. 5.4). L'estratègia utilitzada és similar a les anteriors clonacions (veure capítol 3) i la metodologia emprada està descrita en el capítol de materials i mètodes.



**Fig. 5.4-** A) Representació gràfica de la construcció *pegfp\_IRES\_neo*. B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret de 4 colònies ampicil·lina resistent obtingudes. El marcador emprat va ser GeneRuler (Annex II). Es pot observar la banda corresponent al vector pIRESneo (5231 pb) i al gen *egfp* (731 pb).

### 5.2.2- Vector *pneo\_IRES\_egfp*

Per crear la construcció *pneo\_IRES\_egfp* es va realitzar dues clonacions utilitzant el vector *pIRESneo* com a esquelet. La primera clonació consistia en substituir el gen *neo<sup>r</sup>* del plasmidi *pIRESneo* pel gen *egfp* i generar, d'aquesta manera, el vector *pIRES\_egfp*. La segona clonació es basava en introduir el gen *neo<sup>r</sup>* extret del vector *pIRESneo* en el MCS del vector *pIRES\_egfp* per tal d'obtenir finalment la construcció *pneo\_IRES\_egfp*.

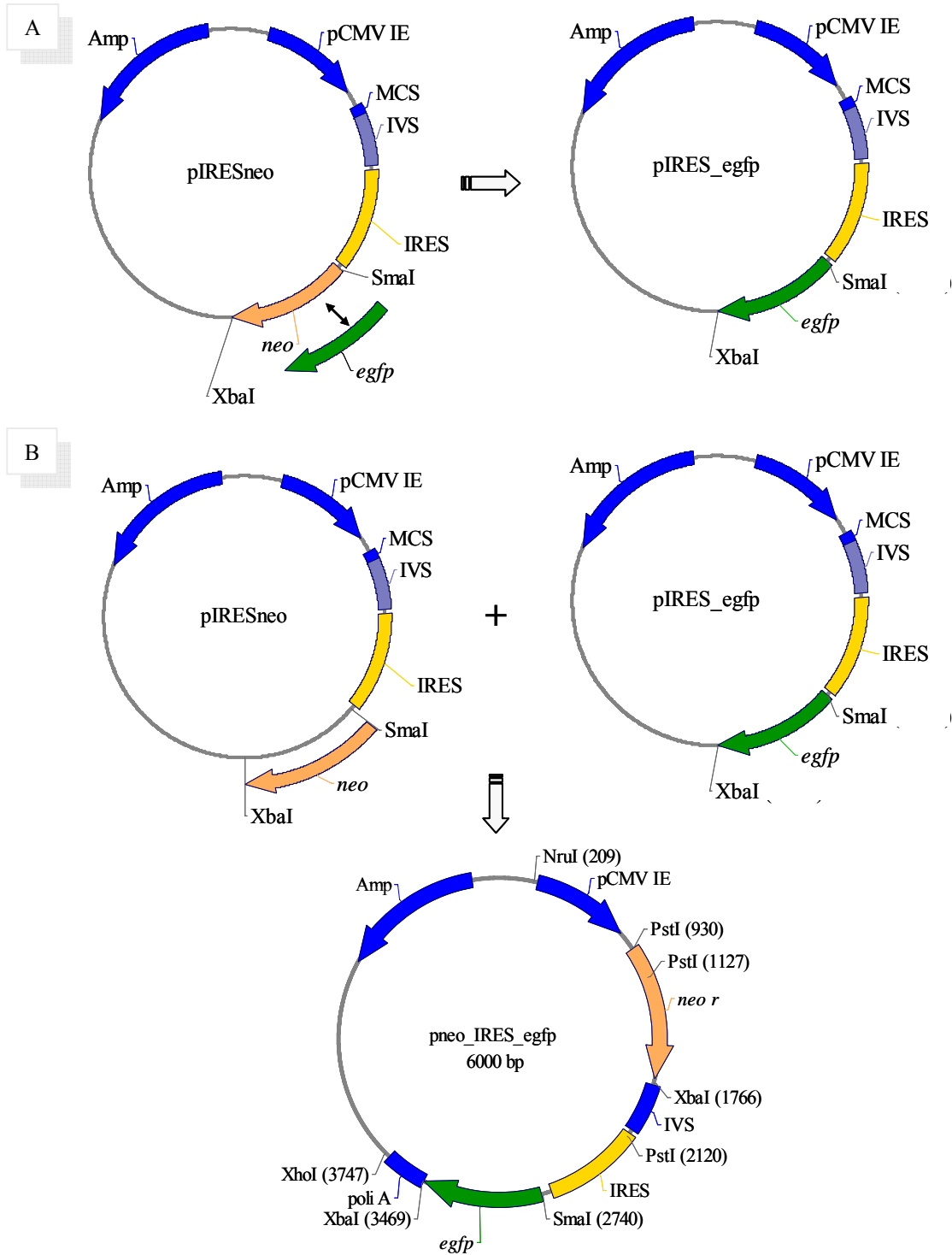
El gen *egfp* es va obtenir per PCR utilitzant el vector *pIRES2-EGFP* com a DNA motlle (apartat 8.12.2). El producte de la PCR es va subclonar en el vector *PCR2.1-TOPO* (apartat 8.13.5) per posteriorment clonar-lo en el vector *pIRESneo* digerit prèviament amb els enzims de restricció *SmaI* i *XbaI* (Fig. 5.5A).

El gen que codifica per la resistència a la neomicina (*neo<sup>r</sup>*) es va obtenir del plasmidi *pIRESneo* digerint aquest vector amb els enzims de restricció *SmaI* i *XbaI* i es va dur a terme en el vector *pIRES\_egfp* una clonació en extrems roms. Per realitzar aquesta clonació, els extrems cohesius del gen *neo<sup>r</sup>* es van transformar en extrems roms mitjançant l'enzim T4 DNA polimerasa (apartat 8.13.2) i el plasmidi *pIRES\_egfp* es va linearitzar amb l'enzim *EcoRV* el qual origina extrems roms preparats per unir-se a l'insert. Abans de fer la lligació, els extrems del vector *pIRES\_egfp* es van desfosforilar amb l'enzim fosfatasa alcalina per evitar possibles relligacions del vector amb ell mateix (apartat 8.13.3) (Fig 5.5B).

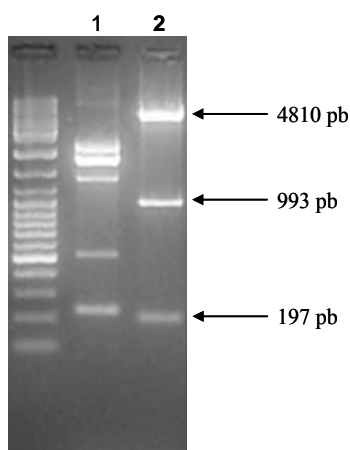
Per determinar l'orientació del gen *neo<sup>r</sup>* de les colònies obtingudes es va extreure el DNA plasmídic dels bacteris (apartat 8.10.1.1) i posteriorment es va tallar amb l'enzim *pstI* (Taula 5.1). A la Fig. 5.6 es mostra el mapa de restricció d'una construcció plasmídica obtinguda quan el gen *neo<sup>r</sup>* es troba amb orientació sentit.

**Taula 5.1-** Longitud dels fragments esperats al tallar amb l'enzim de restricció *pstI* la construcció en sentit o antisentit del gen *neo<sup>r</sup>*.

Construcció	Orientació	Fragments esperats (pb)
<i>pneo_IRES_egfp</i>	Sentit	4810/993/197
	Antisentit	4810/628/562



**Fig. 5.5-** Estratègia realitzada per generar la construcció *pneo\_IRES\_egfp*. A) Creació del vector *pIRES\_egfp*. B) Obtenció i clonació del gen *neo<sup>r</sup>* en el MCS del vector *pIRES\_egfp*.



**Fig. 5.6-** Patró de restricció del DNA d'una colònia transformada amb una construcció sentit. El marcador emprat va ser el GeneRuler (Annex II). 1) Fragments obtinguts després de digerir el DNA amb l'enzim de restricció *AvaII* (Fragments esperats en orientació sentit: 222, 519, 1296, 1811, 2152 pb). 2) Fragments obtinguts després de digerir amb l'enzim *pstI*.

### 5.2.3- Transfecció del vector *pegfp\_IRES\_neo* i *pneo\_IRES\_egfp* en cèl·lules 293-N

Per verificar l'expressió dels gens inserits en les construccions *pegfp\_IRES\_neo* i *pneo\_IRES\_egfp* es van transfectar establenent les cèl·lules 293-N utilitzant el reactiu DMRIE-C (veure apartat 8.15.1). Les cèl·lules 293-N, a diferència de l'hibridoma KB26.5, presenten una elevada eficiència de transfecció (> 95%), la qual cosa va facilitar molt aquest estudi.

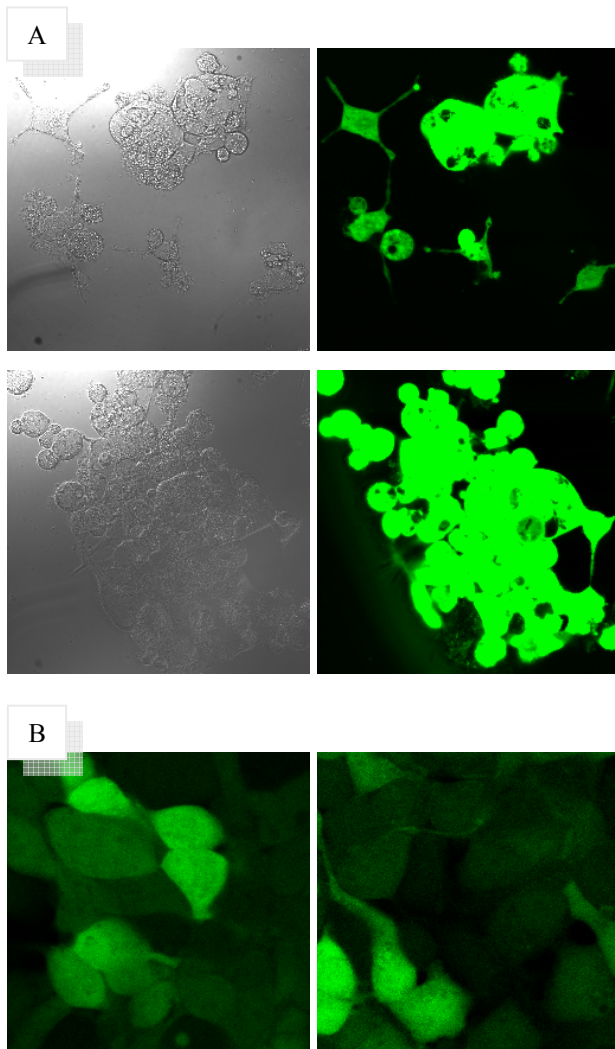
En la transfecció es van realitzar els controls següents:

- Control de creixement: cèl·lules 293-N sense transfectar en medi DMEM 10% FCS sense G418.
- Control negatiu: cèl·lules sense transfectar en medi DMEM 10% FCS, 1.5 mg/ml de G418.
- Control positiu: cèl·lules transfectades amb el vector pIRESneo original en medi DMEM 10% FCS, 1.5 mg/ml de G418.

Els dos primers controls van permetre realitzar el seguiment de l'evolució del cultiu cel·lular en un medi amb i sense G418. En canvi, l'últim control va permetre comprovar la correcta expressió de la resistència a la G418 continguda en el vector pIRESneo. La presència d'un clon es pot detectar fàcilment, ja que les cèl·lules no transfectades del cultiu moren en presència de l'antibiòtic G418. Per tant, les cèl·lules

transfectades han d'expressar la resistència a l'antibiòtic per sobreviure i a més, com que es tracta d'una construcció bicistrònica, simultàniament també han de produir la proteïna EGFP.

Al cap de tres setmanes es va obtenir transfectants dels diferents vectors assajats i a l'irradiar els cultius amb llum ultraviolada, les construccions que duïen la proteïna EGFP emetien fluorescència verda. A la Fig. 5.7 es mostra com les cèl·lules transfectades amb la construcció *pegfp\_IRES\_neo* (A) expressen més eficientment la proteïna EGFP que les cèl·lules que han incorporat el plasmidi *pneo\_IRES\_egfp* (B) ja que totes les cèl·lules transfectades presentaven un elevat nivell d'expressió de la proteïna EGFP.



**Fig. 5.7-** Imatges obtingudes per microscòpia confocal (LEICA TCS 4D) després transfectar cultius amb les construccions *pegfp\_IRES\_neo* (A) i *pneo\_IRES\_egfp* (B). Les cèl·lules verdes són les que expressen la proteïna EGFP.

Així doncs, aquest resultat confirma el correcte funcionament de les construccions bicistròniques i que possiblement, el gen situat davant de l'element IRES s'expressa més eficaçment que el situat darrera, tot i que aquest últim s'expressa suficientment per sobreviure en el medi de selecció. Per tant, en aquest treball, el gen antiapoptòtic es va clonar al davant de l'element IRES i el gen que confereix resistència a l'antibiòtic al darrera de la seqüència IRES, ja que la cèl·lula per sobreviure sempre haurà d'expressar el gen que li proporciona resistència al medi de selecció.

### **5.3- Clonació dels gens antiapoptòtics en els vectors bicistrònics pIRESneo i pIRESpuro2**

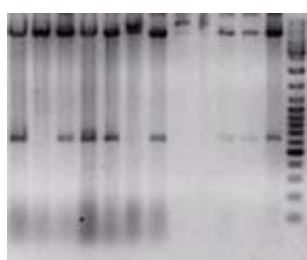
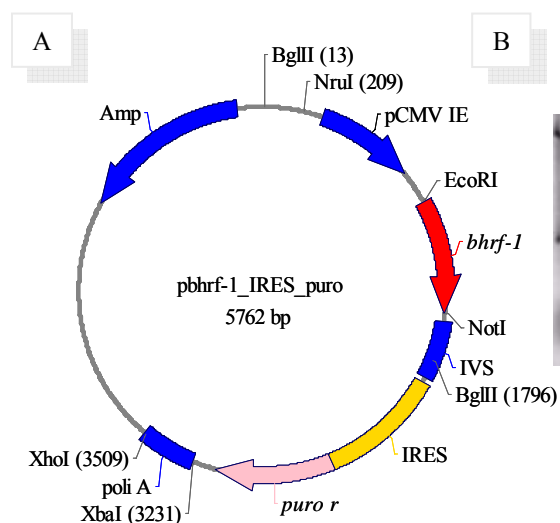
En el capítol 3 d'aquest treball s'ha mostrat que tant les proteïnes antiapoptòtiques cel·lulars Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> com els seus homòlegs vírics BHRF-1 i KsBcl-2 aconseguen retardar l'aparició de l'apoptosi i que, el gen *bhrf-1* és el que aporta una protecció més clara en els experiments de seguiment de la viabilitat del cultiu en condicions inductores de l'apoptosi (apartat 3.5). Per tal d'estabilitzar l'expressió del gen antiapoptòtic *bhrf-1* al llarg del temps, es va generar construccions bicistròniques que duïen el gen *bhrf-1* situat davant de l'element IRES. També, com a control es va crear construccions bicistròniques amb el gen cel·lular *bcl-2*.

Per clonar els gens *bhrf-1* i *bcl-2* en els vectors pIRESneo i pIRESpuro2 es va dissenyar encebadors per amplificar per PCR aquests gens a partir de les construccions pcDNA3\_ *bhrf-1* i pcDNA3\_ *bcl-2* (apartat 8.12.1 i 8.12.2). Els productes de l'amplificació es van subclonar en el vector PCR2.1-TOPO (apartat 8.13.5). Per alliberar els gens de les construccions PCR2.1\_ *bhrf-1* i PCR2.1\_ *bcl-2* es va digerir aquests vectors amb enzims de restricció (Taula 5.2). Les dianes de restricció d'aquests enzims es troben a banda i banda de l'insert i provenen dels encebadors utilitzats en les reaccions d'amplificació del DNA. Els fragments de DNA que es van obtenir tenien els extrems cohesius i estaven preparats per ser clonats directament en vectors amb extrems cohesius complementaris. D'aquesta forma es van obtenir les construccions *pbhrf-1\_IRES\_puro* (Fig. 5.8), *pbcl-2\_IRES\_puro* (Fig. 5.9), *pbhrf-1\_IRES\_neo* (Fig. 5.10) i *pbcl-2\_IRES\_neo* (Fig. 5.11).

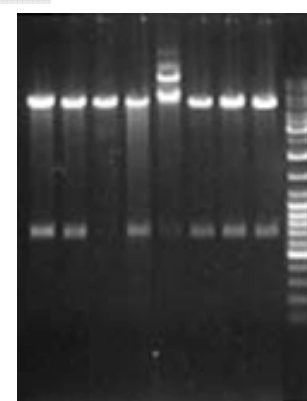
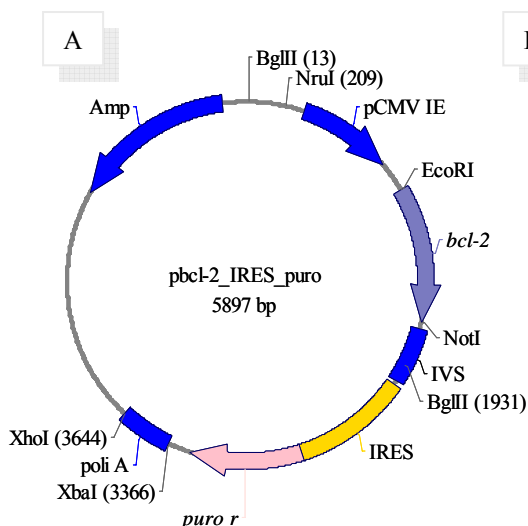


**Taula 5.2-** Relació dels enzims de restricció emprats per alliberar els gens vírics i linearitzar el vector d'expressió pIRESpuoro2 i pIRESneo.

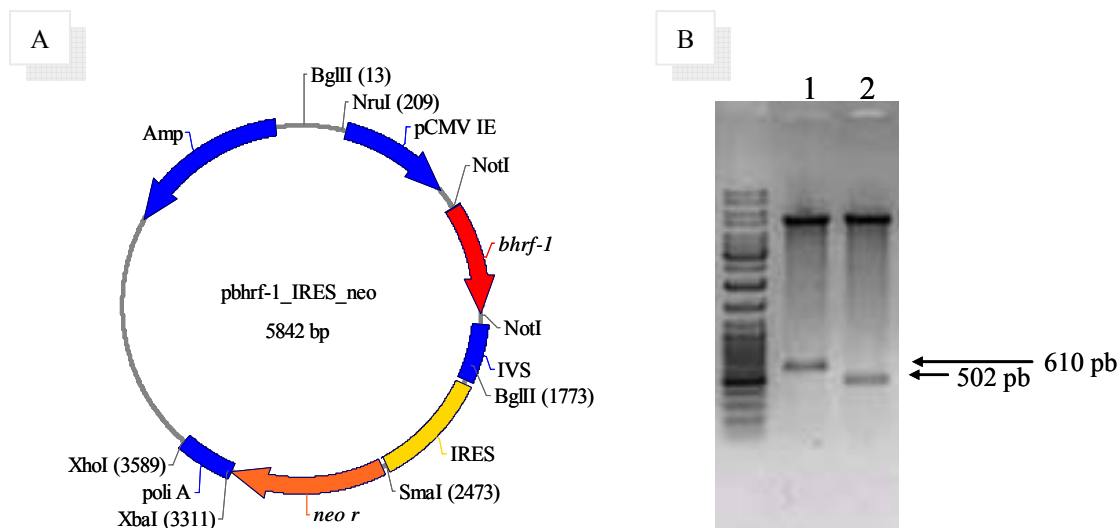
Construcció	Enzim Restricció (Construcció)	Vector d'expressió	Enzim Restricció (Vector)
PCR2.1_ <i>bhrf-1</i>	NotI	pIRESneo	NotI
PCR2.1_ <i>bhrf-1</i>	EcoRI/NotI	pIRESpuoro2	EcoRI/NotI
PCR2.1_ <i>bcl-2</i>	NotI/EcoRI	pIRESneo	NotI/EcoRI
PCR2.1_ <i>bcl-2</i>	EcorRI/NotI	pIRESpuoro2	EcorRI/NotI



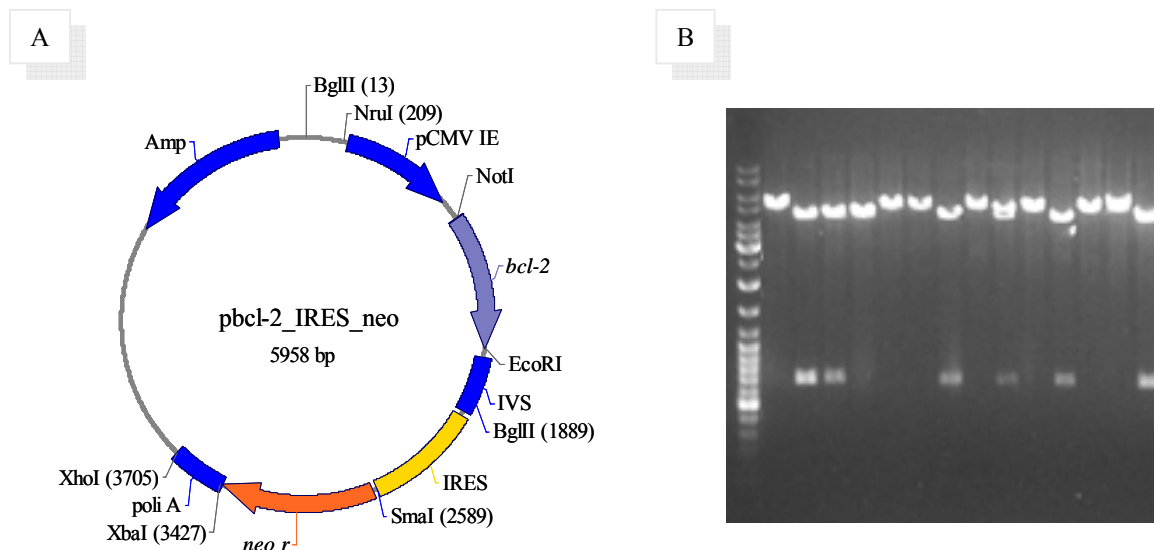
**Fig. 5.8-** A) Representació gràfica de la construcció *pbhrf-1\_IRES\_puro*. B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret de 12 colònies ampicil·lina resistent obtingudes. El marcador emprat va ser GeneRuler (Annex II). Es pot observar la banda corresponent al vector pIRESpuoro2 (5152 pb) i al gen *bhrf-1* (610 pb).



**Fig. 5.9-** A) Representació gràfica de la construcció *pbcl-2\_IRES\_puro*. B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret de 8 colònies ampicil·lina resistent obtingudes. El marcador emprat va ser GeneRuler (Annex II). Es pot observar la banda corresponent al vector pIRESpuoro2 (5185 pb) i al gen *bcl-2* (712 pb).



**Fig. 5.10-** A) Representació gràfica de la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo*. B) Patró de restricció del DNA d'una colònia transformada amb una construcció sentit. El marcador emprat va ser el GeneRuler (Annex II). 1) Alliberament del gen *bhrf-1* (610 pb) després de digerir el DNA amb l'enzim de restricció *NotI*. 2) Fragments obtinguts després de digerir amb els enzims *NheI* i *EcoRI* (fragments esperats en orientació sentit: 502 i 5340 pb i antisentit: 138 i 5704 pb).



**Fig. 5.11-** A) Representació gràfica de la construcció *pbcl-2\_IRES\_neo*. B) Patró de restricció del DNA plasmídic extret de 14 colònies ampil·lina resistent obtingudes. El marcador emprat va ser GeneRuler (Annex II). Es pot observar la banda corresponent al vector pIRESneo (5253 pb) i al gen *bcl-2* (705 pb).

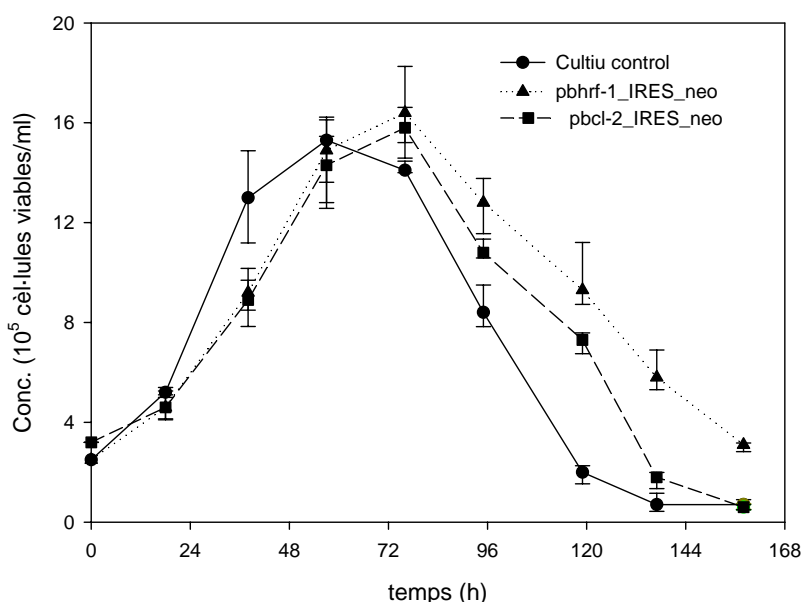
#### 5.4- Estudis d'inhibició de l'apoptosi. Experiments de retorn de la viabilitat dels cultius.

Les construccions plasmídiques *pbhrf-1\_IRES\_neo*, *pbcl-2\_IRES\_neo*, *pbhrf-1\_IRES\_puro*, *pbcl-2\_IRES\_puro* es van transfectar a l'hibridoma KB26.5 mitjançant la formació de coprecipitats adenovirus-DNA (apartat 8.15.3 i 8.15.4). També es va

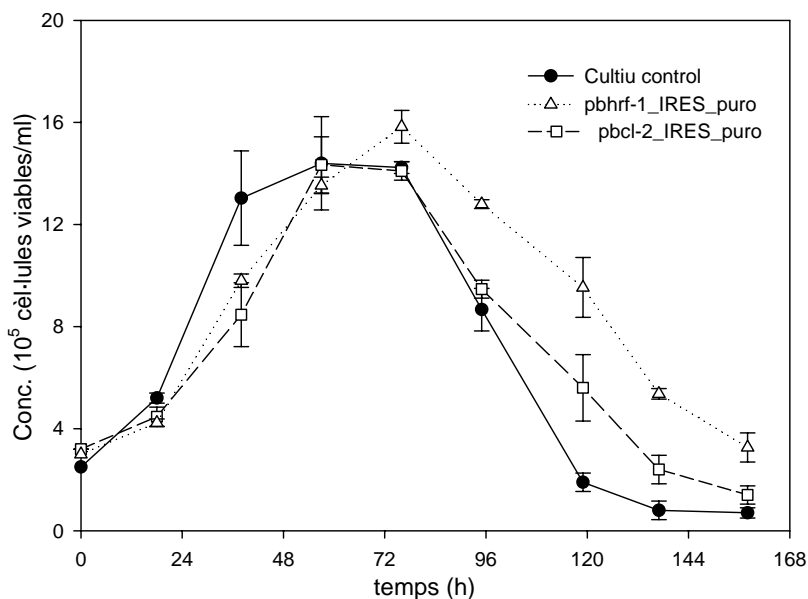
transfectar els vectors pIRESpuro2 i pIRESneo per comprovar l'expressió correcta d'aquests plasmidis. Al cap de 3 setmanes es va obtenir transfectants de totes les construccions assajades.

Per comprovar l'efecte protector contra l'apoptosi del gens *bhrf-1* i *bcl-2* es van realitzar tot un seguit d'experiments utilitzant com a control negatiu cèl·lules transfectades amb el vector bicistrònic original ja que aquest no confereix a la cèl·lula cap avantatge enfront l'apoptosi. Els experiments es van realitzar en flascons no agitats de 25 cm<sup>2</sup> i per triplicat.

Es va determinar el perfil de creixement dels diferents cultius fent un seguiment, al llarg del temps, de la població cel·lular en un medi DMEM al 4% FCS amb 3 mg/ml G418 o 3 µg/ml de puromicina en funció del transfectant obtingut. Com es pot apreciar a la Fig. 5.12 i 5.13, les cèl·lules que han incorporat els gens *bhrf-1* i *bcl-2*, presenten a partir de les 76 hores un descens en el nombre de viables més lent que el cultiu control, gràcies als efectes protectors d'aquest gens.

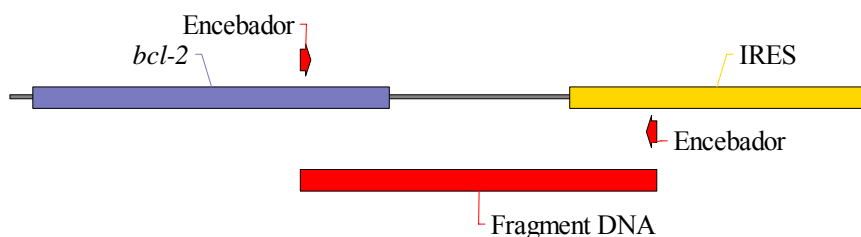


**Fig. 5.12-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb les construccions *pbhrf-1\_IRES\_neo*, *pbcl-2\_IRES\_neo* i del control negatiu en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS i 3 mg/ml de G418.



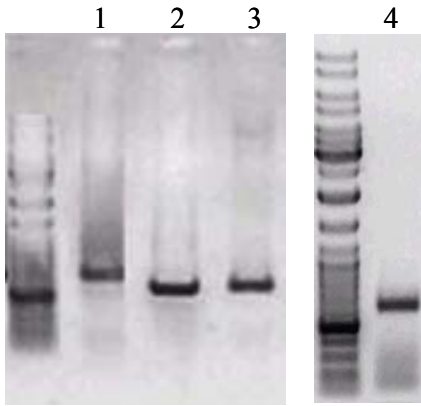
**Fig. 5.13-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb les construccions *pbhrf-1\_IRES\_puro*, *pbcl-2\_IRES\_puro* i del control negatiu en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS i 3 µg/ml de puromicina.

Per verificar l'expressió dels gens *bhrf-1* i *bcl-2* transfectats es va extreure una mostra dels diferents cultius i es va determinar la presència del mRNA d'aquest gens mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa prèvia (RT-PCR) (veure apartats 8.10.3 i 8.12.3 del capítol de materials i mètodes). Aquesta tècnica permet amplificar selectivament el nombre de còpies del cDNA d'un gen determinat a partir del seu propi mRNA. D'aquesta manera es pot saber si la cèl·lula està expressant aquest gen. A l'apartat 8.12.1 es mostra els oligonucleòtids utilitzats com a encebadors per amplificar els mRNAs dels gens antiapoptòtics. Per tal de distingir l'expressió del *bcl-2* endogen del *bcl-2* procedent de la construcció bicistrònica es va dissenyar uns encebadors que amplificaven un fragment de 710 pb comprès entre la part final del gen *bcl-2* i la part inicial de la seqüència IRES (Fig. 5.14).



**Fig. 5.14-** Estratègia emprada per comprovar l'expressió del gen *bcl-2*. Els encebadors utilitzats estan descrits en l'apartat 8.12.1.

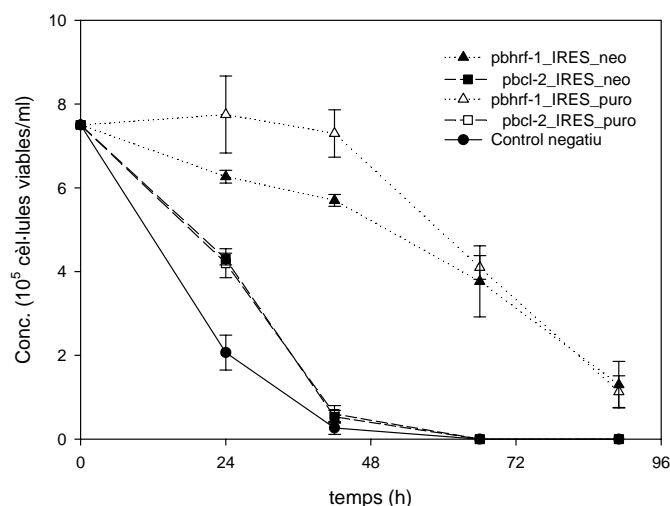
La temperatura a la qual es va dur a terme la síntesi del cDNA de cada gen en la RT-PCR i la temperatura d'hibridació va ser de 50 °C en ambdós casos. Tal i com es pot veure a la Fig. 5.15 es va detectar l'expressió dels gens antiapoptòtics.



**Fig. 5.15-** Determinació de l'expressió dels gens *bhrf-1* i *bcl-2*. El marcador emprat va ser GeneRuler (Annex II). Es pot observar la banda corresponent a: 1- fragment *bcl-2*+IRES del transfectant *pbc1-2\_IRES\_neo*, 2- *bhrf-1* del transfectant *pbhrf-1\_IRES\_puro*, 3- *bhrf-1* del transfectant *pbhrf-1\_IRES\_neo*. 4- fragment *bcl-2*+IRES del transfectant *pbc1-2\_IRES\_puro*. També com a control negatiu es va realitzar RT-PCRs de cèl·lules d'hibridoma sense transfectar amb els diferents oligonucleòtids emprats. En cap dels casos es va observar la banda corresponent al gen *bcl-2* i al gen *bhrf-1*.

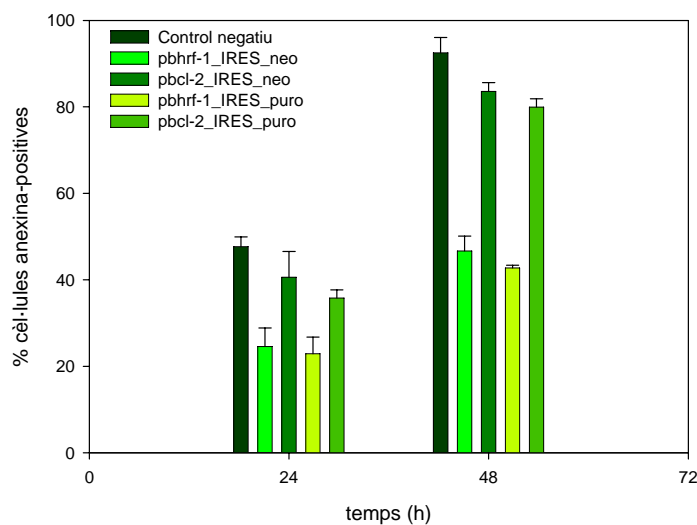
Per corroborar l'efecte protector de les proteïnes BHRF-1 i Bcl-2, els diferents transfectants es van cultivar en medi DMEM amb un 4% FCS, 3 mg/ml de G418 o 3µg/ml de puromicina, sense glutamina i un inòcul inicial de  $7.5 \times 10^5$  cèl·lules/ml. L'experiment es va realitzar per triplicat i es van agafar mostres cada 24 hores per tal de fer el seguiment de la concentració de cèl·lules viables, l'anàlisi per citometria de flux del percentatge de cèl·lules annexina positives i la visualització de la fragmentació del DNA en gels agarosa.

A la Fig. 5.16 es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables dels diferents cultius. Es pot apreciar com els cultius amb les cèl·lules transfectades amb els gens *bhrf-1* i *bcl-2* pateixen un descens del nombre de viables més lent que el cultiu control. També es pot observar com a partir de les 42 hores el nombre de cèl·lules viables disminueix molt dràsticament en els cultius amb els transfectants del *bcl-2* i en el cultiu control, mentre que els cultius amb els transfectants del *bhrf-1* encara mantenen aproximadament el 85% de viabilitat, demostrant clarament el potent efecte inhibidor de l'apoptosi de la proteïna BHRF-1.



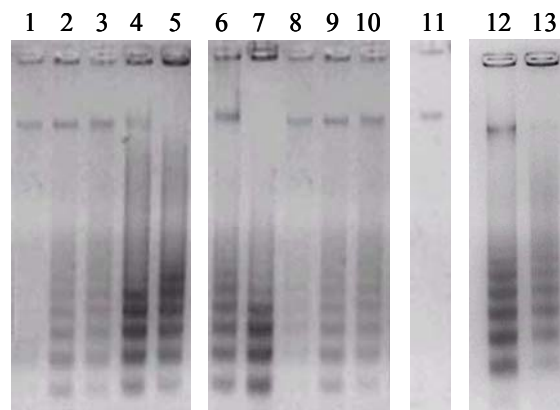
**Fig. 5.16-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb les construccions *pbhrf-1\_IRES\_neo*, *pbcl-2\_IRES\_neo*, *pbhrf-1\_IRES\_puro*, *pbcl-2\_IRES\_puro* en medi DMEM 4% FCS, 3 mg/ml G418 o 3µg/ml puromicina sense glutamina.

