
OBJECTIUS

CAPÍTOL 2

2. OBJECTIUS DEL TREBALL DE TESI

2.1. Objectiu general

En el capítol anterior, s'ha mostrat la mort cel·lular com a factor crític limitant del creixement cel·lular i de la productivitat en bioreactors i, per tant, la seva activació en cultius de cèl·lules animals és un fenomen altament indesitjable. Donada la seva importància en el rendiment del procés, en treballs anteriors, es van determinar els factors inductors de l'apoptosi en cultius en discontinu d'hibridomes i quin d'ells era l'estímul primer.

Així és com es va evidenciar l'efecte en l'activació de la PCD de l'exhauriment de la glutamina en el medi (Sanfeliu, 1995; Tintó, 1999), que tanmateix ha estat descrit també en altres línies cel·lulars (Kerr et al., 1972; Singh et al., 1994; Franek, 1995). El manteniment d'una certa concentració d'aquest nutrient en el medi de cultiu és essencial per al manteniment de la viabilitat i productivitat cel·lular en el cultiu en discontinu d'hibridomes. No obstant això, cal tenir en compte que els cultius de cèl·lules animals comporten l'ús d'aparells complexos i cars i que, quant major vol ser el control dels paràmetres que influeixen en el creixement cel·lular dins els bioreactors, major és també el risc d'avaria i l'encariment del producte final.

És per aquest motiu que en el treball de tesi doctoral que es presenta en aquesta memòria s'han determinat els mecanismes bioquímics que condueixen al desmantellament cel·lular dels híbridomes en condicions de manca de nutrients amb l'objectiu de conèixer amb cert detall les rutes de senyalització i execució de la mort cel·lular programada per modificar-les genèticament, generant així noves línies cel·lulars d'híbridoma més robustes, capaces de sobreviure durant més temps en condicions inductores de l'apoptosi.

Donat que, tal i com s'ha comentat en la introducció, aquest procés de mort es dóna sigui quina sigui l'estratègia de cultiu emprada (excepte en els cultius en continu sense retenció cel·lular), es va decidir treballar com a model amb el sistema més senzill: el *cultiu en discontinu*.

2.2. Objectius específics

- Avaluació de l'efecte de la reformulació del medi de cultiu en l'alentiment del cicle cel·lular per optimitzar les condicions de producció d'anticossos monoclonals i estudi de la inducció de la mort per apoptosi en aquestes condicions. En aquest sentit, es van estudiar els següents factors:
 - Canvi de la font de carboni (glucosa) per fructosa, galactosa i manosa
 - Reducció de la concentració de sèrum
 - Reducció de la concentració de fosfats
 - Reducció de la concentració de vitamines
 - Reducció de la concentració de sals fèrriques
 - Supressió d'aminoàcids no essencials
 - Addició de clorur d'amoni
 - Addició d'hidroxiurea

- Estudi de l'expressió de gens involucrats en l'apoptosi i determinació del seu paper en la fase de mort dels cultius de l'híbridoma KB26.5 mitjançant l'ús de tècniques de RT-PCR, transferència *Western* i inhibició química específica de les Caspases. Els gens estudiats foren:

- Gens que codifiquen per proteïnes protectores de la mort per apoptosi de la família del Bcl-2: *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w* i *mcl-1*
 - Gens que codifiquen per proteïnes promotores de la mort per apoptosi de la família del Bcl-2: *bax* i *bak*
 - Gens que codifiquen per les cisteïna-proteases involucrades en la cascada proteolítica de les Caspases: *caspara 1*, *caspara 2*, *caspara 3* i *caspara 9*
-
- Aïllament i clonatge de cDNAs de gens protectors de l'apoptosi d'origen endogen i víric, i avaluació de la possibilitat de la seva sobreexpressió en l'hibridoma per a l'obtenció de línies cel·lulars més robustes, resistents a la inducció de la PCD per manca de nutrients al medi de cultiu. Aquí s'hi inclouen els gens: *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bhrf-1*, *ksbcl-2*, *p35* i *x-iap*

 - Protecció de la mort per apoptosi en transfectants de l'hibridoma KB26.5 en condicions de manca de nutrients i estudis de recuperació de cultius sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant períodes de temps prolongats (fins a les 48 hores en condicions de manca de glutamina)

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 3

3. TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL APOPTÒTIC I EXECUCIÓ DEL PROGRAMA DE MORT

3.1. Apoptosi i cicle cel·lular

Les cèl·lules d'hibridoma es divideixen ràpidament en la fase de creixement i consumeixen nutrients a una velocitat elevada (Sanfeliu et al., 1996 i 1997; Paredes et al., 1998). A conseqüència de la manca d'un estat de quiescència (o fase G₀), la viabilitat dels cultius descendeix ràpidament degut a l'exhauriment de nutrients i/o a l'acumulació de metabòlits tòxics (Simpson et al., 1997).

La producció d'anticossos monoclonals és constant en la fase exponencial de creixement i a una velocitat encara més elevada en la fase viable de no creixement (fase estacionària i de mort) (Takahashi et al., 1994). De totes formes, les cèl·lules d'hibridoma tendeixen a morir molt ràpidament just després d'haver assolit la màxima densitat cel·lular, com s'ha mostrat al Capítol 1 (veure Figura 1.1) ja que els hibridomes no són cèl·lules optimitzades genèticament per a bioprocessos a escala de producció (Bailey, 1991).

Quan l'activació de l'apoptosi es dona per exhauriment de nutrients, com és el cas considerat en aquesta tesi, es planteja la possibilitat d'aturar el creixement cel·lular mitjançant la detenció del cicle cel·lular. Això es pot aconseguir mitjançant reformulació del medi o bé per modificació

genètica (Fussenegger i Bailey, 1998). De les dues estratègies esmentades, en aquest treball s'ha optat per la reformulació del medi (veure Capítol 4). Aquesta aturada del cicle cel·lular vol aconseguir que les cèl·lules dediquin la seva maquinària a la producció de l'anticòs i no a la divisió cel·lular. Malauradament, els cultius aturats en G_1 pateixen una complicació que porta a l'activació del procés de mort per apoptosi, de manera que es fa necessària la dissecció dels processos bioquímics intracel·lulars que es donen per determinar així quines són les millors dianes per a una interferència genètica en la ruta bioquímica de la PCD. Donat que l'activació de l'apoptosi és una possible complicació en els cultius amb el cicle cel·lular aturat, es recomana la sobreexpressió dels gens de supervivència.

