

3.5. Les Caspases: proteases responsables de la fase efectora de la PCD

Tal i com s'ha explicat en la introducció d'aquesta memòria, els treballs previs de Gabernet, 1999, i Tintó, 1999, han establert que els canvis que es donen en condicions de manca de glutamina conflueixen en l'activació de forma regulada d'una via transductora del senyal apoptòtic i efectora de la PCD.

Les peces clau d'aquesta via transductora i d'execució de la PCD són unes proteïnes anomenades Caspases, caracteritzades el 1992, moment a partir del qual van començar a publicar-se una enorme quantitat de treballs que ens permet avui dia veure que aquestes molècules conformen una maquinària executora de la PCD comuna i altament conservada en tots els sistemes (Stennicke i Salvesen, 1998 i 2000). Del seu nom, la 'c' reflecteix la implicació d'un residu aminoacídic cisteïna en el mecanisme catalític, i '*aspase*' es refereix a la seva habilitat de tallar després d'un aspàrtic (Al-Rubeai i Singh, 1998; Green i Reed, 1998; Thornberry et al., 1998).

La hidròlisi d'un enllaç peptídic és una simple però poderosa forma d'alterar l'activitat d'una proteïna. No és doncs sorprenent que les proteases, els enzims que catalitzen el tall dels enllaços peptídics, siguin emprades per modificar l'activitat en nombrosos contextos biològics. Així, si bé les menys específiques serveixen per a la degradació de proteïnes en múltiples llocs durant la hidròlisi proteica i el metabolisme, amb l'adquisició d'una major especificitat al llarg de l'evolució, existeixen proteases que són utilitzades en els mecanismes cel·lulars de regulació per realitzar alteracions molt més subtils de proteïnes amb l'objectiu de modificar-ne l'activitat enzimàtica enlloc de destruir-la (Slee et al., 2001). En el context de la mort cel·lular, les proteases participen en moltes de les seves fases: com a inductors del programa de mort, com a elements regulatoris intrínsecs, i com a conjunt d'elements reguladors de la maquinària per si mateixa.

Aquesta capacitat hidrolítica de les proteases ha de ser curosament controlada per minimitzar els danys a d'altres proteïnes diferents de les seves dianes. Per aquest motiu, l'activitat de les proteases és normalment silenciada en les cèl·lules fins que la seva inducció sigui requerida. Això és usualment assolit per dues vies diferents:

- moltes proteases són sintetitzades com a pro-enzims (zimògens) que requereixen l'eliminació del pro-peptid per hidròlisi controlada. Les Caspases poden ser tallades per elles mateixes o per altres Caspases.
- les cèl·lules típicament sintetitzen proteïnes que poden complexar-se amb les proteases i inhibir les seves activitats (inhibidors de proteases).

Ambdues estratègies són utilitzades en el control de les proteases relacionades amb la mort cel·lular i donen lloc a diferents formes d'actuació per controlar-ne l'activació en l'hibridoma. D'altra banda, també existeixen les *pseudocaspases*, que han emergit per duplicació gènica tot perdent la seva activitat enzimàtica. Així, conserven la capacitat d'agregar-se amb d'altres Caspases actives i competir amb elles de manera que es dona una inhibició competitiva dominant negativa (Imler et al., 1997).

Les Caspases són responsables de la propagació del senyal apoptòtic i dels canvis morfològics que es produeixen en cèl·lules on aquest procés està activat, encara que, si bé actualment no es disposa de molta informació al respecte, recentment Joza et al., 2001, han descrit l'evidència d'un mecanisme alternatiu pel qual les cèl·lules moren per apoptosi sense que la ruta de les Caspases estigui activada. En el seu treball, mostren que un factor de localització mitocondrial prèviament anomenat AIF induïx la PCD en cèl·lules de mamífer de forma independent a les cisteïna-proteases, i que aquesta ruta apoptòtica és estrictament requerida en el desenvolupament primerenc en ratolí.

Les Caspases existeixen com a zimògens, amb un prodomini i unes subunitats catalítiques el tamany de les quals ha estat utilitzat per a la seva classificació en subfamílies (Alnemri et al., 1996; Cohen et al., 1997; Nicholson, 1999). A la Figura 3.12A es mostra l'anàlisi filogenètica dels membres de la família de les Caspases. L'activació de les procaspases es dona tal i com s'indica a la Figura 3.12B, és a dir, a partir del processat acurat en residus Asp interns que permeten l'alliberament del prodomini i generar així dues cadenes peptídiques que formen l'enzim actiu (Stennicke i Salvesen, 1998).

Aquestes proteïnes són expressades constitutivament per la pròpia cèl·lula, i són activades en determinades condicions en les quals passen a jugar un paper actiu en l'evolució dels canvis morfològics que condueixen a la mort cel·lular (entre d'altres revisions, les de: Bailey, 1998;

Thornberry i Labzebnik, 1999). El paper actiu d'aquestes proteases produïdes per la pròpia cèl·lula en l'apoptosi justifica el fet que molts cops es consideri aquest procés com un *suïcidi cel·lular*.

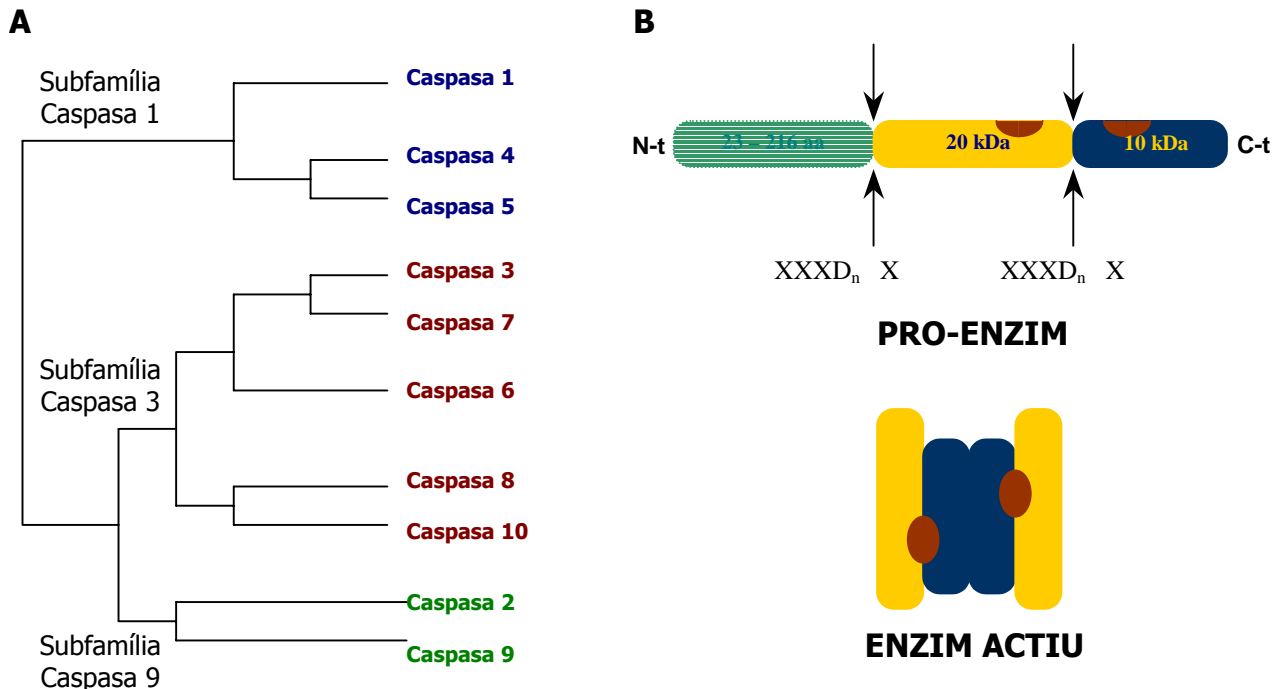


Figura 3.12. Les Caspases. A. Anàlisi filogenètica de les Caspases humanes (Alnemri *et al.*, 1996). En la subfamília de la Caspasa 1 s'hi inclou la Caspasa 1 (també anomenada Ice), la Caspasa 4 i la Caspasa 5. A la subfamília de la Caspasa 3 hi pertanyen la Caspasa 3 (Ccp32), la Caspasa 6 (Mch-2), la Caspasa 7 (Mch3), la Caspasa 8 (Mch5) i la Caspasa 10 (Mch4). Finalment en la subfamília de la Caspasa 9 (d'homòlegs d'Ice i Ced3) s'hi agrupen la Caspasa 2 i la Caspasa 9 (Mch6). Noti's que les Caspases 4, 5, 10 i 13 no tenen homòlegs en murins (Nicholson, 1999). B. Estructura del precursor de les Caspases i esquema de l'estructura que presenta la forma activa, producte del trencament proteolític del proenzim. El domini N-terminal de la forma precursora és molt variable entre les diferents Caspases. La seva funció reguladora en l'activació d'aquests enzims n'indica la importància en el procés d'apoptosi. Les diferents dianes de tall que es produeixen durant el procés proteolític del pro-enzim per formar la unitat enzimàtica activa estan assenyalades, cal destacar el residu Asp altament conservat en tots els casos, adjacent al punt de tall.

En el treball que es presenta en aquesta memòria, s'ha volgut conèixer el paper d'aquestes proteases en la PCD de l'hibridoma KB26.5 activada per eliminació de nutrients. La seva identificació hauria de permetre el disseny d'estratègies genètiques dirigides a inhibir l'acció d'aquelles Caspases que juguen un paper clau en el desenvolupament del procés de mort per apoptosi en l'hibridoma. Es vol conèixer a quin nivell es troba *el punt de no retorn* en la cascada apoptòtica. És a dir, a partir de quin moment, una cèl·lula que ha rebut el senyal de mort, deixa enrera la part del procés on encara és possible fer-lo reversible i decideix, finalment, morir.