Si s'observa el percentatge de cèl·lules annexina positives (Fig. 5.17) a les 24 i 48 hores, els cultius dels transfectants tant del *bhrf-1* com del *bcl-2* mostren un percentatge de cèl·lules annexina positives inferior al cultiu control. Aquesta diferència és més evident en el cas de les cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf-1* ja que aquests cultius presenten aproximadament un 24% de cèl·lules apoptòtiques a les 24 hores i un 45% a les 48 hores, mentre que el cultiu control presenta un 48% i un 93% a les 24 i 48 hores respectivament. Aquest resultat confirma una altra vegada la gran capacitat que té la proteïna BHRF-1 de protegir les cèl·lules contra l'apoptosi.



**Fig. 5.17-** Evolució del percentatge de cèl·lules annexina positives presents en els cultius transfectats amb les construccions *pbhrf-1\_IRES\_neo*, *pbcl-2\_IRES\_neo*, *pbhrf-1\_IRES\_puro*, *pbcl-2\_IRES\_puro* en medi DMEM 4% FCS, 3 mg/ml G418 o 3µg/ml puromicina sense glutamina.

Per tal de visualitzar el processament endonucleotídic del DNA que es dona en estadis mitjanament avançats de l'apoptosi, es va extreure a les 24, 48 i 72 hores el DNA genòmic dels cultius anteriors sotmesos a condicions d'exhauriment de glutamina. A la Fig. 5.18 es pot veure com tots els cultius excepte el que expressa el gen *bhrf-1* presenten a les 24 hores una clara fragmentació del DNA en patró d'escala, sense que es pugui apreciar cap diferència significativa entre ells. A les 48 i 72 hores tots els cultius tenen tot el DNA genòmic fragmentat excepte el del *bhrf-1* que encara conserva DNA intacte, mostrant de nou la capacitat protectora del gen *bhrf-1*.



**Fig. 5.18-** Visualització de la fragmentació del DNA. Fotografia de quatre gels d'agarosa en els quals s'ha fet migrar mostres extretes dels diferents cultius en medi DMEM 4% FCS, 3 mg/ml G418 o 3 µg/ml puromicina, sense glutamina: 1- transfectant *pbhrf-1\_IRES\_neo* a les 24 hores, 2- transfectant *pbhrf-1\_IRES\_neo* a les 48 hores, 3- transfectant *pbhrf-1\_IRES\_neo* a les 72 hores 4- transfectant *pbcl-2\_IRES\_neo* a les 24 hores 5- transfectant *pbcl-2\_IRES\_neo* a les 48 hores, 6- transfectant *pbcl-2\_IRES\_puro* a les 24 hores, 7- transfectant *pbcl-2\_IRES\_puro* a les 48 hores, 8- transfectant *pbhrf-1\_IRES\_puro* a les 24 hores, 9- transfectant *pbhrf-1\_IRES\_puro* a les 48 hores, 10- transfectant *pbhrf-1\_IRES\_puro* a les 72 hores, 11- cultiu control a les 0 hores 12- cultiu control a les 24 hores, 13- cultiu control a les 48 hores. En tots els cultius a les 24 hores encara queda DNA genòmic intacte.

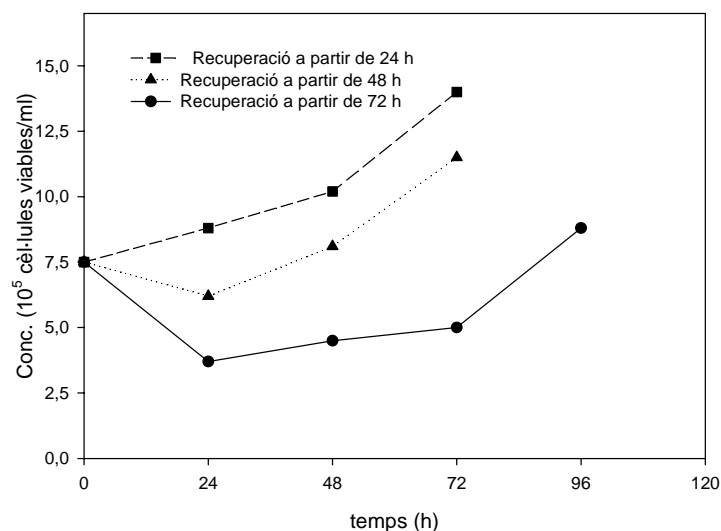
També, es va voler determinar fins a quin punt l'acció de les proteïnes antiapoptòtiques podia permetre recuperar la viabilitat dels cultius després de determinats períodes de condicions desfavorables. Per aquest motiu es va preparar un experiment amb els diferents transfectants cultivats en medi sense glutamina que, després de diferents intervals de temps (12, 24, 48 i 72 h), es tornaven a cultivar amb glutamina i s'observava si la viabilitat es recuperava de nou. Com a cultiu control es va utilitzar cèl·lules d'hibridoma transfectades amb el vector bicistrònic pIRESneo. Els resultats obtinguts mostraven que els transfectants que expressen el gen *bhrf-1* es recuperen fins a les 72 hores de cultiu en condicions inductores de l'apoptosi. En canvi, els que expressen el gen *bcl-2* es recuperen fins a les 24 hores (Taula 5.3).

Aquest fet és molt important, ja que si es produeix qualsevol pertorbació en el bioreactor que indueixi l'apoptosi és possible recuperar els cultius que expressin el gen *bhrf-1* i el gen *bcl-2* aproximadament 72 i 24 hores respectivament després d'haver-se produït l'alteració. En canvi, una població no modificada genèticament, la recuperació del cultiu només és possible fins a 12 hores després d'haver-se induït l'apoptosi.

**Taula 5.3-** Recuperació de la viabilitat de les mostres extretes a diferents intervals de temps dels diferents cultius assajats: (+) cultiu que creix en medi amb glutamina (cultiu recuperat), (-) cultiu que es mor en medi amb glutamina (cultiu no recuperat).

Cultius	Temps (hores)			
	12	24	48	72
Cèl·lules transfectades <i>pbhrf-1_IRES_neo</i>	+	+	+	+
Cèl·lules transfectades <i>pbcl-2_IRES_neo</i>	+	+	-	-
Cèl·lules transfectades <i>pbhrf-1_IRES_puro</i>	+	+	+	+
Cèl·lules transfectades <i>pbcl-2_IRES_puro</i>	+	+	-	-
Cultiu control	+	-	-	-

A la Fig. 5.19 es pot observar la recuperació d'un cultiu amb cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf-1* sotmeses a condicions de manca de glutamina durant 24, 48 i 72 hores. Com es pot apreciar, les cèl·lules sotmeses a condicions inductores de l'apoptosi durant 72 hores triguen més temps a recuperar-se que les sotmeses durant 24 hores, concretament, es comencen a recuperar 72 hores després de l'addició de glutamina.



**Fig. 5.19-** Corbes de creixement de les cèl·lules transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo* en un medi òptim, després d'haver estat privades de glutamina durant 24, 48 i 72 hores.



Els experiments anteriors permeten concloure que l'expressió del gen *bhrf-1* té un efecte molt significatiu sobre la inhibició de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5, corroborant els resultats obtinguts amb les construccions monocistròniques pCDNA3 (capítol 3). Tot i així, si es comparen aquestes dades amb les obtingudes amb les construccions pcDNA3 es poden observar diferències importants, sobretot pel que fa a la proteïna BHRF-1. En condicions inductores de l'apoptosi, les cèl·lules transfectades amb la construcció bicistrònica *bhrf-1* presenten un descens en la viabilitat del cultiu més lent, a les 42 hores encara hi ha un 85% de cèl·lules vives mentre que les cèl·lules que incorporen la construcció pcDNA3\_*bhrf-1* tenen només un 33% de viabilitat cel·lular (veure Fig. 5.16 i Fig. 3.20 del capítol 3). A més, el cultiu transfectat amb el plasmidi bicistrònic *bhrf-1* es pot recuperar després de 72 hores d'estar sotmès a condicions desfavorables, en canvi, el cultiu transfectat amb el vector monocistrònic *bhrf-1* ho fa només fins a les 48 hores de cultiu (Taula 5.3 i Taula 3.5 del capítol 3). Aquest fet va fer pensar que molt probablement els vectors bicistrònics permeten la integració del gen clonat en regions amb elevada taxa de transcripció.

Un altre aspecte a destacar dels experiments anteriors és que no s'observen diferències significatives entre les construccions bicistròniques que duen la resistència a la puromicina o a la G418, per tant, qualsevol d'aquests marcadors de selecció és vàlid. Per tant, els vectors bicistrònics pIRESpuro2 i pIRESneo són una eina molt útil per modificar genèticament les cèl·lules animals. Malauradament, l'ús d'aquests vectors per volums de cultiu a escala de bioreactor resulta inviable econòmicament, ja que l'addició d'antibiòtic al medi de cultiu encareix molt el procés de producció. Per exemple, el fet d'afegir una concentració de 3 mg/ml de G418 al medi de cultiu suposa una augment del cost del medi d'aproximadament 290€ per litre. Per aquest motiu, una alternativa seria generar un vector bicistrònic que, enlloc de dur com a marcador de selecció una resistència a un antibiòtic, dugui un gen que permeti suplir una auxotròfia, com per exemple la glutamina sintetasa. La glutamina sintetasa és un enzim que permet sintetitzar glutamina a partir d'àcid glutàmic, per tant, aquelles cèl·lules que incorporin la glutamina sintetasa sobreviuran en absència

de glutamina al medi de cultiu mentre que les cèl·lules que no adquireixin el vector moriran per apoptosi induïda per manca de glutamina al medi de cultiu.

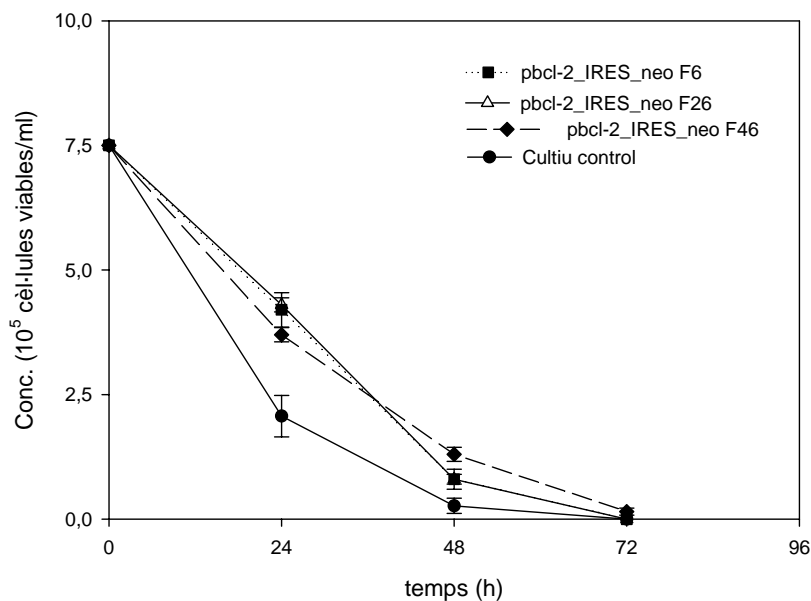
### **5.5- Estabilitat de l'expressió de les construccions bicistròniques en l'hibridoma KB26.5**

Per comprovar l'expressió sostinguda del gens clonats al llarg del temps i d'aquesta manera, confirmar l'estabilitat en l'expressió de les construccions bicistròniques es va preparar un experiment amb els cultius següents:

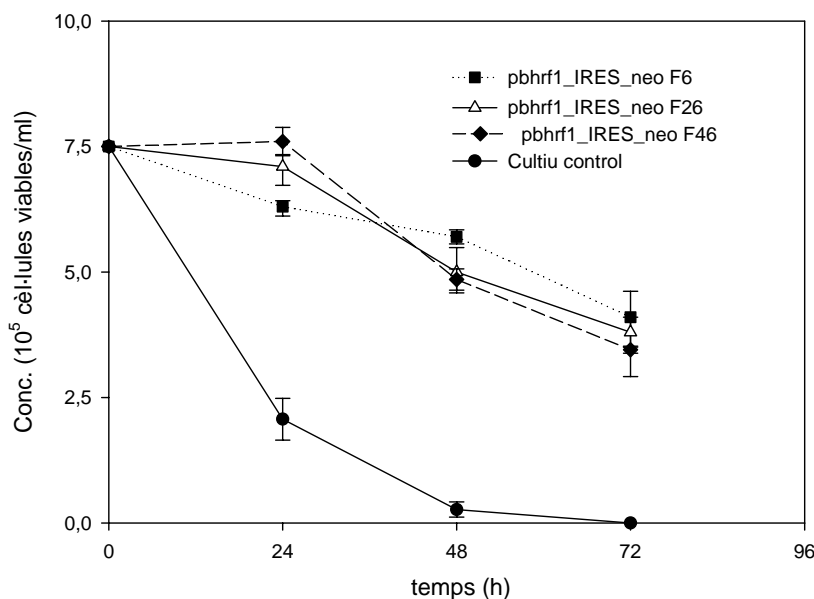
1. Cultiu amb cèl·lules transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo*.
2. Cultiu amb cèl·lules transfectades amb la construcció *pbcl-2\_IRES\_neo*.
3. Cultiu amb cèl·lules transfectades amb la construcció *pegfp\_IRES\_neo*. Per transfectar les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 amb aquesta construcció es va fer servir el mètode de la formació de coprecipitats adenovirus-DNA (veure apartat 8.15.3), però en aquest cas, l'adenovirus utilitzat duia el marcador LacZ enlloc de la EGFP.

L'experiment proposat consistia en fer un seguiment de la viabilitat dels cultius, quan després d'un cert nombre de resembres, les cèl·lules eren exposades de nou a condicions inductores de l'apoptosi. En el cas del cultiu amb les cèl·lules transfectades amb la construcció *pegfp\_IRES\_neo* el seguiment es va realitzar per fluorescència. Els cultius es van sembrar cada 2-3 dies en flascons no agitats amb 10 ml de medi DMEM al 4% FCS sense G418 i amb un inòcul inicial de  $2 \times 10^5$  cèl·lules viables/ml. Per induir l'apoptosi, les cèl·lules es van cultivar en medi DMEM al 4% FCS sense glutamina.

A la Fig. 5.20 i 5.21 es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables dels cultius amb els transfectants del *bcl-2* i del *bhrf-1* al cap de 6, 26, i 46 resembres. En ambdós cultius es pot observar com, al llarg del temps, els transfectants no perden la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi confirmant l'estabilitat d'aquestes construccions.



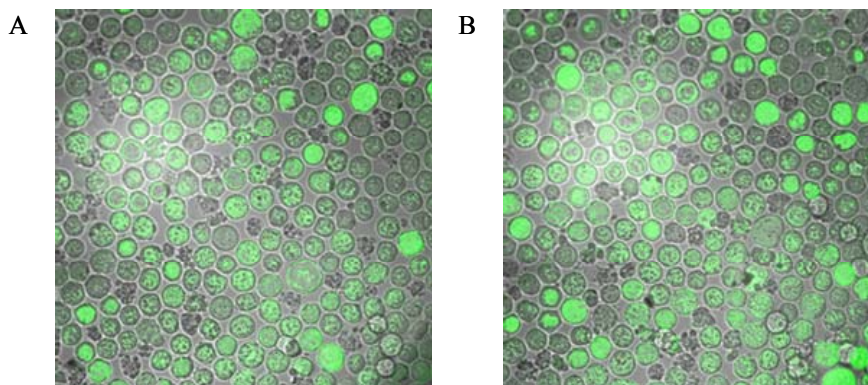
**Fig. 5.20-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb el gen *bcl-2* en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS sense glutamina al cap de 6, 26 i 46 resembres.



**Fig. 5.21-** Perfil de creixement de les cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf-1* en un cultiu en discontinu en medi DMEM al 4% FCS sense glutamina al cap de 6, 26 i 46 resembres.

A la Fig. 5.22 es mostra les fotografies obtingudes per microscòpia confocal del cultiu transfectat amb la construcció *pegfp\_IRES\_neo* al cap de 6 i 46 resembres. Es pot veure que les cèl·lules transfectades no deixen d'expressar la proteïna EGFP al llarg del temps. També es pot apreciar diferents nivells d'expressió de la proteïna EGFP entre els diferents clons obtinguts i per tant, en funció del tipus d'estudi que es vulgui realitzar caldrà dur a terme una posterior selecció de clons individuals. Tot i

així, els estudis realitzats per Figueroa i els seus col·laboradors han mostrat que nivells d'expressió baixos dels gens antiapoptòtics són suficient per protegir les cèl·lules contra l'apoptosi [Figueroa i col., 2006]. En aquest treball, donat que es tractava d'avaluar l'efecte contra l'apoptosi de gens candidats, sempre s'ha treballat amb poblacions clonals.



**Fig. 5.22-** Imatges obtingudes per microscòpia confocal (LEICA TCS 4D) del cultiu amb els transfectants *pegfp\_IRES\_neo* al cap de 6 (A) i 46 (B) resembres.

Per tant, aquests resultats confirmen l'estabilitat de les construccions bicistròniques. Un altre fet que cal constatar és que les cèl·lules expressen establement el gen d'interès sense la necessitat d'addicionar antibiòtic al medi de cultiu ja que, al llarg del temps, els cultius anteriors han estat cultivats en medi sense antibiòtic i no han perdut la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi (veure anteriors Fig. 5.20 i Fig. 5.21). Aquesta dada és molt important, sobretot, quan es treballa en grans volums de cultiu propis dels bioreactors, ja que tal i com s'ha comentat anteriorment l'addició d'antibiòtic al medi de cultiu faria inviable el procés. Gràcies a aquest resultat es descarta la generació d'un vector bicistrònic que contingui el gen de la glutamina sintetasa com a marcador de selecció.

### 5.6- Efecte de l'expressió de les construccions bicistròniques sobre la producció d'anticòs

Un cop conegut els nombrosos avantatges que proporcionen les construccions bicistròniques es va voler veure quina influència tenia l'expressió estable d'aquestes proteïnes sobre la producció d'anticòs monoclonals. Així doncs, es va realitzar un

experiment amb les cèl·lules transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo*, *pbcl-2\_IRES\_neo*, *pbhrf-1\_IRES\_puro* i *pbcl-2\_IRES\_puro*. Com a control es va utilitzar les cèl·lules transfectades amb el vector pIRESneo. Els diferents cultius es van fer créixer en flascons no agitat amb 10 ml de medi DMEM al 4% FCS i 3 mg/ml de neomicina o 3 µg/ml de puromicina. Es va agafar mostra a les 57 i 95 hores després de l'inici del cultiu per analitzar l'activitat de l'anticòs monoclonal mitjançant el test d'hemoaglutinació en placa (apartat 8.8, materials i mètodes).

Al realitzar l'anàlisi, es va veure que els cinc cultius assajats hemoaglutinaven a la mateixa dilució (1/32), i presentaven, doncs, una activitat d'anticòs monoclonal similar. A més, si s'observava el nombre de cèl·lules vives a les 57 i 95 hores de cultiu, i la quantitat d'anticòs monoclonal obtinguda fent una estimació aproximada entre l'activitat i la quantitat (Taula 5.4), es va veure com a les 57 hores els diferents cultius presenten una producció específica similar, mentre que a les 96 hores, el cultiu control presenta una producció específica més elevada en comparació als altres cultius (Taula 5.4). Segurament, aquesta diferència podria explicar-se pel fet que a les 96 hores les cèl·lules d'hibridoma pateixen apoptosi i es comencen a llisar, alliberant el seu contingut citoplasmàtic a l'exterior, mentre que les cèl·lules que incorporen els gens antiapoptòtics romanen intactes, motiu pel qual s'observa més producció específica en el cultiu control [Mohan i Lyddiatt, 1991]. A més a més, si es compara les dades dels cultius que incorporen el gen *bcl-2* i les dels cultius que duen el gen *bhrf-1* (Taula 5.4), també es pot observar una producció específica més elevada en el cas dels transfectant del *bcl-2* ja que la proteïna BHRF-1 és més efectiva que Bcl-2 per retardar l'aparició de l'apoptosi.

Tots aquests resultats van posar de manifest que l'expressió dels gens antiapoptòtics no afecta la producció d'anticòs monoclonal ja que els diferents cultius presenten la mateixa activitat d'anticòs monoclonal.

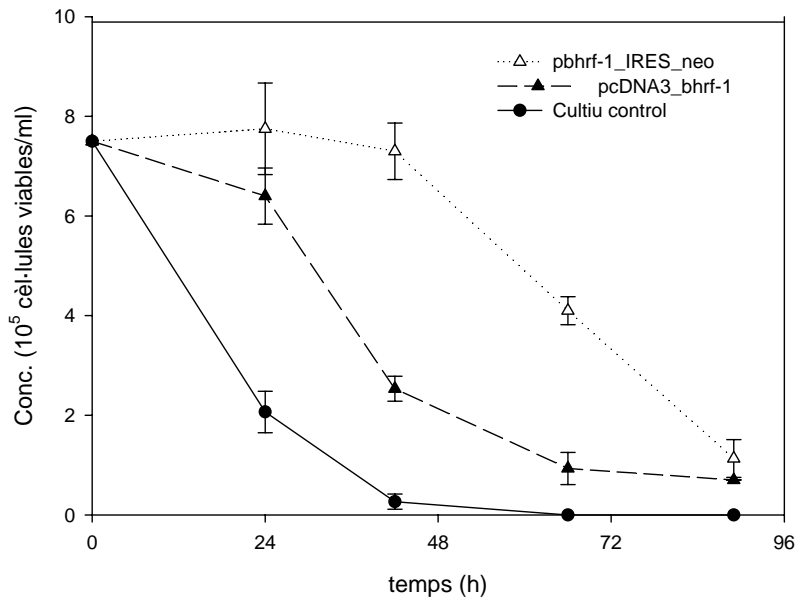
**Taula 5.4-** Concentració d'anticòs monoclonal, concentració cel·lular, i producció específica d'anticòs per cèl·lula (Pesp.) a les 57 i 95 hores de cultiu. Per calcular la quantitat d'anticòs monoclonal es suposa que una dilució 1/64 equival a 30 µg/ml d'anticòs monoclonal i que per tant, una dilució 1/32 equival a 15 µg/ml d'anticòs monoclonal.

Cultius	Temps (hores)					
	57 hores			95 hores		
	Conc. MAbs (µg/ml)	Conc. Cel. (cèls/ml)	Pesp. (µg/cèls)	Conc. MAbs (µg/ml)	Conc. Cel. (cèls/ml)	Pesp. (µg/Cèls)
Cèl·lules transfectades <i>pbhrf-1_IRES_neo</i>	15	14.1	1.064	15	12.7	1.181
Cèl·lules transfectades <i>pbcl-2_IRES_neo</i>	15	14.9	1.007	15	11	1.364
Cèl·lules transfectades <i>pbhrf-1_IRES_puro</i>	15	13.5	1.111	15	12.8	1.172
Cèl·lules transfectades <i>pbcl-2_IRES_puro</i>	15	14.3	1.049	15	9.5	1.579
Cèl·lules transfectades pIRESneo	15	14.4	1.042	15	8.7	1.724

### 5.7- Valoració final

A partir dels resultats obtinguts en els experiments anteriors s'ha pogut constatar que els vectors bicistrònics són una bona eina per modificar genèticament les cèl·lules animals ja que per una banda, permetent una integració adequada del fragment de DNA clonat i per l'altra, garanteixen la generació de línies cel·lulars que expressin establement el gen d'interès.

Els experiment de protecció de l'apoptosi induïda per exhauriment de glutamina en cultius transfectats amb les construccions bicistròniques BHRF-1 i Bcl-2 han evidenciat novament la capacitat protectora d'aquestes proteïnes i a més a més, a diferència de les construccions pcDNA3, s'ha aconseguit relentir encara més la disminució de la viabilitat cel·lular provocada per la manca de nutrients al medi de cultiu (Fig. 5.23) i recuperar la viabilitat de cultius que havien estat sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant 72 hores. Aquest fet fa pensar que molt probablement aquests vectors afavoreixen la integració del gen clonat en alguna zona dels cromosomes amb elevada taxa de transcripció ja que en funció de la regió del genoma on es produeixi la integració, les seqüències transfectades poden ser més o menys expressades.



**Fig. 5.23-** Comparació del perfil de creixement d'un cultiu transfectat amb la construcció bicistrònica *pbhfrf-1\_IRES\_neo* i d'un cultiu amb la construcció monocistrònica *pcDNA3\_bhfrf-1* en medi DMEM al 4% FCS, 3 mg/ml G418 sense glutamina.

A més a més, els experiments d'estabilitat temporal de les construccions bicistròniques han posat de manifest que aquests vectors permeten una integració estable del gen d'interès al llarg de temps, ja que al cap de 46 hores, les cèl·lules transfectades no han perdut la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi, cosa que no succeïa amb les construccions pcDNA3 (apartat 3.6, capítol 3).

Per tant, l'ús de vectors bicistrònics és una opció molt efectiva a l'hora de garantir la integració i l'estabilització del missatge genètic.

Un altre aspecte que s'ha pogut observar és que una vegada obtinguts els clons, aquests expressen establement el gen d'interès sense la necessitat d'exercir una selecció constant amb antibiòtic. Aquest fet és fonamental, sobretot quan es treballa amb volums de cultius propis d'un bioreactor ja que l'addició d'antibiòtic al medi de cultiu faria del tot inviable econòmicament el procés.

A l'hora d'obtenir un millor rendiment en el procés de producció d'anticossos monoclonals, l'estratègia de cultiu també és un factor clau. Tot i que el cultiu en discontinu és el sistema més estès des del punt de vista industrial, bàsicament per la seva simplicitat, és clarament subòptim, ja que al llarg del temps, la composició del medi varia en funció dels nutrients consumits i dels subproductes produïts per les reaccions metabòliques cel·lulars, i a conseqüència d'aquestes variacions en el medi,

el creixement cel·lular és limitat i assolida una certa densitat cel·lular, el cultiu entra en una fase irreversible de mort cel·lular. Per aquest motiu, és fonamental veure com es comporten els hibridomes modificats genèticament en sistemes en continu, com el cultiu en perfusió. El cultiu en perfusió és l'alternativa més adequada a l'hora d'obtenir cultiu de cèl·lules animals amb altes densitats cel·lulars i productivitats específiques més elevades, ja que, en aquest sistema es subministren els nutrients a les cèl·lules i s'eliminen els subproductes cel·lulars de manera constant, reproduint millor les condicions en les quals les cèl·lules subsisteixen *in vivo*. De totes maneres, fins i tot en els cultius en perfusió, com a conseqüència de les elevades densitats cel·lulars assolides, s'arriba a situacions de limitació d'algun dels nutrients essencials per la cèl·lula, iniciant-se així inevitablement la mort cel·lular que condueix a la pèrdua del cultiu [Tintó, 1999; Gàmez, 2000]. Per això, és imprescindible avaluar l'efecte de l'expressió dels gens antiapoptòtics quan les cèl·lules són cultivades en sistemes en perfusió, ja que es podria millorar la productivitat i l'eficiència d'aquest procés. Els resultats obtinguts amb aquest sistema de cultiu estan descrits detalladament al capítol següent (capítol 6).



# CAPÍTOL 6

---

## 6-CULTIUS *IN VITRO* D'HIBRIDOMES MODIFICATS GENÈTICAMENT EN SISTEMES EN CONTINU

### 6.1- Estratègies de cultiu per a cèl·lules animals

Tal i com s'ha mostrat en els capítols anteriors, l'aplicació d'una estratègia genètica basada en l'expressió de gens inhibidors de l'apoptosi en cultius *in vitro* de cèl·lules d'hibridoma ha permès retardar de manera molt efectiva l'aparició de la PCD i recuperar cultius que havien estat sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant 72 hores. A més, la utilització de vectors bicistrònics ha permès assegurar l'estabilitat dels missatges clonats al llarg de temps. Aquest fet és especialment important quan es duen a terme processos de llarga durada, ja que evita una reducció progressiva dels nivells d'expressió de la proteïna d'interès. Per tant, gràcies a les modificacions genètiques realitzades en l'hibridoma KB26.5, s'ha aconseguit mantenir la viabilitat i la productivitat del cultiu durant més temps, augmentant, d'aquesta manera, el rendiment del procés. Un altre aspecte a tenir en compte per millorar el rendiment d'un procés és l'estratègia de cultiu emprada. El cultiu es pot dur a terme de diferents formes:

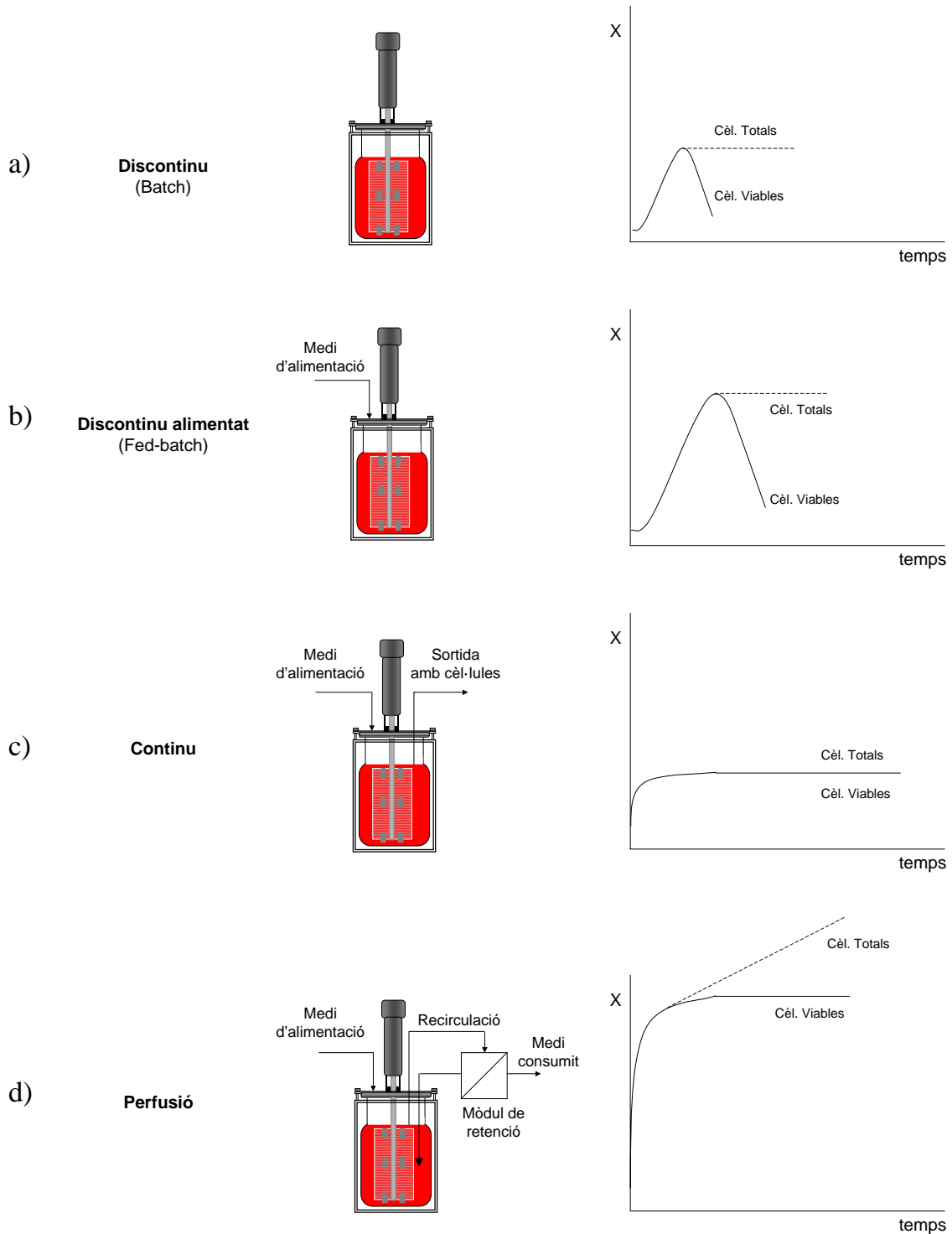
El **cultiu en discontinu (Batch)** (Fig. 6.1a) [Sanfeliu, 1995] és un procediment simple que consisteix en inocular les cèl·lules en un bioreactor amb un medi òptim de creixement. Al llarg del temps, la composició del medi varia en funció dels nutrients consumits i dels subproductes produïts per les reaccions metabòliques cel·lulars. A conseqüència d'aquestes variacions en el medi, el creixement cel·lular és limitat i assolida una certa densitat cel·lular, el cultiu entra en una fase irreversible de mort cel·lular.

En el **cultiu discontinu alimentat (Fed-batch)** (Fig. 6.1b) [Casablanca, 2000; Xie i Wang, 2006], els nutrients necessaris es van addicionant al llarg del temps. L'addició

progressiva d'algun dels nutrients del medi al llarg del cultiu permet eliminar possibles problemes derivats de la inhibició per substrat o l'exhauriment d'algun nutrient, o bé controlar la generació d'un subproducte tòxic. Malgrat l'addició de nutrients, la població cel·lular acaba morint per l'acumulació de metabòlits tòxics produïts per la pròpia cèl·lula. Amb aquest sistema es regula millor el creixement cel·lular, assolint una densitat cel·lular final més gran que el cultiu en discontinu, gràcies al manteniment del cultiu durant més temps.

En el **cultiu continu** (Fig. 6.1c) [Sanfeliu, 1995], el medi és subministrat i extret de forma constant per tal de mantenir el cultiu en estat estacionari, sense canvis en la concentració cel·lular ni en la composició del medi al llarg del temps. Donat que es regula l'aportació de nutrients a la cèl·lula i s'evita l'acumulació de subproductes cel·lulars, s'allarga la durada dels cultius durant mesos. L'inconvenient d'aquest sistema és que la concentració cel·lular és més baixa que en un cultiu en discontinu donat que s'eliminen cèl·lules en la sortida del bioreactor, el producte obtingut és molt diluït i l'estat estacionari és molt inestable ja que pot sofrir pertorbacions.

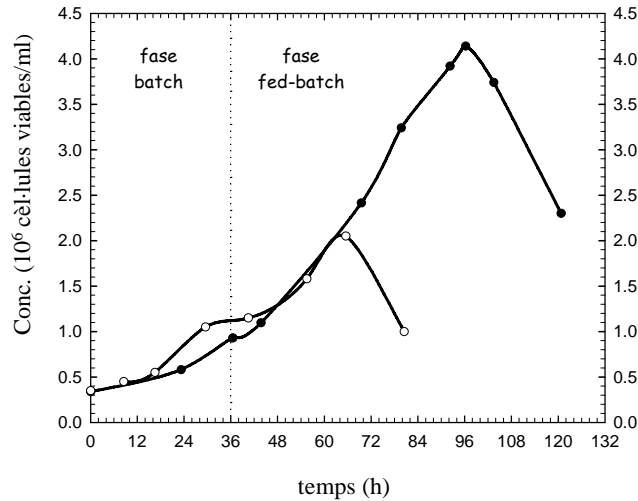
En el **cultiu en perfusió** (Fig. 6.1d) [Tintó, 1999], el medi també és subministrat i extret de forma contínua en el bioreactor, però a diferència del cultiu en continu, les cèl·lules estan retingudes a l'interior del bioreactor, cosa que permet treballar a velocitats de dilució més elevades i per tant, aconseguir concentracions cel·lulars i productivitats molt més grans que les obtingudes en cultius en discontinu. De totes maneres, al llarg del temps al haver-hi concentracions cel·lulars elevades, s'assoleixen condicions limitants, en particular, pel que fa al subministrament d'oxigen i, com a conseqüència, una part de les cèl·lules entren inevitablement en una fase de mort cel·lular.