Els efectes observables a nivell de la morfologia cel·lular, translocació de fosfatidilserina i degradació del DNA són el resultat final de la cascada apoptòtica activada per les condicions de cultiu en els bioreactors, tal i com es representa esquemàticament a la Figura 3.1.

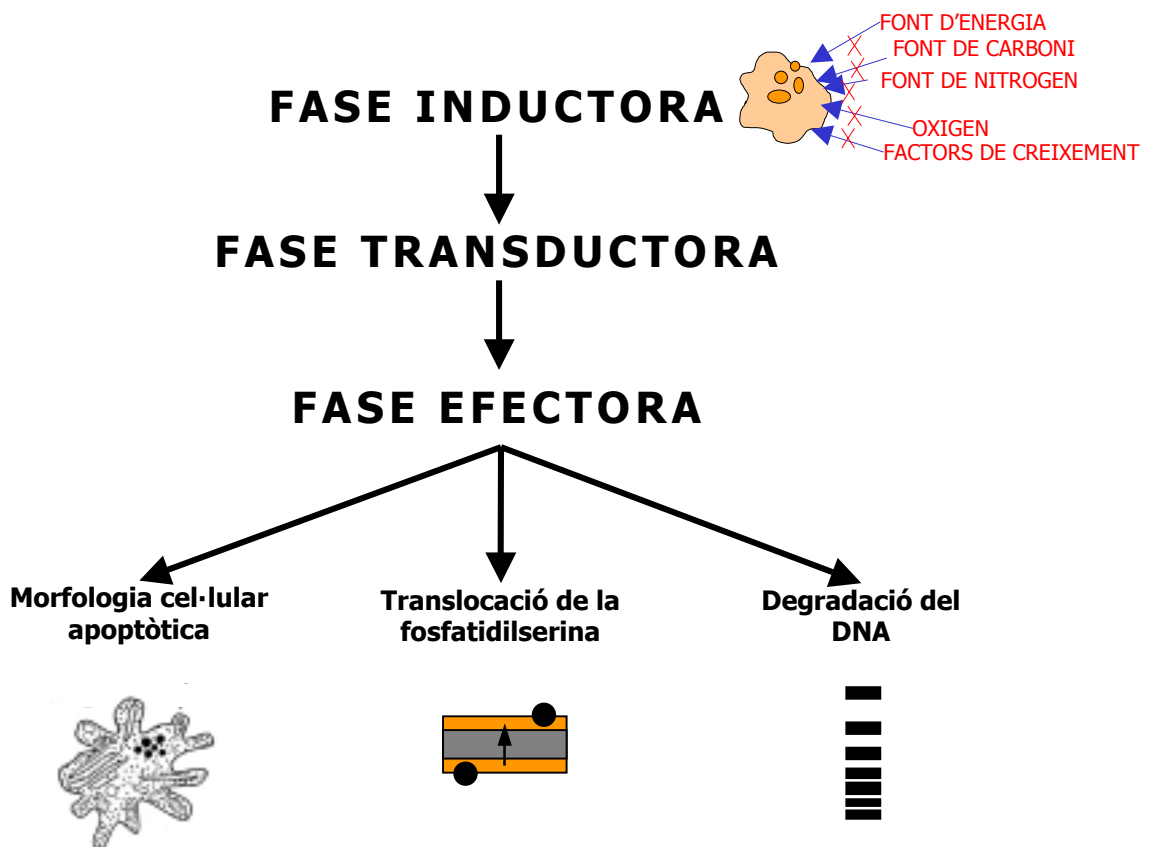


Figura 3.1. Quadre resum on es presenta de forma esquemàtica les diferents fases que ocorren en el procés de mort per apoptosi. En la fase inductora, es llisten els factors que provoquen la mort per apoptosi en l'hibridoma KB26.5.

En els apartats següents es detallen els resultats obtinguts en el treball de tesi adreçats al millor coneixement dels processos moleculars que es donen en l'apoptosi de l'hibridoma KB26.5.

3.2. La transducció del senyal apoptòtic

Tal i com s'ha explicat en la introducció d'aquesta memòria, l'apoptosi és un procés dràstic, on molts dels mecanismes bioquímics activats són dependents d'energia i, per tant, requereixen la síntesi d'ATP, que es dona en mitocondris gràcies a dos fets que defineixen el que es coneix amb el nom de *fosforilació oxidativa*, responsable del manteniment d'un potencial de membrana entre el citoplasma i l'interior del mitocondri: l'oxidació de substrats com el NADH i el succinat, ambdós generats en el cicle dels àcids tricarboxílics en la matriu mitocondrial; i el transport d'electrons a través de les proteïnes integrants de la cadena mitocondrial (entre elles el Citocrom c) (Lodish, 1990).

El desacoblament de la cadena transportadora d'electrons causa l'aturada de la síntesi d'ATP i la disrupció del potencial de membrana mitocondrial. Donada la importància del manteniment funcional d'aquests orgànuls citoplasmàtics en la PCD, en aquest treball s'ha estudiat el seu potencial de membrana en el transcurs d'un cultiu cel·lular en condicions inicials de manca de glutamina, mitjançant la tinció selectiva dependent de potencial de membrana amb un compost fluorescent anomenat *Mito Tracker Green FM* (Baisch et al., 1999)

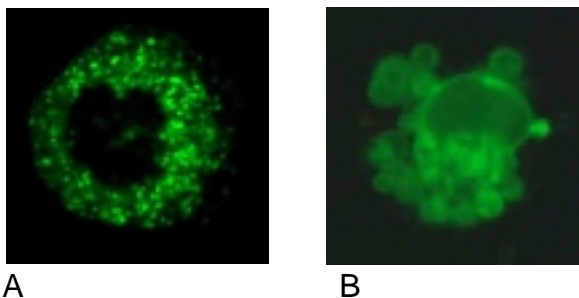


Figura 3.2. Visualització per microscòpia confocal del potencial intermembrana mitocondrial. Es va realitzar una tinció amb *Mito Tracker Green FM* (veure subapartat 7.13.2.3 del Capítol 7, de Materials i Mètodes) a diferents temps d'un cultiu en discontinu de la línia cel·lular d'hibridoma KB26.5 en condicions de manca de glutamina: A, a les 24 hores; B, a les 60 hores.