La hipòtesi que es planteja aquí és que aquest punt es troba a nivell de les proteïnes iniciadores de la cascada proteolítica de les Caspases.

		Funció	Motiu reconegut	Localització i especificitat
I	Caspasa 1	transductora executora inflamatòria	WEHD	<ul style="list-style-type: none"> • Implicada en l'apoptosi per lligands del receptor CD95 (Fas) en timòcits • Intervé en el procés de maduració de la interleuquina-1-β. Substrat: Pro-IL-1β
	Caspasa 14	executora	?	<ul style="list-style-type: none"> • Implicada en la diferenciació terminal dels keratinòcits • La seva acció és inhibida per les IAP i la P35
II	Caspasa 2	transductora	DEHD	<ul style="list-style-type: none"> • Localitzada en el mitocondri, actua com a transmissora del senyal apoptòtic via mitocondri.
	Caspasa 3	executora	DEVD	<ul style="list-style-type: none"> • Caspasa executora del procés de la PCD, reponsible entre altres del processament proteolític de substrats com ara l'enzim nuclear PARP (<i>poly-ADP-ribose polimerase</i>) i la DNA-PK ambdós implicats en activitats reparadores de DNA • PKC δ, processada proteolíticament per la Caspasa 3 per a formar una subunitat associada. La sobreproducció d'aquest fragment de la PKC δ s'ha associat amb la condensació de la cromatina i la fragmentació nuclear, característiques fenotípiques de la mort cel·lular programada • Implicada també en el processament de la PAK2 (<i>p21-activated kinase</i>) que participa en la regulació del citoesquelet i la Mdm2 proteïna clau en la regulació del cicle cel·lular
	Caspasa 7	executora	DEVD	<ul style="list-style-type: none"> • Aquesta proteasa comparteix una elevada similitud amb la Caspasa 3 i a l'igual que aquesta mostra una preferència en el reconeixement i processament de l'enzim PARP
III	Caspasa 6	executora	VEHD	<ul style="list-style-type: none"> • Processa la proteïna Laminina A, essencial per al manteniment de l'embolcall nuclear
	Caspasa 8	iniciadora	LETD	<ul style="list-style-type: none"> • Intervé en l'activació de l'apoptosis via receptors de membrana CD95 i TNF-R1. La seva associació amb el cofactor FADD (<i>Fas-associated protein with death domain</i>) a través del domini DED (<i>death effector domain</i>) inicia la cascada de propagació del senyal apoptòtic que finalitza amb la mort cel·lular
	Caspasa 9	iniciadora	LEHD	<ul style="list-style-type: none"> • La seva associació amb el cofactor APAF-1 a través del domini CARD (<i>CAspase Recruitment Domain</i>) i l'alliberament del Citocrom c del mitocondri a citosol produeix la seva activació i propagació del senyal apoptòtic a la resta de les Caspases

Taula 3.2. Característiques de l'activitat enzimàtica de les principals Caspases homòlogues en humans i murins. Les Caspases són proteïnes amb activitat proteolítica, altament conservades en seqüència, estructura i especificitat de substrat, aquesta especificitat és determinada pel reconeixement d'un tetrapèptid en l'N-terminal respecte la diana de tall, éssent imprescindible la presència d'un residu aspàtic en la posició P₁ de la seqüència reconeguda (Nicholson, 1999 i 2000). La diversitat de substrats processats per les Caspases s'explica pel fet que la seqüència del tetrapèptid reconeguda varia d'una proteasa a l'altra, fins i tot la presència de la seqüència òptima de reconeixement per una Caspasa específica en una proteïna no implica necessàriament el processament per l'enzim, cosa que indica que l'estructura terciària del substrat també influeix en aquest reconeixement. Totes són sintetitzades en forma de proenzim, el polipèptid que correspon a l'enzim inactiu (pot tenir entre 30-50 kDa) comprèn un domini N-terminal (prodromini) i dos pèptids de diferent longitud (de 10 i 20 kDa) alliberats durant la formació de la unitat activa a partir del proenzim, per a associar-se i formar un heterodímer (Raff, 1998; Thornberry i Lazebnik, 1998). Estudis cristal·logràfics de l'estructura que presenta la forma activa indiquen que en general es dona una associació dels heterodímers per a formar un heterotetràmer, $\alpha_2\beta_2$, que conté dos centres catalítics funcionant independentment l'un de l'altre i en els quals hi participen residus aminoacídics d'ambdues subunitats (la gran i la petita). Taula construïda a partir de les dades recollides de Cohen, 1997; Hu et al., 1998; Van de Craen et al., 1998; Budihardjo et al., 1999; Schwartz et al., 1999; Lippens et al., 2000; i Thornberry et al., 2000.

3.6. Identificació de l'expressió de Caspases en l'hibridoma KB26.5

En l'apartat anterior, s'ha explicat que les Caspases són sintetitzades en forma de proenzim inactiu. Actualment, es coneixen 14 Caspases en ratolí i humans que representen almenys 11 enzims diferents. Mentre que les Caspases 1-3, 6-9 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 (Nicholson, 1999).

A la Figura 3.13, es mostra esquemàticament la iniciació de la cascada de les Caspases per la que s'anomena *via intrínseca*, és a dir, aquella que s'inicia a nivell de mitocondri per l'alliberament del Citocrom c, en contraposició de la via extrínseca que és activada pels receptors de membrana.

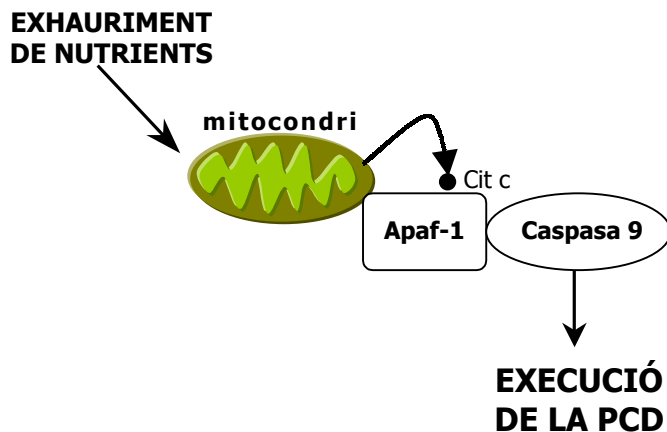


Figura 3.13. Activació de la cascada proteolítica de les Caspases. L'alliberament del Citocrom c de mitocondri a citoplasma permet la formació de l'*apoptosoma*, format pel Citocrom c, l'Apaf-1 i la procaspasa 9. Aquest és el primer pas de la cascada proteolítica de les Caspases que portarà al desmantellament cel·lular.

La transcripció dels proenzims d'algunes de les principals Caspases de les diferents subfamílies s'ha corroborat, a l'igual que per als membres de la família del *bcl-2*, per tècniques de RT-PCR en l'hibridoma KB26.5. En aquest cas, la disponibilitat d'anticossos dirigits contra algunes de les Caspases estudiades ens ha permès determinar, a més, la presència de les seves formes actives i inactives sota diferents condicions de cultiu.

A continuació, es mostren els resultats obtinguts en aquests estudis realitzats amb els membres més representatius de cada família.

3.6.1. Caspasa 1

El seu nom prové de *interleukin β convertase enzyme* (Nett-Fiordalisi et al.,1992) ja que està involucrada en la maduració de la citoquina inactiva pro-IL-1 β , de 31 kDa, en la seva forma activa IL-1 β , de 17 kDa, que és un mediador en processos inflamatoris. La seva activitat va ser identificada el 1989 però la proteïna no fou purificada i caracteritzada fins el 1992, convertint-se així en el primer membre de la família de les Caspases en ser descobert (revisat per Thornberry, 1999). Inicialment, se li va atribuir un paper important en la inducció de l'apoptosi, però estudis realitzats amb ratolins deficients d'aquesta cisteïna-proteasa no semblaven tenir un comportament diferent dels ratolins normals quan se'ls induïa la PCD. Així doncs, bo i el gran nombre de treballs que tracten el seu paper en l'apoptosi, els resultats semblen suggerir que hi ha d'altres Caspases amb major significància en el procés de mort. No obstant això, i degut al gran interès que hi ha avui dia en les empreses farmacèutiques en l'estudi d'aquesta proteïna involucrada en processos inflamatoris, s'ha volgut estudiar la seva expressió en l'hibridoma. A més a més, se sap que durant l'apoptosi la Caspasa 1 es transloca del citoplasma al nucli on podria proteolitzar proteïnes nuclears (Porter, 1999). Així, es va procedir a l'aïllament del seu cDNA per tècniques de RT-PCR, tal i com es mostra a la Figura 3.14.

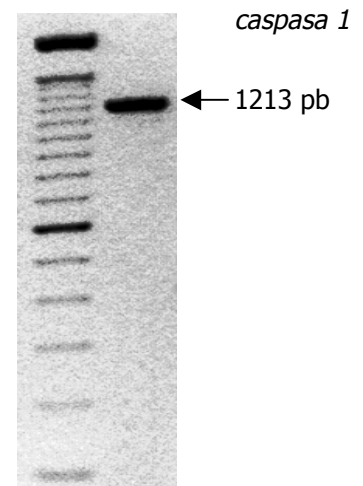


Figura 3.14. Resultats obtinguts en l'aïllament per RT-PCR del cDNA que codifica per la Caspasa 1. Les condicions d'amplificació d'aquest cDNA per RT-PCR han estat: $T_h = 56-59$ °C. La seqüència de la zona codificant del seu mRNA delimitada pels encebadors dissenyats per a la seva amplificació es detalla a l'Annex A d'aquesta memòria.