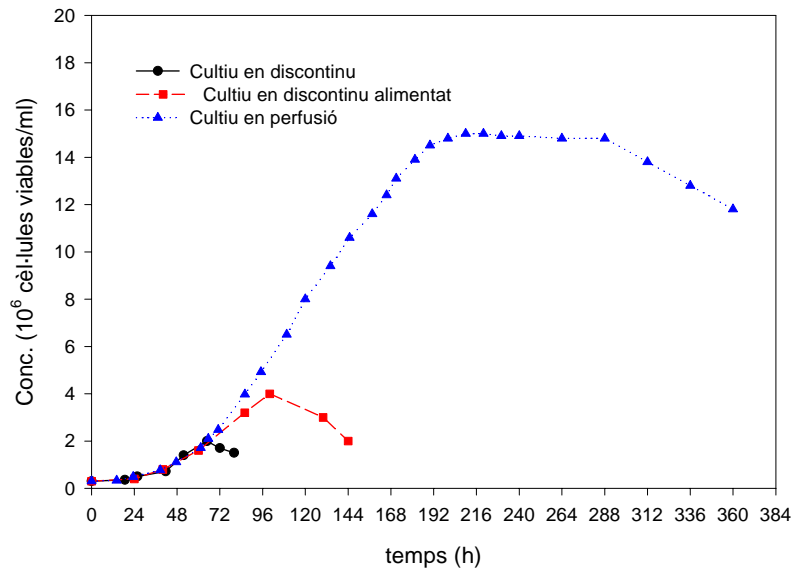
**Fig. 6.1-** Comparació esquemàtica dels perfils típics de creixement de cèl·lules animals en funció de la forma en què es du a terme el cultiu. La 'X' de l'eix de les abscisses representa la concentració de cèl·lules.

Tot i que en el cultiu en continu es subministren els nutrients a les cèl·lules i s'eliminen els subproductes cel·lulars de manera constant, la baixa densitat cel·lular assolida i l'elevat cost de purificació del producte obtingut, el fan poc adequat per a

la producció a escala industrial. Per aquest motiu, els sistemes de cultiu en discontinu, discontinu alimentat o perfusió són una opció interessant, ja que s'obté una concentració cel·lular més elevada malgrat que la població cel·lular acabi entrant en una fase irreversible de mort cel·lular (Fig. 6.2 i Fig. 6.3).



**Fig. 6.2-** Evolució de la concentració de cèl·lules viables d'un cultiu en discontinu alimentat (●) i en discontinu (○) de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 [Casablanca, 2000].



**Fig. 6.3-** Evolució de la concentració de cèl·lules viables d'un cultiu en discontinu, discontinu alimentat i en perfusió de cèl·lules d'hibridoma KB26.5. Es pot veure com el cultiu en discontinu i el cultiu en discontinu alimentat assoleixen una concentració cel·lular d'aproximadament  $2 \times 10^6$  cèl·lules/ml i  $4 \times 10^6$  cèl·lules/ml respectivament, mentre que el cultiu en perfusió pot arribar a  $1.5 \times 10^7$  cèl·lules/ml. També es pot observar que la diferència de durada dels cultius també és notable: un cultiu en discontinu pot durar de l'ordre de 72 h, un discontinu alimentat 144 h, i un cultiu en continu amb perfusió pot durar més de 300 h [Casablanca, 2000; Gàmez, 2000].

Tal i com es pot veure en l'anterior Fig. 6.3 el cultiu en perfusió és el sistema més adequat per produir anticossos monoclonals ja que permet allargar molt la durada del cultiu i obtenir elevades concentracions cel·lulars. Tot i així, de la mateixa manera que succeeix en els cultius en discontinu i discontinu alimentat, en el cultiu en perfusió també es produeix una limitació de nutrients que condueix a la mort per apoptosi de les cèl·lules [Tintó, 1999]. Les elevades concentracions cel·lulars assolides en aquest sistema provoca que els nutrients i l'oxigen esdevinguin limitants i que, al llarg del temps s'assoleixi un estat estacionari, en el que la concentració de cèl·lules viables es manté estable degut a l'equilibri entre el percentatge de cèl·lules que es poden dividir i el de les que entren diàriament a la fase de mort i conseqüentment, es van acumulant a l'interior del bioreactor.

Per aquest motiu, en aquest cas és fonamental avaluar l'efecte de l'expressió dels gens antiapoptòtics, ja que si s'evités l'entrada dels hibridomes en la fase de mort cel·lular, es podria millorar molt la productivitat i l'eficiència del procés. Donat que el cultiu en perfusió és la millor estratègia per aconseguir augmentar considerablement la producció d'anticossos monoclonals, es va decidir dur a terme un cultiu en perfusió amb cèl·lules d'hibridoma KB26.5 modificades genèticament amb el gen *bhrf-1* per tal de veure si s'evitava l'entrada dels hibridomes a la fase de mort cel·lular i d'aquesta forma, millorar encara més el rendiment del procés.

Un altre aspecte que cal tenir en compte a l'hora de treballar en cultius en perfusió és que el fet d'operar en continu durant períodes molt llargs de temps, augmenta la probabilitat que el procés quedi afectat per causes accidentals com ara talls en el subministrament elèctric, d'aigua, etc. Per aquest motiu, paral·lelament al cultiu en perfusió, es va realitzar un cultiu en continu amb les cèl·lules d'hibridoma transfectades amb el gen *bhrf-1* per tal de veure què succeïa quan es provocava un accident, que en aquest cas era l'aturada de l'alimentació del sistema. Tot i que el cultiu en continu no és un procés factible a nivell industrial, com a conseqüència de la baixa densitat cel·lular assolida i l'elevat cost de purificació del producte obtingut, és un bon sistema per estudiar la influència de canvis en les condicions de cultiu sobre el creixement cel·lular, el consum de nutrients i la producció de metabòlits. Els diferents estats estacionaris que es poden anar assolint en un cultiu en continu

permeten avaluar el comportament de les cèl·lules en unes condicions concretes, que no varien amb el temps, a diferència dels cultius en discontinu i en discontinu alimentat.

## 6.2- Cultiu en continu

Tal i com s'ha comentat anteriorment, per tal de veure si l'expressió del gen *bhrf-1* permetia recuperar cultius que, per raons accidentals o per limitacions físiques del sistema, es veien sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi es va portar a terme un cultiu en continu amb cèl·lules d'hibridoma transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo*. Al llarg del cultiu es van provocar una sèrie d'interrupcions en l'alimentació del sistema per engegar el procés d'apoptosi. Com a control, es va utilitzar cèl·lules d'hibridoma transfectades amb el vector nadiu ja que no conferia a la cèl·lula cap avantatge enfront l'apoptosi. El cultiu en continu es van portar a terme en flascons agitats amb un volum de treball de 100 ml (apartat 8.4.1.2.2). La durada del cultiu va ser de 37 dies i es van efectuar una sèrie d'aturades en l'alimentació del sistema que van durar 24, 48 i 72 hores. Les cèl·lules es van inocular a una concentració de  $2 \times 10^5$  cèl·lules/ml i es van deixar créixer en discontinu fins assolir a les 72 hores una concentració de  $12.2 \times 10^5$  cèl·lules/ml en el cas del cultiu transfectat amb el gen *bhrf-1* i de  $12.4 \times 10^5$  cèl·lules/ml pel cultiu control (Fig. 6.4A(a)). A partir de les 72 hores, es va començar a alimentar el sistema amb medi fresc amb 10 mM de glucosa i 3 mM de glutamina (Fig. 6.4A(b)). Les concentracions de glucosa i glutamina emprades són les mínimes per garantir que, en els estats estacionaris, les cèl·lules es trobin al llindar de la limitació de nutrients i d'aquesta manera, poder veure una resposta clara a la pertorbació que s'efectua. La velocitat de dilució utilitzada al llarg del cultiu va ser de  $0.016 \text{ h}^{-1}$ , el que es correspon a un temps de residència de 62.5 hores.

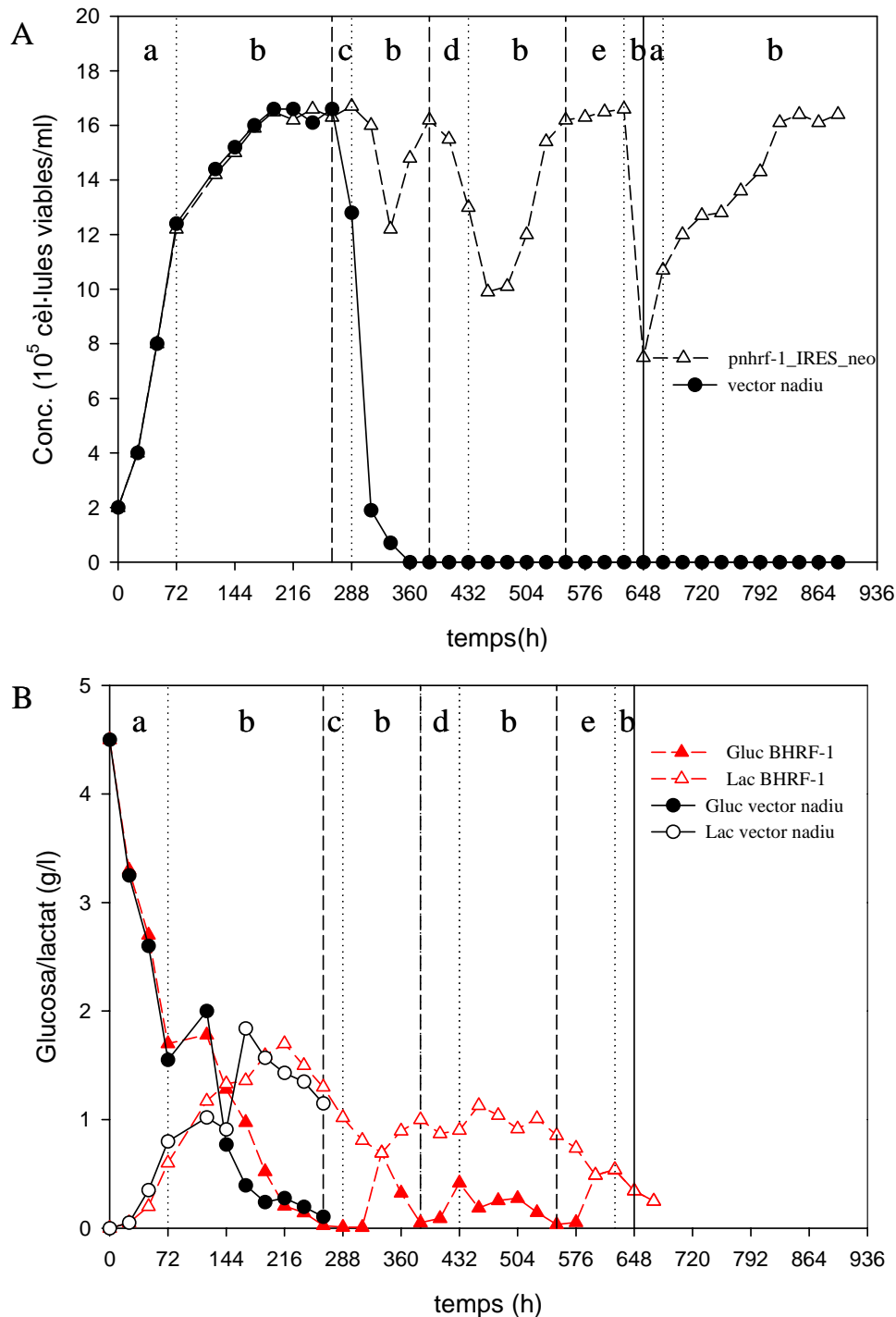
A la Fig. 6.4A es pot veure que quan es comença a alimentar els cultius, el nombre de cèl·lules vives en els dos cultius augmenta fins assolir un nivell estable al voltant de  $16.4 \times 10^5$  cèl·lules/ml i que les cèl·lules han consumit pràcticament tota la glucosa i la glutamina. Després de la primera pertorbació (Fig. 6.4A(c)), la concentració cel·lular del cultiu transfectat amb el gen *bhrf-1* roman constant, mentre que en el cultiu control

decreix assolint un valor de  $12.8 \times 10^5$  cèl·lules/ml. Al restablir l'alimentació del sistema, el cultiu control és incapaç de recuperar-se, en canvi el cultiu que du el gen *bhfr-1* ho fa ràpidament. Al cap de la segona (Fig. 6.4A(d)) i tercera pertorbació (Fig. 6.4A(e)), el cultiu transfectat amb el gen *bhfr-1* també es recupera, però a mesura que la pertorbació és més llarga la recuperació és més lenta, confirmant els resultats obtinguts en els experiments de recuperació (veure apartat 5.4), a on es veia que les cèl·lules que expressaven el gen *bhfr-1* es podien recuperar després d'haver estat sotmeses durant 24, 48 i 72 hores a condicions d'exhauriment de glutamina, però que la recuperació era més lenta com més llarg era el temps d'exposició a condicions inductores de l'apoptosi ja que segurament les cèl·lules estaven més danyades (Fig. 6.5 i Taula 6.1). Tot i així, les cèl·lules que expressen el gen *bhfr-1* encara són capaces de proliferar i repoblar el bioreactor al cap de 72 hores d'haver estat sotmeses a condicions apoptòtiques. Pel que fa al consum de glutamina i a la producció de lactat (Fig. 6.4B), es pot apreciar com la concentració de glucosa va disminuint a mesura que augmenta la concentració de cèl·lules viables, fins assolir un valor mínim final de 0.008 g/l, i la concentració de lactat va augmentant de manera proporcionalment inversa a l'evolució de la concentració de glucosa, arribant a obtenir-se una concentració màxima de 1.7 g/l.

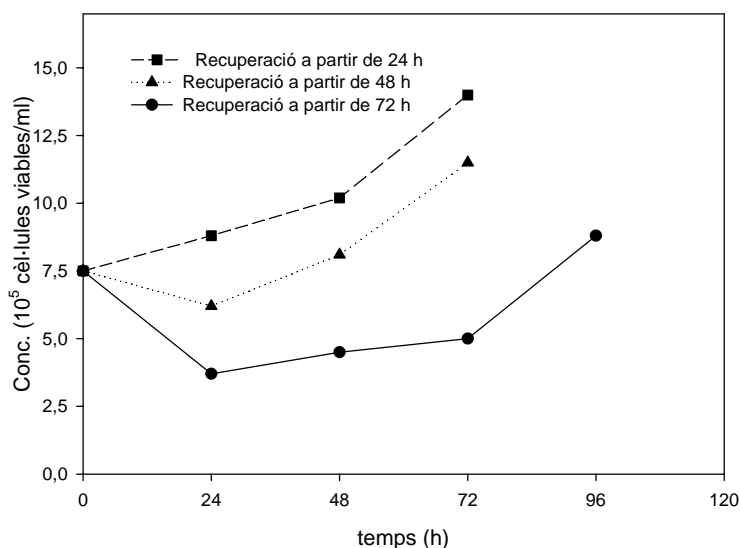
Per tant, totes aquestes dades confirmen de nou la capacitat protectora de la proteïna antiapoptòtica BHRF-1 i que, és possible recuperar cultius d'hibridomes sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant 72 hores, tot i que la recuperació en aquest cas és més lenta. Aquest fet és molt important, ja que si es produeix qualsevol pertorbació en el bioreactor que indueixi l'apoptosi, és possible recuperar el cultiu aproximadament 72 hores després d'haver-se produït l'alteració, mentre que un cultiu no modificat genèticament no es pot recuperar a partir d'una franja al voltant de les 12-24 hores. Per exemple, en el cas d'un cultiu en perfusió i d'un cultiu en discontinu alimentat si fallés el sistema d'alimentació, hi hauria un marge de 72 hores per restablir el sistema. En el cas d'un cultiu en discontinu l'aplicació d'aquesta millora no té gaire sentit ja que, en aquests sistemes degut a la seva simplicitat operacional, el creixement i la durada del cultiu és limitat, i mantenir la viabilitat d'un cultiu que, des d'un bon principi està limitat per la quantitat de nutrients i



l'acumulació de subproductes tòxics per a la cèl·lula no garanteix millorar el rendiment del procés.



**Fig. 6.4-** A- Evolució del nombre de cèl·lules (A) i de la concentració de glucosa i de lactat (B) d'un cultiu en continu de cèl·lules d'hibridoma transfectades amb la construcció *pnhrf-1\_IRES\_neo* i del cultiu control. a- cultiu en discontinu, b- cultiu en continu, c- pertorbació durant 24 hores, d- pertorbació durant 48 hores, e- pertorbació durant 72 hores.



**Fig. 6.5-** Corbes de creixement de les cèl·lules transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo* en un medi òptim, després d'haver estat privades de glutamina durant 24, 48 i 72 hores. Es pot observar que les cèl·lules sotmeses a condicions inductores de l'apoptosi durant 72 hores triguen més temps a recuperar-se que les sotmeses durant 24 hores, concretament, es comencen a recuperar 72 hores després de l'addició de glutamina.

**Taula 6.1-** Recuperació de la viabilitat de les mostres extretes a diferents intervals de temps dels diferents cultius assajats: (+) cultiu que creix en medi amb glutamina (cultiu recuperat), (-) cultiu que es mor en medi amb glutamina (cultiu no recuperat).

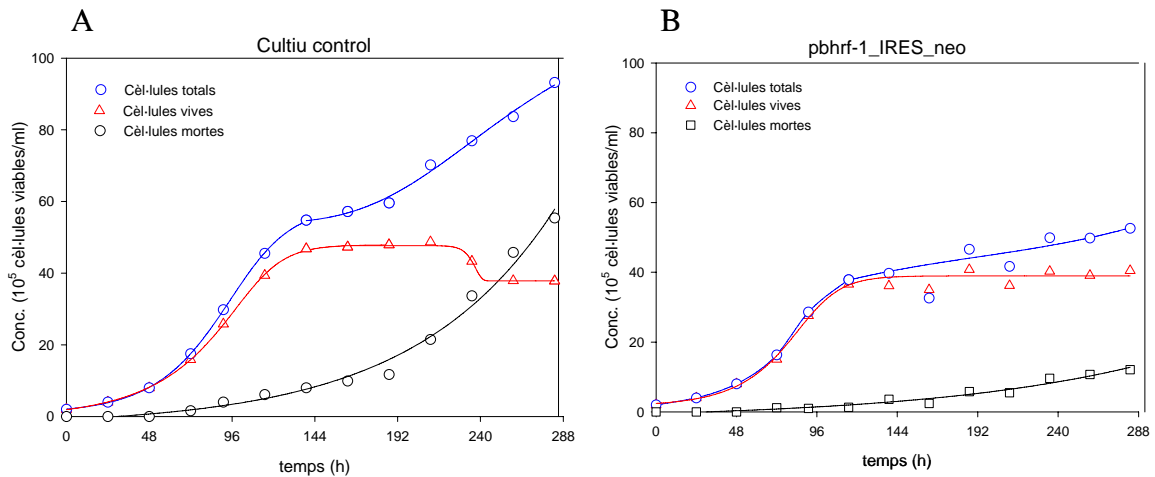
Cultius	Temps (hores)			
	12	24	48	72
Cèl·lules transfectades <i>pbhrf-1_IRES_neo</i>	+	+	+	+
Cultiu control	+	-	-	-

### 6.3- Cultiu en perfusió

En cultius en perfusió de cèl·lules d'hibridoma s'ha observat que el paràmetre que limita la perllongació del procés és l'increment de la concentració de cèl·lules no viables dins els bioreactors [Gàmez, 2000]. És a dir, tot i que es manté una determinada concentració cel·lular, les cèl·lules continuen dividint-se però, al no disposar de tots els recursos necessaris per a la correcta proliferació, augmenta el nombre de cèl·lules mortes i s'arriba a un punt a partir del qual no és possible operar durant més temps. És imprescindible, doncs, reduir el nombre de cèl·lules mortes tot mantenint la densitat de viables. Per aquest motiu, es va dissenyar un experiment amb cèl·lules d'hibridoma transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo* per veure si

s'aconseguia retardar l'aparició de l'apoptosi i d'aquesta manera, disminuir el nombre de cèl·lules mortes. A l'igual que el cultiu en continu, com a control es va emprar cèl·lules d'hibridoma transfectades amb el vector nadiu.

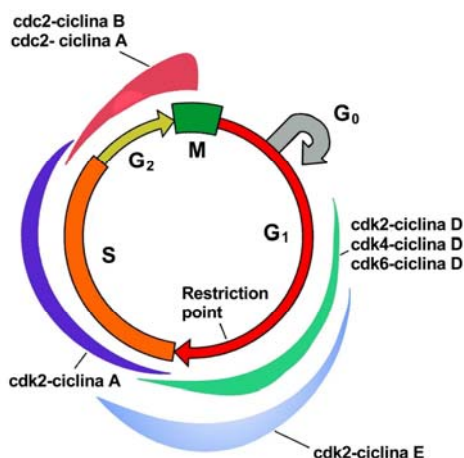
Els cultius es van realitzar en flascons agitats amb un volum de treball de 50 ml i amb un recanvi de medi de cultiu cada 24 hores (veure apartat 8.4.1.2.1). La durada del cultiu va ser de 12 dies i es va realitzar un seguiment de la viabilitat del cultiu. A la Fig. 6.6A i Fig. 6.6B es mostra l'evolució del nombre de cèl·lules viues, mortes i totals del cultiu control i del cultiu que expressa el gen *bhrf-1* respectivament. Es pot observar que tot i que en ambdós cultius es manté una concentració de cèl·lules viables constant, al voltant de  $40 \times 10^5$  cèl·lules/ml, en el cultiu control a diferència del cultiu transfectat amb el gen *bhrf-1*, a partir de les 72 hores comença augmentar dràsticament el nombre de cèl·lules mortes, assolint  $57.9 \times 10^5$  cèl·lules/ml a les 283 hores. Per contra, el cultiu que du el gen *bhrf-1* ateny al final del cultiu només  $12.8 \times 10^5$  cèl·lules mortes. Aquest resultat és molt important, ja que l'expressió del gen *bhrf-1* evitaria l'acumulació de cèl·lules mortes en el bioreactor i en conseqüència, augmentaria la rendibilitat del procés.



**Fig. 6.6-** Evolució del nombre de cèl·lules viables i no viables d'un cultiu en perfusió de cèl·lules d'hibridoma (A) i de cèl·lules transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo* (B).

Per tal de veure si la proteïna BHRF-1 afectava el ritme de divisió cel·lular i d'aquesta manera, evitava el consum desmesurat de nutrients i l'entrada dels hibridomes al procés d'apoptosi es va analitzar en quin estat del cicle cel·lular es trobaven les cèl·lules al llarg del cultiu en perfusió.

En general, dins el bioreactor, les cèl·lules poden trobar-se en tres estats diferents: en procés de divisió; en un estadi anomenat  $G_0$ ; o bé en una etapa terminal on s'executa la mort cel·lular per apoptosi. El progrés entre cadascun d'aquests tres estats es troba lligat a un complex entramat de processos bioquímics [Evan i Littlewood, 1998]. El cicle cel·lular està regulat per senyals que indiquen a la cèl·lula si es donen les condicions adequades per iniciar la divisió cel·lular o bé si existeix la presència d'alguna irregularitat que impedeix la progressió del cicle cel·lular. Quan aquesta anomalia és molt greu es dona l'aturada irreversible del cicle cel·lular i s'inicia el programa apoptòtic. El cicle cel·lular pot dividir-se en quatre fases:  $G_1$ , S,  $G_2$  i M. La transmissió del material genètic requereix d'una acurada replicació del DNA nuclear que es dona en la fase S i d'una correcta segregació de les cromàtides germanes que es produeix a la fase M (Mitosi). Entre el final de la fase M i l'inici de la síntesi del DNA sol haver-hi un interval conegut com a fase  $G_1$ . Durant la fase  $G_1$  la cèl·lula acumula suficients metabòlits i prepara tota la maquinària cel·lular per realitzar la duplicació del DNA. La fase  $G_2$  és el segon interval que separa el final de la síntesi de DNA del començament de la fase M i permet a la cèl·lula preparar-se per la divisió cel·lular. Després de dividir-se, les cèl·lules poden tornar a iniciar el cicle cel·lular a la fase  $G_1$  o entrar a la fase  $G_0$ , de quiescència (Fig. 6.7). Les transicions entre les successives fases del cicle cel·lular són regulades per complexos formats per dues famílies de proteïnes, les Cdks (*Cyclin-dependent protein Kinases*) i les Ciclines (Cyc) que són subunitats reguladores de l'activitat de les proteïnes Cdks.



**Fig. 6.7-** Esquemes de les diferents fases del cicle cel·lular. S'hi indica també els principals dímers Cdk-Ciclina que es formen en cadascuna de les fases. La unió d'una Ciclina a una proteïna Cdk activa l'activitat quinasa d'aquesta. La proteïna Cdk activada pot fosforilar i, conseqüentment, activar diferents substrats implicats en la progressió del cicle cel·lular. Els principals dímers que es formen durant el transcurs del cicle cel·lular són Cdk2, Cdk4 i Cdk6 amb les Ciclines D1, D2 i D3, respectivament, durant la fase  $G_1$ ; Cdk2 i Ciclina E durant la transició de  $G_1$  a la fase S; Cdk2 i Ciclina A durant la fase S; Cdc2 (també anomenada Cdk1) i Ciclina A per passar de  $G_2$  a la fase M, i Cdc2 i Ciclina B durant les diferents etapes de la fase M (profase, metafase, anafase i tel·lofase) [Morgan, 1995; Nigg, 1995].

Al llarg del cicle cel·lular existeixen uns punts de control, que s'asseguren que la cèl·lula hagi completat una fase per iniciar-ne una altra. Hi ha, però, un punt de control previ, aquell on la cèl·lula pren el compromís de dividir-se [Hartwell i Unger, 1977]. Aquest punt es troba en algun lloc de la fase G1 i està sota el control de la proteïna del gen del retinoblastoma (pRb) [Pardee, 1989; Weinberg, 1995]. Un cop superat aquest punt, la cèl·lula completa el cicle fins arribar a la divisió mitòtica, sempre que no es produeixi un accident que dispari l'alarma d'algun dels punts de control [Hartwell i Weinert, 1989]. pRb és una proteïna que, a més de posseir una activitat com a factor de transcripció, exerceix el control sobre la progressió del cicle cel·lular gràcies a la seva capacitat de segrestar factors de transcripció necessaris per induir els elements que calen per a la síntesi de DNA. La seva estructura inclou una butxaca d'unió (*binding pocket*) amb la qual pot unir i inactivar factors de transcripció com el c-Myc i E2F [Helin i col., 1992; Helin i col., 1993]. Molts elements necessaris per a la proliferació cel·lular tenen seqüències d'unió per E2F a les seves regions promotores [Dalton, 1992].

La capacitat de pRb d'unir i inactivar c-Myc i E2F està regulada per fosforilació. pRb té diversos punts de fosforilació, alguns dels quals són a prop de la butxaca d'unió. La fosforilació d'aquests punts inhibiria la capacitat d'unió de pRb a c-Myc i E2F, cosa que permetria exercir la seva funció. Durant la major part de la fase G1, pRb es manté hipofosforilat i segresta c-Myc i E2F. Normalment, en el moment en què la cèl·lula ha de superar el punt de control de G1 i progressar cap a la fase S es produeix la fosforilació de pRb i l'alliberament dels factors segrestats [Buchkovich i col., 1989]. El gen del retinoblastoma va ser el primer gen supressor descrit [Knudson, 1971]. De la fosforilació de pRb se n'encarreguen Cyc/Cdks, particularment els complexos Ciclina D/Cdk4 i Ciclina E/Cdk2 [Hinds i col., 1992]. Aquests complexos es poden considerar holoenzims en què la subunitat catalítica és la Cdk i la subunitat reguladora és la Ciclina [Matsushime i col., 1992]. L'activitat de les Cdks també està regulat per fosforilació. A la vegada, els complexos Cyc/Cdks es regulen negativament per l'acció dels inhibidors dels Cdks, Cdkis (*Cdk inhibitors*), dels quals se'n coneixen dues grans famílies, la de p12, que inclou p27 i p57 [El-Deiry i col., 1993;

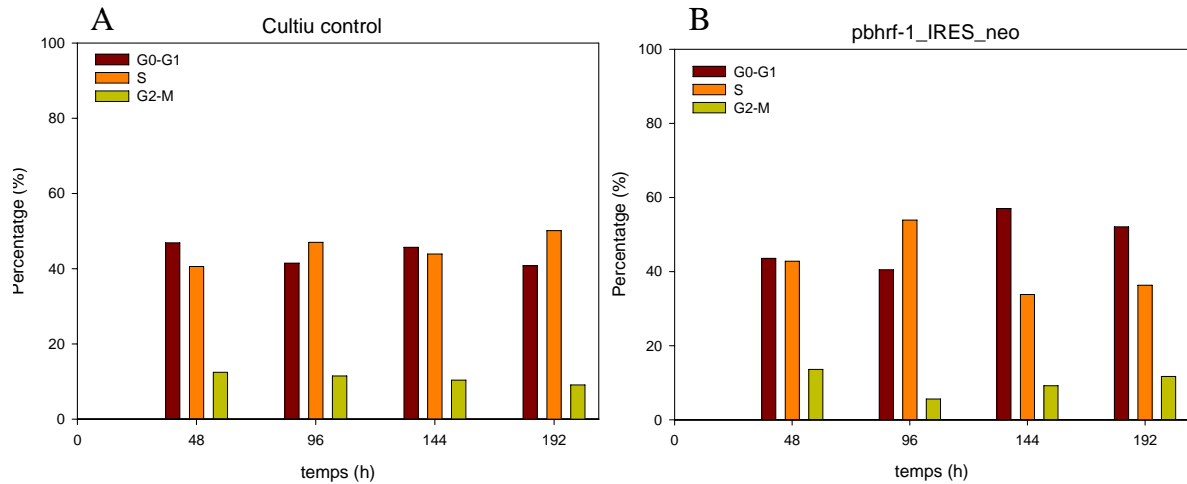
Harper i col., 1993; Polyak i col., 1994; Lee i col., 1995], i la p16 que es completa amb p15, p18 i p19 [Serrano i col., 1993; Hannon i Beach, 1994; Guan i col., 1994; Guan i col., 1996].

Anant més lluny en els mecanismes de control del cicle, es troben els elements que poden regular els inhibidors de les Cdks (Cdkis). Es sap que p21 respon a la inducció de p53 nadiua, no mutada, i que participa en l'aturada del cicle que es produeix després de lesions del DNA [El-Deiry i col., 1993; El-Deiry i col., 1994] i tant p12 com p27 responen a la inducció pel TGF- $\beta$  (factor anti-mitogènic) [Reynisdottir i col., 1995; Datto i col., 1995].

Del complex mecanisme que permet a la cèl·lula avaluar el seu estat intern, es coneix el responsable de la resposta a aquests senyals: la proteïna p53, que pot respondre a certs senyals intracel·lulars que indiquen la presència d'errades o danys en el DNA, o l'existència de desajustaments metabòlics, com per exemple situacions d'anòxia [Kastan i col., 1991; Lane, 1992; Graeber i col., 1996; Woo i col., 1998]. Si l'aturada del cicle cel·lular es dona abans de passar el punt de control i l'alteració cel·lular no és gaire greu, la cèl·lula disposa d'un cert període de temps per corregir-la i, a continuació, seguir la seva progressió cap a la fase S [Gao i Zelenka, 1997].

Per contra, si l'alteració s'ha donat després del punt control o s'ha detectat la presència de danys cel·lulars extremadament greus, p53 actua sobre p21 induint una parada irreversible del cicle cel·lular i, a més, indueix l'inici de l'apoptosi mitjançant la regulació de la transcripció de determinats gens [Pellegata i col., 1996; Sakamuro i col., 1997; Gervais i col., 1998]. La seva acció proapoptòtica es dona sobreexpressant el gen que codifica per la proteïna Bax i reprimint l'expressió del protooncogen Bcl-2, d'aquesta manera contribueix a la inducció de l'apoptosi a través de la via mitocondrial [Evan i Littlewood, 1998; Reed i Paternostro, 1999].

A la Fig. 6.8A i Fig. 6.8B es mostren els resultats obtinguts en l'anàlisi del cicle cel·lular a les 48, 96, 144 i 192 hores d'un cultiu en perfusió de cèl·lules d'hibridoma (control) i d'un cultiu de transfectat amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo*.



**Fig. 6.8-** Anàlisi del cicle cel·lular d'un cultiu en perfusió de cèl·lules d'hibridoma (A) i de cèl·lules d'hibridoma transfectades amb la construcció *pbhrf-1\_IRES\_neo* (B).

Si s'observa la Fig. 6.6 i la Fig. 6.8 es pot veure que a les 48 i 96 hores de cultiu, les cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf-1* i el cultiu control es comporten de manera similar i que el percentatge de cèl·lules que es troben en les diferents fases del cicle cel·lular és similar en ambdós cultius. En canvi, a partir de les 144 hores, les cèl·lules que expressen el gen *bhrf-1* presenten un percentatge de cèl·lules en estat G0-G1 més elevat que el cultiu control. Concretament, a les 144 i 192 hores hi ha un 57% i 52.1% de cèl·lules en fase G0-G1 respectivament, a diferència del cultiu control que mostra un 45.7% i un 40.8%. A més, si s'observa en aquest mateix període de temps, el percentatge de cèl·lules que es troben en la fase S, el cultiu control presenta un 43.9% i un 50.1% de cèl·lules que estan duplicant el seu material genètic, en canvi, el cultiu transfectat amb el gen *bhrf-1* té un 33.8% i un 36.3%. L'aturada del cicle cel·lular en la fase G0-G1 podria explicar el fet que en el cas del cultiu transfectat amb el gen *bhrf-1* apareixen poques cèl·lules mortes en comparació amb el cultiu control. Segurament aquesta aturada provoca l'alentiment del cicle cel·lular, de manera que les cèl·lules aprofiten millor els seus recursos, evitant el consum desmesurat de nutrients i en conseqüència, l'acumulació en excés dels subproductes del metabolisme que condueixen a la mort dels cultius.

Per tant, gràcies a l'expressió del gen antiapoptòtic *bhrf-1* s'ha aconseguit aturar el creixement cel·lular de l'hibridoma KB26.5, de manera que les cèl·lules no

malbaraten els seus recursos i a la vegada protegir les cèl·lules de la inducció de la mort per apoptosi.

#### 6.4- Valoració final

A partir dels resultats obtinguts s'ha vist que l'aplicació d'una estratègia d'inhibició genètica de l'apoptosi en cultius en perfusió permet reduir considerablement el nombre de cèl·lules mortes en el cultiu, tot mantenint la densitat de cèl·lules viables. Aquest fet és molt important, ja que gràcies a l'expressió del gen antiapoptòtic *bhrf-1* es pot allargar la durada del cultiu i en conseqüència, augmentar els nivells de producció del procés. També s'ha observat que, en els cultius en perfusió, aquesta disminució de cèl·lules mortes coincideix amb un alentiment del cicle cel·lular dels hibridomes. Al analitzar en quin estat del cicle cel·lular es trobaven les cèl·lules modificades genèticament amb el gen *bhrf-1*, es va veure que un 57% es trobaven aturades en la fase G0-G1 mentre que el cultiu control només en tenia un 45.7%. Aquest resultat va fer pensar que, possiblement la proteïna BHRF-1 actua directament sobre el cicle cel·lular i no sobre la via mitocondrial, ja que semblaria que, en condicions anòmales (limitació de nutrients), afavoreix que les cèl·lules es mantinguin en la fase G0-G1, la qual cosa impediria l'activació de l'apoptosi. És a dir, és com si aparegués un punt del control del cicle prèviament alterat en l'hibridoma, com a conseqüència de la seva naturalesa tumoral, i que ara que s'expressa la proteïna BHRF-1, aquest control està de nou actiu i no deixa que les cèl·lules progressin de la fase G1 a les altres fases del cicle cel·lular.