A la Figura 3.2A, es mostra una cèl·lula cultivada en condicions de deprivació de glutamina, a les 24 hores amb els mitocondris intactes i funcionalment actius, ja que així ens ho indica la tinció amb *Mito Tracker Green FM*. En canvi, a les 60 hores, la cèl·lula es troba en un estat d'apoptosi molt avançat i els mitocondris no es tenyeixen. Augmentant la intensitat del feix de llum que es fa incidir sobre la mostra, es pot observar la fluorescència intrínseca de la cèl·lula, Figura 3.2B.

Fins el moment, és ben acceptat que el mitocondri és un punt central i integrador de la maquinària de mort cel·lular on hi participen molècules efectores (Caspases), adaptadores (Apaf-1), reguladores (membres pro- i anti-apoptòtics de la família del Bcl-2), i inhibidores de

l'apoptosi (IAPs) (Hunot i Flavell, 2001). En resposta a senyals de diferents orígens, la membrana mitocondrial externa es permeabilitza, resultant en l'alliberament al citosol de molècules com el Citocrom c i Smac/DIABLO, que són clau per a l'activació de proteïnes efectores del procés de l'apoptosi (Liu et al., 1996; Slee et al., 1999). Així doncs, és d'esperar que els mitocondris que perdien la seva funcionalitat a la Figura 3.2 alliberin el Citocrom c i que aquest activi la via proteolítica de les Caspases de la manera en que s'esquemmatitza a la Figura 3.3.

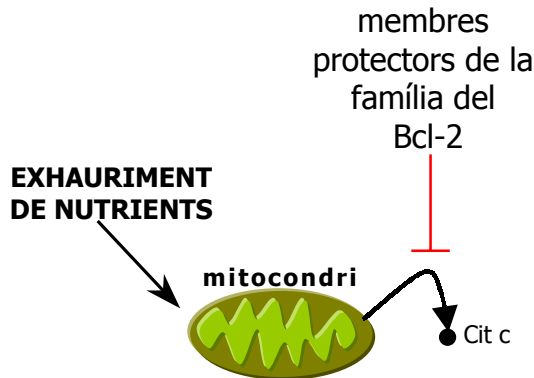


Figura 3.3. Esquema dels efectes de l'exhauriment de nutrients en els mitocondris. L'exhauriment de nutrients condueix a l'alliberament del Citocrom c del mitocondri. Un cop al citoplasma, el Citocrom c transmet el senyal a través de la via proteolítica de les Caspases, que condueix als canvis estructurals típics de l'apoptosi: reducció del volum cel·lular, formació de lòbuls a la membrana plasmàtica, condensació de la cromatina, fragmentació del nucli i, finalment, la desintegració de la cèl·lula en el que s'anomenen els cossos apoptòtics.

Per aquest motiu, es va voler comprovar que el Citocrom c era alliberat dels mitocondris i que passava al citoplasma. A la Figura 3.4, es mostren els resultats obtinguts per transferència *Western* en la detecció del Citocrom c en extractes mitocondrials i citoplasmàtics de cèl·lules d'hibridoma cultivades en presència i en absència de glutamina, respectivament. Aquests resultats confirmen que la pèrdua de l'activitat mitocondrial en cèl·lules creixudes en medis deficientes en glutamina condueix a la mort cel·lular per apoptosi via alliberament del Citocrom c i, en conseqüència, hauríem d'esperar que així és com s'activa la ruta de les Caspases.

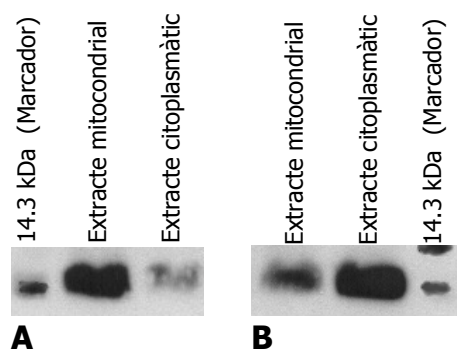


Figura 3.4. Visualització de l'alliberament del Citocrom c per transferència *Western* en la població cel·lular d'un cultiu en discontinu de l'hibridoma KB 26.5. A. En condicions òptimes de creixement; B. En condicions de manca de glutamina. El Citocrom c és vital en la transmissió del senyal apoptòtic induït per la manca de glutamina en cultius en discontinu de la línia cel·lular estudiada. El seu alliberament del mitocondri condueix a l'activació de la via de les Caspases.

Altres proteïnes que s'alliberen dels mitocondris durant l'apoptosi són l'AIF (Hirsch et al., 1997), una proteïna diferent de les Caspases que indueix la condensació i la fragmentació del DNA al marge de les endonucleases CAD (Earnshaw, 1999), i la procaspasa 2 (Susin et al.,

1999; Porter, 1999) que, a l'igual que la Caspasa 9, disposa d'una regió CARD (*Caspase Recruitment Domain*) que permet la seva unió a altres proteïnes (Chou et al., 1998).

La sortida al citoplasma d'algunes d'aquestes proteïnes i les altres alteracions que es produeixen en el mitocondri han estat atribuïdes a la creació d'un canal entre les dues membranes mitocondrials anomenat PT (*mitochondrial Permeability Transition pore* o *megachannel*) (Scarlett i Murphy, 1997). Aquest canal podria estar format per les proteïnes ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*) presents a la membrana mitocondrial interna (Fiore et al., 1998; Marzo et al., 1998) i la porina VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) a la membrana externa (Green i Reed, 1998). L'obertura d'aquest canal origina l'entrada no selectiva de ions a l'interior de la matriu mitocondrial i l'espai intermembrana, provocant la desaparició del gradient de protons existent entre aquests dos compartiments de la mitocòndria i, per tant, la dissipació del potencial transmembrana intern ($\Delta\Psi_m$) així com el trencament de la cadena transportadora d'electrons (Susin et al., 1998). A més a més, l'obertura del PT origina un increment de l'osmolaritat a la matriu mitocondrial, amb el conseqüent inflament de l'òrganul que propicia la ruptura de la membrana mitocondrial externa i l'alliberament al citoplasma de les diferents proteïnes activadores de la via de les Caspases presents a l'espai intermembrana (Susin et al., 1998).

