
CAPÍTOL 5

5. MODIFICACIÓ GENÈTICA DE L'HIBRIDOMA KB26.5

5.1. Dianes per al bloqueig de la PCD

En el capítol anterior s'ha mostrat que una forma d'evitar l'exhauriment de nutrients en el medi de cultiu és alentint la velocitat de divisió de les cèl·lules mitjançant estratègies de perfusió bifàsica. Això evita que s'arribi a situacions de limitació física en l'aportació de nutrients, oxigen i factors de creixement.

De totes maneres, aquest sistema tampoc garanteix que les cèl·lules acabin endegant el programa de mort per apoptosi i les cèl·lules mortes s'acumulen a l'interior dels bioreactors. A més a més, la possibilitat de que esdevinguin situacions, de manera habitual o accidental, en les quals les cèl·lules iniciïn el procés de mort per apoptosi és inevitable.

Això porta aquest treball a l'exploració d'alternatives basades en la modificació genètica de les cèl·lules per fer-les resistents a la inducció de la mort per apoptosi i evitar l'acumulació de cèl·lules mortes dins el bioreactor, perllongant així la viabilitat dels cultius.

En el Capítol 3, s'han mostrat els estudis realitzats en aquest treball dirigits a la identificació de les principals vies de transmissió del senyal apoptòtic en l'hibridoma KB26.5. Aquest

coneixement permet definir dianes per a una intervenció genètica adreçada a protegir les cèl·lules de la mort per apoptosi en l'ambient estressant del bioreactor. Així, aquí s'ha constatat l'expressió dels principals gens reguladors de l'apoptosi que s'expressen en l'hibridoma (els gens proapoptòtics *bax* i *bak*; i els gens protectors *bcl-2*, *bcl-x_L*, *mcl-1*, i *bcl-w*).

En el Capítol 4, s'han mostrat els experiments que demostren que la inhibició de les Caspases 3, 7 i 9 es troba en un punt previ al moment en que les cèl·lules d'hibridoma cultivades en condicions de manca de nutrients entren en la fase irreversible de mort per apoptosi, a partir del qual no és possible rescatar els cultius quan se'ls afegeix medi fresc amb tots els seus components, és el que anomenem *límit d'actuació*. Això es va confirmar en els estudis de recuperació realitzats in vitro en els quals hi havia present la combinació dels pèptids z-VAD-fmk i Ac-DEVD-cho (veure l'apartat 4.5 del Capítol anterior).

L'estudi en profunditat del paper del mitocondri que es mostrava al Capítol 3 d'aquest treball ha permès identificar-lo en l'hibridoma com a punt central en la transmissió del senyal de mort cap a les molècules executores de l'apoptosi i com a lloc on hi realitzen la seva funció reguladora els membres de la família del Bcl-2 (Vives et al., 2001a). En aquells experiments, es va observar que la inducció de l'apoptosi per manca de glutamina desencadenava la sortida del Citocrom c de l'espai intermembrana mitocondrial al citoplasma. Així, en concordància amb la literatura (Budihardjo et al., 1999; Slee, 1999), s'ha establert l'alliberament del Citocrom c com un factor clau en la transmissió del senyal apoptòtic cap a la via de les Caspases.

Coneixent això, en aquest Capítol es mostren els resultats obtinguts en l'aproximació genètica al bloqueig de l'acció de les Caspases ja sigui actuant a nivell de les pròpies Caspases o bé a nivell mitocondrial, evitant la seva activació per l'alliberament del Citocrom c de mitocondri.

Dels diferents gens antiapoptòtics descrits en la bibliografia com a protectors de l'apoptosi, en aquest treball s'ha optat per la sobreexpressió de gens protectors de la família del Bcl-2 i de proteïnes inhibidores de les Caspases 3, 7 i 9.

5.2. Sobreexpressió de membres antiapoptòtics de la família del Bcl-2

La manipulació genètica és una eina que permet sobreexpressar gens inhibidors de l'apoptosi en cèl·lules animals. En aquest treball, s'ha estudiat la sobreexpressió en cèl·lules d'hibridoma de

gens descrits com a antiapoptòtics en la bibliografia. L'exemple més clar d'aquesta estratègia és la sobreexpressió dels gens *bcl-2* i *bcl-x_L*, que ja han estat provats amb anterioritat en cèl·lules d'hibridoma productores de MAbs (Singh et al., 1996; Charbonneau i Gauthier, 2000).

Com s'ha explicat al Capítol 3, 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). Per això, és d'esperar que la sobreexpressió dels membres protectors de la família del Bcl-2 provoquin un desplaçament de l'equilibri cap a la supervivència de les cèl·lules.

La dimerització de Bax amb Bcl-2 o Bcl-X_L evita la formació de porus en la membrana externa mitocondrial per generar canals conductors d'ions (Gottlieb, 2000). A més a més, tant Bcl-2 com Bax afecten la proteïna VDAC en la regulació del transport d'ions, incloent-hi nucleòtids d'adenina. Així, Bcl-2 i Bcl-X_L poden actuar com a canal d'ions per dissipar el potencial a través de la membrana externa, permetent que VDAC romanguí obert.

El tancament de VDAC porta a l'acumulació d'ATP en l'espai intermembrana, provocant la vessiculació de la matriu seguit de la ruptura de la membrana externa i l'alliberament del Citocrom c (Gottlieb, 2000). Llavors, el Citocrom c afavoreix la formació de l'apoptosoma (composat per Citocrom c, Apaf-1 i procaspasa 9) que, al seu torn, activa la via de les Caspases (Slee et al., 1999 i 2001).

Per aquest motiu, es va creure convenient sobreexpressar gens amb capacitat d'evitar l'alliberament del Citocrom c, i impedir així que el senyal apoptòtic flueixi a través de la cascada proteolítica de les Caspases.

En les Figures 3.6A i 3.7A del Capítol 3, es mostraven els resultats de l'aïllament per RT-PCR dels cDNA que codifiquen per Bcl-2 i Bcl-X_L endògens del propi hibridoma. Estudis de transferència *Western* (Figura 3.6B) indicaven la presència de Bcl-2 en cèl·lules cultivades en medi complet, on no es dona la inducció de l'apoptosi, però no s'observava cap banda en les mostres obtingudes a partir de cèl·lules cultivades en condicions de manca de glutamina. Això sembla explicar-se per la proteòlisi específica en el residu Asp³⁴ deguda a la Caspasa 3, que fa perdre al Bcl-2 la capacitat protectora de l'apoptosi (Kirsch et al., 1999).