Per tant, la sobreexpressió del gen *bhrf-1* té un efecte molt significatiu sobre la inhibició de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5. Aquesta inhibició es podria produir impedint la proliferació del cicle cel·lular i no a través del bloqueig de la via mitocondrial. Segurament, l'entrada dels hibridomes a la fase G0 evitaria que davant d'una situació anòmala de cultiu, les cèl·lules engegessin el programa apoptòtic. En canvi, una cèl·lula d'hibridoma en contínua divisió, al detectar un problema en les condicions de cultiu, iniciaria l'apoptosi possiblement via p53. A la Fig. 6.9 es mostra un esquema de les possibles interaccions de la proteïna BHRF-1 amb altres proteïnes



del cicle cel·lular i de la via apoptòtica. Treballs realitzats amb altres proteïnes antiapoptòtiques com ara Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w i E1B19K també han mostrat que aquestes retarden l'entrada de les cèl·lules a la fase S i que per tant, en aquest sentit actuen igual que BHRF-1 (Fig. 6.10) [Zinkel i col., 2006; Bonnefoy-Berard i col., 2004]. En aquests estudis es va veure que quan l'expressió del gens *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>* aturava les cèl·lules en G<sub>0</sub>, el nivell d'expressió de la proteïna inhibidora del cicle cel·lular p27 era més elevat que el de una cèl·lula normal, i que aquesta proteïna retardava l'activació dels complexos Cyc/Cdks, concretament CycE/Cdk2 i CycD/Cdk4, els quals són les responsables de la fosforilació de la proteïna pRb i en conseqüència, de la progressió del cicle cel·lular.

Per tant, de cares al futur caldria esbrinar exactament quin és el mecanisme molecular pel qual BHRF-1 provoca l'aturada del cicle cel·lular i quina relació té aquesta proteïna amb altres proteïnes antiapoptòtiques com ara Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>.

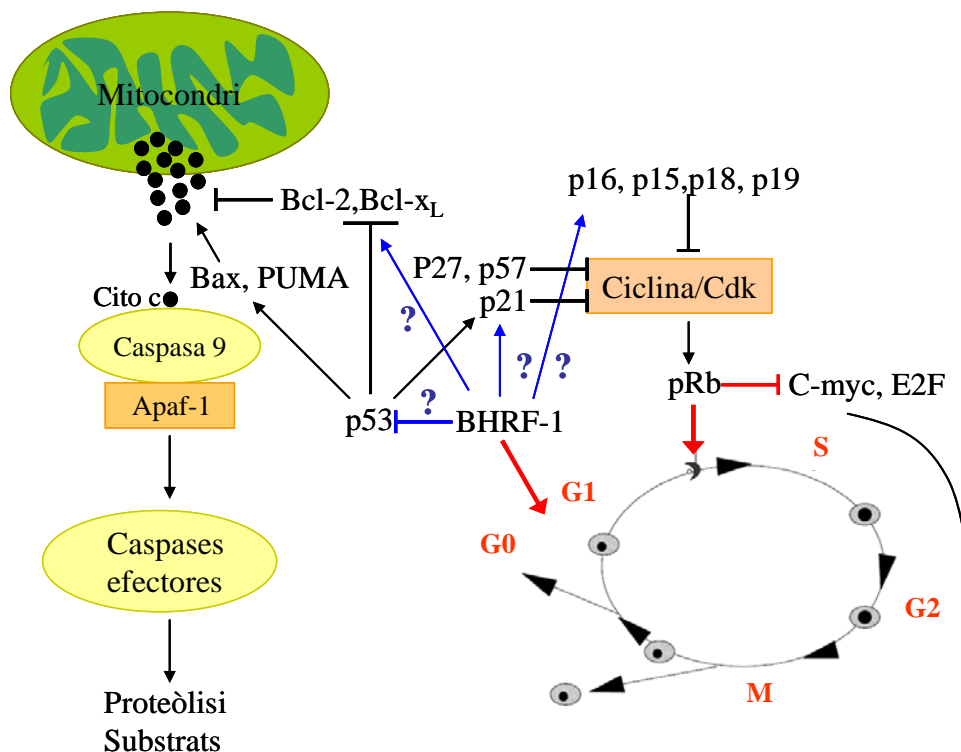
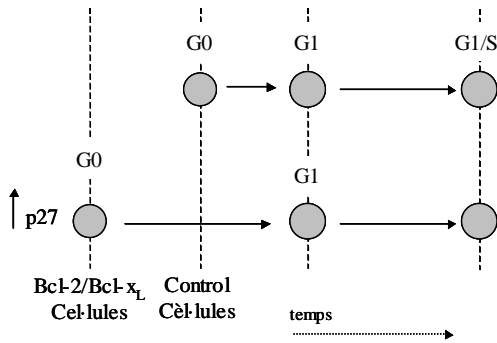


Fig. 6.9-Esquema del possible mecanisme d'actuació de la proteïna BHRF-1.



**Fig. 6.10**-Esquema del retard en la progressió del cicle de les cèl·lules modificades genèticament amb el gen *bcl-2* i *bcl-x<sub>L</sub>*. L'aturada en G0 coincideix amb concentracions elevades de la proteïna p27, la qual regula negativament els complexos Cyc/Cdks, impedit la proliferació del cicle. En aquest cas l'activació dels complexos CycE/Cdk2 i CycD/Cdk4 era retardada [Zinkel i col., 2006].

En resum, en aquest capítol es demostra la importància que per als cultius productius representa la modificació genètica del BHRF-1 enfront de limitacions nutricionals, accidents i estratègies operacionals. A més a més, permet entreveure que aquest fenomen és possiblement motivat per l'efecte del gen inserit sobre el cicle cel·lular.

# CONCLUSIONS

# CAPÍTOL 7

---

## 7-CONCLUSIONS

En l'actualitat, el cultiu *in vitro* de cèl·lules animals en sistemes en discontinu o discontinu alimentat, són l'opció més emprada a nivell industrial per obtenir biomolècules d'elevat interès terapèutic. Malgrat la seva simplicitat d'operació, en aquests sistemes les cèl·lules sempre es troben sotmeses a un ambient canviant en el que les condicions de cultiu són poc favorables: presència de concentracions excessivament elevades de diferents nutrients al principi del cultiu i acumulació de productes tòxics en els estadis finals del cultiu. Precisament aquest fet fa que quan la concentració d'algun dels nutrients és massa baixa o algun subproducte s'acumula fins assolir nivells de toxicitat, la població cel·lular atura el seu creixement i el cultiu inicia una ràpida i irreversible fase de mort [Sanfeliu, 1995].

Com alternativa a aquests sistemes, existeixen els cultius en perfusió. En aquests tipus de cultius s'assoleix un estat estacionari que permet regular de manera òptima l'aportació de nutrients a la cèl·lula i evitar l'acumulació de subproductes cel·lulars, permetent allargar la durada dels cultius durant mesos. De totes maneres, l'elevada densitat cel·lular assolida en aquests sistemes, provoca la limitació de nutrients que condueix a la mort per apoptosi del cultius [Tintó, 1999]. A més a més, el fet d'operar en continu durant llargs períodes de temps, augmenta la probabilitat que el procés quedi afectat per causes accidentals que provoquin l'entrada dels cultius en la fase de mort cel·lular. Per aquest motiu, en aquesta tesi s'han aplicat estratègies genètiques per inhibir l'aparició de l'apoptosi, tant per allargar la durada dels cultius en discontinu, i així augmentar el període de producció de la substància d'interès, com per garantir la persistència dels cultius en perfusió, fins i tot, davant d'accidents operacionals. L'objectiu final és aconseguir cèl·lules resistents a l'apoptosi que evitarien l'enorme pèrdua de rendibilitat que es dona quan el cultiu entra en la fase de mort cel·lular.

Gràcies al coneixement exhaustiu de l'apoptosi i de la importància de la inhibició de la via de les Caspases en les seves etapes preliminars, en aquest treball s'han proposat dues possibles vies d'actuació, una que consisteix en inhibir l'actuació de la Caspasa 3, mitjançant l'expressió de la proteïna inhibidora P35 i l'altra que es centra a nivell de l'alliberament del Citocrom c del mitocondri, sobreexpressant gens de la família Bcl-2, concretament, *bcl-2*, *bcl-xL*, *bhrf-1* i *ksbcl-2*. A partir dels resultats obtinguts s'ha vist que l'aplicació d'una estratègia d'inhibició genètica dirigida a nivell del mitocondri ha permès retardar de manera molt efectiva l'aparició de l'apoptosi i recuperar cultius que havien estat sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant 72 hores. Entre els diferents gens assajats, els resultats més positius s'han obtingut amb la proteïna BHRF-1. En canvi, l'expressió de la proteïna P35 no ha permès protegir les cèl·lules enfront l'apoptosi. De totes maneres, l'expressió d'aquest gen no evitaria la sortida del Citocrom c al citoplasma, només impediria l'activació de determinades Caspases i segurament, que l'apoptosi es desencadena per vies alternatives. En aquest cas l'acció conjunta de més d'una proteïna sobre les diferents Caspases probablement seria l'opció més efectiva.

També s'ha observat que després d'un cert període de manteniment de la resembra, les cèl·lules transfectades perden la capacitat de protegir-se contra l'apoptosi, ja que l'expressió del gen antiapoptòtic s'acaba silenciament. Per aquest motiu, és necessari l'ús de vectors que expressin el gen d'interès al llarg del temps. Una possibilitat per garantir l'estabilització del missatge genètic és l'ús de vectors multicistronicos, els quals permeten la transcripció conjunta i consecutiva del gen d'interès i del marcador de selecció en el mateix missatge. Els resultats obtinguts amb aquest tipus de vectors, han mostrat que els vectors bicistronicos són una bona eina per modificar genèticament les cèl·lules animals ja que per una banda, permetent una integració adequada del fragment de DNA clonat i per l'altra, garanteixen la generació de línies cel·lulars que expressin establement el gen d'interès. Aquest fet és molt important, sobretot quan s'opera en bioreactors durant períodes molt llarg de temps. Un altre aspecte que s'ha pogut constatar amb l'ús d'aquests vectors és que una vegada obtinguts els clons, aquests expressen establement el gen d'interès sense la necessitat

d'exercir una selecció constant amb antibiòtic. Aquesta dada és fonamental, sobretot quan es treballa amb volums de cultius propis d'un bioreactor ja que l'addició d'antibiòtic al medi de cultiu faria del tot inviable econòmicament el procés.

En aquest cas, seria interessant valorar en un futur en quin lloc del genoma s'ha produït la integració del gen antiapoptòtic, ja que es podria, per exemple, resoldre els problemes relacionats amb la integració del DNA que presenta l'enginyeria cel·lular.

Un problema afegit a l'hora de modificar genèticament les cèl·lules d'hibridoma era la baixa eficiència de transfecció d'aquesta línia cel·lular. En aquest treball s'han provat diferents mètodes fisicoquímics (lipofecció, electroporació i coprecipitats adenovirus-DNA) i els virus adenoassociats com a vector víric. Els resultats han evidenciat que les cèl·lules d'hibridoma es resisteixen a ser transfectades, obtenint-se eficiències de transfecció molt baixes de l'ordre d'un 2.9% i 0.85% pel sistema de lipofecció i electroporació respectivament. Tot i així, el mètode basat en la formació de coprecipitats adenovirus-DNA ha permès obtenir un eficiència de transferència gènica del 8%, resultat molt positiu sobretot quan es tracta d'una línia cel·lular tan difícil de transfectar.

A l'hora d'obtenir un millor rendiment en el procés de producció d'anticossos monoclonals, l'estratègia de cultiu també és un factor clau. El cultiu en perfusió és l'alternativa més adequada a l'hora d'obtenir cultiu de cèl·lules animals amb altes densitats cel·lulars i productivitats específiques més elevades, ja que, en aquest sistema es subministren els nutrients a les cèl·lules i s'eliminen els subproductes cel·lulars de manera constant, reproduint millor les condicions en les quals les cèl·lules subsisteixen *in vivo*. De totes maneres, tal i com s'ha comentat anteriorment, fins i tot en els cultius en perfusió, com a conseqüència de les elevades densitats cel·lulars assolides, s'arriba a situacions de limitació d'algun dels nutrients essencials per la cèl·lula, iniciant-se així inevitablement la mort cel·lular que condueix a la pèrdua del cultiu. Per aquest motiu, també s'ha avaluat en aquest tipus de cultiu, l'efecte de l'expressió dels gens antiapoptòtics. A partir dels resultats obtinguts s'ha vist que l'expressió del gen antiapoptòtic *bhrf-1* permet reduir considerablement el

nombre de cèl·lules mortes en el cultiu, tot mantenint la densitat de cèl·lules viables. Aquest fet és molt important, ja que es pot allargar la durada del cultiu i en conseqüència, augmentar els nivells de producció del procés. També s'ha observat que, en els cultius en perfusió, aquesta disminució de cèl·lules mortes coincideix amb un alentiment del cicle cel·lular dels híbridomes, suggerint que probablement la proteïna BHRF-1 actua directament sobre el cicle cel·lular i no sobre la via mitocondrial, ja que semblaria que, en condicions anòmales (limitació de nutrients), afavoreix l'entrada de les cèl·lules a l'estat de quiescència (fase G0), la qual cosa impediria l'activació de l'apoptosi.

Un altre aspecte que cal tenir en compte a l'hora de treballar en cultius en perfusió és que el fet d'operar en continu durant períodes molt llargs de temps, augmenta la probabilitat que el procés quedi afectat per causes accidentals com ara talls en el subministrament elèctric, d'aigua, etc. Per això, també s'ha realitzat un cultiu en continu amb les cèl·lules d'híbridoma transfectades amb el gen *bhrf-1* per tal de veure què succeïa quan es provocava un accident, que en aquest cas era l'aturada de l'alimentació del sistema. El resultat ha evidenciat que és possible recuperar cultius d'híbridomes sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant 72 hores.

Per tant, la intervenció genètica realitzada sobre l'híbridoma KB26.5 ha permès per una banda retardar la mort per apoptosi dels cultius cel·lulars, augmentant així la productivitat del procés, i per l'altra ajudar a superar situacions accidentals que es puguin donar ocasionalment en els cultius, inhibint l'apoptosi durant com a màxim 72 hores, per garantir així la supervivència de les cèl·lules mentre s'intenta solucionar el problema i normalitzar de nou les condicions del cultiu.

Tots aquests resultats obren les portes a la creació de cèl·lules d'híbridoma resistents a l'apoptosi per a la producció d'anticossos monoclonals, la qual cosa suposaria una millora important en el rendiment del procés. Per tal d'evitar de modificar genèticament cada línia cel·lular d'híbridoma, caldria valorar la possibilitat d'actuar directament sobre la cèl·lula tumoral (NSO) precursora de l'híbridoma, que és la que



aporta a la cèl·lula la capacitat de reproduir-se indefinidament, mentre que el limfòcit B determina el tipus d'anticòs produït.

Gràcies als resultats obtinguts en els cultius en perfusió cal plantejar-se en un futur l'estudi del mecanisme d'actuació de la proteïna BHRF-1 sobre el cicle cel·lular ja que aquesta proteïna evita la proliferació cel·lular, afavorint l'entrada de les cèl·lules en la fase G0. En aquest cas, semblaria que els híbridomes modificats genèticament han restaurat un punt de control del cicle cel·lular, prèviament alterat com a conseqüència de la naturalesa tumoral d'aquestes cèl·lules, el qual impediria la divisió cel·lular davant d'una situació anòmla de cultiu. Per comprovar aquesta hipòtesi caldria veure què succeeix quan les cèl·lules precursors dels híbridomes (cèl·lula tumoral NSO i limfòcit B) són cultivades en sistemes en perfusió. En el cas de la cèl·lula tumoral s'esperaria una resposta similar a l'híbridoma ja que té els punts del control del cicle cel·lular alterats, però en canvi, pel que fa el limfòcit B s'hauria d'observar un comportament similar a l'híbridoma modificat genèticament ja que disposa de tots els punts de control. El fet de conèixer en profunditat el mecanisme molecular pel qual és dóna la restauració de punts de control que han estat alterats podria retardar l'evolució de la cèl·lula normal a cèl·lula cancerosa, i d'aquesta manera establir una possible via d'actuació per a la teràpia contra el càncer. De la mateixa manera que BHRF-1, hi ha altres gens de la família Bcl-2 que estan involucrats tant en la progressió del cicle cel·lular de la fase G0-G1 a S com en el control de l'apoptosi [Bonney-Berard i col., 2004, Zinkel i col., 2006]. Per tant, conèixer els nivells d'expressió i la relació dels diferents gens implicats en ambdós processos podria ser essencial a l'hora de dissenyar possibles dianes per a la teràpia antitumoral.

# MATERIALS I MÈTODES

---

# CAPÍTOL 8

---

## 8-MATERIALS I MÈTODES

### 8.1- Material biològic

#### 8.1.1- Línies cel·lulars

##### 8.1.1.1- Línia cel·lular d'hibridoma KB26.5

En aquest treball s'ha emprat la línia cel·lular d'hibridoma KB26.5 que prové de la fusió de cèl·lules de mieloma NS1 i limfòcits B de la soca de ratolí Balb C. Aquesta línia cel·lular produeix un anticòs monoclonal IgG<sub>3</sub> dirigit contra l'antigen A<sub>1</sub> d'eritròcits humans. Aquest anticòs és utilitzat en la determinació del grup sanguini del sistema ABO humà.

Aquesta línia cel·lular va ser cedida pels Laboratoris Knickerbocker (Barcelona) a la Universitat Autònoma de Barcelona amb finalitats experimentals.

##### 8.1.1.2- Línia cel·lular 293-N

En el desenvolupament d'aquest treball, per tal de comprovar la funcionalitat d'unes construccions plasmídiques amb la proteïna GFP es va utilitzar una altra línia cel·lular anomenada 293-N. Les cèl·lules 293-N procedeixen de ronyó d'embrió humà i, a diferència dels hibridomes, són cèl·lules adherents.

#### 8.1.2- Soques bacterianes

*E. coli* HB101, soca receptora per a l'obtenció i amplificació dels plasmidis construïts en aquest treball.

El seu genotip és: F<sup>-</sup> *mcrB*, *mrr*, *hsdS20* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*), *recA13*, *leuB6*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *xyl-5*, *mtl-1*, *rpsL20* (*Sm<sup>r</sup>*), *supE44* λ.

## 8.2- Medis de cultiu

### 8.2.1- Medi de cultiu per a la línia cel·lular KB26.5 i 293-N

El medi base que s'utilitza per al cultiu de les dues línies cel·lulars és el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Aquest medi comercial conté sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement cel·lular. La seva composició es detalla a la Taula 8.1.

Per a la preparació del medi base cal fer una solució amb els components següents:

DMEM (Biological Industries, 1 1-055-1K)	13.83 g
L-Glutamina (Sigma, G-5863)	0.292 g
NaHCO <sub>3</sub> (Panreac)	3.7g
H <sub>2</sub> O ultrapura (Obtinguda en un aparell d'ultrafiltració Milli-Q Plus, Millipore)	1 litre

Per realitzar experiments en què es necessita un medi sense glutamina s'utilitza DMEM (Sigma D5030), ja que aquest medi no conté glucosa, glutamina, NaHCO<sub>3</sub> ni roig de fenol. Cal utilitzar la formulació següent:

DMEM (Sigma, D5030)	8.32g
Glucosa (Panreac)	4.5g
Roig de fenol (Sigma, P-5530)	0.015g
NaHCO <sub>3</sub> (Panreac)	3.7g
H <sub>2</sub> O ultrapura	1 litre

Els medis s'esterilitzen per filtració mitjançant membranes de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millipore, Sterivex-GP) a l'interior d'una cambra de flux vertical (Telstar, AV-100).

Per impulsar el medi s'utilitza una bomba peristàltica (Masterflex, 7521-45) amb un capçal (Masterflex, Easy-Load 7518-00).

**Taula 8.1.** Composició del medi DMEM (Biological Industries, 11-055-1K).

COMPONENTS	MG/ L
<b>Sals inorgàniques</b>	
CaCl <sub>2</sub>	200
Fe(NO <sub>3</sub> ) · 9H <sub>2</sub> O	0.1
KCl	400
MgSO <sub>4</sub>	97.67
NaCl	6400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125
<b>Aminoàcids</b>	
L-Arginina · HCl	84
L-Cistina · 2HCl	62.57
L-Glutamina	584
Glicina	30
L-Histidina · HCl · H <sub>2</sub> O	42
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
L-Lisina · HCl	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptòfan	16
L-Tirosina (sal disòdica)	104.2
L-Valina	94
<b>Vitamines</b>	
D-Àcid pantotènic (sal càlcica)	4
Colina, clorur	4
Àcid fòlic	4
Inositol	7.2
Nicotinamida	4
Piridoxal · HCl	4
Riboflavina	0.4
Tiamina · HCl	4
<b>Altres components</b>	
Glucosa	4500
Roig de fenol	15

El control del pH es realitza amb el tampó  $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$  que requereix la utilització d'una atmosfera de  $\text{CO}_2$  amb valors que oscil·len entre el 5-10%. El valor del pH de la solució final ha de ser proper a 7.1. El roig de fenol és l'indicador de pH present al medi DMEM. El medi esdevé rosa quan el pH és superior a 7.6, vermell si el pH es troba entre 7.6 i 7.0, taronja quan varia entre 7.0 i 6.6, i groc quan es troba per sota de 6.6.

Aquest medi base cal suplementar-lo amb sèrum fetal de vedella (FCS, *Fetal Calf Serum*), concretament, amb un 4% (v/v) de FCS per als híbridomas, i un 10% (v/v) de FCS per a les cèl·lules 293-N. I finalment, en el medi de cultiu s'ha d'afegir 0.05 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma), a partir d'una dissolució mare de 0.1 M i 0.002 UI/ml insulina (Actrapid HM Novo) a partir d'una dissolució mare 4 UI/ml. Aquestes dues últimes solucions, s'esterilitzen per filtració. Un cop preparat el medi de cultiu, aquest es manté a 4°C en absència de llum durant un període no superior a dos mesos.

El sèrum (Hyclone) aporta elements traça, factors de creixement i altres biomolècules no definides, essencials per al creixement de molts tipus de cèl·lules animals. Prèviament a la seva utilització cal procedir a la inactivació del complement que hi pugui haver en el sèrum. El complement és un conjunt de proteïnes presents a la fracció globulínica del sèrum que actuen com a elements inespecífics del sistema immunitari i que poden provocar lisi cel·lular. Les proteïnes del complement, a diferència de les immunoglobulines, són termosensibles, per aquest motiu cal inactivar-les incubant el sèrum a 56°C durant 30 minuts. Una vegada s'ha inactivat el sèrum es preparen alíquotes estèrils de 50 ml, i es guarden a -30°C.

Per evitar contaminacions bacterianes, al medi de cultiu es pot afegir 125 U/ml de penicil·lina i 167  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'estreptomicina.

### 8.2.2- Medi de cultiu per a la soca bacteriana

### 8.2.2.1- Medi LB líquid

Triptona	10 g (Oxoid)
Extracte de llevat	5 g (Oxoid)
NaCl	5 g (Panreac)
H <sub>2</sub> O mQ	Fins a 1 litre

S'ajusta el pH entre 7.0 i 7.5 amb una solució de NaOH al 30%. El medi s'esterilitza en l'autoclau, 120°C durant 20 minuts.

### 8.2.2.2- Medi LB sòlid

Triptona	10 g (Oxoid)
Extracte de llevat	5 g (Oxoid)
NaCl	5 g (Panreac)
Agar	12 g (Oxoid)
H <sub>2</sub> O mQ	Fins a 1 litre

S'ajusta el pH entre 7.0 i 7.5 amb una solució de NaOH al 30%. El medi s'esterilitza en l'autoclau, 120°C durant 20 minuts. El medi s'atempera en un bany d'aigua a 50°C, es disposa 15 ml en plaques de Petri i es deixa solidificar. Aquestes es conserven a 4°C.

### 8.2.2.3- Medi selectiu

Els medis selectius s'utilitzen per seleccionar aquells clons d'*E. coli* que han incorporat el plasmidi amb el que s'està treballant. El tipus de selecció ve determinada per la informació continguda en el vector que permet el creixement de la soca transformada en aquest medi. Els plasmidis utilitzats en aquesta tesi incorporen un gen de resistència a l'ampicil·lina (pIRESneo, pIRESpuro2 i pcDNA3) o a la kanamicina (pEYFP-C1 i pIRES2-EGFP). Per aquest motiu, a l'hora de seleccionar els clons positius cal emprar medis de cultiu als que s'hi haurà afegit un dels dos antibiòtics. Per elaborar aquest medis selectius s'afegeix al medi LB, ampicil·lina (Britapen) o kanamicina (Roche) a una concentració final de 50 µg/ml o de



30 µg/ml respectivament. La preparació dels antibiòtics es realitza seguint les indicacions descrites per Sambrook i col., 1989.

### 8.3- Manteniment del material biològic

#### 8.3.1- Manteniment de les línies cel·lulars KB26.5 i 293-N

Les línies cel·lulars KB26.5 i 293-N es conserven en criotubs (Nunc, 377267) congelats en un contenidor de nitrogen líquid (Forma Scientific, CMR 8031, Cryomed) a una temperatura de -196°C. Abans de realitzar els experiments, es descongela un dels criotubs i s'inicia un cultiu ja sigui de cèl·lules en suspensió (hibridomes) o de cèl·lules adherents (293-N). El procés de descongelació ha de ser ràpid per tal d'assegurar una recuperació òptima de la cèl·lula i es realitza segons la metodologia descrita en Sambrook et col., 1989. Si es desitja preservar alguna de les sublínies obtingudes durant el treball es procedeix a la seva congelació seguint el protocol estàndard amb DMSO [Sambrook i col., 1989].

Una vegada es disposa de la línia cel·lular descongelada, les cèl·lules es cultiven a 37°C en una atmosfera al 90% d'humitat i 5% de CO<sub>2</sub>, en flascons de 25 cm<sup>2</sup> durant un període no superior de tres mesos. Els cultius es resembren cada 2 o 3 dies, que és quan les cèl·lules es troben en plena fase de creixement exponencial, amb un inòcul de 2 x 10<sup>5</sup> cèl·lules vives/ml en 10 ml de medi DMEM fresc. D'aquesta manera es proporciona de nou a les cèl·lules tots aquells nutrients que s'estaven exhaurint (glucosa, glutamina, altres aminoàcids, vitamines o components del sèrum) i s'eliminen tots aquells subproductes cel·lulars que poden tenir un efecte tòxic per la cèl·lula (amoni i lactat que acidifica el medi). Aquests cultius permeten disposar sempre d'un estoc de cèl·lules a partir del qual es poden fer créixer els inòculs per portar a terme els diferents experiments.

El manteniment de l'esterilitat en tots aquests processos és extremadament important. Per aquest motiu, cal comprovar regularment l'absència de contaminacions, mantenint alíquotes de medi sense cèl·lules a l'incubador i comprovant al microscopi l'absència de bacteris, llevats o fongs.

Totes les manipulacions cel·lulars així com la preparació de totes les solucions estèrils es varen portar a terme dins una cambra de flux laminar vertical (Telstar, AV-100).

### 8.3.2- Manteniment de la soca bacteriana

Per a la conservació de soques es preparen cultius estoc glicerinats amb 1.5 ml de cultiu en fase exponencial i glicerol al 15-20%. Els glicerinats es mantenen a  $-80^{\circ}\text{C}$  (congelador Nuair, UN-6512E).

Les soques bacterianes descongelades es mantenen a  $4^{\circ}\text{C}$  en plaques de Petri amb 20 ml de medi LB sòlid, fent subcultius cada mes.

## 8.4- Sistemes de cultiu

### 8.4.1- Sistemes de cultiu per a cèl·lules animals

#### 8.4.1.1- *Flascons de cultiu*

Els flascons de cultiu són flascons de poliestirè que es subministren estèrils. Les mides utilitzades són de  $25\text{ cm}^2$  (Nunc T-flask 136196) per a cultius de volum de 10 ml i de  $260\text{ cm}^2$  (Nunc T-flask 178891) per a cultius de volum de 40 ml de medi. En el tap del cultiu hi ha present un filtre de  $0.22\ \mu\text{m}$  de diàmetre de porus que facilita l'intercanvi de gasos amb l'exterior, permet el control del pH i manté les condicions d'esterilitat.

En aquests flascons s'han dut a terme les resembres de les dues línies cel·lulars i experiments realitzats amb cèl·lules d'hibridomes.

#### 8.4.1.2- *Flascons de cultiu agitats o "Spinner flasks"*

Aquest sistema de cultiu cel·lular consisteix en uns recipients de vidre que proveeixen una constant agitació al medi mitjançant un pèndol, també de vidre, unit

a la base del tap i amb un imant inclòs al seu extrem inferior. Al col·locar aquests recipients sobre una placa d'agitació magnètica de velocitat regulable (Techne, MCS-104S, amb capacitat per 4 flascons), el pèndol proporciona una agitació suau en sentit circular al medi de cultiu. L'agitació suau del medi assegura una homogenització constant de la suspensió cel·lular, amb un esforç tallant mínim per a les cèl·lules. L'agitació emprada en tots els experiments és de 40 rpm. Els flascons Techne disposen en la seva part superior de dues obertures laterals, una de les obertures es cobreix amb paper de filtre, gassa i cotó per permetre l'intercanvi de gasos amb l'exterior tot preservant l'esterilitat del medi. L'altra obertura es destina a la presa de mostres.

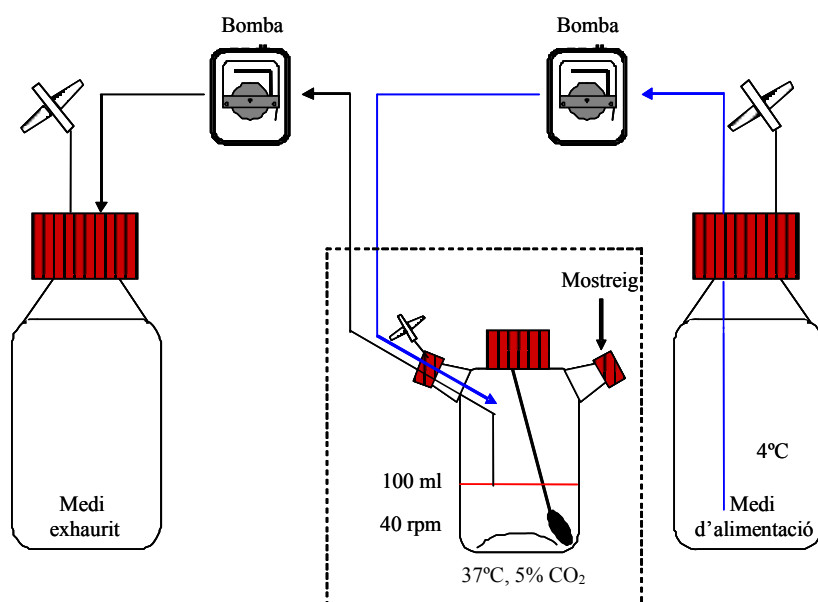
Aquests flascons s'utilitzen per fer créixer cultius amb uns volums de 125 ml (ref. F-7987), 250 ml (ref. F-7690) o 500 ml (ref. F-7609) de medi. En aquest treball s'han emprat els flascons de 125 ml de volum útil per fer el muntatge d'un sistema de cultiu en perfusió i en continu.

#### 8.4.1.2.1- Cultiu en perfusió

El cultiu en perfusió es va dur a terme en un flascó agitat amb un volum de treball de 50 ml i amb un recanvi de medi DMEM al 4% FCS cada 24 hores. Els flascó es va inocular amb  $2 \times 10^5$  cèl·lules/ml i es va incubar a 37°C, en una atmosfera saturada d'humitat (95%) per evitar l'evaporació del medi i amb un 5% de CO<sub>2</sub> per controlar el pH en medis amb tampó bicarbonat. La durada del cultiu va ser de 12 dies i al llarg de l'experiment, es va realitzar un seguiment de la viabilitat del cultiu.

#### 8.4.1.2.2- Cultiu en continu

El cultiu en continu es va portar a terme en un flascó agitat amb un volum de treball de 100 ml. A la Fig. 8.1 es mostra un esquema del muntatge experimental.



**Fig. 8.1-** Esquema del muntatge experimental del cultiu en continu. Es pot diferenciar dues vies: la via d'alimentació (en blau), i la via de recollida de medi (en negre). L'ampolla d'alimentació del sistema, l'ampolla de recollida de medi i el flascó agitat estan connectats amb l'atmosfera exterior amb un filtre d'aire de mida de porus 0.22 µm per tal d'assegurar l'esterilitat de l'aire que entra en contacte amb el sistema. Tant l'entrada del medi d'alimentació com la sortida de medi amb les cèl·lules es realitza mitjançant una bomba peristàltica que permet regular cabals baixos amb una precisió molt acurada. Per a les connexions entre els diferents recipients s'utilitza tub de silicona resistent a les condicions d'esterilització. Una vegada esterilitzat el muntatge es procedeix a omplir el flascó amb 100 ml de medi DMEM 4% FCS i s'inoculen les cèl·lules. Finalment, es renova el medi d'alimentació canviant l'ampolla buida estèril per l'ampolla que conté el medi prèviament esterilitzat per filtració. El flascó es col·loca dins l'incubador i l'ampolla que conté el medi d'alimentació es posa dins de la nevera. El mostreig s'efectua estèrilment dins d'una cabina de flux laminar vertical.

Les cèl·lules es van inocular a una concentració de  $2 \times 10^5$  cèl·lules/ml i es van deixar créixer en discontinu fins assolir a les 72 hores una concentració aproximada de  $12 \times 10^5$  cèl·lules/ml. A partir d'aquest moment es va començar a alimentar el sistema amb medi fresc amb 10 mM de glucosa i 3 mM de glutamina.

La velocitat de dilució utilitzada al llarg del cultiu va ser de  $0.016 \text{ h}^{-1}$ , el que es correspon a un temps de residència de 62.5 hores.

La durada del cultiu va ser de 37 dies i per induir l'apoptosi es van efectuar una sèrie d'aturades en l'alimentació del sistema que van durar 24, 48 i 72 hores. Cada vegada que es feia una aturada del sistema calia assolir de nou l'estat estacionari.

Diàriament es va realitzar un seguiment de la viabilitat del cultiu i es va analitzar la concentració de glucosa i de lactat.

#### 8.4.1.3- Plaques de cultiu de 6 i 12 pous

La plaques de cultiu són plaques de poliestirè (Orange Scientifics, 2030400) que permeten cultivar fins un volum màxim de 2 ml de medi per pou en les plaques de 12 pous i un volum màxim de 4 ml de medi per pou en les plaques de 6 pous.

Aquestes plaques s'han utilitzat per portar a terme les transfeccions de les dues línies cel·lulars i per al control regular de l'esterilitat dels medis de cultiu i dels diferents estocs de les solucions emprades per suplementar els medis.

Els sistemes de cultiu, descrits anteriorment, es mantenen dins d'un incubador (Forma scientifics, Incubador IR amb filtre HEPA, model 3862) a 37°C, en una atmosfera saturada d'humitat (95%) per evitar l'evaporació del medi, i a un 5% de CO<sub>2</sub> per controlar el pH en medis amb tampó bicarbonat.

#### 8.4.2- Sistemes de cultiu de la soca bacteriana

Els cultius d'*E. coli* s'han realitzat en erlenmeyers de diferents volums (25, 50 i 250 ml) i en plaques de Petri amb 20 ml de medi sòlid.

### 8.5- Recompte de cèl·lules animals

Per realitzar el recompte de cèl·lules adherents (293-N), cal, prèviament, desenganxar-les del flascó de cultiu mitjançant el procés de tripsinització. Abans d'afegir la tripsina, les cèl·lules s'han de rentar amb PBS 0.1 M (8g/l NaCl, 0.2g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.8 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.2 g/l KCl) pH 7.4 o NaCl 0.9% (p/v) per eliminar les restes de sèrum presents en el medi de cultiu, ja que el sèrum inhibeix l'activitat de la tripsina. El volum necessari de EDTA-tripsina (Sigma, T4299) per desprendre les cèl·lules depèn de la mida del flascó. Per exemple, en un flascó de 25 cm<sup>2</sup> es posen entre 0.5-1 ml de tripsina i en un de 260 cm<sup>2</sup>, 3-4 ml.

Un cop addicionada la tripsina, es deixa actuar durant 5 min a 37°C. Seguidament, es neutralitza l'acció de la tripsina afegint medi DMEM al 10% FCS, es recull la suspensió cel·lular i es procedeix a fer el recompte cel·lular.

En el cas de l'hibridoma, s'agafa una alíquota de la suspensió cel·lular i es fa el recompte.