3.6.2. Caspasa 2

En el desenvolupament embrionari, la Caspasa 2 s'expressa a nivells elevats en diversos teixits, en els quals s'inclou el sistema nerviós central, fetge, ronyó i pulmó. Podria ser que això fos degut a que tant el ronyó com el sistema nerviós central tenen associats elevats nivells de mort cel·lular programada durant el desenvolupament (Cohen, 1997). Se sap que té distribució citoplasmàtica i nuclear i que el seu prodomini permet l'homodomerització (Kumar, 1999; Bialik i Gottlieb, 2000).

A la Figura 3.15, es mostra el cDNA aïllat per RT-PCR i els resultats obtinguts per transferència *Western* en cultius amb presència i en absència de glutamina.

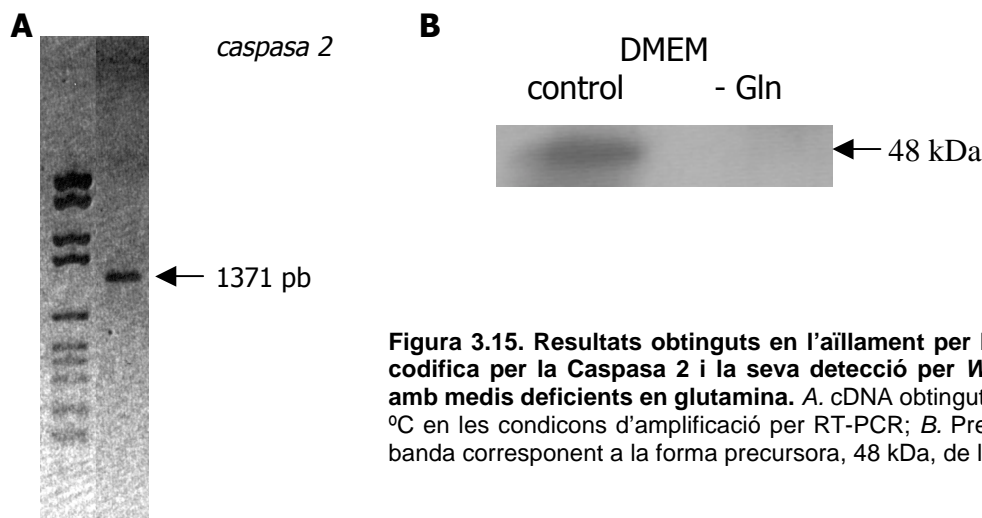


Figura 3.15. Resultats obtinguts en l'aïllament per RT-PCR del cDNA que codifica per la Caspasa 2 i la seva detecció per *Western blot* en cultius amb medis deficientes en glutamina. A. cDNA obtingut utilitzant una $T_f = 56-59$ °C en les condicions d'amplificació per RT-PCR; B. Presència i absència de la banda corresponent a la forma precursora, 48 kDa, de la Caspasa 2.

3.6.3. Caspasa 3

La Caspasa 3 és codificada per un mRNA de 2.6 kb que s'expressa en un gran nombre de teixits i de línies cel·lulars diferents (Kumar, 1997). L'alliberament del Citocrom c del mitocondri en cèl·lules on s'ha induït l'apoptosi sota diferents estímuls (on s'inclouen agents que degraden el DNA, inhibidors de quinases, i activadors de receptors cel·lulars de mort que es troben a la superfície de la membrana cel·lular) condueixen a l'activació de la Caspasa 3.

Sota condicions inductores de l'apoptosi, la Caspasa 3 és translocada de mitocondri a citoplasma, on hidrolitza proteïnes citoplasmàtiques, i de citoplasma a nucli, on digereix proteïnes nuclears (Porter, 1999).

Ratolins que no expressen aquesta Caspasa presenten un nombre de neurones al cervell més elevat del normal, i els seus limfòcits són parcialment resistents a estímuls apoptòtics. Això fa pensar que les Caspases no són únicament responsables de la degradació de substrats cel·lulars a la fase final de l'apoptosi, sinó també reguladors crítics de la fase d'iniciació i de decisió de mort per apoptosi (Strasser et al., 2000).

Donada la importància que se li atribueix a aquesta Caspasa en la bibliografia, es va voler detectar la seva forma activa en condicions inductores de l'apoptosi (Figura 3.16A) i aïllar el seu cDNA en mostres de RNA total de l'hibridoma KB26.5 (Figura 3.16B).

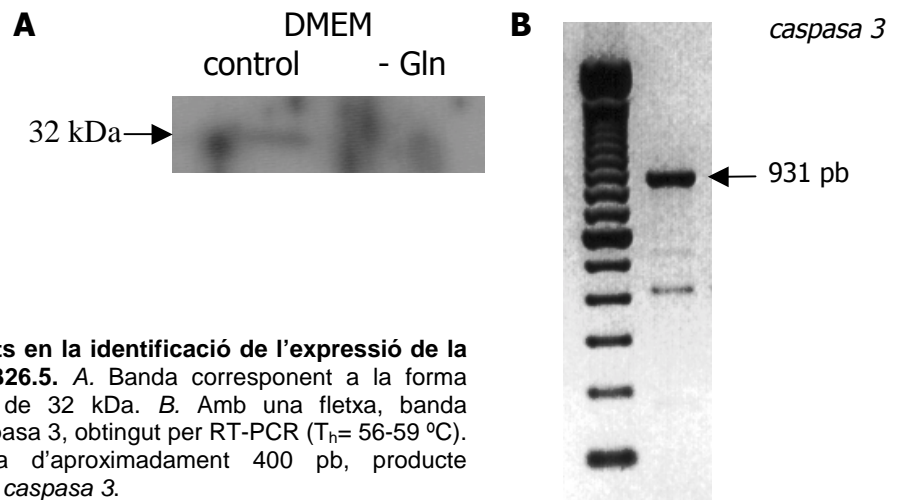


Figura 3.16. Resultats obtinguts en la identificació de l'expressió de la Caspasa 3 en l'hibridoma KB26.5. A. Banda corresponent a la forma precursora de la Caspasa 3, de 32 kDa. B. Amb una fletxa, banda corresponent al cDNA de la Caspasa 3, obtingut per RT-PCR ($T_h = 56-59\text{ }^\circ\text{C}$). S'observa una segona banda d'aproximadament 400 pb, producte inespecífic de l'amplificació de la caspasa 3.

3.6.4. Caspasa-9

Tal i com s'ha mostrat a la Figura 3.13., la procaspasa 9, juntament amb l'Apaf-1 i el Citocrom c, són requerits per a l'activació de la Caspasa 3, encara que també les Caspases 6 i 7 (Budihardjo et al., 1999). Així, la iniciació de l'apoptosi independent de receptors de membrana és endegada per aquest complex activador (Stennicke i Salvesen, 1998).

Igual que la Caspasa 3, la Caspasa 9 es transloca a citoplasma i d'aquí a nucli, per hidrolitzar substrats citoplasmàtics i nuclears, sota condicions apoptòtiques (Porter, 1999). La presència de glutamina evita l'activació de la Caspase-9, entre d'altres involucrades en la via de l'apoptosi, com Bad, Forkhead i IKK α (Ko et al., 2001).

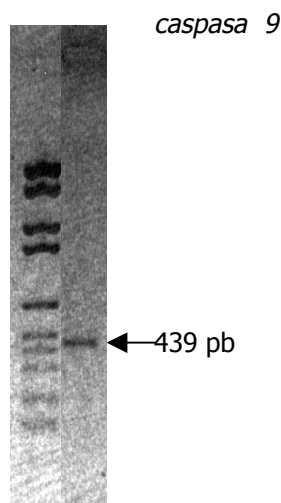


Figura 3.17. Resultats obtinguts en l'aïllament per RT-PCR d'un fragment del cDNA que codifica per a la Caspasa 9. Les condicions d'amplificació de la Caspasa 9 han estat: $T_h = 56-59\text{ }^\circ\text{C}$. Noti's que únicament s'ha amplificat un fragment del cDNA donat que en el moment de dissenyar els encebadors només hi havia una seqüència parcial del mRNA al GenBank. 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.

En l'hibridoma KB26.5, s'ha identificat el mRNA d'aquest gen i s'ha aïllat per tècniques de RT-PCR, tal i com es mostra a la Figura 3.17.

3.7. Estudi del paper de les Caspases en l'apoptosi de l'hibridoma KB26.5

L'ús d'inhibidors peptídics específics permet determinar el paper real de les Caspases en el procés d'apoptosi. Així és com s'han realitzat els estudis dirigits a conèixer la seva importància cabdal en el procés de mort per supressió de glutamina en els cultius d'hibridoma i la possibilitat, no només d'endarrerir la mort tal i com ja s'ha descrit amb l'ús d'aquests inhibidors (McKenna i Cotter, 2000), sinó també demostrar que és possible recuperar els cultius quan es retornen les cèl·lules a unes condicions nutritives originals, com es demostrarà més endavant.