Així doncs, bo i que les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 expressen aquest gen protector de l'apoptosi, o bé els nivells no són suficients per protegir les cèl·lules de la mort per apoptosi en condicions inductores per manca de nutrients, o bé una vegada activada la via de les Caspases, aquestes mateixes proteases s'encarreguen de degradar de forma molt ràpida el Bcl-2 present, conduint a la destrucció de la cèl·lula en un interval de temps molt curt.

D'altra banda, el Bcl-X_L ha estat identificat en cèl·lules d'hibridoma KB26.5 cultivades tant en condicions inductores com en condicions normals de creixement (veure Figura 3.7B). Això fa pensar que la seva sobreexpressió en l'hibridoma hauria de desplaçar l'equilibri entre membres promotors i protectors de l'apoptosi cap a la supervivència cel·lular.

No obstant això, cal considerar dos aspectes importants. Primerament, la inducció de l'apoptosi provoca l'augment de l'expressió de gens proapoptòtics, com Bax, via p53 (Sturm et al., 1999). Altrament, tant Bcl-2 com Bcl-X_L són diana de les Caspases, i els fragments obtinguts com a producte de la seva proteòlisi, enlloc de tenir una funció antiapoptòtica, la promouen (Clem et al., 1998).

Existeixen homòlegs vírics del Bcl-2, com són KSBcl-2 i BHRF-1 que no són proteolitzats per les Caspases ja que no contenen cap diana d'aquestes i que, per tant, escapen als mecanismes de pressió de la pròpia cèl·lula i poden continuar realitzant la seva activitat antiapoptòtica àdhuc en condicions inductores de l'apoptosi (Figura 5.1).

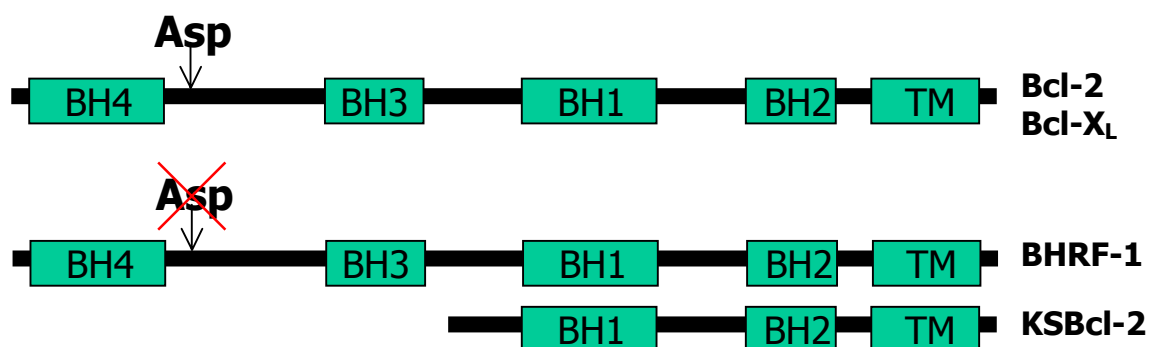


Figura 5.1. Representació esquemàtica de les estructures de les proteïnes homòlogues de la família del Bcl-2. Es mostra la posició del residu Asp diana de la Caspasa 3 en la regió desestructurada compresa entre els dominis BH4 i BH3 de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-X_L. Aquesta diana de les Caspases no es troba present ni al BHRF-1 ni tampoc al KSBcl-2, que té una estructura diferent a les altres tres proteïnes.

Per aquest motiu, s'han escollit gens vírics donat que les proteïnes per les quals codifiquen exhibeixen una funció protectora quan infecten les cèl·lules amb la finalitat d'evitar la mort per apoptosi de la cèl·lula hoste, assegurant així la seva correcta replicació (veure Figura 5.2).

La pertorbació cel·lular que provoca la infecció per un virus fa disparar molts detectors cel·lulars que permeten iniciar una resposta apoptòtica innata. En la majoria de casos, l'apoptosi té un efecte advers en la replicació dels virus i, en aquestes situacions, els virus expressen proteïnes que bloquegen la resposta de mort (Everett i McFadden. 1999).

Els virus tenen aquesta capacitat de protecció, permetent la seva replicació sense que la cèl·lula hoste progressi en el seu intent de morir per apoptosi, assegurant així la formació de més virus i la conseqüent infecció de cèl·lules veïnes (Hardwick, 2001).

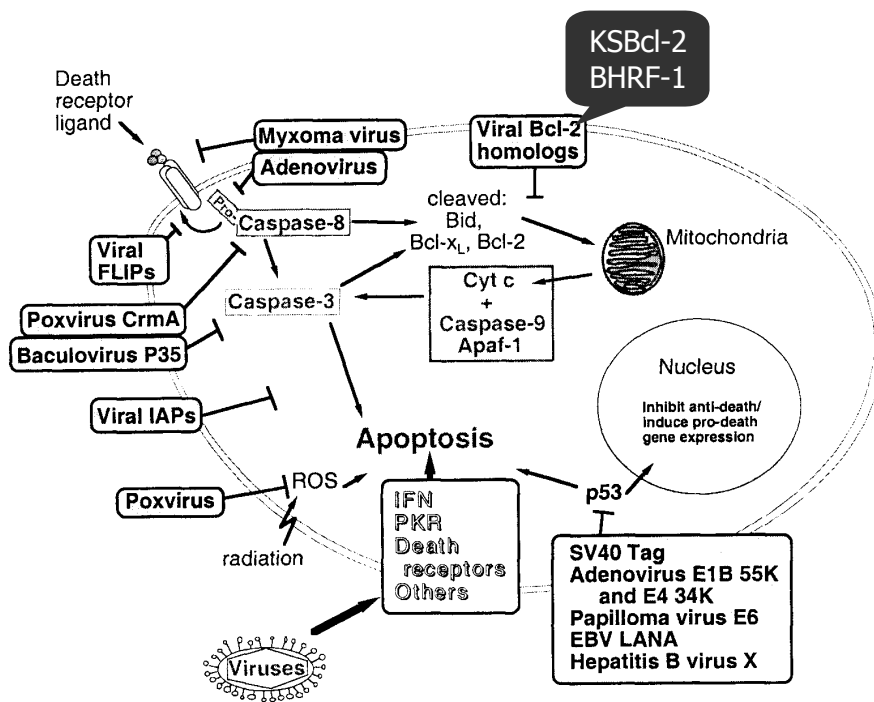


Figura 5.2. Efecte de proteïnes víriques en cèl·lules animals. A la figura, es mostren els nivells d'actuació de proteïnes víriques en la interferència del procés de mort cel·lular programada (figura modificada de l'original de Hardwick, 2001).