El nombre de cèl·lules vives, mortes, totals i el percentatge de viabilitat que presenta el cultiu es calcula a partir del recompte a 100 augments mitjançant un microscopi invertit de contrast de fase (Nikon, TMS) i un hemacitòmetre (Neubauer Improved, Brand). L'hemocitòmetre és un portaobjectes amb quatre camps o cavitats quadrades on hi ha dibuixades unes xarxes de 4x4 quadrats microscòpics. A cada camp hi cap un volum de mostra conegut, i els setze quadres dibuixats faciliten el recompte de les cèl·lules presents a cada camp.

Per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, es tenyeixen amb una mescla 1:1 d'una solució de blau de tripà (Sigma, T8 154) diluïda al 0.2% (v/v) en PBS 0.1 M pH: 7.4 i la mostra cel·lular. El colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes i els dóna un color blavós. Per contra, les cèl·lules vives es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant. Una gota de la dilució es diposita a la zona de recompte de l'hemocitòmetre i es cobreix amb un cobreobjectes (Menzel-Gäser). A continuació, es realitza el recompte de cèl·lules vives i mortes en cadascun dels quatre camps. Els dos valors superior i inferior obtinguts es rebutgen, mentre que els altres dos es promitgen.

### 8.5.1.- Concentració cel·lular i viabilitat cel·lular

El càlcul de la concentració de cèl·lules present al cultiu es realitza mitjançant la següent expressió (Eq. 8.1):

$$[Cèl·lules/ml] = \frac{n_1 + n_2}{d \times V_{camp}} \quad (Eq. 8.1)$$

on  $n_1$  i  $n_2$  són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps seleccionats,  $m$  és el nombre de camps comptats i té un valor de 2,  $d$  és la dilució amb tripà blau realitzada i val 0.5, i  $V_{camp}$  és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de  $10^{-4}$  ml. D'aquesta manera l'expressió queda reduïda a l'equació 8.2:

$$[\text{Cèl·lules/ml}] = (n_1 + n_2) \times 10^4 \quad (\text{Eq. 8.2})$$

Aquesta expressió és aplicable a les cèl·lules viables i mortes.

Per obtenir el percentatge de viabilitat cal calcular prèviament el nombre total de cèl·lules (suma de les viables i les mortes) i, posteriorment, aplicar la següent expressió (Eq. 8.3):

$$\% \text{ Viabilitat} = \frac{\text{Concentració cèl·lules viables}}{\text{Concentració cèl·lules totals}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8.3})$$

### 8.6- Anàlisi de la glutamina i d'altres aminoàcids per HPLC

L'anàlisi de la concentració d'aminoàcids (primaris i secundaris) es realitza per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), mitjançant una tècnica de derivatització dels aminoàcids (Mètode de AccQ·Tag, Waters), prèvia a la seva separació. Els aminoàcids són molècules de polaritat molt elevada, la majoria sense grups cromòfors i amb uns radicals de naturalesa molt diferent. Cal doncs, afegir als aminoàcids alguna característica que permeti separar-los i detectar-los amb suficient sensibilitat. Això s'aconsegueix mitjançant una reacció de derivatització en la que cada aminoàcid s'uneix a un reactiu que en permet la seva posterior detecció. Seguidament els aminoàcids derivatitzats es separen per cromatografia de fase reversa i són detectats ja que absorbeixen llum en la zona ultraviolada.

Per realitzar l'anàlisi dels aminoàcids s'utilitza un cromatògraf Waters LC Module I Plus; una columna de fase reversa (Waters, AccQ·Tag 150x3.9 mm, WAT052885); el *AccQ·Fluor Reagent Kit* (que conté: *Waters AccQ·Fluor Borate Buffer*, *Waters AccQ·Fluor Reagent Powder* i *Waters AccQ·Fluor Reagent Diluent*); i una dissolució patró de tots els aminoàcids de 0.1 mM i 1 mM per efectuar els corresponents calibrats. A més a més, es preparen dues dissolucions patrons concentrades de Gln, Ala amb concentracions en el primer patró de 10, 5 i 10 mM; i, en el segon, de 5, 2.5 i 5 mM, respectivament.

Els eluents necessaris per a la separació dels aminoàcids són:

- ELUENT A: Acetat sòdic/Àcid EtilendiaminotetraAcètic (EDTA)/Trietilamina (TEA). Es preparen 19.0512 g d'acetat sòdic + 1.107 mg de EDTA + 2.35 ml de TEA en 1000 ml d'aigua ultrapura. Una vegada completament dissolt, s'ajusta el pH a 5.05 amb àcid ortofosfòric. A continuació, es filtra amb un filtre d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm i es desgasa.
- ELUENT B: Acetonitril 60% (v/v). Es preparen 600 mL d'acetonitril + 400 mL d'aigua ultrapura. A continuació, es microfiltra de la mateixa manera que l'eluent A i es desgasa.

Les mostres es filtren amb filtres d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm i la detecció es realitza a 254 nm per a tots els aminoàcids. La temperatura de la columna és de 37 °C. Aquest mètode permet separar tots els aminoàcids en 45-50 minuts donant el següent ordre d'elució: Asp-Ser-Glu-Gly-Gln-His-Arg-Thr-Ala-Pro-Cys-Tyr-Val-Met-Lys-Ile-Leu-Phe -Trp.

### **8.7- Determinació de la concentració de glucosa i lactat**

La concentració de glucosa i lactat es mesura amb un analitzador automàtic YSI (Yellow Springs Instrument, 2700 Select). Aquest aparell disposa d'un elèctrode format per una fina membrana amb enzims immobilitzats que envolta un ànode de platí. Les molècules de glucosa o L-lactat presents a la mostra difonen a través de la membrana, i pateixen una transformació enzimàtica per acció de la glucosa oxidasa i la lactat oxidasa, aquestes reaccions alliberen electrons que són finalment detectats per l'elèctrode. La intensitat dels senyals elèctrics produïts és proporcional a la concentració de cadascun dels dos substrats. Aquesta mesura elèctrica no es veu afectada pel color, terbolesa, densitat o temperatura de la mostra, i només precisa que l'alíquota presa per la mesura sigui filtrada o centrifugada amb anterioritat per tal d'eliminar les cèl·lules o impureses que puguin obstruir la membrana.

L'analitzador pren 55 µL de cada mostra i dona els valors de concentració de glucosa i lactat en (g/l). El rang de concentracions que pot mesurar l'aparell oscil·la de 0.05 a



20.0 g/l per a la glucosa i de 0.005 a 2.00 g/l per al lactat. Si s'ha de diluir la mostra, cal fer-ho amb aigua ultrapura.

L'aparell requereix les següents solucions pel seu funcionament:

Solució patró:

K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA	0.159 g
Àcid benzoic	0.263 g
Glucosa	0.45 g
L-Lactat	0.1125 g
Aigua ultrapura	250 ml

Solució tampó:

K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA	0.572 g
Benzoat sòdic	0.948 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.028 g
NaCl	1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	16.2 g
Sulfat de gentamicina	0.0076 g
Aigua ultrapura	1 litre

Les dues solucions es filtren al buit amb una membrana d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm de diàmetre de porus i es renoven una vegada a la setmana.

### 8.8- Determinació de l'activitat de l'anticòs monoclonal

Per a la determinació de l'activitat de l'anticòs monoclonal s'utilitza la tècnica d'hemoaglutinació en placa. Aquesta tècnica està basada en la capacitat dels anticossos IgG<sub>3</sub> produïts per l'hibridoma KB26.5 per aglutinar els anticossos IgG<sub>3</sub> produïts per l'hibridoma KB26.5 per aglutinar els eritròcits del grup sanguini A1. Per tal de mesurar l'activitat cal disposar d'un estoc d'eritròcits del grup sanguini A1 congelats. D'aquest estoc es descongela un criotub i finalment, es fa l'hemoaglutinació en placa. Aquests tres mètodes s'expliquen a continuació:

### 8.8.1- Congelació d'eritròcits

- Solució de glaçat:
  - 35 g (28ml) Glicerol
  - 2.8 g sorbitol (o manitol)
  - 0.65 g NaCl
  - 100 ml Aigua mQ

S'esterilitza per filtració (0,22 µm, Millipore)

- PBS 0.1 M pH: 7.4

#### **Procediment:**

- Es treu la sang (15-20 ml) d'una persona del grup sanguini A<sub>1</sub> i s'afegeixen unes gotes d'anticoagulant.
- Es centrifuga a 1400 g durant 10 minuts en un tub cònic.
- S'aspira el sobrenedant i es resuspèn el pellet amb PBS.
- Es centrifuga a 1400 g durant 10 minuts.
- S'aspira el sobrenedant i si hi ha molt de volum de sediment es repeteixen els 2 passos anteriors.
- Es mesura el volum exacte de sang (sediment) i es posa en un vas de precipitats, agitant-se. A continuació, s'afegeix lentament el mateix volum de solució de glaçat.
- La mescla es manté 30 minuts a temperatura ambient amb agitació lenta per tal que es vagin igualant les concentracions a fora i dins els eritròcits.
- Es reparteix en criotubs (1 ml/criotub) i es posen els criotubs en el contenidor de nitrogen líquid (a -196°C)

### 8.8.2- Descongelació d'eritròcits

- Solució de desglaçat:
  - 16 g de sorbitol

- 0.9 g NaCl
- 100 ml Aigua mQ

S'esterilitza per filtració (0,22 µm, Millipore)

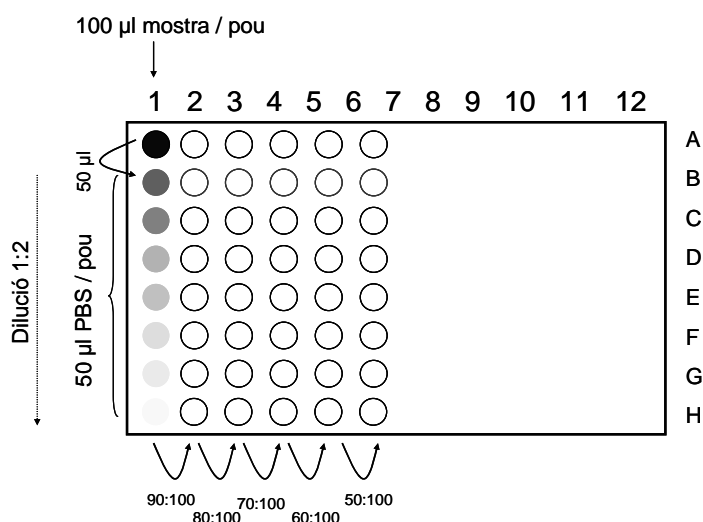
**Procediment:**

- Es treu el criotub del nitrogen líquid i es posa ràpidament en un bany a 37°C.
- Es transfereix la mostra en un tub de centrifuga i es centrifuga a 2 minuts a 1400g.
- S'aspira el sobrenedant i s'afegeix (gota a gota) la solució de desglaçat al pellet omplint el tub fins a 5 ml.
- Es centrifuga durant 5 minuts a 1400 g. S'aspira el sobrenedant i s'afegeix PBS omplint el tub fins a 5 ml per resuspendre el pellet. Es repeteix aquest rentat 3 vegades (amb PBS). Si el sobrenedant continua essent molt vermell, es fa un rentat més.
- En l'últim rentat es llença el sobrenedant i del sediment es prepara la suspensió d'eritròcits amb PBS.

### 8.8.3- Hemoaglutinació en placa

A partir d'eritròcits descongelats es fa una suspensió a l'1% amb PBS (100 µl del sediment d'eritròcits + 10 ml PBS). Es fan dilucions seriades de la mostra a analitzar (que conté l'anticòs) amb tampó PBS en plaques de 96 pous de fons V (Greiner): s'afegeixen 100 µl de mostra en el pou 1A i 50 µl de PBS a la resta de pous de la columna 1. Es fan dilucions dobles transferint 50 µl de pou en pou (fila en fila). Després, de cada mostra de la columna 1, es va fer una bateria de dilucions, 90:100, 80:100, 70:100, 60:100, 50:100, d'esquerra a dreta (Fig. 8.2).

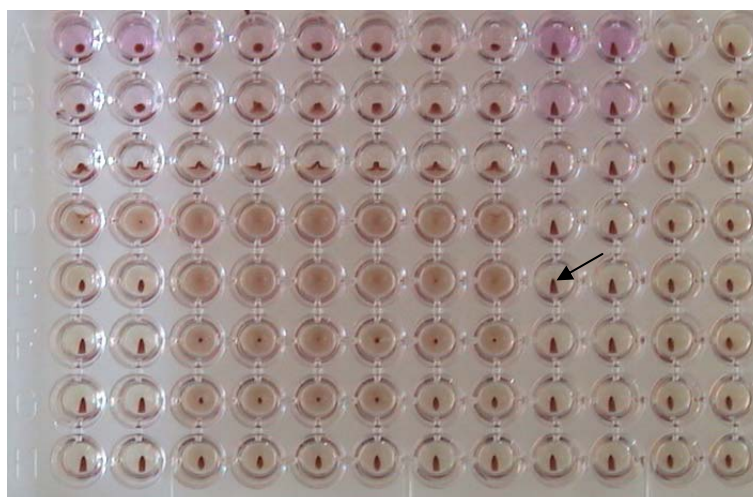
S'afegeixen 50µl de la suspensió d'eritròcits a cada pou i es deixa reposar la placa 1 hora a temperatura ambient. Cal agitar constantment la solució d'eritròcits per evitar la seva ràpida sedimentació.



**Fig 8.2-** Esquema de la distribució i dilució de la mostra en la placa d'hemoaglutinació.

A continuació, ja es pot avaluar el resultat de l'assaig: quan hi ha suficient anticòs com per crear ponts entre els antigens de superfície dels eritròcits, els eritròcits s'aglutinaran (entrecruaran) i es dipositaran uniformement per tot el pou. En canvi, quan l'anticòs està massa diluït, no n'hi haurà prou per crear aquests enllaços entre els eritròcits i aquests relliscaran pels costats del pou per formar un sediment vermell al fons. Es defineix com a títol, la inversa de la última dilució en que hi ha presència d'aglutinació.

A la Fig. 8.3, es mostra una placa d'hemoaglutinació obtinguda en aquest treball. Es pot observar l'aparició d'una llàgrima en aquella dilució on no hi ha el suficient anticòs per unir-se als eritròcits.



**Fig. 8.3-** Exemple d'una placa d'hemoaglutinació. Lectura dels títols d'aglutinació (positius i negatius).

## 8.9- Plasmidis

Els plasmidis són molècules de DNA extracromosòmic autoreplicatives que es transmeten i mantenen de forma estable d'una generació bacteriana a la següent. Els plasmidis es troben en moltes espècies bacterianes i sovint confereixen a la cèl·lula hoste característiques fenotípiques, com ara la resistència a antibiòtics i metalls pesats, o la capacitat per produir determinades proteïnes. L'aplicació dels plasmidis per tal de conferir noves activitats proteiques a les cèl·lules no es restringeix només a organismes procariotes sinó que també pot aplicar-se a cèl·lules eucariotes.

Una altra aplicació dels plasmidis és el seu ús per a l'obtenció de quantitats suficients d'una determinada seqüència de DNA. Després d'inserir en un plasmidi la seqüència d'interès es transformen cèl·lules bacterianes competents amb el plasmidi. En multiplicar-se el nombre de cèl·lules, augmenta el nombre de còpies del plasmidi, i per tant també la quantitat de seqüència inserida.

Per a la construcció dels vectors recombinants amb els gens antiapoptòtics, es va partir dels plasmidis pcDNA3 (Invitrogen), pIRESneo (Clontech), pIRESpuro2 (Clontech) i pIRES2\_EGFP (Clontech). El vector pEYFP-C1 (Clontech) es va emprar per optimitzar les condicions de transfecció en l'hibridoma KB26.5.

### 8.9.1- pcDNA3

El pcDNA3 (Fig. 8.4) és un vector comercial d'unes 5.4 Kb dissenyat per a l'expressió gènica en hostes eucariotes. Aquest plasmidi conté un marcador de selecció eucariota, un promotor i una seqüència de poliadenilació eucariota entre els quals s'ha d'inserir la seqüència desitjada. El marcador de selecció eucariota consisteix en un gen de resistència a la neomicina. Tant el promotor com la seqüència de poliadenilació provenen del virus SV40. Pel fragment de DNA inserit, el plasmidi presenta el promotor de citomegalovirus (CMV), que té un elevat nivell d'expressió en un gran nombre de cèl·lules animals, mentre que el senyal de poliadenilació dels mRNA transcrits és el de l'hormona bovina del creixement. El pcDNA3 també es pot replicar dins d'*E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació ColE1

provinent del plasmidi pUC19. La selecció de les colònies que han incorporat el plasmidi en procariotes es fa gràcies a un marcador de selecció que confereix resistència a l'ampicil·lina.

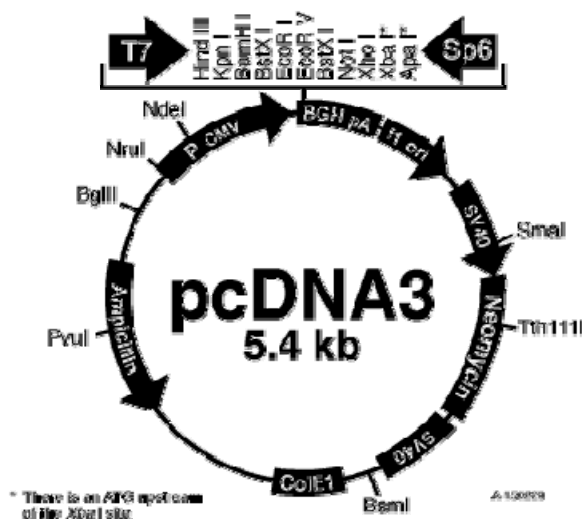
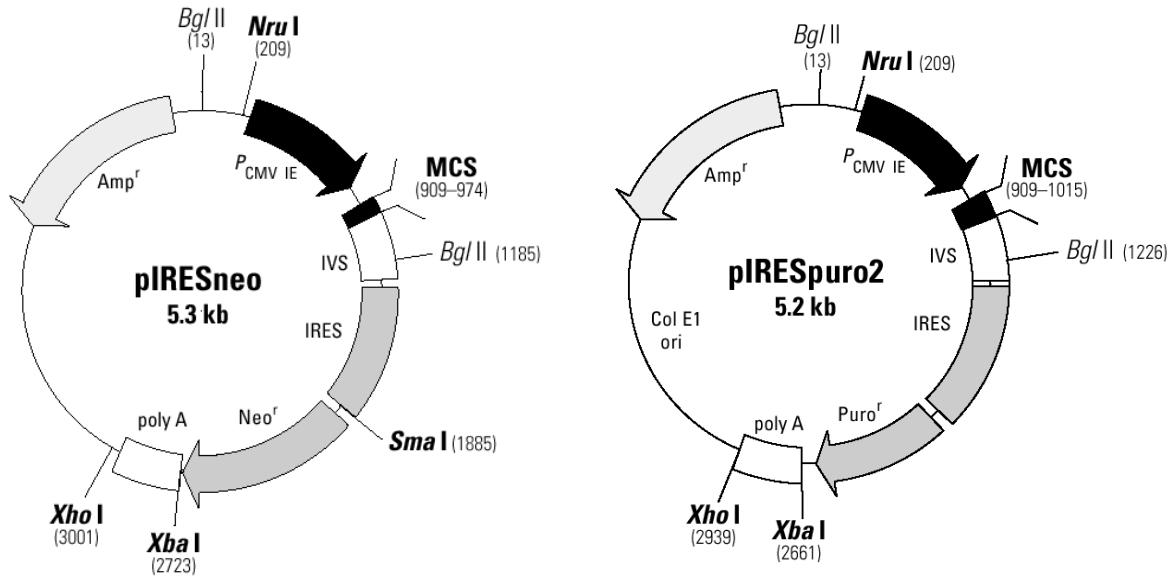


Fig. 8.4- Esquema del vector pcDNA3.

### 8.9.2- pIRESneo i pIRESpuro2

El pIRESneo (Fig. 8.5 Esquerra) i el pIRESpuro2 (Fig. 8.5 Dreta) són uns vectors d'expressió IRES bicistrònics d'unes 5.3 Kb i 5.2 Kb, respectivament. Aquests plasmidis contenen l'IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) del virus de l'encefalomiocarditis (ECMV) el qual permet la traducció de dos ORFs (*Open Reading Frame*) a partir d'un únic RNA missatger, un marcador de selecció eucariota que consisteix en un gen que proporciona resistència a la neomicina (pIRESneo) o puromicina (pIRESpuro2), un promotor de Citomegalovirus ( $P_{CMV IE}$ ) que presenta un elevat nivell d'expressió en un gran nombre de cèl·lules animals i un MCS (*Multiple Cloning Site*) on s'ha d'inserir la seqüència desitjada. El senyal de poliadenilació dels mRNA transcrits és de l'hormona bovina del creixement. Aquests plasmidis, també es poden replicar dins d'*E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació ColE1. La selecció de les colònies que han incorporat el plasmidi en *E. coli* es fa gràcies a un marcador de selecció que confereix resistència a l'ampicil·lina.



**Fig.8.5-** Esquema dels vectors pIRESneo i pIRESpuro2.

### 8.9.3- pEYFP-C1

El pEYFP-C1 (Fig. 8.6) és un vector comercial d'unes 4.7 kb dissenyat per a l'expressió gènica en hostes eucariotes. Aquest plasmidi codifica per la proteïna EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescence protein*), una variant de la *Aequorea victoria* GFP (*Green Fluorescent Protein*). Aquesta proteïna té 4 àa substituïts (Ser-65 per la Gly, Val-68 per la Leu, Ser-72 per la Ala i Thr-203 per la Tyr) i emet fluorescència groga (a  $\lambda=527$  nm) al ser irradiada amb llum ultraviolada.

El vector conté un MCS, per inserir-hi el gen d'interès, un promotor del virus SV40 responsable de l'expressió de la neomicina (marcador de selecció eucariota), i una seqüència de poliadenilació que prové del virus SV40. Aquest plasmidi també es pot replicar dins d'*E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació que prové del plasmidi pUC. La selecció de les colònies d' *E. coli* que han incorporat el plasmidi es fa gràcies a un marcador de selecció que confereix resistència a la kanamicina.

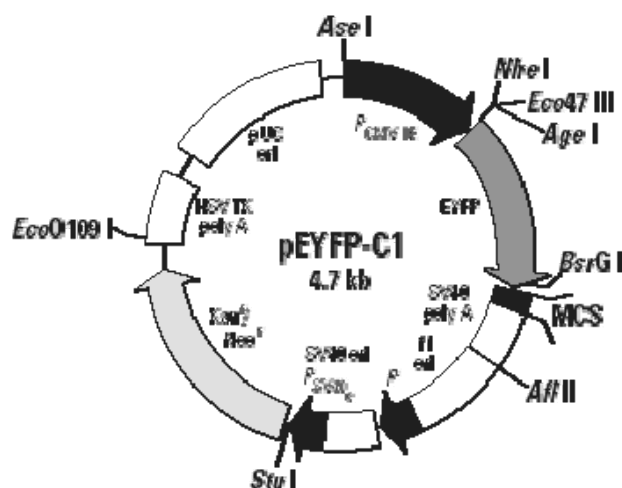


Fig. 8.6- Esquema del vector pEYFP-C1.

#### 8.9.4- pIRES2-EGFP

El pIRES2-EGFP (Fig. 8.7) és un vector comercial d'unes 5.3 kb dissenyat per a l'expressió gènica en hostes eucariotes. Aquest plasmidi conté l'IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) del virus encefalomiocarditis (ECMV) entre el MCS (*Multiple Cloning Site*) i la regió codificant per la proteïna EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Això permet al gen d'interès (clonat en el MCS) i al gen EGFP ser traduïts a partir d'un únic mRNA bicistrònic. El MCS es troba entre el promotor de citomegalovirus ( $P_{CMV IE}$ ) i la seqüència IRES.

El pIRES2-EGFP també es pot replicar dins d'un *E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació que prové del plasmidi pUC. La selecció de les colònies que han incorporat el plasmidi es fa gràcies a un marcador de selecció que confereix resistència a la kanamicina.

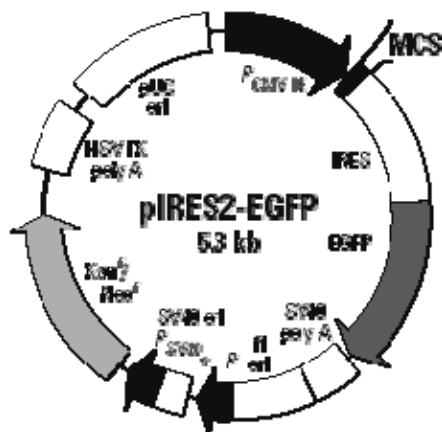


Fig. 8.7- Esquema del vector pIRES2-EGFP.



## 8.10- Extracció i purificació de material genètic

### 8.10.1- Extracció i purificació de DNA plasmídic

#### 8.10.1.1- Minipreparacions de DNA plasmídic

Per extreure petites quantitats de DNA plasmídic es va fer servir el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Aquest kit es basa en el mètode de la lisi alcalina [Birnboim i col., 1979] i és un mètode senzill i ràpid per obtenir fins a 10 µg DNA plasmídic.

#### Solucions:

- Tampó de suspensió: 25 ml [50 mM Tris-HCl i 10 mM EDTA, pH 8.0 (25°C)], 2.5 mg RNAsa A.
- Tampó de lisi: 25 ml [0.2 mM NaOH i 1% SDS]
- Tampó d'unió: 25 ml [4 M hidrocloreur de guanidina i 0.5 M acetat de potassi , pH 4.2]
- Tampó de rentat (I): 33 ml [5 M hidrocloreur de guanidina i 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25°C), concentracions finals després de l'addició de 20 ml d'etanol].
- Tampó de rentat (II): 10 ml [20 mM NaCl i 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C), concentracions finals després de l'addició de 40 ml d'etanol].
- Tampó d'elució: 30 ml [1 mM Tris-HCl, pH 8.5 (25°C)]

#### Procediment:

- A partir d'un cultiu d'*E. coli* en placa es prenen les colònies amb una nansa i es passen a un tub Eppendorf que conté 250 µl de tampó de suspensió i es barreja amb el vòrtex.
- S'afegeix 250 µl de tampó de lisi i es barreja per inversió. S'incuba 5 minuts a temperatura ambient.

- S'addiciona 350 µl de tampó d'unió i barreja per inversió. S'incuba 5 minuts en gel.
- Es centrifuga durant 10 minuts a 13000 rpm (microcentrífuga) i es transfereix el sobrenedant a una columna amb filtre (*High Pure filter tube*).
- Es centrifuga a 13000 rpm durant 1 minut i es descarta l'eluent.
- S'afegeix 500 µl de tampó de rentat (I) a la columna.
- Es centrifuga a 13000 rpm durant 1 minut i es descarta l'eluent.
- S'afegeix 700 µl de tampó de rentat (II) a la columna.
- Es centrifuga a 13000 rpm durant 1 minut, es descarta l'eluent i es torna a centrifugar de nou durant 1 minut.
- Es fa un canvi de tub Eppendorf, es col·loca la columna sobre l'Eppendorf nou i s'afegeix 100 µl de tampó d'elució.
- Es centrifuga a 13000 rpm durant 1 minut i es recull l'eluent que conté el DNA plasmídic.

#### 8.10.1.2- Midipreparacions de DNA plasmídic

Per extreure quantitats de fins a 100 µg de DNA es va utilitzar el *QIAfilter Midiprep Kit* (Qiagen).

#### **Solucions:**

- Tampó de suspensió (P1): 50 mM Tris·Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A
- Tampó de lisi (P2): 200 mM NaOH, 1% SDS
- Tampó de neutralització (P3): 3.0 M KCH<sub>3</sub>COO
- Tampó de rentat (FWB): 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% isopropanol
- Tampó d'equilibració QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100
- Tampó de rentat QC: 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% isopropanol
- Tampó d'elució QF: 1.25 M NaCl, 50 mM Tris·Cl (pH 8.5)

**Procediment:**

- A partir d'un cultiu d'*E. coli* en placa es prenen les colònies amb una nansa i es passen a un tub que conté 4 ml de tampó P1 i es barreja amb el vòrtex.
- S'afegeix 4 ml de tampó P2, es barreja per inversió i s'incuba a temperatura ambient.
- S'afegeix 4 ml de tampó P3, es barreja per inversió. Seguidament, es col·loca el llisat en una xeringa (cartutx QIAfilter). S'incuba a temperatura ambient durant 10 minuts.
- S'equilibra la columna QIAGEN-tip 100 afegint 4 ml de tampó QBT i s'espera que la columna es buidi per gravetat.
- El contingut de la xeringa es passa a la columna i s'espera que la columna es buidi. El DNA plasmídic queda retingut en la columna.
- S'afegeix 10 ml de tampó QC a la columna i s'espera que la columna es buidi i es torna a afegir 10 ml més de tampó QC.
- Un cop buidada la columna, s'afegeix 5 ml de tampó QF i es recull l'eluent que conté el DNA plasmídic.
- Es precipita el DNA afegint 3.5 ml d'isopropanol, es barreja, es centrifuga a 9000 rpm (microcentrífuga) durant 30 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant.
- S'afegeix 2 ml d'etanol al 70% i es centrifuga a 9000 rpm durant 30 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pellet amb 200 µl d'aigua ultrapura.

8.10.2- Extracció de DNA genòmic

Per a l'obtenció de DNA genòmic s'utilitza un mètode molt ràpid que permet visualitzar la fragmentació típica de les cèl·lules que han mort per apoptosi (veure apartat 8.17.3).

**Solucions:**

- Solució de lisi: 0.59 g NaCl, 0.12 g Tris-HCl, 2.5 ml EDTA 0.1 M, 5 mg tripsina i 1 g/ml RNasa lliure de DNasa

- PBS 0.1 M
- Acetat sòdic 3 M
- Etanol absolut
- Etanol 70%

**Procediment:**

- Es centrifuga a 500g durant 5 minuts el volum de cultiu necessari per obtenir un nombre total de  $5 \times 10^5$  cèl·lules, s'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet de cèl·lules en 1 ml de PBS 0.1 M.
- Es centrifuga de nou a 500g durant 5 minuts, s'elimina el sobrenedant i es resuspèn les cèl·lules en 0.5 ml de solució de lisi i s'incuba durant 1 hora a 37°C.
- S'afegeix al llisat 10 µl d'acetat sòdic 3 M i 1 ml d'etanol absolut fred per a la precipitació del DNA.
- Es centrifuga a 1700 g durant 10 minuts, es descarta el sobrenedant i es renta el pellet amb 800 µl d'etanol 80 %.
- Es centrifuga a 1700 g durant 5 minuts, s'elimina l'etanol i es deixa assecar el pellet a temperatura ambient fins que s'evapori l'etanol restant.
- Es realitza la visualització en gel d'agarosa al 1.5 % seguint els passos descrits en l'apartat 8.11.1.

8.10.3- Extracció de RNA<sub>TOTAL</sub>

Per a l'extracció de RNA<sub>TOTAL</sub> de l'hibridoma KB26.5 es va emprar el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Aquest kit és un mètode senzill i ràpid per obtenir fins a 100 µg RNA total.

**Solucions:**

- Tampó de lisi: solució RLT (abans de fer servir aquesta solució s'addiciona 10 µl de β-mercaptoetanol (14.3 M) en 1 ml de tampó RLT i s'utilitza com a màxim durant un mes)
- Etanol 70%

- Tampó de rentat (I): solució RW1
- Tampó de rentat (II): solució RPE
- Tampó d'elució: aigua lliure RNases

**Procediment:**

- Es centrifuguen  $4 \times 10^5$  cèl·lules a 300 g durant 5 minuts, es descarta el sobrenedant.
- S'afegeix 350 µl de tampó de lisi (RLT) i es barreja amb el vòrtex.
- S'addiciona 1 volum d'etanol al 70%, es barreja per inversió i es transfereix a una columna amb una membrana de silicona-gel (*RNeasy mini spin column*).
- Es centrifuga a 10000 rpm (microcentrífuga) durant 15 segons i es descarta l'eluent.
- S'afegeix 700 µl de tampó RW1 de rentat (I) a la columna.
- Es centrifuga a 10000 rpm durant 30 segons i es descarta l'eluent.
- Es transfereix la columna a un nou tub de col·lecció.
- S'afegeix 500 µl RPE de tampó de rentat (II) a la columna.
- Es centrifuga a 10000 rpm durant 15 segons i es descarta l'eluent.
- s'addiciona novament 500 µl de tampó RPE a la columna.
- Es centrifuga a 10000 rpm durant 2 minuts, es descarta l'eluent i es torna a centrifugar de nou durant 1 minut.
- Es transfereix la columna a un nou tub de col·lecció i s'afegeix 30 µl d'aigua lliure de RNases.
- Es centrifuga a 10000 rpm durant 1 minut i es recull l'eluent que conté el RNA total.
- Finalment, es procedeix a fer l'espectre entre 220 i 320 nm (espectrofotòmetre Shimadzu UV-160), els càlculs de la puresa ( $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$ ) i concentració de la mostra ( $[RNA] = A_{260} \times \text{dilució}/24$ ). La integritat del RNA es determina fent córrer la mostra en un gel a l'1.5% d'agarosa.
- El material de vidre s'ha escalfat a 200°C durant un mínim de 4 hores i l'aigua ha estat tractada amb DEPC (Sigma) i seguidament autoclavada.

Els valors de la relació  $A_{260}/A_{280}$  compresos entre 1.7-2.1 són acceptables mentre que valors inferiors podrien indicar que la mostra està contaminada per proteïna. Quan el valor de la relació  $A_{260}/A_{230}$  és 2.0 es considera acceptable, mentre que valors inferiors podrien indicar que la mostra està contaminada per carbohidrats.

## 8.11- Purificació i separació del material genètic

### 8.11.1- Separació del material genètic per electroforesi en gels agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa es basa en la separació de fragments de DNA sotmesos a un camp elèctric en presència d'un gel, format per l'agarosa polimeritzada, que dificulta la migració del DNA cap al pol positiu. La mobilitat electroforètica dels àcids nucleics és inversament proporcional a la mida de la molècula, però també depèn d'altres variables com són la concentració d'agarosa, el corrent elèctric aplicat i la composició en bases nitrogenades dels propis àcids nucleics.

Aquest és un mètode simple i efectiu per separar fragments de DNA o RNA de diferent mida. La mida de cada banda obtinguda s'estableix comparant amb un marcador que conté un patró de DNA de diferents mides conegudes. Aquest marcador també permet realitzar una quantificació de la quantitat de material genètic obtingut en funció de la intensitat de la banda. S'utilitzen gels d'agarosa al 1.5% per separar fragments de DNA de fins 1 Kb i gels d'agarosa al 0.8% per fragments de DNA més grans.

La visualització dels fragments de DNA es realitza emprant bromur d'etidi, agent intercalant del DNA que emet fluorescència al ser irradiat amb llum ultraviolada. Aquest compost permet detectar fins a 1 ng de DNA.

Per dur a terme l'electroforesi de DNA s'utilitzen les solucions següents:

- Tampó d'electroforesi TAE (1x): 4 mM Tris (Panreac), 20 mM àcid acètic (Panreac), 2 mM EDTA (Panreac)

- Tampó de càrrega (6x): 30% glicerol i un 0.25% de blau de bromofenol en tampó TAE 1x
- Solució de bromur d'etidi 200 µg/ml (Bioprobe)
- Agarosa (Boehringer Mannheim)
- Marcadors de pesos moleculars (Annex II): XIV (Roche) i GeneRuler™ (Fermentas)

El tampó d'electroforesi es prepara inicialment a 10x i es guarda a temperatura ambient. En el moment de ser utilitzada es dilueix 10 vegades amb aigua ultrapura.