El mecanisme d'obertura del porus mitocondrial PT encara no és del tot conegut, tot i que podria estar relacionat amb processos previs d'hiperpolarització de la membrana interna mitocondrial. El que sí s'ha pogut apreciar és que l'obertura del PT es produeix per l'acció de substàncies oxidants, increments sobtats de la concentració de Ca^{2+} citosòlic, determinades molècules transductores del senyal apoptòtic, entre les quals es troba la ceramida, que és un lípid intermediari de la via de les Caspases procedent de receptors de membrana, inductors proteics de l'apoptosi i les mateixes Caspases efectores (Chernyak i Bernardi, 1996; Susin et al., 1997; Green i Reed, 1998). Aquest fet sembla indicar que en la cascada proteolítica es pot donar un efecte de reforç positiu de les Caspases sobre el mitocondri (Marzo et al., 1998).

En determinades cèl·lules, la sortida del Citocrom c al citoplasma es dona independentment de la pèrdua del $\Delta\Psi_m$ (Bossy-Wetzel et al., 1998). Aquest fet podria indicar l'existència de múltiples maneres d'induir la sortida de les proteïnes mitocondrials proapòtiques. També s'ha observat que en certes circumstàncies la sortida del Citocrom c de mitocondri pot comportar la mort de la cèl·lula per necrosi (Hirsch et al., 1997; Kroemer et al., 1998). Aquest fenomen es pot

donar en cèl·lules tractades amb elevades concentracions d'inhibidors apoptòtics que frenen l'activació de la Caspasa 9, de manera que la cèl·lula acaba morint per necrosi degut al trencament de la cadena transportadora d'electrons, la creació de molècules amb radicals lliures i la pèrdua de la capacitat de generar ATP (Green i Reed, 1998).

3.3. Gens implicats en la transducció del senyal apoptòtic

Als membres de la família del Bcl-2, se'ls adjudica un paper central en la regulació de l'apoptosi (Reed, 1998). 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 una relació causa-efecte entre la seva expressió i l'activació o inhibició de l'efecte dels factors implicats en aquest programa intracel·lular, afirmant el seu paper crític en la decisió entre vida i mort de la cèl·lula (Muchmore et al., 1996).

El *bcl-2* va ser el primer homòleg dels gens *ced* de *C. elegans* trobat en mamífers. En concret, és homòleg al *ced-9* i està involucrat en la inhibició de la PCD. Fou identificat inicialment en un limfoma de cèl·lules B (d'aquí el seu nom: *B cell lymphoma*) com a resultat de la translocació cromosòmica que comporta una elevada expressió del Bcl-2 en aquests tumors, que evolucionen com a resultat de la disminució de la quantitat normal de PCD (Vaux et al., 1988). Després del Bcl-2, es va descobrir una família sencera de gens que comparteixen regions homòlogues anomenades *dominis BH* (*Bcl Homology*). Bo i aquesta semblança, no tots inhibeixen la mort cel·lular programada; alguns d'ells la promouen. A la Taula 3.1., es mostra en forma de llista alguns dels membres de la família del Bcl-2 i la seva acció en l'apoptosi.

	PCD	
	inhibeix	promou
Bak		x
Bax		x
Bcl-2	x	
Bcl-w	x	
Bcl-X _L	x	
Bcl-X _S		x
Bid	x	
BHRF-1	x	
KSBcl-2	x	
Mcl-1	x	

Taula 3.1. Funció d'alguns membres de la família del Bcl-2. Amb una 'x', s'indica si són factors protectors o bé promotors de la PCD. S'hi inclouen els homòlegs virals BHRF-1 i KSBcl-2 (les característiques dels quals es detallen al Capítol 5).

Tots els membres d'aquesta família posseeixen almenys un motiu estructural que comparteix homologia amb un dels quatre dominis definits en el Bcl-2 (BH1, BH2, BH3, BH4) com es mostra esquemàticament en la Figura 3.5. En funció del seu paper en la PCD, es poden classificar en *proapoptòtics* o *antiapoptòtics*, tal com s'ha esmentat anteriorment. Al seu torn, les proteïnes proapoptòtiques es poden classificar en dues subfamílies més, a una d'elles hi pertanyen aquelles que contenen tres dominis homòlegs als quatre del Bcl-2, el BH1, BH2 i BH3; i, a l'altra, les proteïnes que només contenen un domini homòleg amb el domini BH3 del Bcl-2 (Reed, 1997; Adams i Cory, 1998).



Figura 3.5. Representació esquemàtica de l'estructura del Bcl-2. S'hi han representat els dominis BH i el domini transmembrana (TM). *BH1* i *BH2*: en antagonistes de mort, permet l'heterodimerització amb el Bax per a reprimir la PCD; *BH3*: en agonistes de mort (p. ex.: Bax, Bak) permeten l'heterodimerització amb el Bcl-X_L i el Bcl-2 per promoure la PCD; *BH4*: conservat en els antagonistes de la PCD (p. ex.: Bcl-X_L) però absent en els agonistes de la PCD (excepte en el Bcl-X_S), aquest domini permet la interacció amb proteïnes reguladores de mort com el Raf-1, Bad i potser el Ced-4.

Les proteïnes antiapoptòtiques, entre elles la codificada pel *bcl-x_L*, semblen realitzar la seva funció inhibidora de la PCD mitjançant la unió a adaptadors necessaris per a l'activació de les proteases anomenades Caspases, encara que l'extensa bibliografia que hi ha al respecte sovint es contradiu (Fussenegger i Bailey, 1998; Rossé et al., 1998; Newmeyer et al., 2000). Per contra, les proteïnes proapoptòtiques, entre altres les codificades pel *bax* i el *bak*, efectuen la seva funció mitjançant la competició amb els adaptadors activadors de les Caspases per la unió amb les proteïnes antiapoptòtiques amb les que finalment heterodimeritzen, desplaçant els factors necessaris per a l'activació de la via proteolítica. En l'heterodimerització d'aquestes proteïnes amb les proteïnes inhhidores de l'apoptosi, hi participa el domini BH3, que és comú en totes les molècules proapoptòtiques i que adopta una conformació que permet la seva interacció amb el solc estructural format pels dominis BH1, BH2 i BH3 de les antiapoptòtiques (Chittenden et al., 1995a, b; Kiefer et al., 1995).

Per al millor coneixement a nivell molecular dels gens relacionats amb l'apoptosi expressats en l'hibridoma KB26.5, s'han identificat i aïllat els següents membres de la família del Bcl-2: els proapoptòtics *bax* i *bak*; i els antiapoptòtics, *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w* i *mcl-1*.