A la Figura 5.3A, es mostra el nivell d'actuació d'aquests membres vírics de la família del Bcl-2 així com, en la Figura 5.3B, els resultats obtinguts en el seu aïllament, per RT-PCR i PCR (veure el Capítol 7, de Materials i Mètodes).

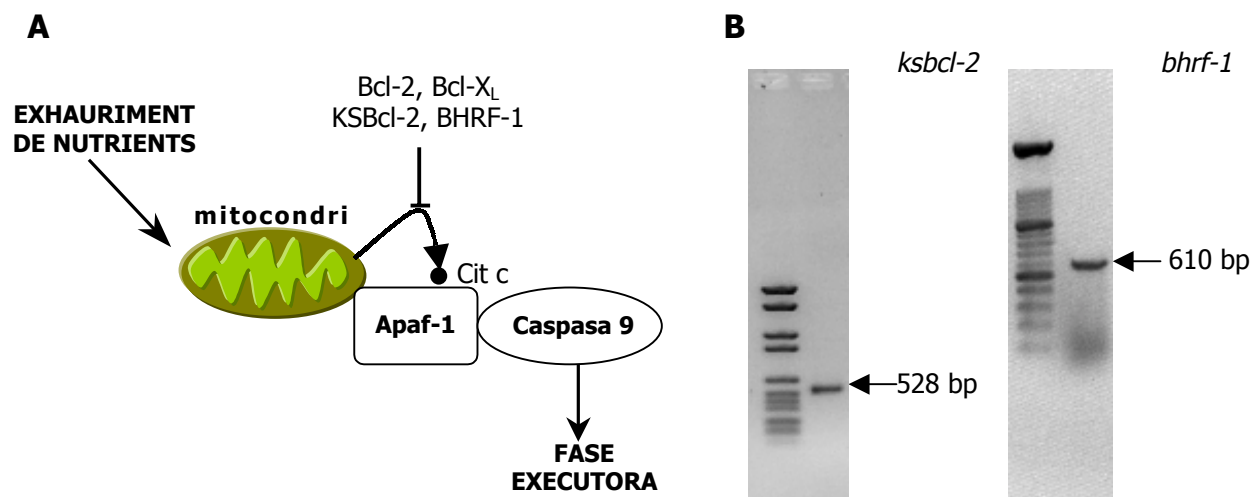


Figura 5.3. Inhibició de l'alliberament del Citocrom c de mitocondri i aïllament dels cDNA dels homòlegs vírics del Bcl-2. A. Nivell on actuen els gens de la família del Bcl-2; B. Aïllament dels homòlegs vírics del Bcl-2: *ksbcl-2* (per PCR; $T_h= 55\text{ }^\circ\text{C}$) i del *bhrf-1* (per RT-PCR de RNA total extret de cèl·lules Raji; $T_h= 55\text{ }^\circ\text{C}$).

D'aquests dos gens vírics, escollits en el treball que aquí es presenta, se'n destaquen les característiques següents:

- El virus herpes 8 humà (HHV8) és un virus associat al Sarcoma de Kaposi (KS). En el genoma del virus herpes es troba un gen que codifica per una proteïna homòloga a Bcl-2, anomenat *ksbcl-2*. El HHV8 està estretament associat a tumors i es creu que l'expressió del gen *ksbcl-2* podria inhibir el procés apoptòtic (Cheng et al., 1997b). El gen *ksbcl-2* (Figura 5.4B), del qual es mostra la seqüència extreta del NCBI a l'Annex A, va ser cedit per la Dra. J. M. Hardwick i es trobava inserit dins del vector pSG5 (Annex B). A la Taula 5.1, es mostra l'homologia d'aquesta seqüència respecte altres membres de la família del Bcl-2.

	BHRF-1	Bcl-2	Bcl-X _L	Mcl-1	Bax	Bak
KSBcl-2	19 %	15 %	17 %	16 %	20 %	17 %

Taula 5.1. Identitats de seqüència de la proteïna KSBcl-2 respecte altres membres de la família del Bcl-2.

- El virus d'Epstein-Barr (VEB) és un virus herpes humà tipus 4 responsable, entre d'altres malalties, del limfoma de Burkitt (Young et al., 1999). Aquest virus és capaç de mantenir la viabilitat de la població cel·lular infectada mitjançant la inhibició de l'apoptosi. Una de les proteïnes del virus *VEB* implicada en aquest procés és BHRF-1. Es tracta d'una proteïna homòloga a Bcl-2 que pot interferir en el balanç entre Bcl-2 i Bax i inhibir la mort cel·lular programada (Clearly et al., 1986; Khanim et al., 1997). El

cDNA de *bhrf-1* emprat en aquest treball s'ha aïllat de la línia cel·lular Raji (cedida pel Dep. d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona) que prové d'un limfoma de Burkitt. L'obtenció del cDNA de *bhrf-1* es va realitzar per RT-PCR a partir de RNA total de cèl·lules Raji (Figura 5.4B), purificat segons els protocol que es detalla al capítol de Materials i Mètodes (apartat 7.5.3). A l'Annex A, es mostra la seqüència del gen *bhrf-1* extreta del NCBI i els oligonucleòtids emprats com encebadors per amplificar el mRNA d'aquest gen es troben al Capítol 7 (Taula 7.2).

5.3. Inhibidors de Caspases

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, de forma similar al que s'ha explicat en l'apartat anterior referent als gens *bhrf-1* i *ksbcl-2*, o bé inhibint-les directament (Hardwick, 2001). Aquesta és una forma d'assegurar la propagació de la progènie vírica en la cèl·lula hoste, com és el cas també de les proteïnes P35 i X-IAP. La primera d'elles, originària de baculovirus, inhibeix fortament la Caspasa 3 (Bump et al., 1995), mentre que X-IAP és d'origen endogen i inhibeix fortament i de forma selectiva les Caspases 3, 7 i 9 (Deveraux i Reed, 1999). A la Figura 5.4A, es mostren els punts d'interferència d'aquests inhibidors en la via de les Caspases.