### **Procediment:**

- Es pesa la quantitat corresponent d'agarosa en pols (p/v) i s'afegeix el volum corresponent de tampó TAE (1x).
- L'agarosa es fon en un forn microones fins que no quedin partícules en suspensió i es deixa refredar fins a 50-55 °C.
- S'afegeix bromur d'etidi a la solució d'agarosa a una concentració final de 0.5 µg/ml.
- Es prepara el motlle per al gel d'agarosa segellat amb cinta adhesiva. Es disposa la pinta que formarà els pous de càrrega de manera que quedi a 0.5-1 cm de l'extrem del motlle i que no toqui el fons del motlle. L'agarosa fosa es dispensa en el motlle. Cal esperar fins que l'agarosa hagi solidificat.
- Es treu la pinta per deixar lliure els pous on es carregaran les mostres, es treu la cinta adhesiva i es submergeix el gel en una cubeta que conté tampó d'electroforesi. El tampó d'electroforesi ha de cobrir del tot la superfície del gel.
- Es carreguen les mostres de DNA en el gel i s'inicia l'electroforesi tenint en compte que s'ha d'aplicar un voltatge constant que no superi els 5 V/cm.
- L'electroforesi es deixa córrer fins que el colorant del tampó de càrrega (Orange G) assoleix les 2/3 parts del gel.
- Les bandes de DNA es visualitzen a  $\lambda=302$  nm amb un transil·luminador d'UV (TFX-20M). Les fotografies dels gels s'han obtingut amb la càmera Kodak DC120.

### **Preparació de les mostres:**

Es barreja 1 µl de la mostra de DNA amb 8 µl d'aigua ultrapura autoclavada i 1µl de tampó de càrrega (volum final 10 µl). Si la mostra no està prou concentrada es pot substituir part de l'aigua ultrapura per un major volum de mostra. Si es vol carregar volums finals superiors a 10 µl únicament cal respectar la proporció 1:10 de tampó de càrrega. Pel que fa els marcadors de pesos moleculars, es barreja 2 µl de marcador amb 4 µl de tampó de càrrega. Finalment, per tal d'homogeneïtzar les mostres abans de carregar-les al gel es dona un pols de centrifugació (1 s) a tots els tubs.

### 8.11.2- Purificació de bandes de DNA en gels d'agarosa

Per recuperar els fragments de DNA separats electroforèticament, es talla amb una fulla d'afaitar la porció del gel d'agarosa que conté la banda desitjada i es purifica amb el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) seguint les especificacions del proveïdor. Aquest és un mètode senzill i ràpid que permet una elevada recuperació de bandes amb una grandària superior al 100 pb.

### **Solucions:**

- Tampó de solubilització d'agarosa (QG)
- Isopropanol
- Tampó de rentat (PE)
- Tampó d'elució (EB)

### **Procediment:**

- Per a la recuperació del DNA cal tallar la porció del gel d'agarosa que conté la banda desitjada. Per fer-ho s'utilitza una fulla d'afaitar i s'ha de procurar eliminar el màxim possible d'agarosa.
- A continuació es transfereix la porció del gel a un tub Eppendorf prèviament tarat i es determina el pes del fragment de gel.



- S'afegeix 300 µl de tampó de solubilització d'agarosa per cada 100 mg de gel. Si la concentració d'agarosa en el gel és superior al 2% cal afegir 600 µl en lloc de 300 µl.
- S'incuba la barreja a 50°C durant 10 minuts, agitant cada 2-3 minuts amb un vòrtex fins que l'agarosa estigui completament dissolta. A continuació, es centrifuga la solució en una microcentrífuga durant 1 minut i es descarta el sobrenedant.
- S'afegeix 100 µl d'isopropanol per cada 100 mg de gel.
- Es posa la solució en una columna (*QIAquick spin column*), on el DNA s'uneix a la columna.
- Es centrifuga la columna durant 1 minut i s'afegeix 0.5 ml de tampó QG.
- Es centrifuga la columna durant 1 minut i s'afegeix 0.75 ml de tampó PE.
- Es centrifuga la columna durant un minut i es torna a centrifugar 1 minut més.
- Es col·loca la columna a sobre d'un tub Eppendorf nou i s'elueix el DNA amb 50 µl de tampó EB.

### 8.11.3- Quantificació de la concentració de DNA

Per quantificar el DNA es va utilitzar dos mètodes. El primer es basa en la comparació visual de la lluminositat de la banda obtinguda respecte la lluminositat de les bandes del marcador de pes molecular, de concentració coneguda. El segon mètode és més precís i consisteix en la lectura de l'absorció a 260 nm ( $A_{260}$ ) amb un espectrofotòmetre (Shimadzu UV-160A) que dona la mesura de la concentració de DNA present a la mostra. Per tal de determinar aquesta concentració es va diluir 2 µl de la solució de DNA en 800 µl d'aigua ultrapura. Seguidament, es va fer la lectura d'absorbància entre les longituds d'ona de 320 a 210 nm. Per calcular la concentració de DNA plasmídic present a la mostra es va utilitzar la fórmula següent:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 \times \text{Dilució}^{-1}$$

La relació  $A_{260}/A_{280}$  és un indicatiu de la puresa de les mostres. Els valors d'aquesta relació compresos entre 1.8 i 1.9 per al DNA i 1.9-2.0 per al RNA es consideren

acceptables. La relació disminueix en presència de contaminants que absorbeixen a 280 nm.

## 8.12- Obtenció i amplificació enzimàtica del material genètic

### 8.12.1- Disseny dels encebadors

A partir de les seqüències conegudes dels gens *bcl-2*, *bcl-x<sub>L</sub>*, *ksbcl-2*, *bhrf-1* i *p35* extretes de les bases de dades disponibles en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) es van dissenyar els encebadors que delimiten les regions codificants corresponents als mRNA d'aquests gens. Aquests encebadors inclouen el codó d'iniciació de la traducció (AUG) i el codó de terminació (UGA, UAA, UAG). Es va afegir a l'extrem 5' dels encebadors dianes de restricció per tal de realitzar lligacions orientades en vectors d'expressió addients. A més, en els encebadors es va incloure la seqüència de Kozak (CCACC) per tal d'assegurar nivells elevats de transcripció [Kozak, 1987]. A l'hora de dissenyar els encebadors es va tenir en compte la seva temperatura de fusió ( $T_m$ ). La  $T_m$  és la temperatura de dissociació de l'encebador hibridat a una seqüència complementària i, es calcula a partir de l'equació següent:

$$T_m = (69.3^\circ\text{C} + 0.41 \times (\%GC) - 650) / L$$

on %GC és el percentatge de bases nitrogenades guanina i citosina presents a l'oligonucleòtid i L la longitud de l'oligonucleòtid.

Els dos encebadors emprats per amplificar un fragment específic de DNA han de tenir una  $T_m$  propera.

Els encebadors emprats en aquest treball són els següents:

<i>bcl-2</i>	Líder: 5' -ATGCGAATTCATGGCGCACGCTGGGAG- 3'	<i>EcoRI</i>
	Cua: 5' - <u>CTCGAGTCACTTGTGGCC</u> CAGATA- 3'	<i>XhoI</i>
<i>bcl-2</i>	Líder: 5' -AGTCGCGGCCGCCACCATGGCGCACGCTGGGAG- 3'	<i>NotI</i>
	Cua: 5' -AGTCGAATTC <u>TCACTTGTGGCC</u> CAGATAGGCACCCAGGG- 3'	<i>EcoRI</i>
<i>bcl-2</i>	Líder: 5' -ATGCGAATTCATGGCGCACGCTGGGAG- 3'	<i>EcoRI</i>
	Cua: 5' -AGTCGCGGCCGCTCACTTGTGGCCAGATAGGCAC- 3'	<i>NotI</i>

<i>bcl-2</i> +IRES	Líder: 5' -AACCGGCATCTGCACACCTG- 3' Cua: 5' -AGAGGGGAAAGACCCCTAGG- 3'	
<i>bcl-x<sub>L</sub></i>	Líder: 5' - GAATTCCACCC <b>ATG</b> TCTCAGAGCAACCGGGA- 3' Cua: 5' - CTCGAGT <b>TCAGT</b> GTCTGGTCACTTCCGACTG - 3'	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>
<i>bhrf-1</i>	Líder: 5' -GAATTCCACCC <b>ATG</b> GCCTATTCAACAAGGGAGATACT- 3' Cua: 5' - GCGGCCGCT <b>TTAGT</b> GTCTTCTCTGGAGATAAAT- 3'	<i>EcoRI</i> <i>NotI</i>
<i>bhrf-1</i>	Líder: 5' -AGTCGCGGCCGCCACCC <b>ATG</b> GCCTATTCAAC- 3' Cua: 5' -TCAGGCGGCCGCT <b>TTAGT</b> GTCTTCTCTGGAG - 3'	<i>NotI</i> <i>NotI</i>
<i>p35</i>	Líder: 5' -CGGAATTCACCC <b>ATG</b> TGTGTAATTTTTCCGGTAGAAAT- 3' Cua: 5' -TCAGGCGGCCGCT <b>TAAT</b> TGTGTTTAATATTACATTTTTGTTG- 3'	<i>EcoRI</i> <i>NotI</i>
<i>egfp</i>	Líder: 5' -AGTCGCGGCCGCCACCC <b>ATG</b> GTGAGCAAGGGCGAG- 3' Cua: 5' -TACGGGATCC <b>TTACT</b> TGTACAGCTCGTC- 3'	<i>NotI</i> <i>BamHI</i>
<i>egfp</i>	Líder: 5' -AGTCCCGGGGCCACCC <b>ATG</b> GTGAGCAAGGGCGAG - 3' Cua: 5' -TACGTCTAGAT <b>TTACT</b> TGTACAGCTCGTC - 3'	<i>SmaI</i> <i>XbaI</i>

Les dianes de restricció es destaquen subratllades i el codó d'inici i el de stop en negreta.

### 8.12.2- Amplificació per PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és un mètode ràpid per amplificar enzimàticament fragments específics de DNA. Els reactius i la metodologia que es va emprar són els indicats per l'enzim *Gentaq-DNA polimerasa* (Progenetic) i *Pfu DNA polimerasa* (Fermentas).

Per dur a terme la PCR es van utilitzar els components següents:

- H<sub>2</sub>O ultrapura estèril
- Deoxinucleòtids trifosfat (dNTPs) 10x (2.5 mM) a partir de 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP (Fermentas)
- Oligonucleòtids encebadors 50x (10µM)
- DNA motlle
- *Gentaq DNA polimerasa* / *pfu DNA polimerasa*
- Tampó Gentaq 10x (Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50 mM i gelatina 0.001% a pH 8.3 mesurat a 20°C) / Tampó pfu 10x ( (200mM Tris-HCl (pH

8.8 at 25°C), 100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100mM KCl, 1% Triton X-100, 1mg/ml BSA)

**Procediment:**

Es prepara un tub de PCR a on s'afegeixen els components de la reacció de PCR següents:

COMPONENTS	VOLUM (µL)	CONCENTRACIÓ FINAL
DNA motlle	x	0.1 - 0.75 µg
dNTP (2.5 mM)	5	0.25 mM
Tampó Gentaq	5	1x
Encebador dret	1	0.2 µM
Encebador esquerra	1	0.2 µM
DNA polimerasa	x	1 U
H <sub>2</sub> O ultrapura estèril	Fins a 50 µl	

Es col·loca el tub en el termociclador *Gene Cycler* (BIO-RAD) i es comencen els cicles d'amplificació tal i com es mostra en el programa següent:

Nº DE CICLES	TEMPERATURA (°C)	DURADA	FUNCIÓ
1	95	2 min	Desnaturalitzar el motlle
30	95	30 s	Desnaturalització
	T <sub>h</sub>	45 s	Unió motlle-encebadors
	72	1 min	Elongació
1	72	10 min	Elongació addicional

La temperatura d'hibridació T<sub>h</sub> (temperatura a la qual l'encebador s'uneix al DNA motlle) es calcula com T<sub>m</sub>-5°C. En el cas que l'amplificació no doni el resultat esperat, cal determinar la temperatura d'hibridació empíricament. El temps d'elongació de la cadena depèn de la longitud del fragment que es vol amplificar.

Quan va ser necessari reamplificar una banda de DNA, es va fer la reacció a partir del retall de la banda en agarosa i amb el programa descrit anteriorment però amb només 16-18 cicles.

Els fragments de DNA obtinguts per PCR es van dur a seqüenciar al Servei de Seqüenciació i Síntesi d'Àcids Nucleics de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

### 8.12.3- Amplificació per RT-PCR

Aquesta és una tècnica molt sensible que permet determinar la presència o absència d'un RNA missatger (mRNA) concret en un extracte cel·lular i per tant pot ser emprada per determinar i fins i tot quantificar l'expressió de determinats gens. A més a més, permet l'obtenció de cDNA sense la necessitat d'haver de recórrer a llibreries existents.

Els reactius i la metodologia emprada són els indicats pel producte "Titan One Tube RT-PCR System" (Roche, N° 1 888 382). Aquest kit utilitza l'activitat de la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosi aviària (AMV) per a la síntesi de la primera cadena de cDNA i una barreja de *Taq* i *Pwo* polimerases per a la seva amplificació. En la reacció de RT-PCR es va partir sempre de 5 µg de RNA<sub>Total</sub>.

Per dur a terme la RT-PCR es van utilitzar els components següents:

- H<sub>2</sub>O ultrapura estèril
- 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP (Fermentas)
- Oligonucleòtids encebadors 50x (10µM)
- RNA motlle
- Solució de DTT: 1000 µl de solució 100 mM de ditiotreitòl (DTT)
- Tampó de RT-PCR (5x): 1000 µl d'una solució 7.5 mM de MgCl<sub>2</sub> i DMSO
- Solució que conté una barreja de *Pwo* i *Taq* polimerases així com la transcriptasa inversa AMV

En el moment de realitzar la RT-PCR, es col·loquen dos tubs en gel i es preparen les dues solucions següents:

Solució A:

COMPONENTS	VOLUM ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓ FINAL
dATP, 10 mM	1	200 $\mu\text{M}$
dCTP, 10 mM	1	200 $\mu\text{M}$
dGTP, 10 mM	1	200 $\mu\text{M}$
dTTP, 10 mM	1	200 $\mu\text{M}$
Encebador dret 10 $\mu\text{M}$	1	0.2 $\mu\text{M}$
Encebador esquerra 10 $\mu\text{M}$	1	0.2 $\mu\text{M}$
RNA motlle	x	1 $\mu\text{g}$ - 1 pg de RNA total
Solució de DTT	2.5	5000 $\mu\text{M}$
H <sub>2</sub> O ultrapura estèril	Fins a 25 $\mu\text{l}$	

Solució B:

COMPONENTS	VOLUM A AFEGIR ( $\mu\text{L}$ )
Tampó de RT-PCR (5x)	10
Barreja d'enzims	1
H <sub>2</sub> O ultrapura estèril	14

S'afegeixen 25  $\mu\text{l}$  de solució A i 25  $\mu\text{l}$  de solució B a cada tub de PCR. Es barreja adequadament i es centrifuga breument per tal de recollir la solució en el fons del tub. Es col·loquen els tubs en el termociclador *Gene Cyclor* (Biorad) i es comença els cicles d'amplificació tal i com es mostra en el programa següent:

Nº DE CICLES	TEMPERATURA (°C)	DURADA	FUNCIÓ
1	50	30 min	Allargar la còpia de cDNA
1	94	2 min	Desnaturalització
35	94	20 s	Desnaturalització
	T <sub>h</sub>	45 s	Unió motlle-encebadors
	68	1 min	Elongació
1	68	10 min	Elongació final

Es van modificar les  $T_h$  segons les seqüències dels encebadors dissenyats, i el temps d'elongació de la cadena, segons la longitud del fragment que es volia amplificar.

Tant en la reacció de PCR com de RT-PCR, quan les seqüències a amplificar tenen un elevat contingut en guanines i citosines, s'afegeix DMSO al 10% (v/v) final.

### **8.13- Modificacions enzimàtiques del DNA**

#### 8.13.1- Restricció enzimàtica

Les endonucleases de restricció són enzims que hidrolitzen el DNA bicatenari en llocs específics segons la seva seqüència. Els enzims de tipus 2, els més utilitzats reconeixen seqüències de 4 a 6 nucleòtids, normalment simètriques. Alguns tallen per l'eix de simetria donant lloc a molècules amb els extrems roms i altres deixen extrems 5' o 3' protuberants anomenats cohesius. Les quantitats d'enzim, DNA, tampó, la concentració iònica, la temperatura i la durada de la reacció depenen, en cada cas, de l'enzim i de l'aplicació específica. Normalment, la majoria dels enzims actuen a 37°C, tot i que n'hi ha que requereixen temperatures diferents. El tampó d'incubació és específic per a cada enzim. Els tampons usuals de digestió contenen  $MgCl_2$ , NaCl o KCl, Tris-HCl,  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT i BSA. La presència de cations divalents és imprescindible per a l'activitat enzimàtica. La concentració de cations monovalents és més crítica i depèn de cada enzim específic. Pot variar entre 0 i 150 mM de  $Na^+$ . Els tampons es preparen concentrats 10x i es guarden a -30°C.

L'activitat dels enzims es mesura en unitats d'activitat. Una activitat d'enzim de restricció es defineix com la quantitat necessària per digerir completament 1  $\mu$ g de DNA en 60 minuts, en les condicions recomanades. El volum d'enzim ha de ser inferior a 1/10 part del volum final de la barreja de reacció, ja que el glicerol present en el tampó pot arribar a interferir si la seva concentració és superior al 5%.

Els enzims es conserven a -30°C i cal mantenir-los en gel durant la seva utilització. No convé tenir-los fora del congelador més temps del necessari per agafar l'alíquota desitjada.

En aquest treball s'han utilitzat enzims de restricció subministrats per la companyia Roche i Fermentas, amb els seus respectius tampons.

**Procediment:**

En un tub Eppendorf s'afegeixen els components següents:

COMPONENT	VOLUM A AFEGIR (µL)
Mostra amb DNA	x
Tampó de restricció	1
Enzims de restricció	1 (1-5 U/µg DNA)
H <sub>2</sub> O Ultrapura estèril	Fins a 10 µl

S'incuba 1 o 2 hores a la temperatura adient (normalment 37°C). La reacció s'atura afegint EDTA (0.2 M) a una concentració final de 20 mM per quelar els ions Mg<sup>2+</sup>, o bé congelant a -30°C. Si el DNA digerit ha de ser utilitzat en posteriors reaccions enzimàtiques, no és aconsellable l'addició d'EDTA. Per aquest motiu, s'inactiva l'enzim escalfant a 65°C durant 10 minuts. Posteriorment, es purifica el DNA amb el *QIAquick Gel Extraction Kit* per tal d'eliminar l'enzim present en la mostra.

Quan s'ha de digerir el DNA amb més d'un enzim de restricció i les condicions de reacció dels enzims són les mateixes, es poden afegir conjuntament en la reacció i es segueix el protocol de digestió explicat en aquest apartat. Si varia la temperatura de reacció, s'ha d'incubar primer amb l'enzim que hidrolitza a menor temperatura i després, augmentar la temperatura i afegir el segon enzim. Si les concentracions salines difereixen, s'ha de digerir primer el DNA amb l'enzim actiu a la concentració més baixa de sal, i a continuació, afegir NaCl per obtenir una concentració final adequada per a l'activitat del segon enzim i deixar seguir la reacció de digestió.

8.13.2- Reompliment d'extrems

En determinades circumstàncies és necessari transformar els extrems cohesius d'un fragment de DNA o d'un plasmidi linearitzat en extrems roms. En aquest cas



s'utilitza l'enzim T4 DNA polimerasa (Roche), amb el seu corresponent tampó de reompliment:

- T4 DNA polimerasa
- Tampó de reompliment (5x): 250 mM Tris-HCl, 75 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 50 mM 2-Mercaptoetanol, 0.1 mg/ml BSA a pH 8.8 mesurat a 25°C

Aquest enzim reomple els extrems 3' del DNA en presència de deoxinucleòtids. És necessari que hi hagi un excés de nucleòtids ja que aquest mateix enzim pot tenir activitat exonucleasa 3' en absència de nucleòtids. Per a la reacció s'utilitza una barreja en la que els quatre deoxinucleòtids trifosfats (dNTPs) es troben a una concentració de 2.5 mM.

**Procediment:**

En un tub Eppendorf s'afegeixen els components següents:

COMPONENT	VOLUM A AFEGIR (µL)
Mostra amb DNA	x
Solució dNTPs (2.5 mM)	4
Tampó de reompliment (5x)	8
T4 DNA polimerasa (1 U/µl)	1
H <sub>2</sub> O Ultrapura estèril	Fins a 40 µl

S'incuba a 37°C durant 1 hora. La reacció s'atura afegint 2 µl d'EDTA 0.2 M o bé escalfant a 65°C durant 10 minuts. Posteriorment, es purifica el DNA amb el *QIAquick Gel Extraction Kit* per eliminar l'enzim T4 DNA polimerasa de la mostra.

8.13.3- Desfosforilació de DNA

La defosforilació dels extrems 5' del DNA es realitza per tal d'evitar el religament dels plasmidis linearitzats amb enzim de restricció. L'enzim utilitzat per portar a terme aquesta reacció és la fosfatasa alcalina (Roche), amb el seu corresponent tampó

de desfosforilació. S'afegeix 1 µl de solució de fosfatasa alcalina per cada 50 pmol de DNA a desfosforilar. Els reactius requerits són els següents:

- Fosfatasa alcalina
- Tampó de desfosforilació (10x): 0.5 M Tris-HCl, 1 mM d'EDTA a un pH de 8.5 mesurat a 20°C

**Procediment:**

En un tub Eppendorf s'afegeixen els components següents:

COMPONENT	VOLUM A AFEGIR (µL)
Mostra amb DNA	x
Tampó de desfosforilació (10x)	4
Fosfatasa alcalina (1 U/µl)	1
H <sub>2</sub> O Ultrapura estèril	Fins a 39 µl

S'incuba durant 30 minuts a 50°C si els extrems són roms i a 37°C si els extrems són cohesius. A continuació s'afegeix 1 µl més de fosfatasa alcalina i es deixa incubar durant 30 minuts a la mateixa temperatura. La reacció s'atura afegint 2 µl d'EDTA 0.2 M o bé escalfant a 65°C durant 10 minuts. Seguidament, es purifica el DNA amb el *QIAquick Gel Extraction Kit* per treure les restes d'enzim.

8.13.4- Lligació de fragments de DNA

La lligació de fragments de DNA és una tècnica utilitzada per unir inserts a plasmidis. L'enzim utilitzat per dur a terme aquesta reacció és la T4 DNA lligasa (Fermentas), amb el seu corresponent tampó de lligació. Aquest enzim requereix de la presència d'ATP per portar a terme la reacció. El tampó de lligació utilitzat ja inclou la quantitat d'ATP necessària. Els reactius requerits són els següents:

- Lligasa T4

- Tampó de lligació (10x): 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT i 5 mM ATP a un pH 7.8 mesurat a 25°C

**Procediment:**

En un tub Eppendorf s'afegeixen els components següents:

COMPONENT	VOLUM A AFEGIR (µL)
Plasmidi	x
Insert	x
Tampó de lligació (10x)	2
T4 DNA lligasa (5 U/µl)	1
H <sub>2</sub> O ultrapura estèril	Fins a 19 µl

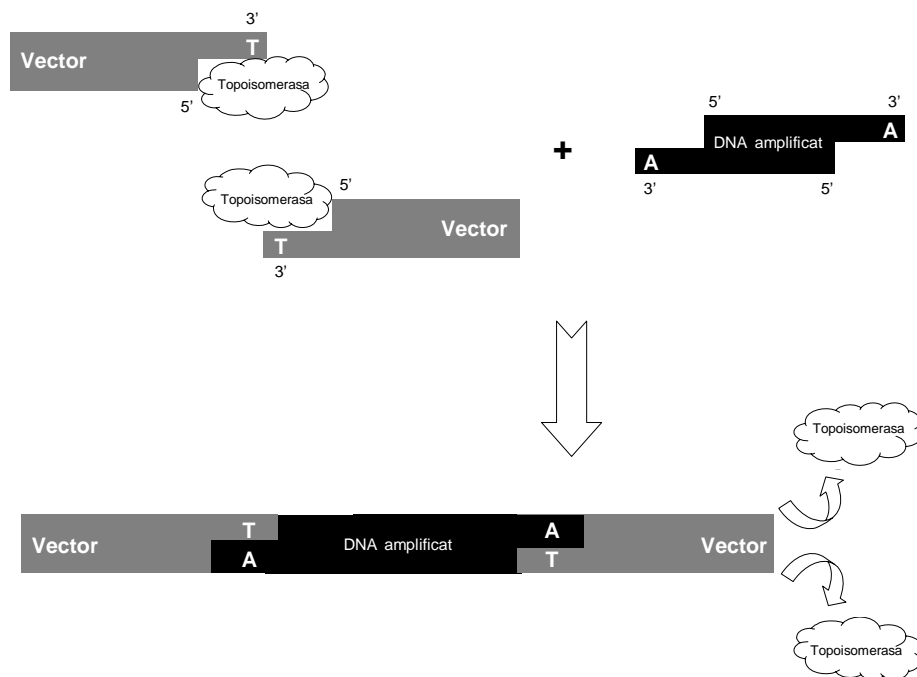
La quantitat de plasmidi i insert que s'ha d'afegir depèn de la proporció molar existent entre les dues mostres de partida. Si els extrems a lligar són roms s'afegeix a la reacció la solució PEG4000 (polietilèglicol) que incrementa l'eficiència de la lligació. La concentració final recomanada de PEG4000 és d'un 5% (p/v).

S'incuba la mescla a 4°C durant tota la nit i l'endemà s'afegeix 1 µl de T4 DNA lligasa i s'incuba durant 6 hores més a 4°C.

8.13.5- TOPO Cloning Kit

En aquells casos en què hi ha hagut problemes en la clonació d'inserts, s'ha fet servir el *TOPO Cloning Kit* (Invitrogen) que assegura, mitjançant l'ús de topoisomerases unides als extrems del vector pCR2.1-TOPO linearitzat, una lligació ràpida i eficient dels fragments de DNA amplificats per PCR amb l'enzim *Taq* polimerasa.

En la Fig. 8.8 es mostra l'esquema de la clonació directa d'un fragment de DNA en el vector pCR2.1-TOPO. Per amplificar el fragment, en la reacció de PCR o RT-PCR, s'utilitza l'enzim *Taq polimerasa* per generar seqüències de DNA amb extrems complementaris als extrems del vector pcDNA4.



**Fig. 8.8-** Esquema del procés de clonació utilitzant el *TOPO cloning Kit*.

### Vector pCR2.1-TOPO:

El pCR2.1-TOPO (Fig. 8.9) és un vector de clonació d'aproximadament 3.9 kb que conté dos marcadors de selecció, un que confereix resistència a la kanamicina i un altre a l'ampicil·lina. També du l'origen de replicació (pUC ori) i un fragment del gen lacZ d' *E.coli*. Aquest fragment codifica els primers 146 aa de la  $\beta$ -galactosidasa per a la  $\alpha$ -complementació.

### Reactius:

- pCR2.1-TOPO: Un tub de 20  $\mu$ l amb 10 ng/ $\mu$ l de DNA plasmídic, 50% glicerol, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100  $\mu$ g/ml BSA, roig de fenol, pH 7.4 a 25°C

### Procediment:

- Inicialment, es barreja 4  $\mu$ l del producte de PCR/RT-PCR (veure apartat 8.12.2 i 8.12.3) amb 1  $\mu$ l de vector pCR2.1-topo i s'incuba durant 5 minuts a temperatura

ambient. Aquest pas només és possible si el producte obtingut per PCR/RT-PCR conté a l'extrem 3' adenines. La topoisomerasa situada als extrems del vector uneixen el producte amb el vector.

- S'afegeixen 2 µl de la mescla en un tub Eppendorf que conté 200 µl de cèl·lules competents HB101 i s'inicia la transformació (veure apartat 8.14).

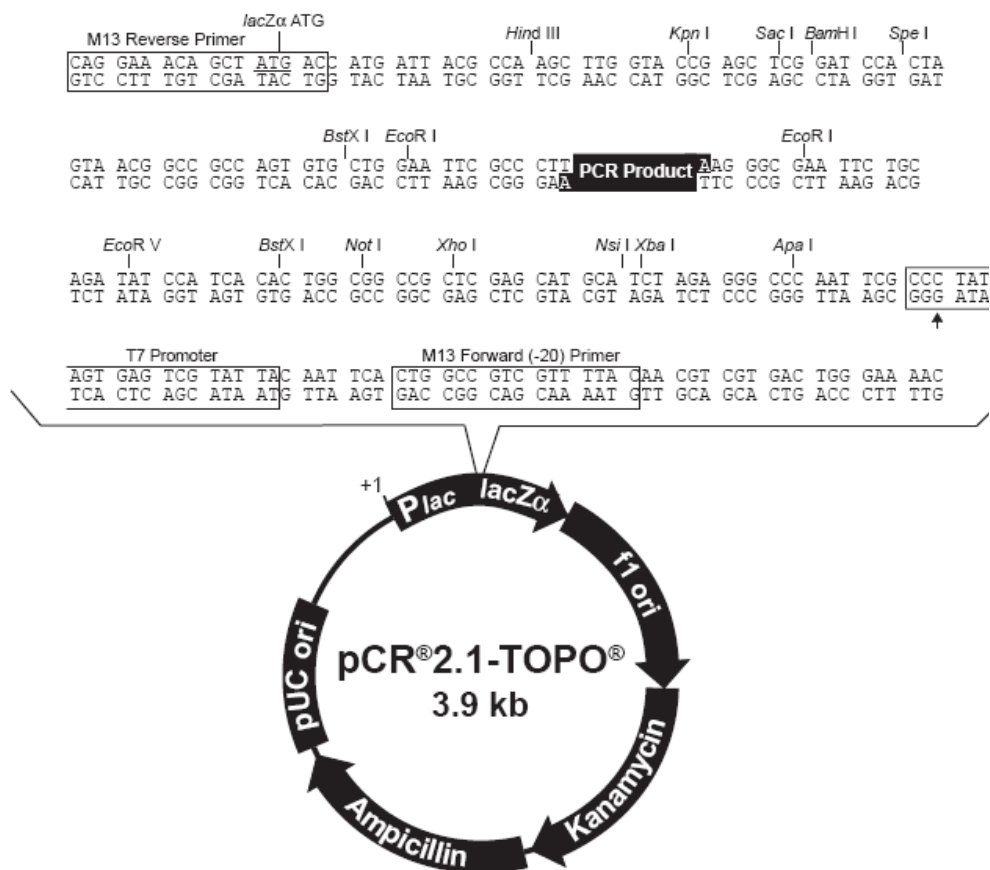


Fig. 8.9- Esquema del vector pCR2.1-TOPO

## 8.14- Transformació

El procés de transformació consisteix en la incorporació de DNA plasmídic exogen en cèl·lules d'*E. coli*.

### 8.14.1- Preparació de cèl·lules competents. Mètode clorur de calci

Inicialment es preparen les solucions següents:

- $\text{CaCl}_2$  0.5 M
- Tris 1M (pH 8.0)
- $\text{CaCl}_2$  50 mM en Tris 10 mM (pH 8.0). La solució s'esterilitza per filtració
- Medi LB líquid

**Procediment:**

- S'inocula un pre-cultiu de 3 ml de medi LB amb la soca HB101 i s'incuba durant 12 hores a 37°C amb agitació.
- S'inocula un cultiu de 50 ml de medi LB amb 500 µl de pre-cultiu i s'incuba a 37°C amb agitació fins que el cultiu tingui  $A_{550} = 0.4-0.5$ .
- El cultiu es centrifuga a 2500 rpm (Centrífuga Sorvall) durant 10 minuts a 4°C. El pellet es resuspèn en 12.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM/ Tris 10 mM i es deixa reposar 15 minuts a 0°C.
- Es centrifuga 10 minuts a 2500 rpm a 4°C, es descarta el sobrenedant i el pellet es resuspèn en 4 ml de la solució de  $\text{CaCl}_2$ .
- Es preparen alíquotes de 200 µl. Si no s'han d'utilitzar s'afegeix un 20% de glicerol i es conserva a -80°C.

8.14.2- Transformació

Per dur a terme la transformació s'ha de treballar en condicions estèril, al costat d'una flama.

**Procediment:**

- Barrejar 200 µl de cèl·lules competents amb el DNA a transformar (10-100 ng en un volum inferior al 10% del total).
- Mantenir en gel 30 minuts.
- Xoc tèrmic a 42°C durant 2 minuts.
- Mantenir en gel durant 90 segons.
- Diluir amb 0.5 ml de medi LB.

- Incubar aproximadament 1 hora a 37°C.
- Sembrar en plaques LB selectives.
- Incubar les plaques invertides a 37°C durant tota la nit.

### 8.15- Transfecció de cèl·lules animals

L'estudi de la regulació i expressió gènica en cèl·lules eucariotes requereix del desenvolupament de mètodes per transferir el DNA dins d'aquestes cèl·lules.

En aquest treball per dur a terme la transfecció s'han provat tres metodologies diferents: la lipofecció, l'electroporació i l'ús d'adenovirus.

#### 8.15.1- lipofecció

El reactiu DMRIE-C (Life Technologies) és un liposoma catiònic compost pel lípid catiònic DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxi ethyl ammonium bromide) i colesterol, que interacciona amb els grups fosfat carregats negativament del DNA. Es creu que aquest complex és introduït a dins de la cèl·lula per endocitosi. Per dur a terme el protocol de transfecció s'utilitzen els medis i reactius següents:

- DMRIE-C (Life Technologies)
- Medi DMEM sense sèrum
- Medi DMEM 4% FCS
- Medi DMEM 8% FCS
- Medi DMEM 8% FCS amb 6 µg/ml de puromicina (transfeccions pIRESpuro2) i medi DMEM 8% FCS 6 mg/ml G418 (transfeccions pcDNA3, pIRESneo)
- Medi de cultiu DMEM 4% FCS amb 3 µg/ml de puromicina (transfeccions pIRESpuro2) i medi DMEM 4% FCS 3 mg/ml G418 (transfeccions pcDNA3, pIRESneo)

#### **Procediment:**

- Diluir 8 µl de reactiu DMRIE-C amb 500 µl de medi DMEM sense sèrum en un pou d'una placa de poliestirè (6 o 12 pous) (Orange Scientifics, 2030400) per preparar la solució A.
- Calcular els microlitres necessaris de DNA per obtenir una quantitat final de 4 µg de DNA. Diluir els microlitres de DNA amb 500 µl de medi DMEM sense sèrum en un altre pou per preparar la solució B.
- Barrejar la solució A amb la solució B durant 45 minuts a temperatura ambient.
- Paral·lelament, es determinen el nombre de cèl·lules que s'inocularan en la solució final (solucions A+B) tenint en compte que es requereixen  $8 \times 10^5$  cèl·lules per pou. Aquestes cèl·lules han de provenir d'un cultiu que es trobi a la meitat de la fase exponencial de creixement. En el cas de transfectar cèl·lules adherents, aquestes han d'estar a una confluència del 60-80% en els pous i preferentment plaquejades el dia anterior, ja que com més vell és el cultiu, pitjor és l'eficiència de transfecció.
- Es renten les cèl·lules amb medi sense sèrum, centrifugant la suspensió cel·lular durant 5 minuts a 500g. Es resuspenen les cèl·lules en 200 µl de medi sense sèrum i es col·loquen en un pou. A continuació, s'afegeix la solució A+B lentament damunt de les cèl·lules. En el cas de les cèl·lules adherents, es treu el medi de cultiu i s'afegeix lentament la solució A+B.
- En el cas d'emprar la puromicina, al cap de 24 hores s'afegeix en el pou 1 ml de medi DMEM 8% FCS per tal que la concentració final sigui del 4% FCS. Al cap de 48 hores, es treu 1 ml de la solució i s'afegeix 1 ml de medi DMEM 4% FCS amb 6 µg/ml de puromicina per tal que la concentració final de puromicina sigui de 3 µg/ml. Cada 3-4 dies cal canviar el medi eliminant 1 ml de medi vell i afegint 1 ml de medi nou DMEM 4% FCS amb 3 µg/ml de puromicina.
- En el cas d'utilitzar la neomicina, al cap de 24 hores s'afegeix en el pou 1 ml de medi DMEM 8% FCS amb 6 mg/ml de neomicina per tal que la concentració final sigui del 4% FCS amb 3 mg/ml de neomicina. Cada 3-4 dies cal canviar el



medi eliminant 1 ml de medi vell i afegint 1 ml de medi nou DMEM 4% FCS amb 3 mg/ml de neomicina.

Donat que la neomicina té un efecte més lent sobre les cèl·lules que la puromicina, s'afegeix la neomicina al cultiu 24 hores després d'haver realitzat la transfecció.