3.4. Identificació de l'expressió de membres de la família del *bcl-2*

La detecció dels gens expressats durant el procés de mort en els cultius d'hibridomes on s'ha exhaurit la glutamina, és imprescindible per identificar possibles dianes a considerar en el disseny d'estratègies d'inhibició genètica de l'apoptosi en aquest tipus de cèl·lules. La transcripció d'aquests gens implicats en un punt de la regulació del programa de mort, on la cèl·lula ha de decidir el seu destí, s'ha estudiat mitjançant tècniques de RT-PCR, que permeten la detecció altament sensitiva de mRNA específics a partir de mostres de RNA extret de la pròpia línia cel·lular estudiada, amb el propòsit de clonar els cDNA corresponents als gens protectors en vectors d'expressió eucariotes i, posteriorment, decidir quins són els millors candidats per modificar la seva expressió amb la finalitat de bloquejar la PCD de l'hibridoma KB26.5.

Per dur a terme aquest estudi, s'ha extret RNA total de l'hibridoma a partir de cèl·lules d'un cultiu en discontinu en la fase de màxima densitat cel·lular ($1 \cdot 10^6$ cèl·lules·mL⁻¹) en medi DMEM al 2% de FCS. A més a més, en alguns casos, la disponibilitat d'anticossos dirigits contra els productes gènics d'algun dels membres de la família del *bcl-2*, ha permès fer ús de la tècnica de transferència *Western* per a la detecció de la proteïna en cèl·lules cultivades en condicions inductores i no inductores de l'apoptosi.

3.4.1. *bcl-2*

Tal i com s'ha explicat, el Bcl-2, de 236 aa, prolonga la supervivència de cèl·lules hematopoètiques en absència dels factors de creixement requerits o bé en presència de gran varietat d'estímuls inductors de la mort cel·lular (revisats per Kroemer, 1997). El Bcl-2 bloqueja l'apoptosi perquè interfereix en l'activació de les Caspases prevenint l'alliberament del Citocrom c de mitocondri, encara que també podria actuar en una ruta antioxidant per la prevenció de l'apoptosi en punts de generació de radicals lliures, com són els mateixos mitocondris (Reed et al., 1996).

Si bé en humans el *bcl-2* presenta múltiples mRNA codificant a diferents isoformes proteïques amb dominis transmembrana, localitzades en la membrana mitocondrial, en el cas dels murins, s'ha confirmat l'existència de dues espècies de mRNA a partir d'un gen compost de dos exons separats per més de 15 kb. Els dos mRNA productes del processament alternatiu del transcrit primari són de 7.5 kb i 2.4 kb (aquest darrer deriva només de l'exó 5'), i codifiquen, respectivament, per a dues proteïnes que es diferencien en l'extrem C-terminal: isoforma α , de

236 aa; i isoforma β , de 199 aa (Massimo et al., 1987). La primera d'elles s'expressa en totes les línies cel·lulars derivades de limfòcits testades, però no en tots els hibridomes (Mercille i Massie, 1994). Éssent aquest el nostre cas, es va procedir a estudiar-ne la transcripció i esbrinar si l'hibridoma KB26.5 expressava o no aquest gen. Després de provar un gran nombre de condicions diferents, únicament es va aconseguir amplificar el cDNA addicionant DMSO 10% (v/v) a la mescla de reacció, degut a l'elevat %GC de la seva seqüència. Els resultats es mostren a la Figura 3.6A. A més a més, la disponibilitat d'un anticòs dirigit contra el producte gènic ha permès realitzar la detecció de la proteïna per *Western* en cèl·lules cultivades en diferents condicions (Figura 3.6B).

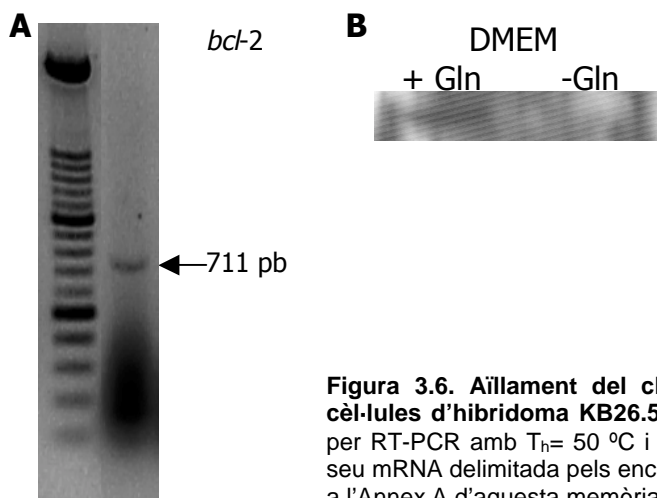


Figura 3.6. Aïllament del cDNA i determinació de l'expressió del *bcl-2* en cèl·lules d'hibridoma KB26.5. A. Banda corresponent al cDNA del *bcl-2* (obtingut per RT-PCR amb $T_H = 50\text{ }^\circ\text{C}$ i 10% DMSO). La seqüència de la zona codificant del seu mRNA delimitada pels encebadors dissenyats per a la seva amplificació es troba a l'Annex A d'aquesta memòria; B. Banda de 28 kDa corresponent al Bcl-2.

Els resultats obtinguts per *Western* (Figura 3.6B) indiquen la presència de Bcl-2 en cèl·lules cultivades en medi complet, on no es dona la inducció de l'apoptosi. En canvi, en les mostres obtingudes a partir de cèl·lules cultivades en condicions de manca de glutamina, no s'observa cap banda. Aquest fet pot explicar-se per la proteòlisi específica del Bcl-2 en el residu Asp³⁴ deguda a la Caspasa 3, perdent d'aquesta forma la capacitat protectora de l'apoptosi i alliberant en aquest procés dos fragments, un dels quals és inductor de la PCD ja que promou l'alliberament del Citocrom c de mitocondri (Kirsch et al., 1999). D'aquesta manera, es dona una retroalimentació positiva una vegada iniciada la PCD, gràcies a la inversió de l'activitat protectora de l'apoptosi del Bcl-2, per passar a promoure-la (Tanaka et al., 1992; Cheng et al., 1997a).