La determinació de la importància de les diferents subfamílies de Caspases en el procés d'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5 es va realitzar amb l'ús d'inhibidors peptídics específics, que tenen una seqüència d'aminoàcids reconeguda únicament per determinades Caspases (vegeu les característiques d'aquests pèptids en la inhibició de les Caspases a la Taula 3.3.). A més a més, disposen d'una modificació química que permet la unió irreversible del pèptid al centre actiu de la Caspasa que el reconeix, induint així la seva inhibició. Els pèptids inhibidors específics de Caspases emprats pels experiments van ser els següents: z-VAD-fmk, N-benzioxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona; Ac-DEVD-cmk, Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehid; z-YVAD-cmk, Acetil-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona. El procediment emprat per dissoldre els pèptids en el medi de cultiu DMEM s'explica amb detall al Capítol de Materials i Mètodes.

Caspasa	Constants d'inhibició (K_i nM)		
	z-VAD-fmk	AC-DEVD-cho	Ac-YVAD-cho
1	2.5	15-18	0.76
2	2400	1710	>10000
3	43	0.23-2.2	>10000
4	130	132	362
5	5.3	205	163
6	98	31	>10000
7	39	1.6	>10000
8	2.5	0.92	352
9	3.0	60	970
10	?	12	408

Taula 3.3. Inhibició de Caspases de mamífers per inhibidors sintètics. Valors de K_i extrets de Ekert et al., 1999.

3.7.1. z-VAD-fmk

En aquest experiment, per estudiar l'efecte del pèptid z-VAD-fmk en l'endarreriment de l'apoptosi induïda per supressió de glutamina, es van preparar els cinc cultius que es mostren a la Taula 3.4 amb diferents concentracions d'inhibidor: cultiu control amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina ni inhibidor; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i z-VAD-fmk 10

µM; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i z-VAD-fmk 50 µM; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i z-VAD-fmk 100 µM. Es van utilitzar 10 mL de cadascun dels medis per a cada cultiu amb un inòcul de 5.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹. També es va preparar un cinquè cultiu amb medi DMEM complet al 2% FCS com a control positiu, que va permetre verificar que l'inòcul creixia normalment en un medi amb tots els nutrients. Els resultats obtinguts per aquest cultiu no han estat inclosos.

cultiu	DMEM	2% FCS	Gln	z-VAD-fmk	
control negatiu	+	+	-	-	
1	+	+	-	10 µM	Taula 3.4. Quadre resum dels experiments realitzats en cultius d'hibridoma KB26.5 en presència de diferents concentracions de l'inhibidor peptídic z-VAD-fmk.
2	+	+	-	50 µM	
3	+	+	-	100 µM	
control positiu	+	+	+	-	

A la Figura 3.18, es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables, el percentatge de cèl·lules Annexina-positives i la fragmentació de DNA en cadascun dels cultius de l'experiment. Es pot observar com els cultius amb concentracions de z-VAD-fmk de 50 i 100 µM van mantenir el nombre de cèl·lules viables fins 36 hores després de l'inici de l'experiment. Per contra, el cultiu amb una concentració de 10 µM presenta un descens de la concentració de cèl·lules viables gairebé tan ràpida com l'experimentada pel cultiu control. Per altra banda, els cultius tractats amb z-VAD-fmk 50 i 100 µM mostren un percentatge de cèl·lules apoptòtiques molt inferior als valors obtinguts en el cultiu control negatiu, tant a les 12 hores (15% i 13%, respectivament) com a les 36 (32% i 30%, respectivament) o, fins i tot, a les 60 hores (88 i 87%, respectivament). El cultiu tractat amb z-VAD-fmk 10 µM també va presentar percentatges de cèl·lules Annexina-positives per sota del control negatiu: 43% a les 12 hores, 73% a les 36 hores, i 95% a les 60 hores, igualant en aquest moment els resultats obtinguts pel control negatiu.

A la Figura 3.18B es mostra en el patró de degradació del DNA extret dels diferents cultius a les 60 hores d'haver iniciat l'experiment. Al primer carril, s'observa com en el cultiu amb z-VAD-fmk a una concentració de 100 µM les cèl·lules tenien encara el DNA essencialment intacte. En el segon carril, el DNA de les cèl·lules del cultiu amb z-VAD-fmk 50 µM presentava una certa degradació. Finalment, tant el cultiu amb una concentració d'inhibidor de 10 µM com

el cultiu control negatiu (carrils 3 i 4, respectivament) presentaven el típic patró en escala del DNA degradat propi de les cèl·lules apoptòtiques.

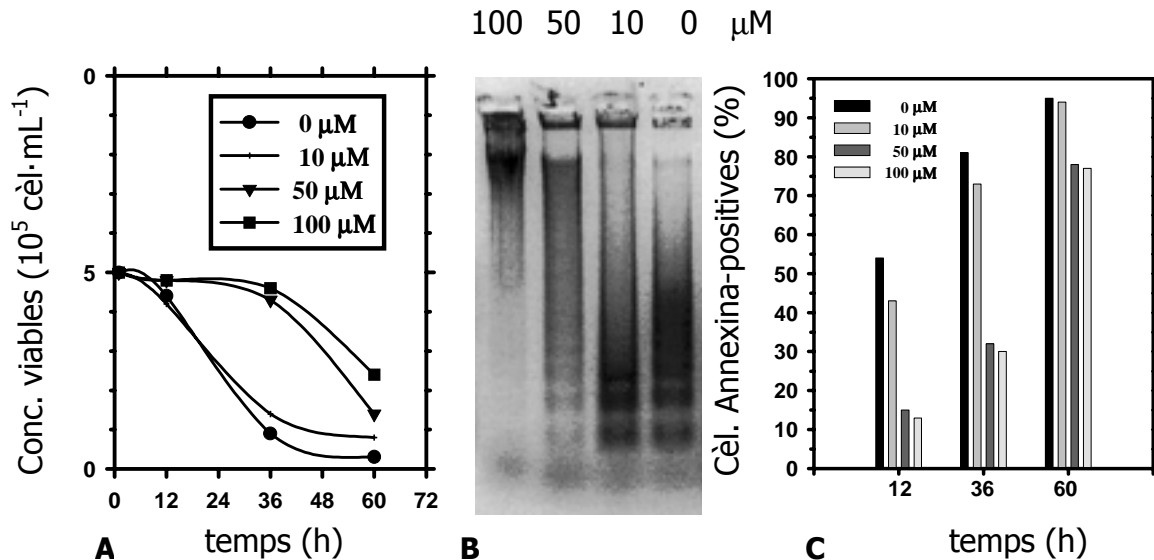


Figura 3.18. Efecte de l'inhibidor z-VAD-fmk en el cultiu en discontinu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5. A. Evolució de la concentració de cèl·lules viables; B. Fragmentació internucleosòmica del DNA a les 60 h; C. Percentatge de cèl·lules que presenten translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtingut per citometria de flux.

A la Figura 3.19., es mostra l'evolució de les diferents morfologies cel·lulars en els quatre cultius. A les 12 hores, el percentatge de cèl·lules apoptòtiques era d'un 70% tant al cultiu control com al de z-VAD-fmk 10 μM, mentre que els cultius amb una concentració d'inhibidor de 50 i 100 μM mantien uns nivells de cèl·lules viables no apoptòtiques molt elevats, del 75% i el 84%, respectivament. Aquest valors de viabilitat tan elevats es van mantenir també a les 36 hores: un 67% pel cultiu amb z-VAD-fmk 100 μM i un 55% pel de 50 μM, mentre que el cultiu amb z-VAD-fmk a una concentració de 10 μM també presentava uns nivells de cèl·lules viables no apoptòtiques del 16%, quatre vegades superior al control negatiu. Finalment, a les 60 hores únicament restaven cèl·lules viables als cultius amb presència de z-VAD-fmk 50 i 100 μM: 17% i 18%, respectivament.

Els resultats obtinguts permeten concloure que el pèptid z-VAD-fmk és un potent inhibidor de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5, ja que a concentracions d'entre 50 i 100 μM retarda la mort dels cultius i l'aparició de l'apoptosi unes 36 hores respecte del cultiu control no tractat. Aquest retard s'observa tant en el procés de translocació de la fosfatidilserina, com en el manteniment de la morfologia cel·lular i, sobretot, en la inhibició del procés de degradació del DNA, ja que

després de 60 hores de cultiu, tot i la presència majoritària de morfologies apoptòtiques, les cèl·lules del cultiu que conté z-VAD-fmk 100 µM mantenen íntegre el seu DNA genòmic.

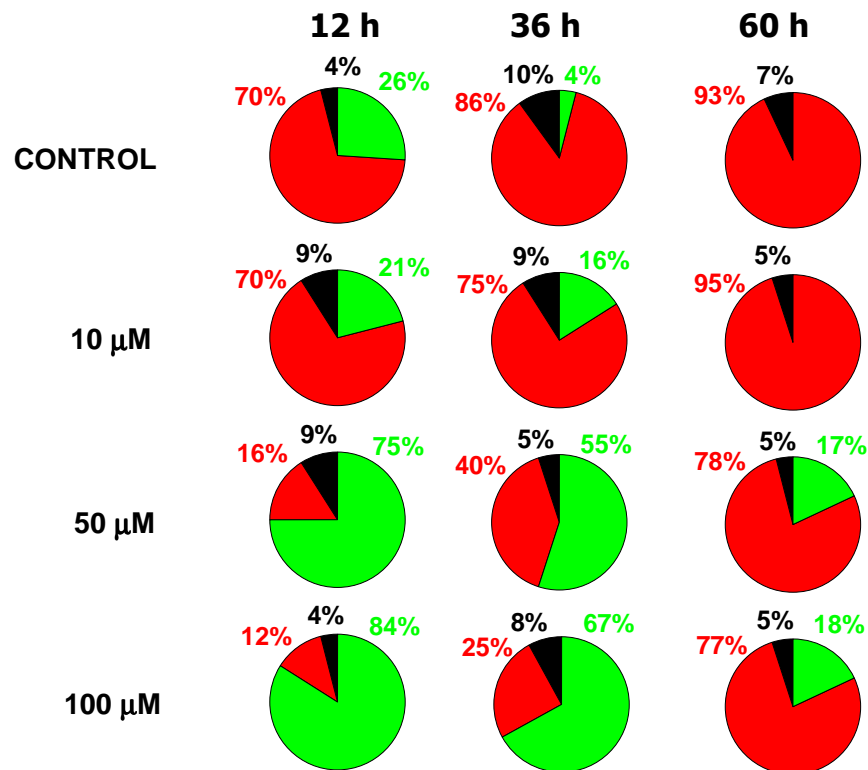


Figura 3.19. Estudi de la morfologia cel·lular per microscòpia de fluorescència en els cultius tractats amb l'inhibidor z-VAD-fmk. Evolució dels percentatges de cèl·lules viables (en verd), apoptòtiques (en vermell) i necròtiques (en negre).