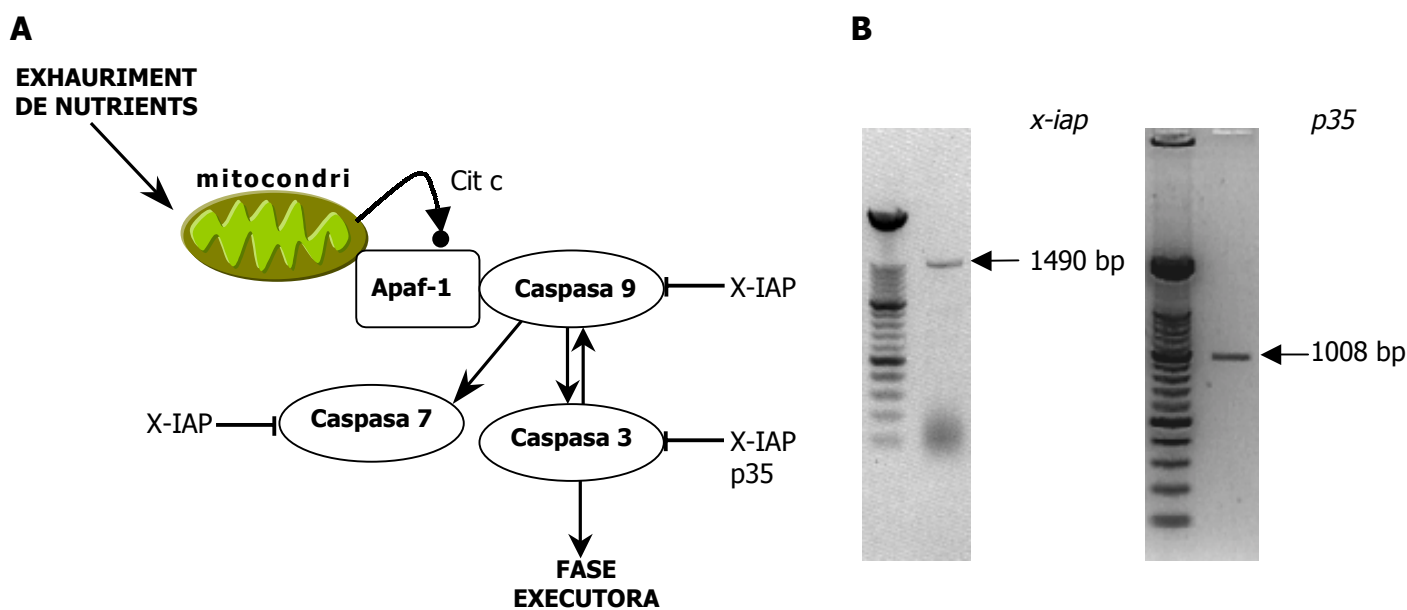


Figura 5.4. Inhibidors de Caspases. Nivell d'actuació de la proteïna endògena X-IAP i la vírica p35 en la cascada apoptòtica de l'hibridoma KB26.5 (A) i aïllament dels cDNA dels inhibidors de Caspases (B): *x-iap*, per RT-PCR ($T_h=50\text{ }^\circ\text{C}$) amb els encebadors que es descriuen al Capítol de Materials i Mètodes; i *p35*, per PCR ($T_h=60\text{ }^\circ\text{C}$) a partir del genoma sencer del baculovirus AcNPV amb els encebadors que es descriuen al capítol de Materials i Mètodes (veure Taula 7.2).

Com s'ha explicat, el gen *p35* del baculovirus AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) codifica una proteïna repressora de l'apoptosi en línies cel·lulars d'insectes i animals. Això és degut a que la proteïna P35 inhibeix l'apoptosi actuant especialment sobre la Caspasa-3 (Ekert et al., 1999). El gen que codifica per aquesta proteïna es va aïllar per PCR a partir de DNA genòmic del baculovirus AcNPV (veure Figura 5.4B).

D'altra banda, la X-IAP és membre de la família de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi o IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), que ha estat identificada en humans i murins, i que vam aïllar de l'hibridoma KB26.5 (veure Figura 5.4B; Vives et al., 2001b). Les IAPs són una família de proteïnes altament conservada al llarg de l'evolució. De tota manera, els mecanismes pels quals interfereixen en el procés de mort per apoptosi és encara desconegut. Se sap que les IAPs són inhibidors molt selectius, mentre que P35 té una especificitat més àmplia, fins i tot en Caspases filogenèticament diferents (Deveraux et al., 1999; Ekert et al., 1999).

Un cop coneguda la importància relativa de les diferents subfamílies de Caspases en el procés d'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5, es va determinar si era possible, mitjançant la sobreexpressió de P35 i X-IAP, mimetitzar els efectes dels inhibidors peptídics de les Caspases 3, 7 i 9 que, com s'ha mostrat en el Capítol 4, permeten la protecció i recuperació dels cultius en condicions inductores de mort per supressió de nutrients.

5.4. Estratègia de transfecció de l'hibridoma KB26.5

Per a la transferència del material genètic a l'hibridoma, es van realitzar experiments amb diferents reactius (FuGENE, Roche; Superfect, Qiagen; DMRIE-C, Life Technologies) i els resultats obtinguts van demostrar que el reactiu DMRIE-C era el que millor funcionava en la línia cel·lular d'hibridoma estudiada (veure apartat 7.12.1 del Capítol 7, de Materials i Mètodes), oferint una eficiència de l'ordre del 1-4 % (determinat amb estudis d'expressió transitòria amb la proteïna fluorescent EGFP, continguda en el vector pIRES2-EGFP).

L'experiència obtinguda en aquest treball ha permès comprovar que la transferència del material genètic a les cèl·lules en estudi és una metodologia que depèn de factors no controlats que comporten diferències en els resultats obtinguts en diferents tandes de transfecció. Això es fa

especialment evident en les cèl·lules d'hibridoma degut a la seva baixa eficiència de transfecció. Per aquest motiu, bo i haver determinat unes condicions òptimes de concentració de DNA i de reactiu de transfecció (4 µg de DNA i 8 µL de reactiu DMRIE-C), en aquest treball es van realitzar transfeccions per duplicat i en diverses tandes realitzades en dies diferents.