### 8.15.2- Electroporació

L'electroporació és una tècnica que es basa en l'aplicació d'un elevat voltatge a les cèl·lules durant un període curt de temps per permeabilitzar la membrana plasmàtica i permetre la introducció del DNA. La permeabilització dels fosfolípids depèn bàsicament del nombre, la intensitat i la duració de les pulsacions elèctriques. Aquesta tècnica és fàcil, segura i els costos associats són baixos. L'electroporació de les cèl·lules es va dur a terme amb l'electroporador BTX 600 amb cubetes d'electroporació de 2 mm de gap (620 BTX).

#### **Solucions:**

- PBS 0.1 M
- Medi DMEM 4% FCS

#### **Procediment:**

- S'afegeix 500 µl d'una suspensió cel·lular de  $1 \times 10^7$  cèl·lules/ml en PBS i 5 µg de DNA plasmídic linearitzat en una cubeta d'electroporació de 2 mm de gap (620 BTX). Les cèl·lules es renten prèviament amb PBS.
- S'incuba 10 min en gel la cubeta d'electroporació.
- Es sotmet la barreja a un voltatge de 200 v, una capacítància de 25 µF i una resistència R4 (72 Ω) durant 1.1 ms en l'aparell d'electroporació BTX-600. Es realitzen dues pulsacions en aquestes condicions i entre cada pulsació es deixa la cubeta 1 min en gel.

- Un cop electroporades les cèl·lules, s'incuba la suspensió cel·lular 10 min en gel.
- Es resuspèn la suspensió cel·lular en 10 ml de medi DMEM al 4% FCS.
- Al cap de 24 hores s'afegeix medi fresc.
- A les 48 hores s'observen les cèl·lules al microscopi confocal.

### 8.15.3- Coprecipitats Adenovirus-DNA

Aquest mètode de transfecció combina el mètode clàssic del fosfat càlcic amb la capacitat dels adenovirus de transferir el material genètic a les cèl·lules [Lee i welsh, 1999]. En aquest treball es va emprar Ad2-CMV-GFP ( $7.25 \times 10^{11}$  partícules físiques/ml i  $5.12 \times 10^{10}$  partícules infectives/ml, obtingut del CBATEG, UAB) que incorpora la GFP com a marcador de selecció.

#### **Solucions:**

- $\text{CaCl}_2$  2M
- DMEM sense sèrum

#### **Procediment:**

- Es dilueix  $4 \times 10^9$  partícules físiques de virus (Ad2-CMV-GFP) i 1  $\mu\text{g}$  DNA plasmídic en 200  $\mu\text{l}$  de medi DMEM sense sèrum.
- S'afegeix a la solució 0.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2M i es barreja lentament.
- S'incuba la solució durant 30 min a temperatura ambient.
- Es posa  $8 \times 10^5$  cèl·lules en un pou d'una placa de poliestirè de 6 pous (Orange Scientifics, 2030400) i s'afegeix al damunt la solució virus-DNA. Aquestes cèl·lules han estat prèviament rentades amb medi DMEM sense sèrum.
- S'incuba a  $37^\circ\text{C}$  durant 40 min.
- Es centrifuga les cèl·lules a 500 g durant 5 min.

- S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb 1 ml de medi DMEM al 4 %.
- Al cap de 24 hores s'afegeix medi fresc.
- A les 48 hores s'observen les cèl·lules al microscopi confocal.

#### 8.15.4- Seguiment de la transfecció

En cada tanda de transfecció s'afegeixen tres controls:

- Cèl·lules d'hibridoma sense transfectar cultivades en un medi DMEM 4% FCS sense marcador de selecció. Aquest control es fa per comprovar que els cultius creixen normalment.
- Cèl·lules sense transfectar cultivades en un medi DMEM 4% FCS amb antibiòtic. Aquest control serveix per verificar que les cèl·lules que no han incorporat el vector es moren.
- Cèl·lules transfectades amb els vectors pIRESpuro2, pIRESneo o pcDNA3, i cultivades en un medi DMEM 4% FCS amb el seu marcador de selecció, respectivament. Aquest control permet observar l'expressió correcta dels vectors transfectats.

La presència d'un clon es pot detectar quan les cèl·lules no transfectades del cultiu control amb antibiòtic estan mortes ja que les cèl·lules transfectants són les úniques capaces de sobreviure en un medi amb antibiòtic.

#### 8.16- Infecció de l'hibridoma KB26.5 amb virus adenoassociats

Les cèl·lules d'hibridoma es va infectar amb el virus adenoassociat AAV-CMV-GFP ( $2.25 \times 10^{11}$  partícules físiques/ml) i AAV2-CMV-(nls)LacZ ( $4.5 \times 10^{11}$  partícules físiques/ml i  $6.30 \times 10^6$  partícules infectives/ml). Ambdós virus van ser cedits pel CBATEG, un d'ells com a marcador la proteïna GFP i l'altre el gen *lacZ* que codifica per a la proteïna  $\beta$ -galactosidasa. Els hibridomes es van infectar a una multiplicitat

d'infecció (MOI) de 1, 10 i 50. La MOI es defineix com el nombre d'unitats formadores de calves (pfu, *plaque forming units*) que hi ha per cèl·lula.

$$\text{MOI} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de virions}}{\text{n}^\circ \text{ de cèl·lules}} \quad (\text{Eq. 8.4})$$

#### 8.16.1- Determinació de l'activitat de la $\beta$ -galactosidasa

Per tal de detectar les cèl·lules infectades amb el virus AAV2-CMV-(nls)LacZ es va realitzar l'assaig  $\beta$ -galactosidasa. Aquest assaig consisteix en posar en contacte l'extracte cel·lular amb un substrat artificial anomenat ONPG (Orto-nitrofenil-  $\beta$  galactòsid). En presència de  $\beta$ -galactosidasa, l'ONPG s'hidrolitza en galactosa i orto-nitrofenil (ONP), un compost de color groc en medi alcalí. La quantitat de color groc pot ser mesurat en un espectrofotòmetre.

#### **Solucions:**

- Solució de lisi (0.1 % triton X-100, 0.1 M tris-HCl (pH=8))
- Fosfat sòdic 0.1 M (pH=7.5)
- Solució de clorur de magnesi ( 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 4.5 M  $\beta$ -mercaptoetanol)
- Substrat (4 mg/ml de ONPG en fosfat sòdic 0.1 M).
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M
- PBS

#### **Procediment:**

Obtenció de l'extracte cel·lular:

- Es renten les cèl·lules infectades amb PBS dues vegades centrifugant a 500g durant 5 minuts.
- Es descarta el sobrenedant i s'afegeix al pellet 750  $\mu$ l de solució de lisi.
- S'incuba 15 min a temperatura ambient amb agitació suau ocasional.
- Es vorteja 15 segons l'extracte cel·lular i es congela en neu carbònica/etanol.
- Es descongela la solució a 37°C, es centrifuga a 13000 rpm (microcentrífuga) 15 segons i es passa el sobrenedant a un nou tub.

- Es conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins que es realitza l'assaig  $\beta$ -galactosidasa.

Assaig  $\beta$ -galactosidasa:

- Es barreja en gel:
  - 201  $\mu\text{l}$  de fosfat sòdic 0.1M
  - 3  $\mu\text{l}$  de solució clorur de magnesi
  - 66  $\mu\text{l}$  de ONPG
  - 33  $\mu\text{l}$  de mostra
- S'incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durant aproximadament 3 hores (apareix coloració groga).
- S'afegeix 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M per aturar la reacció enzimàtica.
- Es llegeix l'absorbància a 420 nm en un espectrofotòmetre. El blanc que s'utilitza conté solució de lisi enlloc d'extracte cel·lular.

### 8.17- Tècniques de seguiment de l'apoptosi

#### 8.17.1- Marcatge amb Anexina-V-Fluos i quantificació per citometria de flux

La detecció de la translocació de la fosfatidilserina es du a terme mitjançant el marcatge amb anexina-v-fluos (Roche) un anticòs específic de la fosfatidilserina que porta conjugat una molècula fluorescent anomenada fluoresceïna. Aquest anticòs permet la quantificació mitjançant citometria de flux del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta translocació [Blanckenberg i col., 1998].

#### Solucions:

- PBS 0.1 M
- Solució de dilució: 2.38 g/l NaCl, 8.19 g/l  $\text{CaCl}_2$  anhidre, 0.55 g/l HEPES (Sigma)
- Solució anexina-v-fluos 2%

#### Procediment:

- Es centrifuga a 500g durant 5 minuts el volum de cultiu necessari per obtenir un nombre total de  $3 \times 10^5$  cèl·lules.
- Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en 1 ml de tampó PBS 0.1M.
- Es centrifuguen les cèl·lules a 500g durant 5 minuts.
- Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb 50 µl de solució de dilució.
- S'afegeix 50 µl de la solució Annexina-V-Fluos (Roche) 2% (aquest reactiu s'aliquota i es guarda a  $-30^{\circ}\text{C}$  en absència de llum; en el moment de realitzar l'anàlisi, es dilueixen 10 µL en 0.5 ml de solució de dilució).
- Es deixen en contacte les cèl·lules amb la solució final d'anexina 1% durant uns 15 minuts en absència de llum.
- Es realitza la lectura de la mostra al citòmetre de flux (FACSCaliburcan, Beckton-Dickinson). Per processar les anàlisis de les mostres, s'utilitza el programa CellQUEST (Beckton-Dickinson).

#### 8.17.2- Visualització de l'apoptosi per microscòpia de fluorescència o microscòpia confocal

Durant el procés d'apoptosi, la cèl·lula adopta unes morfologies característiques observables per microscòpia òptica. Per veure les diferents morfologies cel·lulars, es tenyeixen les cèl·lules amb bromur d'etidi i taronja d'acridina.

La tinció de les cèl·lules es realitza barrejant 75 µl de la mostra de cultiu amb 3 µl de la solució de tinció (0.5 ml de solució de taronja d'acridina 200 µg/ml (Sigma) + 0.5 ml de solució de bromur d'etidi 200 µg/ml (Bioprobes).

La visualització de la mostra tenyida a través del microscopi de fluorescència (Olympus BH-2) o del microscopi òptic làser confocal (LEICA TCS 4D) permet distingir quatre morfologies cel·lulars diferents: cèl·lules viables no apoptòtiques (VNA), viables apoptòtiques (VA), no viables apoptòtiques (NVA) i necròtiques (N) [Tintó, 1999].

Si la barreja de tinció es posa en un hemacitòmetre es pot quantificar, mitjançant l'observació al microscopi de fluorescència, el percentatge de cèl·lules que presenten una de les quatre morfologies descrites anteriorment.

### 8.17.3. Visualització de la fragmentació del DNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa

En els estadis mitjanament avançats de l'apoptosi, en la cèl·lula s'inicia la fragmentació del DNA per l'acció d'endonucleases que degraden el DNA en les posicions internucleosomals, produint fragments de DNA de longitud múltiple a 180 parells de bases [Sakahira i col., 1998]. La fragmentació del DNA genòmic es visualitza en gels d'agarosa (veure apartat 8.10.2 i 8.11.1). El patró electroforètic observat és molt característic, similar a una escala [Wyllie, 1980; Franek i col., 1992].

### 8.18- Estudi del cicle cel·lular de les cèl·lules d'hibridoma per citometria de flux

Aquest mètode permet determinar el percentatge aproximat de cèl·lules d'un cultiu que es troben en cadascun dels estadis del cicle cel·lular, mitjançant la mesura del contingut de DNA de cada cèl·lula. Les cèl·lules en  $G_0$  o  $G_1$  tenen una dotació diploide ( $2n$ ) de DNA. Les cèl·lules en  $G_2$  o  $M$  tenen el doble de DNA ( $4n$ ). I les cèl·lules en fase  $S$  poden tenir una quantitat variable de DNA ( $2n$  o  $4n$ ).

Per a la tinció del DNA, s'utilitza una dissolució de iodur de propidi. Les mesures de l'estat de la població cel·lular es realitzen mitjançant citometria de flux. Els percentatges corresponents a les poblacions cel·lulars que es troben en fase  $G_0$ ,  $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$ ,  $M$  i es resolen matemàticament a través d'un programari específic. El percentatge de cèl·lules apoptòtiques pot ser detectat com a un pic sub  $G_0 / G_1$ .

Per a realitzar l'anàlisi del cicle cel·lular de les mostres cal agafar inicialment un volum del cultiu que contingui una concentració aproximada de  $10^6$ - $10^7$  cèl·lules viables. La mostra se centrifuga a 500g durant 5 minuts i s'elimina el sobrenadant.

A continuació es resuspèn el botó de cèl·lules en 4.5 ml de PBS 0.1 M i es torna a centrifugar a 500g durant 6 minuts. El sobrenadant es descarta i es resuspèn el botó de cèl·lules en 0.5 ml de PBS 0.1 M. Aquesta suspensió de cèl·lules s'afegeix a 4.5 ml d'etanol fred i es guarda a -30 °C fins el moment de l'anàlisi. Just abans de realitzar l'anàlisi, se centrifuguen les mostres 5 minuts a 500g i es resuspenen en 1 ml de dissolució de iodur de propidi. Es deixen 30 minuts a temperatura ambient i s'analitzen amb un citòmetre de flux (FACScalibur, Becton-Dickinson). Per processar les anàlisis de les mostres s'utilitza el programari ModFit LT (Becton-Dickinson).



# REFERÈNCIES

---

## REFERÈNCIES

**Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W.** (2002): Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.* 9, 423-432.

**Almofti M.R., Harashima H., Shinohara Y., Almofti A., Baba Y., Kiwada H.** (2003): Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Arch. Biochem. Biophys.* 410 (2), 216-253.

**Al Moslih M. I., Dubes G.R.** (1973): The kinetics of DEAE-dextran-induced cell sensitization to transfection. *J.Gen.Virol.* 2 (18), 189-193.

**Al-Rubeai M., Singh R.P.** (1998): Apoptosis in cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (2), 152-6.

**Ameisen J.** (1998): Suicidio celular. *Investigación y Ciencia.* Tema 11: Biología del envejecimiento, 10-17.

**Andreason, G.L., Evans, G.A.** (1988): Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* 6 (7), 650-660.

**Antonsson B.** (2004): Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 256-257 (1-2), 141-155.

**Arathoon W., Birch J.** (1986): Large-scale cell culture in biotechnology. *Science.* 232, 1390-1395.

**Ardjomande S.L., Martinou J.C.** (2005): Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J. Cell Sci.* 118, 473-483.

**Aris A.** (2003): Desenvolupament de proteïnes quimèriques multifuncionals com a vectors de transferència gènica mediada per receptor. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Aris A., Villaverde A.** (2004): Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends Biotechnol.* 22 (7), 371-377.

**Armstrong J.S.** (2006): Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays.* 28 (3), 253-260.

**Armstrong J.S.** (2006): Mitochondria: a target for cancer therapy. *Br. J. Pharmacol.* 147 (3), 239-248.

**Ashkenazi A.** (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.* 2 (6), 420-430.

**Bailey J.** (1991): Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 252, 1668-1674.

**Baines C.P., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R.A., Dorn G.W., Robbins J., Molkenin J.D.** (2005): Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 434, 658-662.

**Baker A., Saltik M., Lehrmann H., Killisch I., Mautner V., Lamm G., Christofori G., Cotten M.** (1997): Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Ther.* 4 (8), 773-782.

**Basanez G., Zhang J., Chau B.N., Maksaev G.I., Frolov V.A., Brandt T.A., Burch J., Hardwick J.M., Zimmerberg J.** (2001): Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J.Biol.Chem.* 276, 31083-31091.

**Basso E., Fante L., Fowlkes J., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P.** (2005): Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* 280, 18558- 18561.

**Bellows D.S., Chau B.N., Lee P., Lazebnik Y., Burns W.H., Hardwick J.M.** (2000): Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase mediated conversion to proapoptotic proteins. *J.Virol.* 74, 5024-5031.

**Birnboim H.C., Doly J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6), 1513-1523.

**Blankenberg F., Katsikis P., Tait J., Davis R., Naumovski L., Ohtsuki K., Kapiwoda S., Abrams M., Darkes M., Robbins R., Maecker H., Strauss H.** (1998): In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 95, 6349-6354.

**Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G., Thompson C.B.** (1993): Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 74 (4), 597-608.

**Bonnefoy-Berard N., Aouacheria A., Verschelde C., Quemeneur L., Marcais A., Marvel J.** (2004): Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta*. 1644 (2-3), 159-168.

**Borner C.** (2003): The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* 39, 615-647.

**Boya P., Pauleau A.L., Poncet D., Gonzalez-Polo R.A., Zamzami N., Kroemer G.** (2004): Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim. Biophys. Acta*. 1659 (2-3), 178-189.

**Breckenridge D.G., Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore G.C.** (2003): Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 22, 8608-8618.

**Brisson M., Huang L.** (1999): Liposomes: conquering the nuclear barrier. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1 (2), 140-146.

**Bröker L.E., Krüyt F.A.E., Giaccone G.** (2005): Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin. Cancer Res.* 11 (9), 3155-3162.

**Buchkovich K., Duffy L.A., Harlow E.** (1989): The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*. 58, 1097-1105.

**Buendia B., Santa-Maria A., Courvalin J.C.** (1999): Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 11), 1743-53.

**Bump N.J., Hackett M., Hugunin M., Seshagiri S., Brady K., Chen P., Ferenz C., Franklin S., Ghayur T., Li p., Licari P., Mankovich J., Shi L., Greenberg A. H., Miller L.K., Wong W.W.** (1995): Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*. 269, 1885-1888.

**Cain K., Bratton S. B., Cohen G.M.** (2002): The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*. 84 (2-3): 203-214.

**Casablanca A.** (2000): Optimització del consum de nutrients i generació de subproductes en cultius *in vitro* de cèl·lules animals. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Cathomas G.** (2000): Human herpes virus 8: a new virus discloses its face. *Virchows Arch*. 436, 195-206.

**Chacón-Salinas R., Sánchez- Cruz P.** (2000): Mecanismos Virales de Bloqueo de la Apoptosis como Estrategia de Evasión de la Respuesta Inmunológica. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42, 83-93.

**Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles D.M., Moore P.S.** (1994): Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 266, 1865-1869.

**Chang D.C., Reese T.S.** (1990): Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys. J.* 58 (1), 1-12.

**Chang H.Y., Yang X.** (2000): Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (4), 821-846.

**Charbonneau J.R., Furtak T., Lefebvre J., Gauthier E.R.** (2003): Bcl-xL expression interferes with the effects of L-glutamine supplementation on hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 81 (3), 279-290.

**Chen C., Okayama H.** (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7 (8), 2745-2752.

**Chen L., Willis S.N., Wei A., Smith B.J., Fletcher J.I., Hinds M.G., Colman P.M., Day C.L., Adams J.M., Huang D.C.** (2005): Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-Only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell*. 17 (3), 393-403.

**Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan M.B., Bedi A., Ueno K., Hardwick J.M.** (1997a): conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. 278, 1966-1968.

**Cheng E.H., Nicholas J., Bellows D. S., Hayward G. S., Guo H.G., Reitz M.S., Hardwick J.M.** (1997b): A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 690-694.

**Cheng E.H., Wei M.C., Weiler S., Flavell R.A., Mak T.W., Lindsten T., Korsmeyer S.J.** (2001): BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.* 8 (3), 705-711.

**Chiou S., White E.** (1998): Inhibition of ICE-like proteases inhibits apoptosis and increases virus production during adenovirus infection. *Virology.* 244, 108-118.

**Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elangovan B., Chinnadurai G., Lutz R.J.** (1995): A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J.* 14 (22), 5589-5596.

**Clem R.J.** (2001): Baculovirus and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ.* 8(2), 137-143.

**Clem R.J., Cheng E.H., Karp C.L., Kirsch D.G., Ueno K., Takahashi A., Kastan M.B., Griffin D.E., Earnshaw W.C., Veluona M.A., Hardwick J.M.** (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 554-559.

**Clem R.J., Miller L.K.** (1994): Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5212-5222.

**Cohen J.** (1998): Apoptosis: to be or not to be. *American Academy of Allergy Asthma & Immunology 54<sup>th</sup> Annual Meeting.* Washington, D.C. (EE.UU.).

**Coonrod A., Li F.Q., Horwitz M.** (1997): On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther.*, 4 (12), 1313-1321.

**Cory S., Adams J.M.** (2002): The Bcl-2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 647-656.

**Cory S., Huang D.C., Adams J.M.** (2003): The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 22, 8590-8607.

**Cotten M., Wagner E., Zatloukal K., Phillips S., Curiel D.T., Birnstiel M.L.** (1992): High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene

constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (13), 6094-6098.

**Cristiano R.J.** (2002): Protein/DNA polyplexes for gene therapy. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 11 (3), 697-716.

**Cryns V., Yuan J.** (1998): Proteases to die for. *Genes Dev.* 12, 1551-1570.

**Curiel D.T., Wagner E., Cotten M., Birnstiel M.L., Agarwal S., Li C.M., Loechel S., Hu P.C.** (1992): High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum. Gene Ther.* 3 (2), 147-154.

**Dalton S.** (1992): Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO.* 11, 1797-1804.

**Daniel N.N., Korsmeyer S.J.** (2004): Cell death: critical control points. *Cell.* 116, 205-219.

**Datto M. B., Li Y., Panu J.F., Howe D.J., Xiong Y., Wang X.F.** (1995): Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5545-5549.

**Davis A.R., Wivel N.A., Palladino J.L., Tao L., Wilson J.M.** (2001): Construction of adenoviral vectors. *Mol. Biotechnol.* 18 (1), 63-70.

**Degterev A., Boyce M., Yuan J.** (2003): A decade of caspases. *Oncogene.* 22, 8543-8567.

**Dejean L.M., Martinez-Caballero S., Manon S., Kinally K.W.** (2006): Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1762 (2), 191-201.

**De Laporte L., Cruz Rea J., Shea L.D.** (2006): Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials.* 27 (7), 947-954.

**Desagher S., Martinou J.C.** (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Bio.* 10 (9), 369-377.

**Deveraux Q.L., Reed J.C.** (1999): IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes. Dev.* 13, 239-252.

**Donovan M., Cotter T.G.** (2004): Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644 (2-3), 133-147.

**Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.** (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102 (1), 33-42.

**Dunphy E.J., Redman R.A., Herweijer H., Cripe T.P.** (1999): Reciprocal enhancement of gene transfer by combinatorial adenovirus transduction and plasmid DNA transfection in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther.* 10 (14), 2407-2417.

**Duzgunes N., De Ilarduya C.T., Simoes S., Zhdanov R.I., Konopka K., Pedroso de Lima M.C.** (2003): Cationic liposomes for gene delivery: novel cationic lipids and enhancement by proteins and peptides. *Curr. Med. Chem.* 10 (14), 1213-1220.

**Earnshaw W. C., Martins L.M., Kaufmann S.H.** (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383-424.

**Ekert P.G., Vaux D.L.** (2005): The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders?. *Curr.Opin. Cell Biol.* 17 (6), 626-630.

**El-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M., Velculescu V.E., Canman C.E., Jackman J., Pietenpol J.A., Burrell M., Hill D.E., Wang Y., Wiman K.G., Mercer W.E., Kastan M.B., Kohn K.W., Elledge S.J., Kinzler K.W., Vogelstein B.** (1994): WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *cancer Res.* 54, 1169-1174.

**El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B.** (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75, 817-825.

**Ensoli B., Sgadari C., Barillari G., Sirianni M.C., Sturzl M., Monini P.** (2001): Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Cancer.* 37, 1251- 1269.

**Erin N., Bronson S.K., Billingsley M.L.** (2003): Calcium-dependent interaction of calcineurin with Bcl-2 in neuronal tissue. *Neuroscience.* 117 (3), 541-555.

**Everett H., McFadden G.** (1999): Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 7,160-165.



- Evan G., Littlewood T.** (1998): A matter of life and cell death. *Science*. 281, 1317-1321.
- Fan T.J., Han L.H., Cong R.S., Liang J.** (2005): Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 37 (11), 719-727.
- Farhood H., Serbina N., Huang L.** (1995): The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta*. 1235 (2), 289-295.
- Farrow S.N., White J.H., Martinou I., Raven T., Pun K.T., Grinham C.J., Marinou J.C., Brown R.** (1995): Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*. 374, 731-733.
- Felgner P.L., Barenholz Y., Behr J.P., Cheng S.H., Cullis P., Huang L., Jessee J.A., Seymour L., Szoka F., Thierry A.R., Wagner E., Wu G.** (1997): Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene. Ther.* 5 (8), 511-512.
- Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringolds G.M., Danielsen M.** (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (21), 7413-7417.
- Figuroa B., Ailor E., Osborne D., Hardwick J.M., Reff M., Betenbaugh M.J.** (2006): Enhanced cell culture performance using inducible anti-apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* Nov.10.
- Fiore C., Trezeguet V., Le Saux A., Roux P., Schwimmer C., Dianoux A. C., Noel F., Lauquin G.J., Brandolin G., Vignais P.V.** (1998): The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie*. 80, 137-150.
- Fischer U., Janicke R.U., Schulze-Osthoff K.** (2003): Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differ.* 10, 76-100.
- Foghsgaard L., Jaattela M.** (1997): The ability of BHRF1 to inhibit apoptosis is dependent on stimulus and cell type. *J. Virol.* 71, 7509- 7517.
- Franek F.** (1995): Starvation-induced programmed death of hybridoma cells: Prevention by aminoacid mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 86-90.

**Franek F., Vomastek T., Dolikova J.** (1992): Fragmented DNA and apoptotic bodies document the programmed way of cell death in hybridoma cultures. *Cytotechnol.* 9, 117-123.

**Fuentes-Prior P., Salvesen G.S.** (2004): The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384, 201-232.

**Gabernet C.** (1999): Disseny d'estratègies per a la inhibició de l'apoptosi en cultius d'hibridomes. Treball experimental de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Galonek H.L., Hardwick J.M.** (2006): Upgrading the BCL-2 Network. *Nat. Cell Biol.* 8 (12), 1317-1319.

**Gàmez X.** (2000): Estudi d'estratègies de cultiu per a cèl·lules animals, basades en eines d'instrumentació i control. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Gao C.Y., Zelenka P.S.** (1997): Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *BioEssays.* 19, 307-315.

**Garrido C., Kroemer G.** (2004): Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (6), 639-646.

**Gehl J.** (2003): Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* 177 (4), 437-447.

**Gershon H., Ghirlando R., Guttman S.B., Minsky A.** (1993): Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry.* 32 (28), 7143-7151.

**Gervais J.L., Seth P., Zhang H.** (1998): Cleavage of CDK inhibitor p21 (Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 19207-19212.

**Ghobrial I.M., Witzig T.E, Adjei A.A.** (2005): Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* 55, 178-194.

**Ghosh S.S., Gopinath P., Ramesh A.** (2006): Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 133 (1), 9-29.

**Girard C., Tenenbaum L., Chtarto A., Attali B., Salvetti A., Bachelin C., Evercooren A.B., Lachapelle F.** (2005): Efficiency of adeno-associated virus type-2 vectors in non-human primate Schwann cells. *Neuroreport*. 16 (16): 1757-1762.

**Golzio M., Teissie J., Rols M.P.** (2002): Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim. Biophys. Acta*. 1563 (1-2), 23-28.

**Goswami J., Sinskey A.J., Steller H., Stephanopoulos G.N., Wang D.I.** (1999): Apoptosis in Batch Cultures of Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol. Bioeng.* 62 (6), 632-640.

**Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., Housman D.E., Koch C.J., Lowe S.W., Giaccia A.J.** (1996): Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 379, 88-91.

**Graham F.L., Prevec L.** (1995): Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 3, 207-220.

**Greber U.F., Singh I., Helenius A.** (1994): Mechanisms of virus uncoating. *Trends Microbiol.* 2 (2), 52-56.

**Greber U.F., Willetts M., Webster P., Helenius A.** (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*. 75 (3), 477-486.

**Green D.R.** (2006): At the gates of death. *Cancer Cell*. 305, 626-629.

**Green D.R., Kroemer G.** (2004): The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 305, 626-629.

**Green D.R., Reed J.C.** (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281, 1309-1312.

**Griffiths G.J., Dubrez L., Morgan C.P., Jones N.A., Whitehouse J., Corfe B.M., Dive C., Hickman J.A.** (1999): Cell damage induced conformational changes of the proapoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 903-914.

**Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J.** (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13 (15), 1899-1911.

**Guan K.L., Jenkins C.W., Li Y., Nichols M.A., Wu X., O'keefe C.L., Matera A.G., Xiong Y.** (1994): Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1-and p14INK4/MTS2-related CDK16 inhibitor, correlates with e1d-type pRb function. *Genes Dev.* 8, 2939-2952.

**Guan K.L., Jenkins C.W., Li Y., O'keefe C.L., Wu X., Zariwala M., Matera A.G., Xiong Y.** (1996): Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol. Biol. Cell.* 7, 57-70.

**Gurtu V., Yan G., Zhang G.** (1996): IRES bicistronic vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 295-298.

**Guo L., Pietkiewicz D., Pavlov E.V., Grigoriev S.M., Kasianowicz J.J., Dejean L.M., Korsmeyer S.J., Antonsson B., Kinnally K.W.** (2004): Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am. J. Physiol. Cell physiol*, 286, C1109-C1117.

**Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J.** (2002): The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 84, 153-166.

**Hannon G.J., Beach D.** (1994): p15INKB is potential effector of TGF $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature.* 371, 257-261.

**Hardwick J.M.** (2001): Apoptosis in viral pathogenesis. *Cell Death Differ.* 8, 109-110.

**Hardwick J.M., Bellows D.S.** (2003): Viral versus cellular BCL-2 proteins. *Cell Death Differ.* 10, Suppl 1, S68-76.

**Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J.** (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 75, 805-816.

**Hart S.L., Harbottle R.P., Cooper R., Miller A., Williamson R., Coutelle C.** (1995): Gene delivery and expression mediated by an integrin-binding peptide. *Gene Ther.* 2 (8), 552-554.

**Hartwell L.H., Unger M.W.** (1977): Unequal cell division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J. Cell Biol.* 75, 422-435.

**Hartwell L.H., Weinert T.A.** (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246, 629-633.

**Hauser H., Wagner R.** (1997): Mammalian Cell Biotechnology in protein production. Walter de Gruyter Berlin.

**Hausmann G., O'Reilly L.A., Van Driel R., Beaumont J.G., Strasser A., Adams J.M., Huang D.C.S.** (2000): Proapoptotic apoptosis protease-activating Factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-xL. *J. Cell Biol.* 149, 623-634.

**Hay B.A., Wolff T., Rubin G.M.** (1994): Expression of baculovirus p35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development*. 120 (8), 2121-2129.

**Helin K., Harlow E., Fattaey A.** (1993): Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.*, 13, 6501-6508.

**Helin K., Lees J.A., Vidal M., Dyson N., Harlow E., Fattaey A.** (1992): A cDNA encoding a pRb-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell*. 70, 337-350.

**Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G., Rickinson A.** (1993): Epstein-Bar virus coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8479-8483.

**Hengartner M.O.** (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407, 770-776.

**Hesse F., Wagner R.** (2000): Development and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Tibtech*. 18, 173-180.

**Hinds P.W., Mittnacht S., Dulic V., Arnold A., Reed S. I., Weinberg R.A.** (1992): Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*. 70, 993-1006.

**Hitomi J., Katayama T., Eguchi Y., kudo T., Taniguchi M., Koyama Y., Manabe T., Yamagishi S., Bando Y., Imaizumi K., Tsujimoto Y., Tohyama M.** (2004): Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J. Cell Biol.* 165 (3), 347-356.

**Hockenbery D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J.** (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 348 (6299), 334-336.

**Hollander K., Bar-Chen M., Efrat S.** (2005): Baculovirus p35 increases pancreatic beta-cell resistance to apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2), 550-556.

**Hsu Y.T., Wolter K.G., Youle R.J.** (1997): Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3668-3672.

**Hsu Y.T., Youle R.J.** (1998): Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* 273, 10777-10783.

**Huang D.C., Adams J.M., Cory S.** (1998): The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *Embo J.* 17 (4), 1029-39.

**Huang Q.L., Petros A.M., Virgin H.W., Fesik S.W., Olejniczak E.T.** (2003): Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr virus, a homolog of human Bcl-2. *J. Mol. Biol.* 332, 1123-1130.

**Irusta P.M., Chen Y.B., Hardwick J.M.** (2003): Viral modulators of cell death provide new links to old pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15 (6), 700-705.

**Ito T., Deng X., Carr B., May W.S.** (1997): Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.* 272 (18): 11671-11673.

**Jäättelä M.** (1999): Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 248 (1), 30-43.

**Johnson-Saliba M., Jans D.A.** (2001): Gene therapy: optimizing DNA delivery to the nucleus. *Curr. Drug Targets.* 4 (2), 371-399.

**Jonas E.A., Hickman J.A., Chachar M., Polster B.M., Brandt T.A., Fannjiang Y., Ivanovska I., Basanez G., Kinnally K.W., Zimmerberg J., Hardwick J.M., Kaczmarek L.K.** (2004): Proapoptotic N- truncated BCL-xL protein activates endogenous mitochondrial channels in living synaptic terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101 (37), 13590-13595.

**Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga-Pflucker J.C., Kroemer G., Penninger**

**J.M.** (2001): Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 410 (6828), 549-554.

**Juanola S.** (2001): Retard del procés de mort cel·lular programada en híbridomes mitjançant la sobreexpressió de gens vírics antiapoptòtics. Treball experimental de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Jung D., Cote S., Drouin M., Simard C., Lemieux R.** (2002): Inducible expression of Bcl-xL restricts apoptosis resistance to the antibody secretion phase in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2), 180-187.

**Kaneda Y., Tabata Y.** (2006): Non-viral vectors for cancer therapy. *Cancer Sci.* 97 (5), 348-354.

**Kastan M.B., Onyekwere O., Sindransky D., Vogelstein B., Graig R.W.** (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.

**Kato S., Anderson R.A., Camerini-Otero R.D.** (1986): Foreign DNA introduced by calcium phosphate is integrated into repetitive DNA elements of the mouse L cell genome. *Mol. Cell Biol.* 5 (6), 1787-1795.

**Kawanishi M.** (1997): Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody. *J. Virol.* 71, 3319- 3322.

**Kawanishi M., Tada-Oikawa S., Kawanishi S.** (2002): Epstein-Barr virus BHRF1 functions downstream of Bid cleavage and upstream of mitochondrial dysfunction to inhibit TRAIL-induced apoptosis in BJAB cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 682- 687.

**Kelekar A., Thompson C.B.** (1998): Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8 (8), 324-330.

**Kerr J., Wyllie A., Currie A.** (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26, 239-257.

**Khalil I.A., Kogure K., Akita H., Harashima H.** (2006): Uptake Pathways and Subsequent Intracellular trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacol. Rev.* 58 (1), 32-45.

**Khanim F., Dawson C., Meseda C.A., Dawson J., Mackett M., Young L.S.** (1997): BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. *J. Gen. Virol.* 78, 2987-2999.

**Kim S.J., Park Y., Hong H.J.** (2005): Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. *Mol. Cells.* 20 (1), 17-29.

**Kirkin V., Joos S., Zornig M.** (2004): The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644 (2-3), 229-249.

**Kirkwood E., Lewis C.** (1985): Inmunología médica básica, *Interamericana*, Madrid.

**Kirsch D.G., Doseff A., Chau B.N., Lim D.S., De Souza-Pinto N.C., Hansford R., Kastan M.B., Lazebnik Y.A., Hardwick J.M.** (1999): Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 274, 21155-21161.

**Klumpp S., Krieglstein J.** (2002): Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2 (4), 458-462.

**Knudson A.G.** (1971): Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 820-823.

**Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R., Wallace D.C.** (2004): The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 427, 461-465.

**Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Kohts K., Kwiatkowski D.J., Williams L.T.** (1997): Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 278 (5336), 294-298.

**Koyama A.H., Irie H., Fukumori T., Hata S., Ida S., Akari H., Adachi A.** (1998): Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection. *J. Med. Invest.* 45, 37-45.

**Kozak M.** (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids. Res.* 15, 8125-8148.

**Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., Reed J.C.** (1993): Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the



nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53 (19), 4701-4714.

**Kroemer G.** (2002): Introduction: mitochondrial control of apoptosis. *Biochimie.* 84 (2-3), 103-104.

**Kroemer G., Martin S.J.** (2005): Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* 11 (7), 725-730.

**Kuida K., Haydar T.F., Kuan C.Y., Gu Y., Taya C., Karasuyama H., Su M.S., Rakic P., Flavell R.A.** (1998): Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* 94, 325-337.