Els resultats obtinguts ens mostren la gran importància que les Caspases afectades per aquest pèptid tenen en el programa de mort en l'hibridoma KB26.5. De totes formes, tenint en compte els valors de les K_i que s'indicaven a la Taula 3.3, són varies les Caspases murines inhibides pel z-VAD-fmk, amb K_i 's per sota de 0.1 µM: Caspases 1, 3, 7, 8 i 9.

De totes formes, més endavant, es demostrarà el paper poc important de la Caspasa 1 en la PCD de l'hibridoma. A més a més, la Caspasa 8 pot ser descartada de la llista donat que la seva acció sembla quedar restringida a l'apoptosi induïda per receptors de membrana i no per eliminació de nutrients (Varfolomeev et al., 1998). Així, i coincidint amb la bibliografia, s'entreveu el paper clau de les Caspases 9, 3 i, en menor mesura, la 7.

En l'apartat següent, l'ús de l'inhibidor Ac-DEVD-cmk permetrà estudiar el paper de les Caspases 3 i 7 en la PCD de l'hibridoma en condicions de cultiu en medis deficientes en glutamina.

3.7.2. Ac-DEVD-cmk

Per a la realització d'aquest experiment, es van preparar quatre cultius on el factor inductor de l'apoptosi era també la manca de glutamina i on s'utilitzaven diferents concentracions d'inhibidor Ac-DEVD-cmk (Taula 3.5): cultiu control amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina ni inhibidor; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i Ac-DEVD-cmk 100 µM; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i Ac-DEVD-cmk 200 µM; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i Ac-DEVD-cmk 300 µM.

Igual que en l'experiment amb el z-VAD-fmk, els cultius es van realitzar en flascons no agitats amb 10 mL de cadascun dels medis i un inòcul de 5.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹.

També es va preparar un control positiu amb medi DMEM complet al 2% FCS i amb glutamina per verificar que l'inòcul creixia normalment en un medi amb tots els nutrients. Els resultats obtinguts en aquest control no han estat inclosos.

cultiu	DMEM	2% FCS	Gln	Ac-DEVD-cmk
control negatiu	+	+	-	-
1	+	+	-	100 µM
2	+	+	-	200 µM
3	+	+	-	300 µM
control positiu	+	+	+	-

Taula 3.5. Quadre resum dels experiments realitzats en cultius d'hibridoma KB26.5 en presència de diferents concentracions de l'inhibidor peptídic Ac-DEVD-cmk.

L'evolució de la concentració de cèl·lules viables, el percentatge de cèl·lules Annexina-positives i l'estudi de la fragmentació del DNA en cadascun dels cultius de l'experiment es mostren a la Figura 3.20.

Concentracions de Ac-DEVD-cmk de 300 i 200 µM van permetre als cultius créixer lleugerament durant les primeres 12 hores, si bé posteriorment començaren a morir fins assolir concentracions finals properes a 2.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹. Per contra, el cultiu amb una concentració de només 100 µM va experimentar un descens constant del nombre de cèl·lules viables, tot i que molt menor que l'observat en el cultiu control negatiu, arribant a una concentració final de 0.8×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹.

També s'hi pot observar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques (Figura 3.20C) que va ser sempre significativament inferior en els tres cultius amb l'inhibidor Ac-DEVD-cmk, si bé a les

36 hores tots quatre cultius ja superaven el 50% de cèl·lules Annexina-positives. No es va observar cap millora en el retard de la PCD quan s'augmentava la concentració d'inhibidor de 200 a 300 μM .

A les 60 hores d'haver iniciat l'experiment, s'observava que en tots quatre cultius ja es donava una fragmentació considerable del DNA, si bé sembla apreciar-se com en el cultiu amb major concentració d'inhibidor, 300 μM , la degradació del DNA és lleugerament menor.

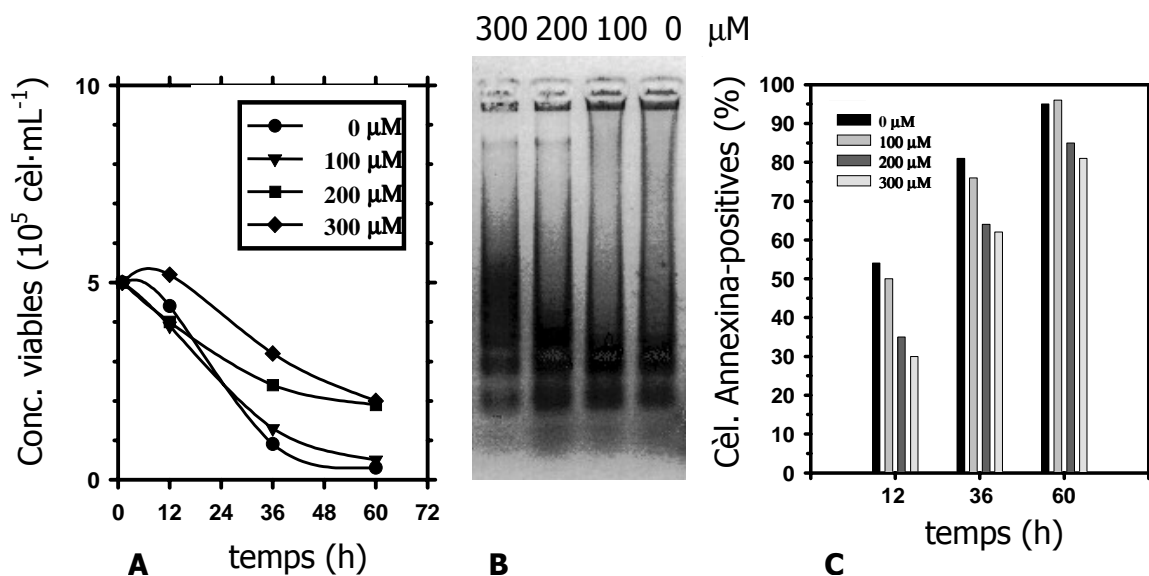


Figura 3.20. Efecte de l'inhibidor Ac-DEVD-fmk en el cultiu en discontinu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5. A. Evolució de la concentració de cèl·lules viables; B. Fragmentació internucleosòmica del DNA a les 60 h; C. Percentatge de cèl·lules que presenten translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtinguts per citometria de flux.

Pel que fa a l'evolució de les diferents morfologies cel·lulars en els quatre cultius, Figura 3.21, es va poder observar que ja a les 12 hores el percentatge de cèl·lules apoptòtiques era considerablement inferior en tots tres cultius amb inhibidor respecte el cultiu control negatiu. Fins i tot el cultiu amb una concentració d'inhibidor de 100 μM tenia un menor percentatge d'apoptosi (21%).

Posteriorment, s'observà que a les 36 hores, els dos cultius amb una concentració major de Ac-DEVD-cmk eren els que mantenien uns percentatges de cèl·lules viables no apoptòtiques més elevats, gairebé un 50%, mentre que en el cultiu amb Ac-DEVD-cmk 100 μM , aquest valor era ja del 40%, i només del 4% en el cultiu control.

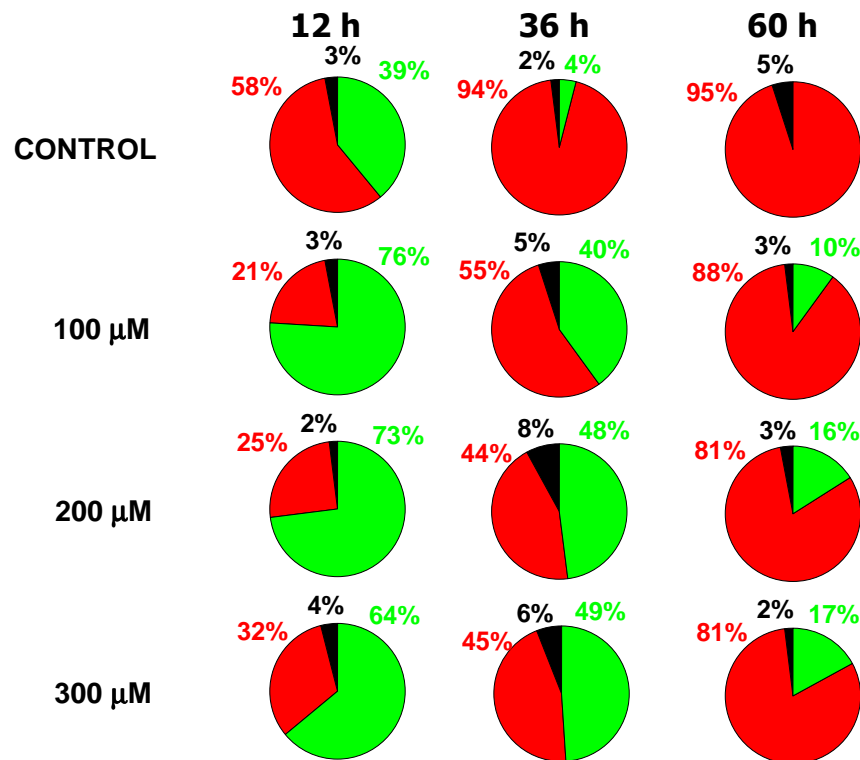


Figura 3.21. Estudi de la morfologia cel·lular per microscòpia de fluorescència en els cultius tractats amb l'inhibidor Ac-DEVD-cmk. Evolució dels percentatges de cèl·lules viables (en verd), apoptòtiques (en vermell) i necròtiques (en negre).