Donat que el plasmidi pcDNA3 conté com a marcador de selecció la resistència a neomicina, abans de transfectar, es va determinar la corba de viabilitat del cultiu d'hibridoma KB26.5 en presència de l'antibiòtic G418. Un cop obtinguda la corba de viabilitat (veure Figura 5.5), es van transfectar les construccions pcDNA3:*bcl-2*, pcDNA3:*bcl-x_L*, pcDNA3:*bhrf1*, pcDNA3:*ksbcl-2*, i pcDNA3:*p35* (Annex B) en l'hibridoma KB26.5 en un medi amb 3 mg·mL⁻¹ de G418 (concentració determinada a partir de la Figura 5.5).

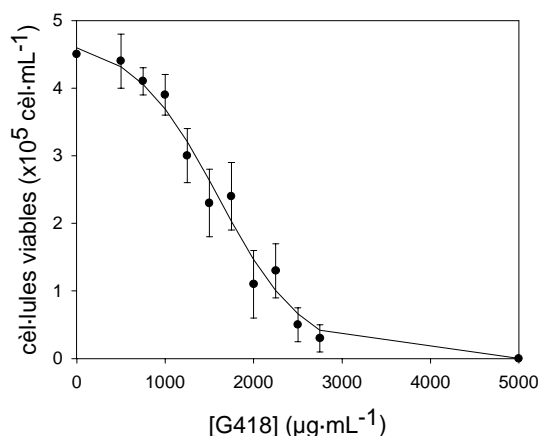


Figura 5.5. Corba de viabilitat del cultiu d'hibridoma KB26.5 en funció de la concentració de G418. Les dades han estat preses a les 2 setmanes de la inoculació del cultiu, degut al efecte lent de l'antibiòtic en la viabilitat cel·lular.

Quan els estudis són orientats a respondre preguntes de tipus qualitatiu o analític com és el nostre cas, normalment és suficient treballar amb cultius de mesclades de poblacions clonals, encara que només una fracció d'aquestes cèl·lules expressi la proteïna d'interès a nivells raonables (és normalment detectable per transferència *Western*, ELISA o assajos d'activitat) (Schlokot et al., 1997). Després de la transfecció i selecció, aproximadament del 5 al 30% de les cèl·lules expressen funcionalment la proteïna recombinant d'interès (Sambrook et al., 1989; Rees et al., 1996). Aquestes freqüències relativament baixes poden ser degudes a molts factors, entre els quals s'inclouen la deleció o inactivació de la cassette que expressa el gen d'interès o, en el cas de la cotransfecció, la integració estable d'únicament la cassette que expressa el marcador de selecció i no del gen d'interès. Així doncs, cal un crivellatge posterior de les colònies seleccionades per a la detecció de l'expressió específica del gen d'interès de manera que es trobin els clons funcionals. Endemés, els nivells d'expressió gènica no poden ser predits utilitzant aquest mètode estàndard; l'expressió és generalment baixa i, donat que la pressió

selectiva es troba únicament en la cassette que expressa el marcador de resistència a l'antibiòtic, els nivells d'expressió decreixen a mesura que augmenta el temps en el cultiu i el nombre de resembres.

En el treball que aquí es presenta, donat que l'interès se centra bàsicament en l'avaluació qualitativa de l'efecte d'una bateria de gens amb capacitat d'acció protectora de l'apoptosi, es va treballar amb poblacions clonals de cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3 nadiu (utilitzat com a control en els experiments de protecció de l'apoptosi i de recuperació) i amb la resta de construccions. D'aquesta forma, es van obtenir transfectants amb totes les construccions generades excepte per pcDNA3:*p35* i pcDNA3:*x-iap*, com s'explica a l'apartat 5.5.3.

5.5. Efectes de la sobreexpressió de gens protectors de l'apoptosi

5.5.1. Protectors endògens: Bcl-2 i Bcl-X_L

Al Capítol 3, s'han explicat les característiques de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-X_L que es localitzen a la membrana mitocondrial externa, però també a les membranes nuclear i del reticle endoplasmàtic. Com a possible mecanisme de la seva funció antiapoptòtica es proposa que bloquegen l'activitat proapoptòtica de Bax i Bak, unint-s'hi. De totes formes no queda clar si el Bcl-2 ha de formar homodímers amb sí mateix per aturar la ruta de mort (Gottlieb, 2000). El que sembla important és la relació de la concentració de membres antiapoptòtics respecte la dels membres proapoptòtics per a la decisió de mort (Al-Rubeai i Singh, 1998), tal i com es mostrava al Capítol 3. Els membres de la família del Bcl-2 podrien tenir diferents mecanismes de funció que no necessàriament han d'excloure's. Segons aquest esquema, es planteja la possibilitat que la sobreexpressió dels membres protectors de la família del Bcl-2 haurien de permetre desplaçar l'equilibri cap a la supervivència de les cèl·lules bo i trobar-se en condicions inductores de l'apoptosi.

Els cultius preparats per a la realització d'aquest experiment van ser els següents (Taula 5.2): cultiu control negatiu amb cèl·lules transfectades amb el vector plasmídic pcDNA3 nadiu; cultiu amb els transfectants del pcDNA3:*bcl-2*; cultiu amb els transfectants pcDNA3:*bcl-x_L*. Els experiments es van realitzar per triplicat. Les cèl·lules van ser cultivades en flascons no agitats amb 10 mL de medi DMEM 4% FCS, 0.3 mg·mL⁻¹ G418 sense glutamina, amb una concentració

d'inòcul de 5.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹. També es va preparar un control positiu per a cada transfectant amb medi complet DMEM 4% FCS i 0.3 mg·mL⁻¹ G418 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	Gln	construcció
control negatiu	-	pcDNA3
experiment 1	-	pcDNA3: <i>bcl-2</i>
experiment 2	-	pcDNA3: <i>bcl-x_L</i>
control positiu	+	pcDNA3
control positiu	+	pcDNA3: <i>bcl-2</i>
control positiu	+	pcDNA3: <i>bcl-x_L</i>

Taula 5.2. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments amb els transfectants obtinguts de l'hibridoma KB26.5 amb els vectors pcDNA3:*bcl-2* i pcDNA3:*bcl-x_L*.

Per confirmar la sobreexpressió del gen Bcl-2 es va realitzar una transferència *Western* i, tal i com es mostra a la Figura 5.6, es va detectar la sobreexpressió de Bcl-2 amb un anticòs monoclonal (veure apartat 7.16.5 del Capítol 7, de Materials i Mètodes).