Els estudis basats en la sobreexpressió del Bcl-2 en cèl·lules d'hibridoma van començar amb el treball de Itoh et al., 1995. A partir d'aquell moment, s'ha publicat un gran nombre de treballs al respecte que suggereixen aquest gen com a bon candidat a ser sobreexpressat en l'hibridoma

KB26.5 (entre d'altres, els de: Simpson et al., 1997; Fassnacht et al., 1998 i 1999; Perani et al., 1998; Terada et al., 1999; Mastrangelo et al., 2000a i b). D'altra banda, cada cop hi ha més treballs que especulen sobre si la funció antiapoptòtica del Bcl-2 podria dependre més del seu estat de fosforilació que no pas dels nivells d'expressió (Srivastava et al., 1998; Chadebech et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Yokote et al., 2000; Breitschopf et al., 2000). Això ens ha portat a plantejar la possibilitat de crear mutants que no continguin els llocs de fosforilació, Ser⁷⁰ i Ser⁸⁷, responsables de l'activitat protectora del Bcl-2. En el Capítol 5, es mostraran els efectes de la sobreexpressió del Bcl-2 i els seus mutants en l'hibridoma KB26.5 en condicions de manca de glutamina.

3.4.2. *bcl-x_L*

El Bcl-X és un regulador dominant de la mort cel·lular per apoptosi. La forma llarga, anomenada Bcl-X_L i de 233 aa, mostra activitat repressora de la mort cel·lular, mentre que la isoforma curta, anomenada Bcl-X_S, promou l'apoptosi.

El mRNA aïllat en les mostres de RNA total extretes de la línia cel·lular estudiada en aquest treball correspon al transcrit de major longitud format en el processament alternatiu del transcrit primari del gen murí *bcl-x*. Aquest s'expressa de forma diferencial al llarg el desenvolupament de l'organisme i, per tant, és imprescindible durant aquest procés (Gonzalez-Garcia, 1994). L'altra forma de mRNA formada per processament alternatiu del transcrit primari s'anomena *bcl-x_S* i la seva longitud és menor. Donada la diferència que existeix en la funció d'aquestes dues proteïnes, el treball dut a terme s'ha centrat en l'aïllament del *bcl-x_L*, i no del *bcl-x_S*.

El Bcl-X_L opera en l'apoptosi per davant de l'activació de la Caspasa 9 (Lindenboim et al., 1998) i regula la supervivència cel·lular almenys per dos mecanismes diferents: l'un és associat amb l'heterodimerització i l'altre amb la capacitat de formar canals d'ions (Minn et al., 1999). Tant el Bcl-X_L com el Bcl-2 eviten l'alliberament del Citocrom c de mitocondris però no interaccionen a nivell d'apoptosoma, és a dir, no inhibeixen la funció de l'Apaf-1 (Newmeyer et al., 2000). La seva funció antiapoptòtica s'ha confirmat en estudis realitzats en gran varietat de línies cel·lulars, inclosos els hibridomes. En aquests darrers s'han obtingut resultats positius a l'aconseguir perllongar la vida de cultius en discontinu en transfectar el gen del *bcl-x_L* i sota estímuls apoptòtics diferents (Decaudin et al., 1997; Charbonneau i Gauthier, 2000; Mastrangelo et al., 2000a i b). El Bcl-X_L és doncs, a l'igual que el Bcl-2, un bon candidat a ser sobreexpressat en hibridomes i estudiar el seu possible paper en l'endarreriment de l'apoptosi induïda per

exhauriment de nutrients. No obstant això, cal considerar que, com també passava amb el Bcl-2, el Bcl-X_L és diana de les Caspases, que el proteolitzen tot alliberant una regió d'aquesta proteïna que lluny de tenir una funció antiapoptòtica, la promou (Clem et al., 1998).

El producte de RT-PCR obtingut es mostra a la Figura 3.7A. En l'Annex A, es troba la seqüència del corresponent mRNA i la zona amplificada delimitada pels encebadors dissenyats. Observi's també, en la Figura 3.7B, que la proteïna s'expressa tant en cèl·lules que s'han cultivat en medis complets com en medis mancats de glutamina. En canvi, les cèl·lules cultivades en aquestes últimes condicions moren per apoptosi i l'expressió del Bcl-X_L. Aquest fet posa de manifest la importància de l'equilibri entre les concentracions de proteïnes protectores de l'apoptosi respecte de les inductores.

Així, la inducció de l'expressió de membres proapoptòtics com el Bax en condicions inductores de la PCD provoquen un excés d'aquesta proteïna al mitocondri, conduint a la formació d'homodímers Bax-Bax sense que hi hagi la possibilitat d'evitar-ho degut al relativament baix nombre de molècules de Bcl-X_L. Això provoca, com s'ha explicat anteriorment, l'alliberament del Citocrom c de mitocondri i a l'activació de la cascada de les Caspases.