Finalment, a les 60 hores, no restaven cèl·lules viables en el cultiu control, mentre que els cultius tractats amb Ac-DEVD-cmk 100 µM, 200µM i 300 µM, el percentatge de cèl·lules que encara no havien entrat en apoptosi era del 10%, 16% i 17%, respectivament.

Tots aquests resultats indiquen que l'inhibidor Ac-DEVD-cmk permet una certa inhibició de l'apoptosi en cultius de l'hibridoma KB25.6, si bé la concentració mínima de pèptid requerida per obtenir un retard apreciable de l'aparició de l'apoptosi és 200 µM. També es pot apreciar que la inhibició de l'apoptosi es dona principalment durant les primeres 12 hores, mentre que a partir de les 36 hores, els cultius ja presenten un 50% de cèl·lules apoptòtiques. També cal destacar que la inhibició de l'apoptosi és més evident en els canvis morfològics de les cèl·lules del cultiu que no pas en els processos de translocació de la fosfatidilserina i la degradació del DNA.

Així doncs, es pot concloure que la inhibició de les principals Caspases efectores (subfamília de la Caspasa 3) permet retardar l'aparició de l'apoptosi en períodes molt inicials del cultiu, si bé el fet que aquestes Caspases no es trobin situades a l'inici de la cascada proteolítica fa que possiblement es produeixi una activació del procés apoptòtic per alguna altra via alternativa.

3.7.3. z-YVAD-cmk

En un tercer experiment, es va determinar la importància de la Caspasa 1 en el procés d'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5, fent ús de l'inhibidor z-YVAD-cmk, el més específic dels tres emprats en aquest treball, amb una forta afinitat, K_i de 0.76 nM, gairebé exclusiva, vers la Caspasa 1 (Ekert et al., 1999; Slee et al. 1999).

Per portar a terme aquest experiment es van preparar quatre cultius on el factor inductor de l'apoptosi era també la manca de glutamina i on s'utilitzava diferents concentracions de l'inhibidor z-YVAD-cmk (Taula 3.6): cultiu control amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i sense inhibidor; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i z-YVAD-cmk 100 μ M; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i z-YVAD-cmk 200 μ M; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i z-YVAD-cmk 300 μ M. A l'igual que en els experiments anteriors, es va preparar un cinquè cultiu com a control positiu amb medi DMEM complet al 2% FCS per verificar que l'inòcul creixia normalment en un medi amb tots els nutrients. Els resultats obtinguts en aquest control no han estat inclosos. La concentració d'inòcul emprada va ser de 5.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹.

cultiu	DMEM	2% FCS	Gln	z-YVAD-cmk
control negatiu	+	+	-	-
1	+	+	-	100 μ M
2	+	+	-	200 μ M
3	+	+	-	300 μ M
control positiu	+	+	+	-

Taula 3.6. Quadre resum dels experiments realitzats en cultius d'hibridoma KB26.5 en presència de diferents concentracions de l'inhibidor peptídic z-YVAD-cmk.

A la Figura 3.22, es mostra l'evolució per a tots els cultius de la concentració de cèl·lules viables, el percentatge de cèl·lules Annexina-positives i la fragmentació internucleosomal del DNA a les 60 hores d'haver iniciat l'experiment. S'observa que aquells cultius amb presència d'una concentració d'inhibidor de 200 i 300 μ M van retardar el descens de la població de cèl·lules viables durant les primeres 12 hores, si bé posteriorment van començar a morir fins assolir, a les 36 hores d'haver-se iniciat l'experiment, concentracions de cèl·lules viables iguals a les del control negatiu. A les 60 hores, ja no hi havia cèl·lules viables en cap dels quatre cultius.

En la Figura 3.22C, es pot observar que en cap moment el percentatge de cèl·lules apoptòtiques no va ser significativament diferent entre els quatre cultius i com, a les 36 hores, el percentatge de cèl·lules Annexina-positives superava el 85% en tots els casos. En l'electroforesi del DNA

extret dels diferents cultius a les 36 hores d'haver-se iniciat l'experiment, s'observava que tots quatre cultius presentaven una clara fragmentació del DNA en patró d'escala, sense que es pugui apreciar cap diferència significativa entre ells.

A la Figura 3.23, es pot observar l'evolució de les diferents morfologies cel·lulars en els quatre cultius. A les 12 hores, el percentatge de cèl·lules viables no apoptòtiques era lleugerament inferior en tots tres cultius amb inhibidor respecte el cultiu control negatiu: 61% per una concentració de l'inhibidor de 300 μM , 56% per 200 μM , 54% per 100 μM i 39% pel control negatiu.

De totes maneres a les 36 hores ja no es van donar diferències significatives, ja que tots quatre cultius presentaven uns percentatges de cèl·lules amb morfologies apoptòtiques superiors al 85% i, a les 60 hores, no quedaven cèl·lules viables en cap dels cultius.

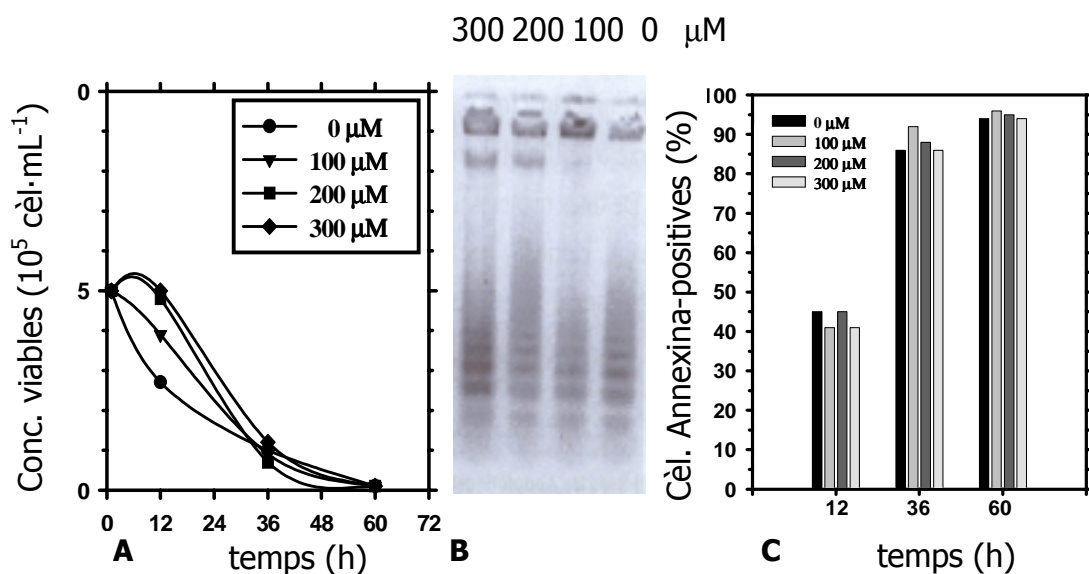


Figura 3.22. Efecte de l'inhibidor z-YVAD-fmk en el cultiu en discontinuu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5. A. Evolució de la concentració de cèl·lules viables; B. Fragmentació internucleosòmica del DNA a les 60 h; C. Percentatge de cèl·lules que presenten translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtinguts per citometria de flux.

A partir d'aquests resultats, es pot concloure que la subfamília de la Caspasa 1, especialment la pròpia Caspasa 1, no juga un paper significatiu en l'execució de l'apoptosi induïda per supressió de glutamina en l'hibridoma KB26.5, ja que la seva inhibició específica amb el pèptid z-YVAD-cmk a concentracions de fins 300 μM només permet observar un lleuger retard en l'aparició de morfologies cel·lulars apoptòtiques durant les primeres 12 hores de l'experiment, possiblement per una certa acció inhibidora sobre altres Caspases efectores.