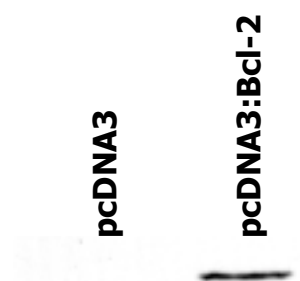


Figura 5.6. Determinació de la sobreexpressió del Bcl-2 en els transfectants de pcDNA3:*bcl-2*. Per confirmar la sobreexpressió del Bcl-2 en els transfectants, s'ha realitzat un *Western* amb l'ús d'un anticòs monoclonal dirigit al Bcl-2 murí (veure Capítol 7, de Materials i Mètodes). A diferència de la identificació del Bcl-2 endogen (Capítol 3), en la qual era necessària la detecció amb el reactiu luminescent *Femto* (Pierce), per a la detecció de la sobreexpressió del Bcl-2 és suficient l'ús del reactiu *Pico* (Pierce). Per aquest motiu, no s'observa cap banda corresponent al Bcl-2 endogen en el carril on ha correbut la mostra de cèl·lules transfectades amb el pcDNA3 nadiu.

A la Figura 5.7, es mostren els resultats obtinguts amb els transfectants del Bcl-2 i el Bcl-X_L en experiments en absència de glutamina al medi. L'evolució de la concentració de cèl·lules viables mostra clarament l'efecte protector del Bcl-2 en l'hibridoma fins, aproximadament, les 40 hores de cultiu en condicions inductores de l'apoptosi (Figura 5.7A). Així, el percentatge de cèl·lules Annexina-positives roman pràcticament constant fins a les 48 hores de cultiu en medi mancat de glutamina (Figura 5.7B). Això és d'especial importància en comparació amb la disminució brusca de la viabilitat en el cultiu control. Ara bé, observi's com a les 72 hores de cultiu, no resten pràcticament cèl·lules viables ni en el cultiu control ni en el cultiu amb els transfectants del Bcl-2 i el Bcl-X_L. Aquest fet sembla donar encara més importància a la proteòlisi específica d'aquestes proteïnes per part de les Caspases, que converteixen l'activitat protectora de

l'apoptosi que tenen Bcl-2 i Bcl-X_L en promotora. Això queda clarament reflectit en la velocitat de mort dels transfectants, respecte les cèl·lules del cultiu control (Figura 5.7A).

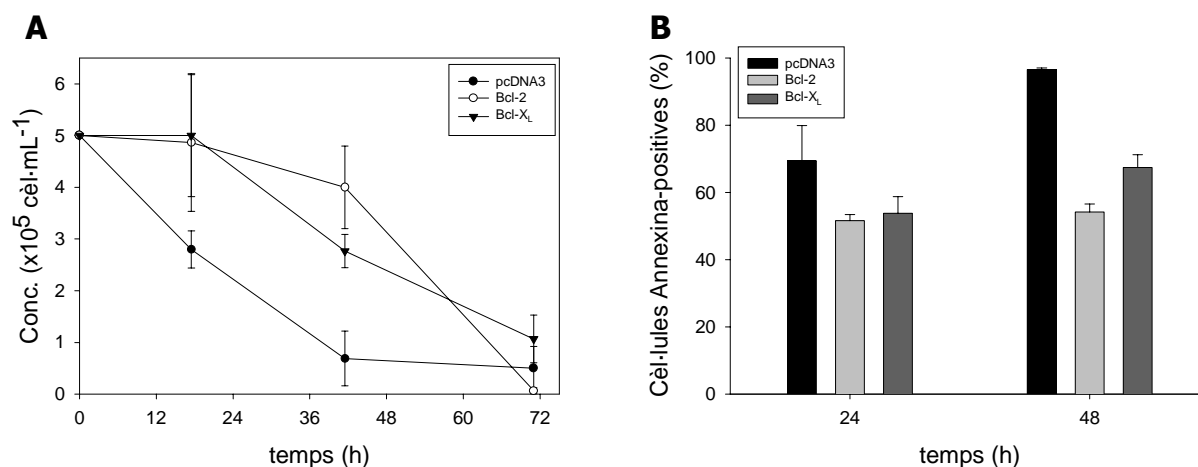


Figura 5.7. Efecte de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-X_L en l'hibridoma KB26.5. A. Evolució de la concentració de cèl·lules viables; B. Percentatge de cèl·lules que presenten translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtingut per citometria de flux.



Figura 5.8. Fragmentació de DNA de mostres de cultius dels transfectants del Bcl-2 cultivats en medis sense glutamina. En les mostres de DNA extretes i separades electroforèticament en gels d'agarosa s'observa el patró típic de fragmentació del DNA a les 24 h (carril 1) i a les 48h (carril 2). Amb una fletxa, s'indica el DNA genòmic que roman íntegre bo i el prolongat període de temps d'exposició a condicions inductores de l'apoptosi.

Es va extreure DNA genòmic de les diferents mostres i es van fer córrer en gels d'agarosa amb la finalitat de comprovar si es donava o no la fragmentació de DNA típica de les cèl·lules d'hibridoma que moren per apoptosi. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 5.8. La fragmentació visible tant en el control com en les mostres procedents dels transfectants es deu, probablement, a la mescla 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.

També es van realitzar experiments de recuperació a les 12, 24 i 48 hores. Els resultats obtinguts, que es mostren a la Taula 5.3, són molt positius donat que fou possible recuperar la

viabilitat cel·lular dels cultius de cèl·lules transfectades amb *bcl-2* i *bcl-x_L* després d'aquests intervals de temps sota condicions inductores de l'apoptosi.

CULTIUS SENSE GLUTAMINA	temps (hores)		
	12	24	48
pcDNA3	+	-	-
pcDNA3: <i>bcl-2</i>	+	+	+
pcDNA3: <i>bcl-x_L</i>	+	+	+

Taula 5.3. Recuperació de la viabilitat de mostres extretes a diferents intervals de temps dels cultius de l'experiment de retorn amb els transfectants pcDNA3:*bcl-2* i pcDNA3:*bcl-x_L*. Els símbols emprats representen el següent: '+' per als cultius que recuperen la viabilitat en medi amb glutamina; '-' per als cultius que no són capaços de recuperar la viabilitat cel·lular en medi amb glutamina.