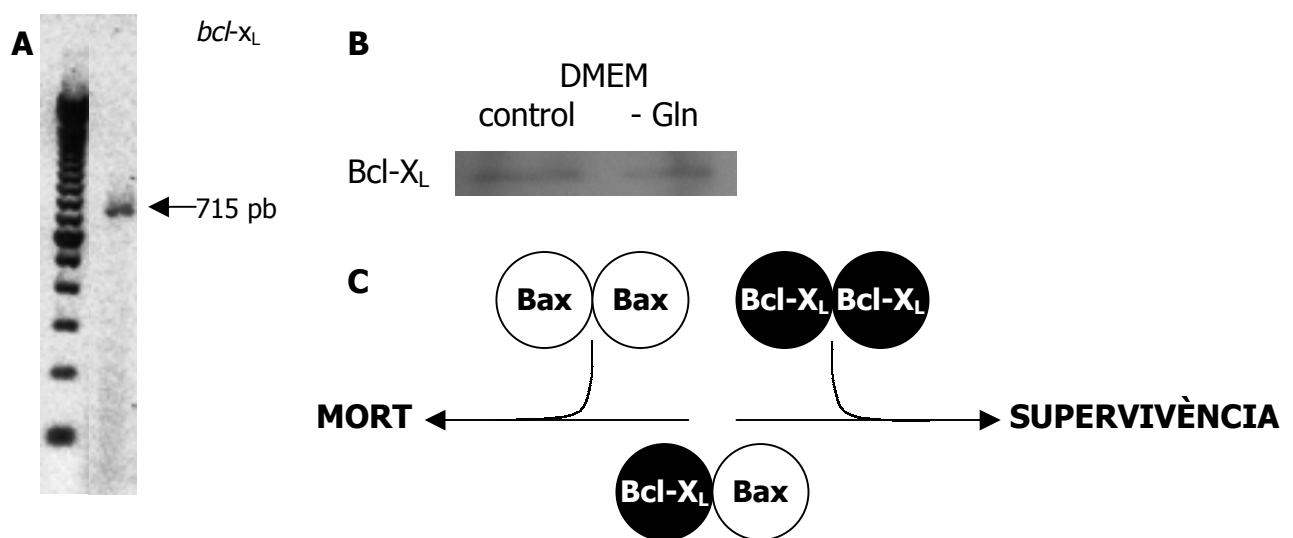


Figura 3.7. Aïllament per RT-PCR del cDNA del *bcl-x_L* a partir d'una mostra de RNA total de l'hibridoma KB26.5 i detecció de la proteïna sota diferents condicions de cultiu. A. Banda de 715 pb corresponent al cDNA del *bcl-x_L*, al costat del marcador de 100 pb (les condicions de l'amplificació per RT-PCR han estat T_n= 50-59 °C). La seqüència de la zona codificant del seu mRNA delimitada pels encebadors dissenyats per a la seva amplifcació es troba a l'Annex A d'aquesta memòria; B. Resultats obtinguts per *Western* de l'expressió d'aquest gen en cultius amb i sense glutamina al medi. En ambdós casos s'observa expressió del gen; C. La dimerització de membres pro- i antiapoptòtics de la família del Bcl-2 regula la decisió de procedir amb la PCD. Els homodímers de Bcl-X_L són requerits per suprimir activament la PCD o per promoure activament la supervivència. Així l'heterodimerització Bcl-X_L/Bax promou PCD; els homodímers Bax són requerits per promoure activament la PCD o inhibir activament la supervivència.

La sensibilitat d'una cèl·lula a engegar el programa de mort per apoptosi quan és cultivada en bioreactors depèn dels nivells d'expressió de gens que poden o bé incrementar la resistència o bé la susceptibilitat a la mort per apoptosi (Al-Rubeai i Singh, 1998). A la Figura 3.7C, es mostra com les concentracions dels diferents membres de la família del Bcl-2, protectors i promotors de l'apoptosi, mitjançant dimerització, provoquen un desplaçament de l'equilibri cap a la supervivència de les cèl·lules, o bé cap a la seva mort.

3.4.3. *bax*

El mRNA d'aquest gen codifica per a una proteïna transmembrana, de 192 aa (Schmitt, 1998), que està implicada en la regulació de l'apoptosi en diferents tipus d'activació on els canvis que es donen en el mitocondri tenen un paper decisiu en l'execució de la mort cel·lular programada, ja que indueix l'alliberament del Citocrom c, l'activació de la Caspasa 3 i, per tant, l'apoptosi (Oltvai, 1998). El Bax accelera la PCD heterodimeritzant amb el Bcl-2, el Bcl-X_L o el seu homòleg viral E1B 19K, i antagonitzant així els efectes d'aquests repressors de l'apoptosi. De fet, el Bax fou la primera proteïna identificada que immunoprecipitava amb el Bcl-2 (Oltvai et al., 1998).

Sembla ser que el Bax es transloca del citoplasma al mitocondri per alliberar agonistes de la PCD (Porter, 1999). L'ancorament al mitocondri és degut a un canvi conformacional que desplaça l'hèlix C-terminal de la butxaca d'unió BH3, permetent que aquesta hèlix interaccioni amb la membrana mitocondrial i promogui la formació de dímers. Així, l'hèlix C-terminal del Bax ofereix un mecanisme autoinhibitori que evita tant l'exposició de la butxaca d'unió BH3 com l'ancoratge mitocondrial previ a l'apoptosi (Suzuki et al., 2000).

En aquest treball, s'ha considerat important conèixer si aquest gen era expressat en l'hibridoma donat el seu paper clau en molts càncers, en els quals la seva acció queda anul·lada per insercions en el seu gen que provoquen un desplaçament de la pauta de lectura de manera que les cèl·lules, com a resultat de la manca de Bax funcional, proliferen de forma descontrolada (Ionov et al., 2000). A més a més, els nivells de transcripció d'aquest gen són regulats per la p53, proteïna clau en la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi (Sturm et al., 1999). Per això, s'ha identificat la transcripció del gen per tècniques de RT-PCR. A la Figura 3.8., es mostren els resultats obtinguts.

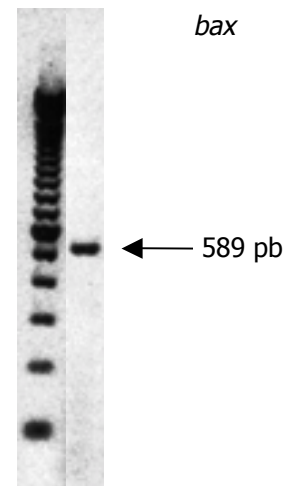


Figura 3.8. Aïllament del cDNA del *bax* per RT-PCR a partir de RNA total de l'hibridoma KB26.5. El *bax* va ser obtingut a $T_h=56-59$ °C. La seqüència de la zona codificant del seu mRNA delimitada pels encebadors dissenyats per a la seva amplificació es detalla a l'Annexe A d'aquesta memòria.

3.4.4. *bak*

El *bak* murí és un gen proapoptòtic compost de sis exons, que codifica per una proteïna de 208 aa, potent inductora de l'apoptosi (Ulrich et al., 1997; Herberg et al., 1998).

El Bak només té tres dels quatre dominis que conté el Bcl-2 (BH1-3, però no el BH4) i, com s'ha dit, en presència d'un estímul apropiat, accelera la PCD unint-se als repressors Bcl-2, Bcl-X_L o el seu homòleg adenovíric E1B 19K. Això és degut al seu domini BH3, que està involucrat tant en la funció promotora de l'apoptosi com en la capacitat d'unir-se a d'altres proteïnes.

A l'igual que en el cas del *bax*, en aquest treball s'ha volgut examinar l'expressió d'aquest gen en les cèl·lules d'hibridoma donada la seva importància en el procés de regulació de la PCD. A la Figura 3.9., es troben els resultats de l'aïllament del cDNA per RT-PCR.