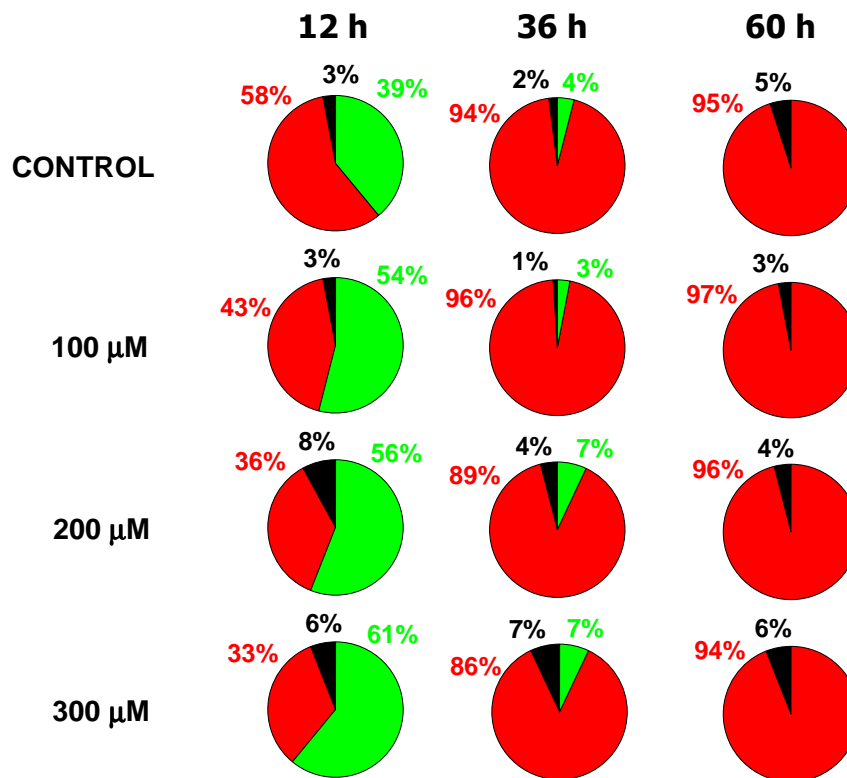


Figura 3.23. Estudi de la morfologia cel·lular per microscòpia de fluorescència en els cultius tractats amb l'inhibidor z-YVAD-cmk. Evolució dels percentatges de cèl·lules viables (en verd), apoptòtiques (en vermell) i necròtiques (en negre).

3.7.4. Ús combinat dels inhibidors z-VAD-fmk i Ac-DEVD-cmk

Per tal d'estudiar l'efecte complementari de la inhibició amb els dos inhibidors específics de Caspases que han donat els millors resultats en els apartats anteriors, es va realitzar l'experiment que es mostra a continuació.

Els cultius preparats van ser els que es mostren de forma resumida a la Taula 3.7: cultiu control negatiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i sense inhibidors; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i z-VAD-fmk 100 µM; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i Ac-DEVD-cmk 200 µM; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina, z-VAD-fmk 100 µM i Ac-DEVD-cmk 200 µM.

Com en experiments anteriors, es van cultivar les cèl·lules en flascons no agitats amb 10 mL de cadascun dels medis i amb una concentració d'inòcul de 5.0×10^5 cèl·lules viables $\cdot \text{mL}^{-1}$. També es va preparar un control positiu amb medi complet DMEM 2% FCS per verificar que l'inòcul creixia normalment en un medi amb tots els nutrients. Els resultats obtinguts en aquest control no han estat inclosos.

cultiu	DMEM	2% FCS	Gln	z-VAD-fmk	Ac-DEVD-cmk
control negatiu	+	+	-	-	-
1	+	+	-	100 µM	-
2	+	+	-	-	200 µM
3	+	+	-	100 µM	200 µM
control positiu	+	+	+	-	-

Taula 3.7. Quadre resum dels experiments realitzats en cultius d'hibridoma KB26.5 en presència de diferents concentracions de l'inhibidor peptídic z-VAD-cmk.

A la Figura 3.24, es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables i la fragmentació de DNA genòmic de cadascun dels cultius. Tant el cultiu tractat sols amb z-VAD-fmk com el que conté els dos inhibidors alhora presentaven comportaments semblants, mantenint gairebé constant la concentració de cèl·lules viables durant les primeres 36 hores i assolint un valor final d'aproximadament 2.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹ a les 60 hores. Per contra, el cultiu tractat amb Ac-DEVD-cmk va patir un cert descens de la viabilitat, tot i que molt inferior a l'observada en el control negatiu i, finalment, arribava a una concentració de cèl·lules viables semblant a les dels altres dos cultius amb inhibidors.

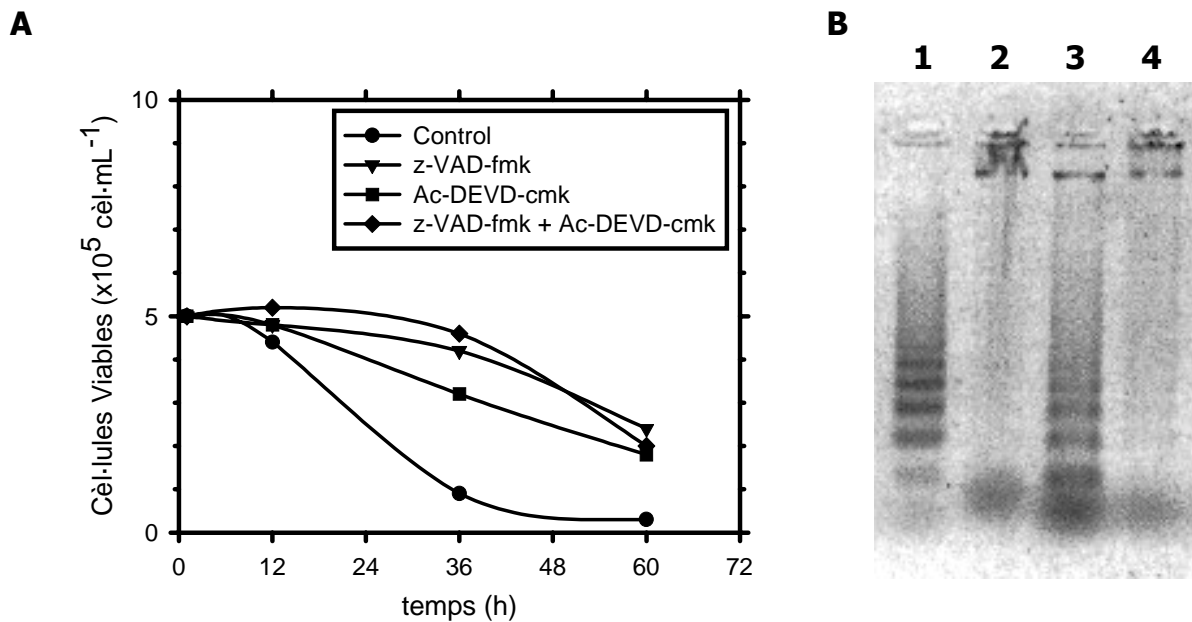


Figura 3.24. Evolució de la concentració de cèl·lules viables i visualització de la fragmentació del DNA en els quatre cultius. A. Evolució de la concentració de cèl·lules viables; B. Gel d'agarosa on es mostra l'estat del DNA de les cèl·lules en els diferents cultius de l'experiment: al carril 1, DMEM 2% FCS sense glutamina (Control -); al carril 2, DMEM 2% FCS sense glutamina i z-VAD-fmk 100 µM; al carril 3, DMEM 2% FCS sense glutamina i Ac-DEVD-cmk 200 µM; i, al carril 4, DMEM 2% FCS sense glutamina amb z-VAD-fmk 100 µM i Ac-DEVD-cmk 200 µM.

Pel que fa als percentatges de morfologies cel·lulars, Figura 3.25, es va observar que el cultiu tractat amb z-VAD-fmk i el que contenia els dos inhibidors presentaven percentatges de cèl·lules

viables no apoptòtiques molt semblats entre sí i sempre superiors a la resta, si bé en el cultiu amb tots dos inhibidors els percentatges de cèl·lules apoptòtiques eren lleugerament inferiors.

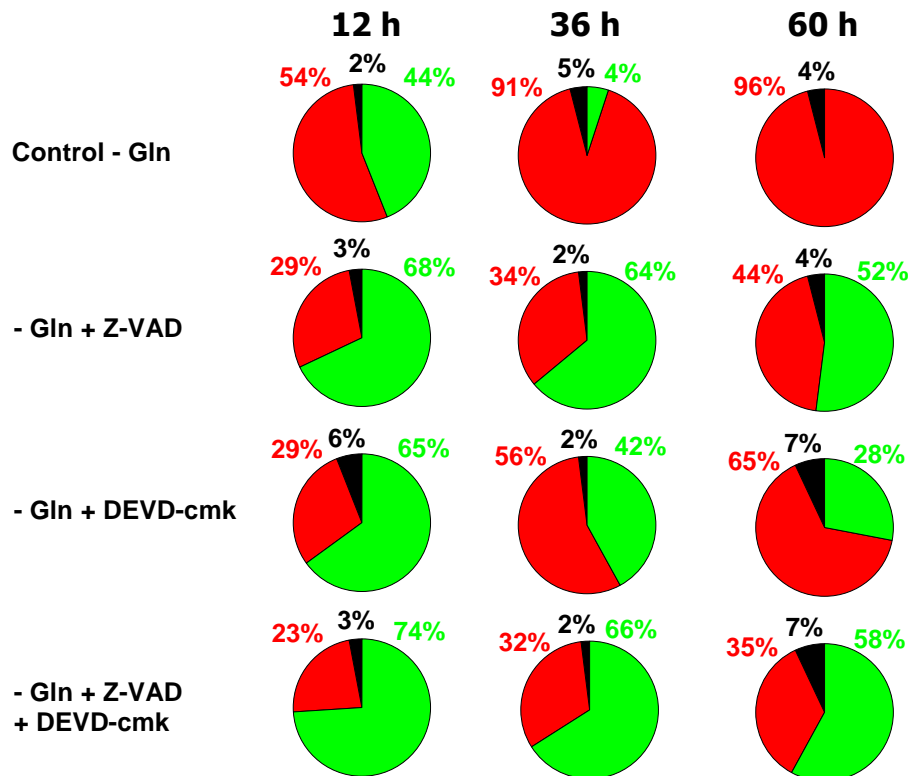


Figura 3.25. Morfolofies cel·lulars observades per microscòpia de fluorescència. Evolució dels percentatges de cèl·lules no apoptòtiques (en verd), apoptòtiques (en vermell) i necròtiques (en negre) als diferents cultius de l'experiment de retorn, obtinguts per microscòpia de fluorescència.