Els resultats obtinguts permeten concloure que tant Bcl-2 com Bcl-X_L són bons candidats per ser utilitzats en la generació de noves línies cel·lulars que expressin aquests gens antiapoptòtics ja que mostren un clar efecte en el manteniment de la viabilitat en condicions inductores de l'apoptosi en medis mancats de glutamina si bé, a les 72 hores de cultiu, el nombre de cèl·lules viables va disminuir molt ràpidament fins assolir valors molt semblants als del control.

5.5.2. Protectors vírics: KSBcl-2 i BHRF-1

Per comprovar l'efecte protector contra l'apoptosi dels gens vírics *ksbcl-2* i *bhrf-1*, es van realitzar un seguit d'experiments utilitzant, com a control, cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3, ja que aquest vector no conté cap gen d'interès i no confereix a la cèl·lula cap avantatge enfront l'apoptosi.

Els cultius preparats per a la realització d'aquest experiment van ser els següents (Taula 5.4): cultiu control negatiu amb cèl·lules transfectades amb el vector plasmídic pcDNA3 nadiu; cultiu amb els transfectants del pcDNA3:*ksbcl-2*; cultiu amb els transfectants pcDNA3:*bhrf-1*. Els experiments es van realitzar per triplicat. Les cèl·lules van ser cultivades en flascons no agitats amb 10 mL de medi DMEM 4% FCS, 0.3 mg·mL⁻¹ G418 sense glutamina, amb una concentració d'inòcul de 5.0x10⁵ cèl·lules viables·mL⁻¹. També es va preparar un control positiu per a cada transfectant amb medi complet DMEM 4% FCS i 0.3 mg·mL⁻¹ G418 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	Gln	construcció
control negatiu	-	pcDNA3
experiment 1	-	pcDNA3: <i>ksbcl-2</i>
experiment 2	-	pcDNA3: <i>bhrf-1</i>
control positiu	+	pcDNA3
control positiu	+	pcDNA3: <i>ksbcl-2</i>
control positiu	+	pcDNA3: <i>bhrf-1</i>

Taula 5.4. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments amb els transfectants obtinguts de l'hibridoma KB26.5 amb els vectors pcDNA3:*ksbcl-2* i pcDNA3:*bhrf-1*.

A la Figura 5.9, es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables i el percentatge de cèl·lules Annexina-positives. S'observa que tant les cèl·lules transfectades amb la construcció pcDNA3:*ksbcl-2* com amb pcDNA3:*bhrf-1* triguen més temps a morir que les del cultiu control i, per tant, s'aconsegueix retardar l'apoptosi de forma molt efectiva, especialment en el cultiu realitzat amb els transfectants del *bhrf-1*. És en aquest cultiu on la viabilitat es manté per damunt de les $3 \cdot 10^5$ cèl·lules viables·mL⁻¹ fins i tot a les 72 hores, fet que no es va observar ni en el cas del KSBcl-2 ni dels seus homòlegs endògens Bcl-2 i Bcl-X_L.

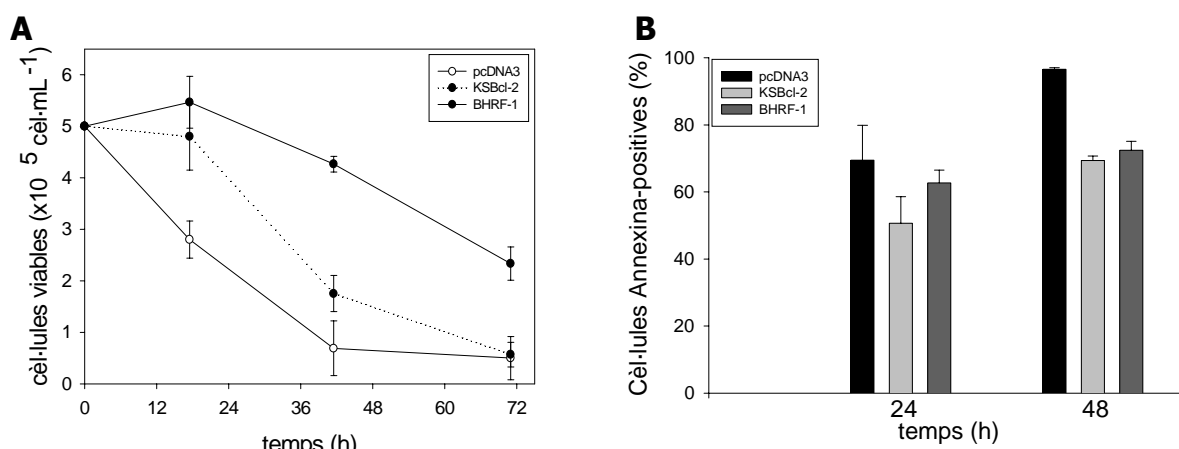


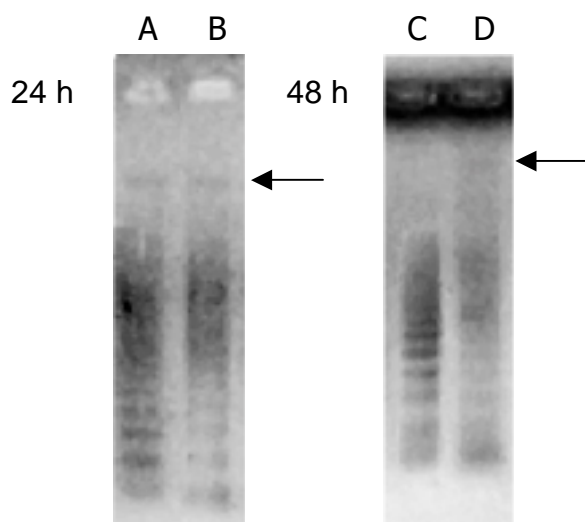
Figura 5.9. Efecte de l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques KSBcl-2 i BHRF-1 en l'hibridoma KB26.5. A. Evolució de la concentració de cèl·lules viables; B. Percentatge de cèl·lules que presenten translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtingut per citometria de flux.

Endemés, a banda dels resultats del seguiment de la viabilitat (Figura 5.9A), el seu efecte protector queda reflectit en el percentatge de cèl·lules Annexina-positives (Figura 5.9B). La detecció de cèl·lules apoptòtiques mitjançant aquest tipus de marcatge mostra un efecte molt clar respecte el control. Així, a les 24 i a les 48 hores, els cultius dels transfectants tant del *ksbcl-2* com del *bhrf-1* mostren un percentatge de cèl·lules Annexina-positives inferior al del cultiu control. Aquesta diferència és molt evident a les 24 hores, on aproximadament hi ha un 50 %, pel cas del KSBcl-2, i d'un 60 %, pel BHRF-1, respecte el 70% de cèl·lules apoptòtiques en el

cultiu control. A les 48 hores, els cultius dels transfectants presenten un percentatge superior de cèl·lules Annexina-positives, però sempre valors inferiors als obtinguts en els cultius control.