**Kuwana T., Newmeyer D.D.** (2003): Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 691-699.

**Laffly E., Sodoyer R.** (2005): Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. *Hum. Antibodies.* 14 (1-2), 33-55.

**Lane D.P.** (1992): p53, guardian of the genome. *Nature.* 358, 15-16.

**Lassus P., Opitz-Arava X., Lazebnik Y.** (2002): Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science.* 297 (5585), 1352-1354.

**Lavrik I.N., Golks A., Krammer P.H.** (2005): Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115 (10), 2665-2672.

**Lee M.H., Reynisdottir I., Massagué J.** (1995): Cloning of p57Kip2, a cyclin-dependent kinase inhibition with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9,639-649.

**Lee J.H., Welsh M.J.** (1999): Enhancement of calcium phosphate-mediated transfection by inclusion of adenovirus in coprecipitates. *Gene Ther.* 6, 676-682.

**Letai A., Bassik M., Walensky L., Sorcinelli M., Weiler S., Korsmeyer S.** (2002): Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2, 183-192.

**Li S., Huang L.** (2000b): Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 1 (7), 31-34.

**Li K., Li Y., Shelton J.M., Richardson J.A., Spencer E., Chen Z.J., Wang X., Williams R.S.** (2000a): Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell.* 101, 389-399.

**Li L.Y., Luo X., Wang X.** (2001a): Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412 (6842), 95-99.

**Li S., Ma Z.** (2001b): Nonviral Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* 2 (1), 201-226.

**Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J.** (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94, 491-501.

**Liston P., Fong W.G., Korneluk R.G.** (2003): The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl-2. *Oncogene.* 22, 8568-8580.

**Lithgow T., Van Driel R., Bertram J.F., Strasser A.** (1994): The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ.* 5 (4), 411-417.

**Lockshin R.A., Zakeri Z.** (2004): Caspase-independent cell death?. *Oncogene*, 23, 2766-2773.

**Lorenzo H.K., Susin S.A.** (2004): Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett.*, 557 (1-3), 14-20.

**Lucken-Ardjomande S., Martinou J.C.** (2005a): Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *CR Biol.* 328 (7), 616-631.

**Lucken-Ardjomande S., Montessuit S., Martinou J.C.** (2005b): Changes in the outer mitochondrial membranes during apoptosis. *J. Soc. Biol.* 199 (3), 207-210.

**Lundstrom K.** (2003): Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* 21 (3), 117-122.

**Macdonald C.** (1990): Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10, 155-178.

- Mastrangelo A.J., Betenbaugh M.J.** (1998): Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Tibtech.* 16, 88-95.
- Mastrangelo A.J., Hardwick J.M., Zou S., Betenbaugh M.J.** (2000): Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnol. Bioeng.* 67 (5), 555-564.
- Martin B., Sainlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.P., Lehn J.M., Lehn P.** (2005): The design of cationic lipids for gene delivery. *Curr. Pharm. Des.* 11 (3), 375-394.
- Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J.M., Susin S.A., Viera H.L.A., Prévost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G.** (1998): Bax and Adenina Nucleotide Translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 281, 2027-2030.
- Mate M.J., Ortiz-Lombardia M., Boitel B., Haouz A., Tello D., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G., Alzari P.M.** (2002): The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat. Struct. Biol.* 9 (6), 442-446.
- Matsushime H., Ewen M.E., Strom D.K., Kato J.Y., Hanks S.K., Roussel M.F., Sherr C.J.** (1992): Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/CDK4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell.* 71, 323-334.
- McDonnell T.J., Beham A., Sarkiss M., Andersen M.M., Lo P.** (1996): Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia.* 52 (10-11), 1008-17.
- Mercille S., Jolicoeur P., Gervais C., Paquette D., Mosser D., Massie B.** (1999): Dose dependent reduction of apoptosis in nutrient limited cultures of NS/0 myeloma cells transfected with the E1B-19K adenoviral gene. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 516-528.
- Mercille S., Massie B.** (1994): Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1140-1154.
- Meunier-Durmort C., Grimal H., Sachs L.M., Demeneix B.A., Forest C.** (1997): Adenovirus enhancement of polyethylenimine-mediated transfer of regulated genes in differentiated cells. *Gene ther.* 4 (8), 808-814.
- Milstein C.** (1980): Anticuerpos monoclonales. *Investigación y Ciencia.* Diciembre, 100-164.

**Mizuguchi H., Xu Z., Ishii-Watabe A., Uchida E., Hayakawa T.** (2000): IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol. Ther.* 1 (4), 376-382.

**Mohan S.B., Lyddiatt A.** (1991): Passive release of monoclonal antibodies from hybridoma cells. *Cytotechnology.* 5 (3), 201-209.

**Monaghan P., Robertson D., Amos T.A., Dyer M.J., Mason D.Y., Greaves M.F.** (1992): Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* 40 (12), 1819-1825.

**Morgan D.O.** (1995): Principles of CDK regulation. *Nature.* 374, 131-134.

**Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T., Yasuhiko Y.** (2002): An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.* 277 (37), 34287-34294.

**Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettlesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wongs S., Fesik W.F.** (1996): X-ray and NMR structure of human Bcl-x<sub>L</sub>, and inhibitor of programmed cell death. *Nature.* 381, 335-341.

**Murphy E., Imahashi K., Steenbergen C.** (2005): Bcl-2 regulation of mitochondrial energetics. *Trends Cardiovasc. Med.* 15 (8), 283-290.

**Nagata S.** (2000): Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256 (1), 12-8.

**Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T., Tsujimoto Y.** (2005): Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 434, 652-658.

**Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J.** (2000): Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 403 (6765), 93-103.

**Nathaniel R., MacNeill A.L., Wang Y.X., Turner P.C., Moyer R.W.** (2004): Cowpox virus CrmA, Myxoma virus SERP2 and baculovirus P35 are not functionally interchangeable Caspase inhibitors in poxvirus infections. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt5), 1267-1278.

**Negrini M., Silini E., Kozak C., Tsujimoto Y., Croce C.M.** (1987): Molecular analysis of mbcl-2: structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell*. 49 (4), 455-463.

**Nguyen T.H., Ferry N.** (2004): Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther.* 11 Suppl 1, S76-S84.

**Nicholson D.W.** (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1028-1042.

**Nigg E.A.** (1995): Cyclin-dependent kinases: key regulators of the eucaryotic cell cycle. *BioEssays*. 17, 471-480.

**Núñez G., Benedict M.A., Hu Y., Inohara N.** (1998): Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 7 (25), 3237-3245.

**Ohlfest J.R., Freese A.B., Largaespada D.A.** (2005): Nonviral Vectors for cancer Gene therapy: Prospects for integrating vectors and combination therapies. *Curr. Gene Ther.* 5 (6), 629-641.

**Ojala P.M., Tiainen M., Salven P., Veikkola T., Castanos-Velez E., Sarid R., Biberfeld P., Makela T.P.** (1999): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded v-cyclin triggers apoptosis in cells with high levels of cyclin-dependent kinase 6. *Cancer Res.* 59, 4984- 4989.

**Pack D. W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S.** (2005): Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (7), 581-593.

**Pardee A.B.** (1989): G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 246, 603-608.

**Paredes C.** (1998): Anàlisi i redistribució dels fluxos metabòlics en cèl·lules animals. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Pastorini J., Simbula G., Yamamoto K., Glascott P., Rothman R., Farber G.** (1996): The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 271, 29792-29798.

**Pellegata N.S., Antoniono R.J., Redpath J.L., Stanbridge E.** (1996): DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15209-15214.

**Pellinen R., Hakkarainen T., Wahlfors T., Tulimaki K., Ketola A., Tenhunen A., Salonen T., Wahlfors J.** (2004): Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int. J. Oncol.* 25 (6), 1753-1762.

**Peterson N.C., Servinsky M.** (2005): Characterization of the effects of Bcl-2 and Bcl-xL deletion mutant expression in cell lines used for antibody production. *Hybridoma.* 24 (6), 275-282.

**Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W.** (2004): Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644 (2-3), 83-94.

**Polster B.M., Pevsner J., Hardwick J.M.** (2004): Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644 (2-3), 211-227.

**Polyak K., Lee M.H., Erdjument-bromage H., Koff A., Roberts J.M., Tempst P., Massagué J.** (1994): Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell.* 59-66.

**Price B.** (1987): Monoclonal antibodies: the coming revolution in diagnosis and treatment of human disease. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 96, 497-504.

**Puppi J., Guillonneau C., Pichard V., Bellodi-Privato M., Cuturi M.C., Anegón I., Ferry N.** (2004): Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene. *J. Hepatol.* 41(2), 222-228.

**Putnam D.** (2006): Polymers for gene delivery across length scales. *Nat. Mater.* 5 (6), 439-451.

**Ranjan P., Shivastava P., Singh S.M., Sodhi A., Heintz N.H.** (2004): Baculovirus P35 inhibits No-induced apoptosis in activated macrophages by inhibiting Cytochrome c release. *J. Cell. Sci.* 117 (Pt14), 3031-3039.

**Rao L., Perez D., White E.** (1996): Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135 (6 Pt 1), 1441-1455.

**Ray J., Wolfe J.M., Aguirre G.D., Haskins M.E.** (1998): Retroviral cDNA transfer to the RPE: stable expression and modification of metabolism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1658-1666.

**Reed J.C., Paternostro G.** (1999): Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7614-7616.

**Rees S., Coote J., Stables J., Goodson S., Harris S., Lee M.G.** (1996): Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *BioTechniques.* 20, 102-110.

**Revilla Y., Cebrian A., Baixeras E., Martinez C., Vinuela E., Salas M.L.** (1997): Inhibition of apoptosis by the african swine fever virus Bcl-2 homologue: role of BH1 domain. *Virology.* 228, 400-404.

**Reynisdottir I., Polyak K., Iavarone A., Massagué J.** (1995): Kip/Cip and INK4 CDK inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9, 1831-1845.

**Riedl S.J., Renatus M., Snipas S.J., Salvesen G.S.** (2001): Mechanism- Based inactivation of Caspases by the apoptotic supressor P35. *Biochemistry.* 40 (44), 13274-13280.

**Rols M. P., Coulet D., Teissie J.** (1992): Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur .J. Biochem.* 1 (206), 115-121.

**Rossi G.R., Mautino M.R., Morgan R.A.** (2003): High-efficiency lentiviral vector-mediated gene transfer into murine macrophages and activated splenic B lymphocytes. *Hum. Gene Ther.* 14 (4), 385-391.

**Rozalén J., Ceña V., Jordán J.** (2003): Terapia génica. Vectores de expresión. *OFFARM.* 22 (8), 102-108.

**Rudel T., Bokoch G.M.** (1997): Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science.* 276 (5318), 1571-1574.

**Sahdev S., Taneja T.K., Mohan M., Sah N.K., Khar A.K., Hasnain S.E., Athar M.** (2003): Baculoviral P35 inhibits oxidant-induced activation of mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (3), 483-490.

**Sakahira H., Enari M., Nagata S.** (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391 (6662), 96-99.

**Sakamuro D., Sabbatini P., White E., Prendergast G.C.** (1997): The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*. 15, 887-898

**Salvesen G.S., Duckett C.S.** (2002): IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (6), 401-410.

**Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. *Cold Spring Harbour Laboratory*, Cold Spring Harbour, New York.

**Sanfeliu A.** (1995): Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Sarid R., Sato T., Bohenzky R.A., Russo J.J., Chang Y.** (1997): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nat. Med.* 3, 293- 298.

**Sauerwald T.M., Oyler G.A., Betenbaugh M.J.** (2003): Study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 81 (3), 329-340.

**Schinzl A., Haufmann T., Borner C.** (2004): Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology. *Biochim. biophys. Acta.* 1644 (2-3), 95-105.

**Schmitz S., Kirchhoff I., Krammer P.H.** (2000): Regulation of death receptor mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1123-1136.

**Sedlak T.W., Oltvai Z.N., Yang E., Wang K., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J.** (1995): Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (17), 7834- 7838.

**Serrano M., Hannon G.J., Beach D.** (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibiiton of cyclin D/cdk4. *Nature*. 366, 704-707.

**Sharpe J.C., Arnoult D., Youle R.J.** (2004): Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644, (2-3), 107-113.



**Shi Y.** (2002): Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol. Cell.* 9, 459-470.

**Shibasaki F., Kondo E., Akagi T., McKeon F.** (1997): Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature.* 386 (6626), 728-731.

**Simpson N.H., Singh P., Perani A., Goldenzon C., Al-Rubeai M.** (1998): In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the *bcl-2* gene. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 90-98.

**Singh R.P., Al-Rubeai M., Gregory C., Emery A.** (1994): Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 720-726.

**Skommer J., Wlodkowic D., Deptala A.** (2006): Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. *Leuk. Res.* In press.

**Slee E.A., Adrain C., Martin S.J.** (1999): Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(11), 1067-74.

**Smith J.G., Walzem R.L., German J.B.** (1993): liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1154 (3-4), 327-340.

**Soley A.** (2002): Estudi de cultius d'hibridoma en continu i perfusió. Treball experimental de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Spierings D., McStay G., Saleh M., Bender C., Chipuk J., Maurer U., Green D.R.** (2005): Connected to Death: The (Unexpurgated) Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Science.* 310, 66-67.

**Stennicke H.R., Ryan C.A., Salvesen G.S.** (2002): Reprieve from execution: the molecular basis of Caspase inhibition. *Trends Biochem. Sci.* 27 (2), 94-101.

**Sugiyama O., An D.S., Kung S.P., Feeley B.T., Gamradt S., Liu N.Q., Chen I.S., Lieberman J.R.** (2005): Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. *Mol. Ther.* 11 (3), 390-398.

**Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami I., Marzo C., Brenner N., Larochette M.C., Prevost P.M., Alzari P.M., Kroemer G.** (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and 9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189, 381-394.

**Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R.** (2001): A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell.* 8 (3), 613-621.

**Tamura Y., Simizu S., Osada H.** (2004): The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett.* 569 (1-3), 249-255.

**Tarodi B., Subramanian T., Chinnadurai G.** (1994): Epstein -Barr virus BHRF1 protein protects against cell death induced by DNA-damaging agents and heterologous viral infection. *Virology.* 201, 404- 407.

**Tey B.T., Singh R.P., Piredda L., Piacentini M., Al-Rubeai M.** (2000): Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures. *J. Biotechnol.* 79, 147-159.

**Thornberry N., Lazebnik Y.** (1998): Caspases: Enemies within. *Science.* 281, 1312-1316.

**Tiera M.J., Winnik F.M., Fernandes J.C.** (2006): Synthetic and Natural Polycations for gene therapy: State of the Art and New Perspectives. *Curr. Gene Ther.* 6 (1), 59-71.

**Tintó A.** (1999): Millora de cultius in vitro d'hibridomes mitjançant el desenvolupament d'un sistema de perfusió i la inhibició de la mort cel·lular programada. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Tintó A., Gabernet C., Vives J., Prats E., Cairo J.J., Cornudella L., Gòdia F.** (2002): The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *J. Biotechnol.* 95, 205-214.

**Tomei L.** (1991): Apoptosis: a program for death and survival? pp. 279-316 In: Tomei, L.D. and F.O. Cope (eds), Apoptosis: the molecular basis of cell death. *Cold spring Harbor Laboratory Press.* Cold Spring, NY.

**Tomioka M., Shirotani K., Iwata N., Lee H.J., Yang F., Cole G.M., Seyama Y., Saido T.C.** (2002): In vivo role of Caspases in excitotoxic neuronal death: generation and analysis of transgenic mice expressing baculoviral Caspase inhibitor, P35, in postnatal neurons.. *Brain Res Mol. Brain Res.* 108 (1-2), 18-32.

**Tsujimoto Y., Shimizu S.** (2000): Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466 (1), 6-10.

**V**ander Heiden M.G., Chandel N.S., Li X.X. Schumacker P.T. Colombini M., Thompson C.B. (2000): Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 97 (9), 4661-4671.

Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 335, 440-442.

Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing inhibitor of apoptosis (IAP) proteins. *Cell.* 102, 43-53.

Verma I.M., Weitzman M.D. (2005): Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 711-738.

Vives J. (1999): Modulació del flux glucolític en cèl·lules d'hibridoma mitjançant una estratègia de RNA antisentit. Treball experimental de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.

Vives J. (2001): Protecció del procés de mort cel·lular programada en cultius *in vitro* de cèl·lules animals. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.

Vives J., Juanola S., Cairó J.J., Prats E., Cornudella L., Gòdia F. (2003a): Protective effect of viral homologues of bcl-2 on hybridoma cells under apoptosis-inducing conditions. *Biotechnol. Prog.* 19, 84-89.

Vives J., Juanola S., Cairó J.J., Gòdia F. (2003b): Metabolic engineering of apoptosis in cultured animal cells: implications for the biotechnology industry. *Metab. Eng.* 5 (2), 124-132.

**W**agner E., Zatloukal K., Cotten M., Kirlappos H., Mechtler K., Curiel D.T., Birnstiel M.L. (1992): Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (13), 6099-6103.

Waldmann T. (1991): Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science.* 252, 1657-1662.

Waldmann T. (2003): Immunotherapy: past, present and future. *Nat. Med.* 9 (3), 269-277.

**Wang H.G., Miyashita T., Takayama S., Sato T., Torigoe T., Krajewski S., Tanaka S., Hovey L., Troppmair J., Rapp U.R., i col.** (1994): Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene*. 9 (9), 2751-6.

**Wang Y., Qi Y., Zhu Y., Li Z., Yang Y.** (2003): Functional study on baculovirus anti-apoptosis genes. *Mol. Cell Biochem*. 252 (1-2), 103-107.

**Wang X.H., Xu J., Zhang Y., Li L., Feng Q., Mi L., Chen Z.N.** (2004): Inducible expression of Bcl-XL inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in hybridoma, resulting in enhanced antibody production. *Cell Bio. Int*. 28 (3), 185-191.

**Weinberg R.A.** (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81, 323-330.

**Werner R.** (1998): Identification and development of new biopharmaceuticals. *Arzneim.-Forsch./Drug.Res.* 48, 523-530.

**White E.** (2006): Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 13 (8), 1371-1377.

**Widlak P., Garrard W.T.** (2005): Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J. Cell Biochem*. 94 (6), 1078-1087.

**Williams R.S., Johnston S.A., Riedy M., DeVit M.J., McElligott S.G., Sanford C.** (1991): Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc .Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 7 (88), 2726-2730.

**Willis S.N., Adams J.M.** (2005): Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol*. 17 (6), 617-625.

**Willis S., Day C.L., Hinds M.G., Huang D.C.** (2003): The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J. Cell Sci*. 116 (Pt 20), 4053-4056.

**Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L.** (1990): Direct gene transfer into mouse muscle "in vivo". *Science*. 4949 Pt 1 (247), 1465-1468.

**Wolter K.G., Hsu Y.T., Smith C.L., Nechushtan A., Xi X.G., Youle R.J.** (1997): Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol*. 139 (5), 1281-1292.

**Woo R.W., Mclure K.G., Lees-Miller S.P., Rancourt D.E., Lee P.W.K.** (1998): DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*. 394, 700-704.

**Wyllie A.H.** (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous nuclease activation. *Nature*. 284, 555-556.

**Xie L., Wang D.I.** (2006): Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. 1994. *Biotechnol. Bioeng.* 95 (2), 270-284.

**Xiong K.H., Liang Q.C., Xiong H., Zou C.X., Gao G.D., Zhao Z.W., Zhang H.** Expression of chimeric antibody in mammalian cells using dicistronic expression vector. *Biotechnol. Lett.* 27 (21), 1713-1717.

**Xu G., Girilli M., Huang Y., Rich R.L., Myszka D.G., Wu H.** (2001): Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/P35 complex. *Nature*. 410 (6827), 494-497.

**Xu Y., Szoka F.C.** (1996): Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*. 18 (35), 5616-5623.

**Xue D., Horvitz H.R.** (1995): Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus P35 protein. *Nature*. 377 (6546), 248-251.

**Yanez-Muñoz R.J., Balaggan K.S., MacNeil A., Howe S.J., Schmidt M., Smith A.J., Buch P., MacLaren R.E., Anderson P.N., Barker S.E., Duran Y., Bartholomae C., Von Kalle C., Heckenlively J.R., Kinnon C., Ali R.R., Thrasher A.J.** (2006): Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat. Med.* 12 (3), 348-353.

**Yang N., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D.** (1990): "In vivo" and "in vitro" gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 24 (87), 9568-9572.

**Yelton D., Scharff M.** (1981): Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 657-680.

**Yin X.M.** (2006): Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*. 369, 7-19.

**Yoshida H., Kong Y.Y., Yoshida R., Elia A.J., Hakem A., Hakem R., Penninger J.M., Mak T.W.** (1998): Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. 94, 739-750.

**Yoshimura K., Rosenfeld M.A., Seth P., Crystal R.G.** (1993): Adenovirus-mediated augmentation of cell transfection with unmodified plasmid vectors. *J. Biol. Chem.* 268 (4), 2300-2303.

**Young L.S., Dawson C.W., Eliopoulos A.G.** (1999): Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 807-812.

**Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T., Poellinger K.A., Welsh M.J.** (1995): Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 32 (270), 18997-19007.

**Zamzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S.A., Kroemer G.** (1998): Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*. 16 (17), 2265-2282.

**Zhou Y., Aran J., Gottesman M.M., Pastan I.** (1998a): Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector. *Hum. Gen. Ther.* 9 (3), 287-293.

**Zhou Q., Krebs J.F., Snipas S.J., Price A., Alnemri E.S., Tomaselli K.J., Salvesen G.S.** (1998b): Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases: specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry*. 37, 10757-10765.

**Zhou Q., Snipas S., Orth K., Muzio M., Dixit V.M., Salvensen G.S.** (1997): Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.* 272 (12), 7797-7800.

**Zimmermann K., Bonzon C., Green D.** (2001): The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92, 57-70.

**Zinkel S., Gross A., Yang E.** (2006): Bcl-2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 13 (8), 1351-1359.

**Zong W.X., Li C., Hatzivassiliou G., Lindsten T., Yu Q.C., Yuan J., Thompson C.B.** (2003): Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162 (1), 59-69.

**Zong W.X., Lindsten T., Ross A.J., MacGregor G.R. Thompson C.B.** (2001): BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 15 (12), 1481-1486.

# NOMENCLATURA



## NOMENCLATURA

aà: Aminoàcid

AAV: Virus adenoassociat

AcNPV: *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*

Ad: Adenovirus

AIF: Factor inductor d'apoptosi

AMV: virus de la mieloblastosi aviària

Apaf-1: *Apoptotic protease activating factor 1*

Asp: Àcid aspàrtic

ATP: Adenosina 5'-trifosfat

Bcl-2: *B-Cell Leukaemia/Lymphoma-2*

BGH: Hormona bovina de creixement

BH: *Bcl-2 homology domains*

BHRF-1: *BamHI rightward reading frame 1*

BL: *Biosecurity level*

BSA: Albúmina de sèrum boví

CAD: *Caspase activated DNase*

CaPi: Fosfat calci

CARD: *Caspase recruitment domain*

Caspases: *Cysteinyll aspartate specific proteinases*

cDNA: DNA complementari

CBATEG: Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica

CDK: *Cyclin-dependent protein kinasa*

CED: *Caenorhabditis elegans cell death gene*

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

Cito c: Citocrom c

CMV: Citomegalovirus

COX: Citocrom Oxidasa

Cyc: Ciclina

dATP: Deoxiadenina trifosfat.

dCTP: Deoxicitosina trifosfat

DED: *Death effector domain*

DEPC: Dietilpirocarbonat

DEVD-cmk: Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-clorometilcetona

dGTP: Deoxiguanina trifosfat

DHFR: Dihidrofolat-reductasa

Diablo: *Direct inhibitors of apoptosis protein (IAP) binding protein with low pI*

DMEM: Medi d'Eagle modificat per Dulbecco

DMRIE-C: *1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxi ethyl ammonium bromide* en una formulació liposòmica contenint colesterol

DMSO: Dimetilsulfòxid

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DNAsa: Desoxiribonucleasa

dNTPs: Deoxinucleòtids trifosfat

DOPE: *Dioleoyl phosphatidylethanolamine*

DTT: Ditiotreitòl

dTTP: Deoxitimina trifosfat

dUTP: desoxiuracil trifosfat

ECMV: Encefalomiocarditis virus

EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

EYFP: *Enhanced Yellow Fluorescent protein*

FCS: Sèrum fetal de vedella

%GC: percentatge de les bases nitrogenades Guanina i Citosina en una seqüència nucleotídica

GFP: *Green Fluorescent Protein*

Gln: Glutamina

Gluc: Glucosa

G418: neomicina

HEPES: Àcid N-2-hidroxietilpiperazina-N'-3-propasulfònic

HHV8: herpesvirus 8 humà  
IAP: *Inhibitor apoptosis protein*  
ICAD: *Inhibitor of CAD*  
IRES: *Internal ribosome entry site*  
Kb: Kilobases  
Kda: Kilodalton  
KS: Sarcoma de kaposi  
Lac: Lactat  
LB: Luria Bertoni  
MAbs: *Monoclonal antibodies*  
MAC: *Mitochondrial apoptosis-induced channel*  
MCS: *Multiple cloning site*  
MME: Membrana Mitochondrial Externa  
MMI: Membrana Mitochondrial Interna  
mRNA: RNA missatger  
NCBI: *National center for biotechnology information*  
MOI: multiplicitat d'infecció  
*Neor*: *Neomycin resistance*  
Omi /HTRA2: *Pro-apoptotic mitochondrial serine protease*  
ONP: Orto-nitrofenil  
ONPG: Orto-nitrofenil-  $\beta$  galactòsid  
ORF: *Open Reading Frame*  
PAK2: *p21-activated kinase 2*  
Pb: parell de bases  
PBS: *Phosphate buffered saline*  
PCD: *Programmed cell death*  
 $P_{CMV IE}$ : Promotor de citomegalovirus  
PCR: Reacció en cadena de la polimerasa  
PEG: polietilèglicol  
PEI: polietilenamina  
Pfu: *Plaque forming units*

pRb: Proteïna del retinoblastoma

PTP: Porus de permeabilitat transitòria

p10: Subunitat petita de les Caspases de 10 KDa

p20: Subunitat gran de les Caspases de 20 KDa

RNA: Àcid ribonucleic

RNAsa: Ribonucleasa

RT-PCR: Reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa prèvia

SDS: Lauril sulfat sòdic

Smac: *Second mitochondria-derived activator of Caspases*

TAE: Tampó Tris-Acètic-EDTA

T<sub>h</sub>: Temperatura d'hibridació

TM: Domini transmembrana

T<sub>m</sub>: Temperatura de fusió

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TRIS: Tris[hidroximetil]- aminometà

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*

UV: Ultraviolat

VEB: Virus d'Epstein-Barr

z-VAD-fmk: N-benzioxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona

$\Delta\Psi_m$ : Potencial mitocondrial de transmembrana

# ANNEXOS

---

---

# ANNEX I

---

## ANNEX I

## 1- Seqüències de DNA extretes dels Nacional Center for biotechnology Information (NCBI)

\* Les regions utilitzades per al disseny dels encebadors es destaquen subratllades.

✓ *bcl-2* (Ref. NM\_000633, *Homo sapiens*):

ATGGCGCACGCTGGGAGAACAGGGTACGATAACCGGGAGATAGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTCGCAG  
 AGGGGCTACGAGTGGGATGCGGGAGATGTGGGCGCCGCGCCCCGGGGGCCGCCCCGCGCCGGGCATCTTCTCC  
 TCGCAGCCCGGGCACACGCCCCATACAGCCGCATCCCGGGACCCGGTCCGACAGGACCTCGCCGCTGCAGACCCCG  
 GCTGCCCCCGGCGCCGCGCGGGGCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCC  
 GCGGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGCCGCGACTTCGCGGAGATGTCCAGGCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCC  
 GCGCGGGGACGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGACGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTGGCCTTC  
 TTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACCGGGAGATGTCGCCCCCTGGTGGACAACATCGCCCTG  
 TGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCACCTGCACACCTGGATCCAGGATAACGGAGGCTGGGATGCCTTTGTGGAA  
 CTGTACGGCCCCAGCATGCGGCCTCTGTTTGTATTTCTCCTGGCTGTCTCTGAAGACTCTGCTCAGTTTGGCCCTG  
 GTGGGAGCTTGCATCACCCCTGGGTGCCTATCTGGGCCACAAGTGA

✓ *bcl-x* (Ref. NM\_009743, *Mus musculus*):

ATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTGGTGGTTCGACTTTCTCTCCTACAAGCTTTCCCAGAAAGGATACAGCTGGAGT  
 CAGTTTGTAGTGATGTCTGAAGAGAATAGGACTGAGGCCCCAGAAGAAACTGAAGCAGAGAGGGAGACCCCCAGTGCC  
 ATCAATGGCAACCCATCCTGGCACCTGGCGGATAGCCCCGGCCGTGAATGGAGCCACTGGCCACAGCAGCAGTTTG  
 GATGCGCGGGAGGTGATTCCCATGGCAGCAGTGAAGCAAGCGCTGAGAGAGGCAGGCGATGAGTTTGAAGTGCAGG  
 TACCGGAGAGCGTTTCAAGTATCTAACATCCCAGCTTACATAACCCAGGGACCGCGTATCAGAGCTTTGAGCAG  
 GTAGTGAATGAAGTCTTTTCGGGATGGAGTAAACTGGGGTTCGCATCGTGGCCCTTTTCTCCTTTGGCGGGGCACTG  
 TCGTGGAAAGCGTAGACAAGGAGATGCAGGTATTGGTGGTTCGGATTGCAAGTTGGATGGCCACCTATCTGAAT  
 GACCACCTAGAGCCTTGGATCCAGGAGAACGGCGGCTGGGACACTTTTGTGGATCTCTACGGGAACAATGCAGCA  
 GCCGAGAGCCGAAAGGCCAGGAGCGCTTCAACCGCTGGTTTCTGACGGGCATGACTGTGGCTGGTGTGGTTCTG  
 CTGGGCTCACTCTTTCAGTCGGAAGTGACCAGACACTGAATGTCTCAGAGCAACCGGGA

✓ *bhrf-1* (Ref. M17416 Herpesvirus humà de tipus 4):

ATGGCCTATTCAACAAGGGAGATACTGTTAGCCCTGTGTATACGGGACAGTCGTGTGCATGGAAATGGTACCCTG  
 CATCCTGTGTTGGAGCTAGCAGCAAGAGAAACACCTCTCCGCCTTTTCGCCAGAGGACACTGTAGTTCTGCGTTAT  
 CATGTGTTGCTTGAGGAGATAAATTGAACGAAATTCAGAGACATTTACAGAACTTGGAACAGATTTATAACACAC  
 ACCGAACATGTGGATCTGGATTTTAACTCAGTATTTTTAGAGATATTTACACCGTGGAGACCCAAGCCTTGGGCGC  
 GCGTTGGCCTGGATGGCCTGGTGCATGCATGCCTGCAGGACATTGTGTTGTAACCAGTCTACTCCTTACTATGTT  
 GTGGACCTGTGAGTTGTTGGGATGTTAGAAGCCAGCGAAGGCCTGGATGGTTGGATTTCATCAACAGGGCGGCTGG  
 TCTACATTAATTGAAGACAACATTCCTGGATCCAGAAGGTTTAGCTGGACTTTGTTTCTTGCTGGACTGACTTTG  
 AGTCTGTTAGTTATATGTAGTTATTTATTTATCTCCAGAGGAAGACACTAA

✓ *ksbcl-2* (Ref.U67773, Herpesvirus humà de tipus 8):

ATGGACGAGGACGTTTTGCCTGGAGAGGTGTTGGCCATTGAAGGGATATTCATGGCCTGTGGATTAACGAACCT  
 GAGTACCTGTACCATCCTTTGCTCAGCCCTATTAAGCTATACATCACAGGCTTAATGCGAGACAAGGAGTCTTTA  
 TTCGAGGCCATGTTGGCTAATGTGAGATTTACAGCACCACCGGTATAAACCAGCTTGGGTTGAGCATGCTGCAG  
 GTTAGCGGCGATGGAAACATGAACTGGGGGCGAGCCCTGGCTATACTGACCTTTGGCAGTTTTGTGGCCCAGAAG  
 TTATCCAACGAACCTCACCTGCGAGACTTTGCTTTGGCCGTTTTACCTGTATATGCGTATGAAGCAATCGGACCC  
 CAGTGGTTTTCGCGCTCGCGGAGGCTGGCGAGGCCTGAAGGCGTATTGTACACAGGTGCTTACCAGAAGAAGGGGA  
 CGGAGAATGACAGCGCTATTGGGAAGCATTGCATTATTGGCCACTATATTGGCAGCGGTGCGGATGAGCAGGAGA  
 TAA

✓ *p35* (NC\_001623\*, *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*):

ATGTGTGTAATTTTTCCGGTAGAAATCGACGTGTCCAGACGATTATTCGAGATTGTCAGGTGGACAAACAAACC  
 AGAGAGTTGGTGTACATTAACAAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAAACATTTCC  
 GGTCTATACGAAGCGTTACGCGCAAGAACAACAATTTGCGCGACAGAATAAAAATCAAAAAGTCGATGAACAATTT  
 GATCAACTAGAACGCGATTACAGCGATCAAATGGATGGATTCCACGATAGCATCAAGTATTTTAAAGATGAACAC  
 TATTCGGTAAGTTGCCAAAATGGCAGCGTGTGAAAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGAGTCATGATTATACC  
 GATAAAAAGTCTATTGAAGCTTACGAGAAATACTGTTTGCCCAAATTTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTG  
 GCGGTATGCGTGTGAAAGCCGGGATTTGAGAACGGCAGCAACCAAGTGCTATCTTTTCGAGTACAACCCGATTGGT  
 AACAAAGTTATTGTGCCGTTTGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACGAGTACGACGTCGTAGCTTACGTG  
 GACAGTGTGAGTTTGGATGGCGAACAATTTGAAGAGTTTGTGCGAGATTTAATATTGCCGTCGTCGTTCAAAAAT  
 TCGGAAAAGGTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAGCATGATCTACAAGGCTTTAGAGTTTACTACA  
 GAATCGAGCTGGGGCAAATCCGAAAAGTATAATTGGAAAATTTTTTTGTAACGGTTTTATTTATGATAAAAAATCA  
 AAAGTGTGATGTTAAATTGCACAATGTAAGTAGTGCCTCAACAAAATGTAATATTAACACAATTAATAA

\*ORF comprès entre 116492 i 117391.



✓ *egfp* (pIRES2-EGFP):

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC  
CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACC  
ACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGACGTGCTTCAGCCGCTAC  
CCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC  
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAG  
CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAAC  
GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC  
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCAC  
TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG  
ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

# ANNEX II

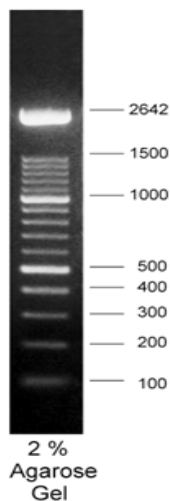
---

## ANNEX II

## Marcadors de pes molecular

▪ Roche:

XIV

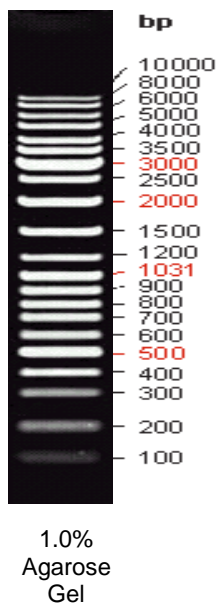
**Marcador XIV:**

Font: Preparat per restricció de plasmidis construïts específicament. Les bandes de 500 i 1000 pb són de dues a tres vegades més intenses

Rang: 0.1 - 2.6 kb

Fragments: 15 (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 i 2642 pb)

Concentració: 250 µg/ml

▪ Fermentas:**Marcador GeneRuler™:**

Font: Preparat de set plasmidis diferents, entre els quals hi ha el pUC, pBR322, fag λ i seqüències del genoma de llevat. Cada plasmidi o seqüència de DNA és digerit individualment amb enzims de restricció apropiats.

Rang: 0.1 - 10 kb

Fragments: 21 (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 i 10000 pb)

Concentració: 500 µg/ml