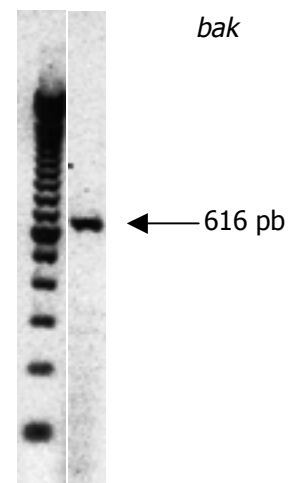


Figura 3.9. Aïllament per RT-PCR del cDNA del gen *bak* a partir de RNA total de l'hibridoma KB26.5. Les condicions emprades foren $T_h=50-59$ °C. La seqüència de la zona codificant del seu mRNA delimitada pels encebadors dissenyats per a la seva amplificació es detalla a l'Annexe A d'aquesta memòria.

3.4.5. *bcl-w*

El producte gènic del *bcl-w*, de 193 aa, permet mantenir la viabilitat cel·lular mitjançant la prevenció de l'activació de les Caspases. Hi ha evidències del seu requeriment en

l'espermatogènesi de ratolins i en la supervivència de cèl·lules epitelials malmeses a l'intestí. El *Bcl-w* sembla jugar també un paper important en la carcinogènesi de còlon (O'Reilly et al., 2001). Participa en la regulació de l'apoptosi mitjançant la unió als factors proapoptòtics Bax i Bak (Yan et al., 2000).

En el nostre cas, es va voler identificar la seva expressió en l'hibridoma KB26.5 i disposar del cDNA per al seu possible ús en estratègies d'inhibició genètica de l'apoptosi en base a la sobreexpressió de gens protectors. A la Figura 3.10., es mostra la banda obtinguda en les reaccions de RT-PCR a partir de mostres de RNA total de la línia cel·lular estudiada.

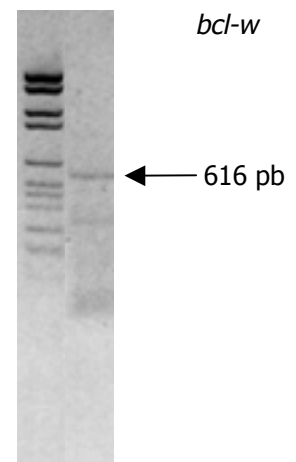


Figura 3.10. cDNA corresponent al *bcl-w*, aïllat per RT-PCR a partir de RNA total de l'hibridoma KB26.5. Les condicions emprades per a la seva amplificació foren $T_H=50$ °C. La seqüència de la zona codificant del seu mRNA delimitada pels encebadors dissenyats per a la seva amplificació es detalla a l'Annexe A d'aquesta memòria.

3.4.6. *mcl-1*

El *mcl-1* va ser identificat en estudis d'expressió diferencial de gens en una línia cel·lular de leucèmia monocítica, ML-1 (Kozopas et al., 1993; Okita et al., 1998).

Aquest gen és àmpliament expressat en teixits humans i murins i en moltes línies cel·lulars, així com en molts tumors humans.

La proteïna, de 331 aa, conté quatre dominis homòlegs als del Bcl-2 (BH1-4) i es localitza en membranes intracel·lulars, particularment a la mitocondrial. Està involucrada en la diferenciació cel·lular i el manteniment de la viabilitat, i ha mostrat tenir efecte en la protecció de l'apoptosi en algunes línies cel·lulars, però sembla que el seu efecte no és tan intens com la sobreexpressió del Bcl-2 i, a més a més, no té efecte en alguns sistemes en els quals el Bcl-2 ha mostrat ser un bon protector (Reynolds et al., 1994 i 1996; Bodrug et al., 1995; Zhou et al., 1997). No obstant això, en el nostre cas, la seva identificació ens permet determinar si juga algun paper important en l'hibridoma. En la Figura 3.11., es mostra la banda obtinguda per tècniques de RT-PCR.

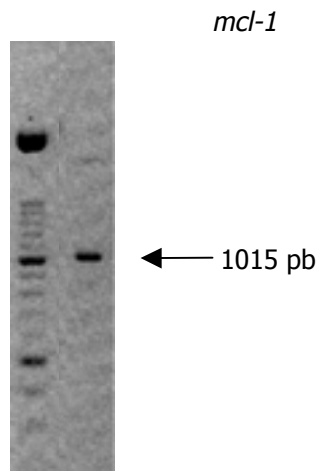


Figura 3.11. cDNA del *mcl-1* obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA total de l'hibridoma KB26.5. Les condicions d'amplificació del *mcl-1* foren $T_h=50$ °C. La seqüència de la zona codificant del seu mRNA delimitada pels encebadors dissenyats per a la seva amplificació es detalla a l'Annex A d'aquesta memòria.

3.4.7. Valoració dels resultats obtinguts en la identificació de gens de la família del Bcl-2 en l'hibridoma KB26.5

En aquesta part del treball, s'ha demostrat mitjançant l'ús combinat de tècniques de RT-PCR i de transferència *Western*, l'existència de mRNAs de membres pro- i antiapoptòtics de la família del Bcl-2 i de les seves proteïnes en l'hibridoma KB26.5.

Com a resultat destacable es vol fer esment de la detecció de degradació del Bcl-2 en condicions de cultiu amb manca de glutamina, fet descrit per primera vegada pel grup de la Dra. Hardwick (Kirsch et al., 1999). En base a aquest resultat es planteja la possibilitat de sobreexpressar gens homòlegs al Bcl-2 que no continguin dianes per a les Caspases o bé la creació de mutants D34A (veure Capítol 5).

Bo i la presència de gens protectors de l'apoptosi, com són el Bcl-2, el Bcl-X_L, el Bcl-w i el Mcl-1, els hibridomes pateixen un descens de la viabilitat molt marcat quan són cultivats en condicions inductores de l'apoptosi (com és l'absència de glutamina al medi). Això ens fa pensar que la inducció per manca de nutrients essencials condueix al desplaçament de l'equilibri existent entre els senyals de vida i de mort intracel·lulars cap a l'activació de la via intrínseca de la PCD, que es caracteritza per l'alliberament del Citocrom c de mitocondri i la immediata activació de la ruta de les Caspases mitjançant l'acció de l'apoptosoma.

A continuació, es presenten els resultats obtinguts en l'estudi del paper dels membres de la família de les Caspases en l'apoptosi induïda per manca de nutrients en cèl·lules d'hibridoma.