El cultiu tractat amb l'inhibidor Ac-DEVD-cmk només va mantenir un percentatge de cèl·lules apoptòtiques semblants al cultiu amb z-VAD-fmk durant les primeres 12 hores (29%) i, després, el nombre de cèl·lules apoptòtiques va augmentar fins assolir un 65% a les 60 hores, gairebé el doble de l'observat en el cultiu amb tots dos inhibidors (entorn del 35%).

Pel que fa al control negatiu, només restava un 4% de cèl·lules viables no apoptòtiques a les 36 hores de cultiu, assolint-se un percentatge final de cèl·lules apoptòtiques del 96%.

A l'observar el patró de degradació del DNA de les cèl·lules de tots quatre cultius a les 36 hores (Figura 3.24), es pot apreciar com tant el cultiu control (carril 1) com el cultiu amb Ac-DEVD-cmk (carril 3) presenten fragmentació en patró d'escala, mentre que les cèl·lules del cultiu amb només z-VAD-fmk (carril 2) i del cultiu amb tots dos inhibidors (carril 4) mantenien encara el DNA intacte.

3.7.5. Importància de les Caspases en l'execució de l'apoptosi en l'hibridoma

Atenent als resultats obtinguts en tots els experiments anteriors, es va determinar quines eren les Caspases que tenien un paper més important en el programa apoptòtic de l'hibridoma KB26.5, i de quina manera es produïa la interacció entre el mitocondri i la via de les Caspases (Figura 3.26).

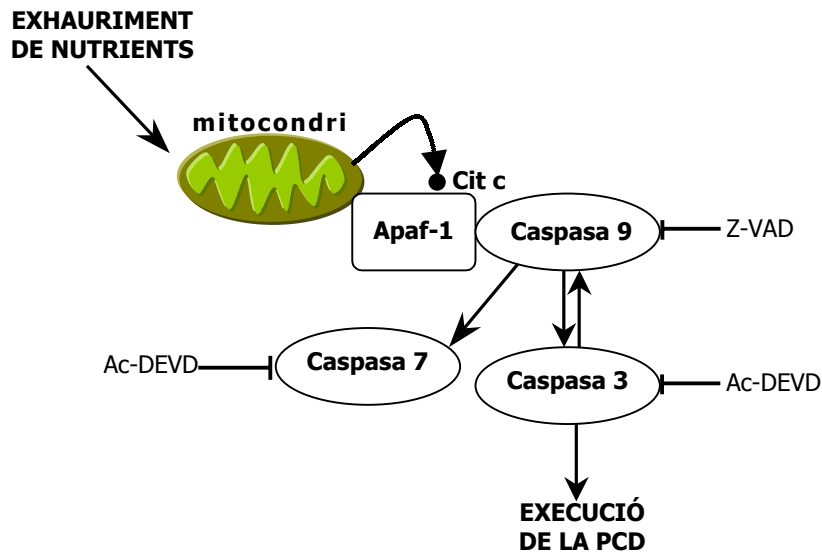


Figura 3.26. Esquema de les possibles jerarquies existents entre les caspases implicades en l'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5.

Els experiments realitzats amb inhibidors específics de les Caspases van permetre establir que concentracions de z-VAD-fmk entre 50 i 100 μ M inhibien l'aparició de l'apoptosi fins a les 36 hores després d'haver-se exhaurit la glutamina dels medis. Aquesta inhibició era molt més evident en el procés de translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana cel·lular i en la degradació internucleosòmica del DNA.

Tot i que el pèptid z-VAD-fmk té una acció d'ampli espectre que afecta diferents Caspases, recentment s'ha descrit que podria actuar amb major especificitat sobre les Caspases 1, 3, 7, 8 i 9, amb unes K_i inferiors a 0.1 nM (Susin et al., 1999; Ekert et al., 1999). D'aquestes, considerant la ruta bioquímica de les Caspases actualment acceptada (revisada, entre d'altres per Budihardjo et al., 1999; i Slee et al., 1999), la Caspasa 8 pot ser descartada, donat que es troba implicada principalment en el procés de mort per apoptosi mitjançant receptors de membrana i no per estrès cel·lular (Varfolomeev et al., 1998). Així mateix, es pot descartar també la Caspasa 1, que no té cap efecte significatiu en el procés d'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5. Així, els resultats obtinguts amb concentracions de l'inhibidor z-YVAD-cmk de fins a 300 μ M únicament han permès retardar molt lleugerament l'aparició de cèl·lules amb morfologia apoptòtica en els

cultius sense glutamina durant les primeres 12 hores i no semblen que afectin els processos de translocació de la fosfatidilserina i de degradació del DNA.

L'ús simultani dels inhibidors Ac-DEVD-cmk i z-VAD-fmk permet augmentar la longevitat dels cultius, si bé l'ús individual del Ac-DEVD-cmk en concentracions quatre vegades superiors a les emprades amb el pèptid z-VAD-fmk dóna resultats molt menys eficients en el bloqueig de l'aparició de l'apoptosi i, a més a més, solament aconsegueix endarrerir l'apoptosi les primeres 12 hores en absència de glutamina.

Donat que el Ac-DEVD-cmk és un fort inhibidor de la Caspasa 3 i, en certa mesura, de les Caspases 7 i 8, els nostres resultats semblen suggerir un paper principal de les Caspases 9 i 3 en el procés de mort per apoptosi de cèl·lules d'hibridoma en medis sense glutamina, bo i que no es pot descartar la participació de la Caspasa 7, o bé d'alguna altra Caspasa pel moment desconeguda.

El fet de que les Caspases 3 i 7 mostren una especificitat de substrat molt similar en assajos d'hidròlisi de pèptids *in vitro*, fa que sovint s'assumeixi que la Caspasa 7 pot substituir funcionalment la Caspasa 3. Bo i que la Caspasa 7 és activada al mateix nivell jeràrquic de la Caspasa 3 per la Caspasa 9, la Caspasa 7 no pot substituir la Caspasa 3 en la majoria de substrats tallats per aquesta proteasa (Slee et al., 2001).

Tot i que aquests experiments no proporcionen dades experimentals suficients per demostrar-ho, és molt possible que la Caspasa 9 sigui la proteïna transductora que condicioni tota la cascada proteolítica en hibridomes. Aquest fet ve recolzat pels resultats obtinguts en l'estudi sobre la implicació del mitocondri en l'apoptosi, en els que s'ha pogut constatar la sortida al citoplasma del Citocrom c, cofactor del procés d'activació de la Caspasa 9.

En el capítol següent s'estudiarà la possibilitat de recuperació de cultius deficients en glutamina que han estat tractats amb els pèptids inhibidors de l'apoptosi que han mostrat millors resultats en la prolongació de la viabilitat dels cultius: z-VAD-fmk i Ac-DEVD-cmk, així com agents citoprotectors, com és el Zn^{2+} , que està descrit a la bibliografia com a protector de les cèl·lules enfront de la inducció de l'apoptosi (Chai et al., 1999).

A partir dels resultats obtinguts i del coneixement cada cop més acurat de la ruta bioquímica activada en la PCD de l'hibridoma, serà possible el disseny racional d'estratègies genètiques per a la inhibició de l'apoptosi en cultius d'hibridomes mancats de nutrients. A la Figura 3.27, es mostra una representació esquemàtica dels esdeveniments que possiblement es donen en l'hibridoma KB26.5 una vegada activada la PCD per exhauriment de nutrients.

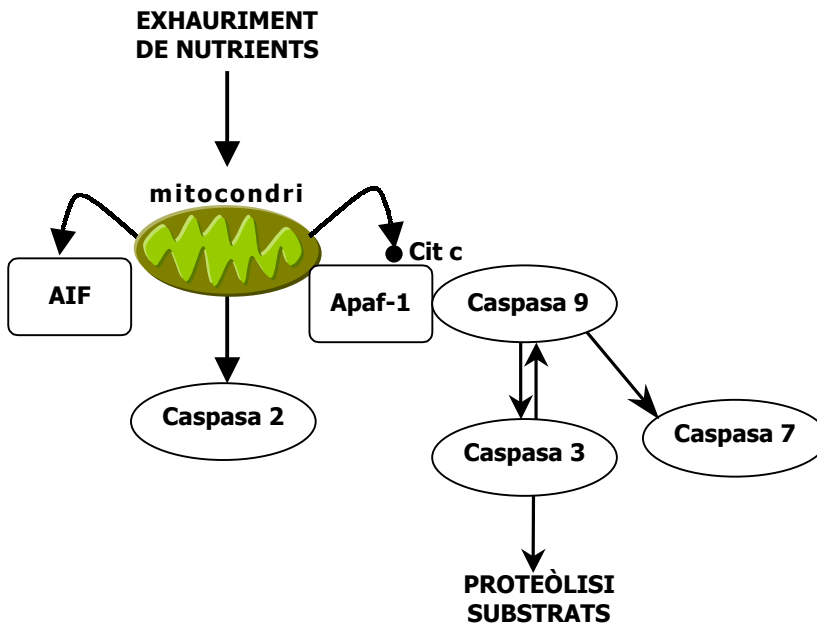


Figura 3.27. Esquema d'actuació de les Caspases murines en resposta a la inducció de l'apoptosi per manca de nutrients.