Aquests resultats confirmen la capacitat de retardar l'apoptosi que ofereixen els gens *ksbcl-2* i *bhrf-1* en les cèl·lules d'hibridoma que els expressen. Observi's també com a les 72 hores (Figura 5.9A), encara hi ha una concentració gens menyspreable de cèl·lules viables en els cultius amb els transfectants que expressen la proteïna BHRF-1, en contraposició amb la pràcticament total pèrdua de viabilitat dels cultius control i dels transfectants del *ksbcl-2*. Malauradament, no es disposa de cap anticòs que reconegui cap de les dues proteïnes expressades que permetés realitzar transferències *Western* de control dels nivells de sobreexpressió d'ambdós gens vírics en els transfectants generats. De totes formes, el seu efecte és evident en els resultats presentats a la Figura 5.7.

Es va extreure DNA genòmic dels cultius a les 24 i 48 hores per observar la fragmentació de DNA, a l'igual que en el cas del Bcl-2 i el Bcl-X_L. A l'exposar les cèl·lules a medis que no contenen glutamina en la seva formulació, aquelles que contenen únicament el vector pcDNA3 buit mostren fragmentació de DNA a les 24 hores i una fragmentació molt més avançada de tot el seu DNA genòmic a les 48 hores. En canvi, les cèl·lules que han incorporat els gens *ksbcl-2* i *bhrf-1*, a banda de presentar la inevitable fragmentació de DNA pel fet d'estar treballant amb poblacions clonals enlloc de clons individuals, presenten també una banda a la part superior del gel corresponent al DNA genòmic no fragmentat de les cèl·lules que han incorporat el gen antiapoptòtic i que són resistents a la inducció de l'apoptosi per esgotament de glutamina al medi de cultiu. Aquest efecte s'observa fins i tot a les 48 hores de cultiu. El cultiu control únicament mostra la típica escala de fragments de DNA múltiples de 200 parells de bases. A la Figura 5.10,



es mostra com exemple el cas dels transfectants del KSBcl-2, encara que pel BHRF-1 s'han obtingut resultats similars.

Figura 5.10. Fragmentació de DNA. Fotografia de dos gels d'agarosa en els quals s'han fet migrar mostres de material genètic extretes de dos cultius diferents en medi DMEM 4% FCS, 3 mg·mL⁻¹ G418, sense glutamina: A, cultiu control a les 24 h; B, cultiu transfectants KSBcl-2 a les 24 h; C, cultiu control a les 48 h; D, cultiu transfectants KSBcl-2 a les 48 h.

També, a l'igual que en el cas del Bcl-2 i el Bcl-X_L, es va estudiar fins a quin punt l'efecte protector dels gens *ksbcl-2* i *bhrf-1* podia permetre la recuperació de la viabilitat del cultiu després de determinats períodes de cultiu en condicions desfavorables, com ara la manca d'un nutrient essencial. Per aquest motiu, es va preparar un experiment amb cèl·lules d'hibridoma transfectades amb les construccions pcDNA3:*ksbcl-2* i pcDNA3:*bhrf-1* 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. Com a cultiu control, es va utilitzar cèl·lules d'hibridoma transfectades amb el vector pcDNA3.

Els resultats obtinguts mostraren que tant els transfectants que expressen el KSBcl-2 com els que expressen el BHRF-1 es recuperen passades les 40 hores de cultiu en condicions inductores de l'apoptosi, fet que no esdevé amb els transfectants que contenen el vector pcDNA3 buit (Taula 5.5).

CULTIUS SENSE GLUTAMINA	temps (hores)		
	12	24	48
pcDNA3	+	-	-
pcDNA3: <i>ksbcl-2</i>	+	+	+
pcDNA3: <i>bhrf-1</i>	+	+	+

Taula 5.5. Recuperació de la viabilitat de mostres extretes a diferents intervals de temps dels cultius de l'experiment de retorn amb els transfectants pcDNA3:*ksbcl-2* i pcDNA3:*bhrf-1*. Els símbols emprats representen el següent: '+' per als cultius que recuperen la viabilitat en medi amb glutamina; '-' per als cultius que no són capaços de recuperar la viabilitat cel·lular en medi amb glutamina.

Aquests resultats són de gran interès en l'estratègia de creació de noves línies cel·lulars més robustes donat que, com passava amb el Bcl-2 i el Bcl-X_L, la sobreexpressió d'un únic gen antiapoptòtic mimetitzava l'efecte observat amb els inhibidors peptídics de les Caspases.

Com a exemple del seguiment de la viabilitat d'aquests cultius, a la Figura 5.11, es mostra el resultat obtingut en l'experiment de recuperació dels cultius control (pcDNA3 buit) i el del pcDNA3:*ksbcl-2* sotmesos a condicions de manca de glutamina durant 41.5 hores. Com es pot apreciar, les cèl·lules que han incorporat el gen *ksbcl-2* es recuperen a les 96 hores, a diferència del cultiu control. Aquest fet demostra que és possible recuperar el cultiu després d'intervals de temps considerables de cultiu en condicions desfavorables.

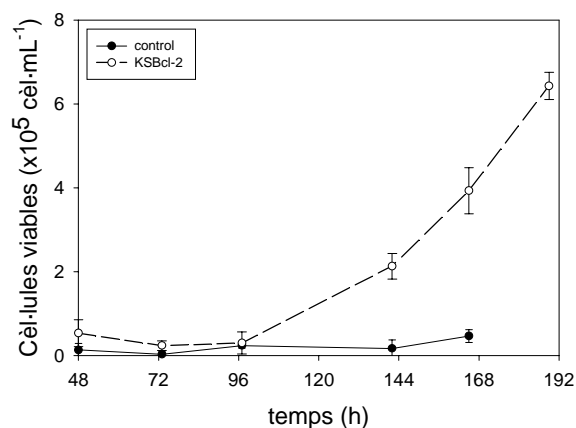


Figura 5.11. Recuperació de cultius cel·lulars sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi per manca de glutamina durant 48 hores. Corbes de creixement de les cèl·lules transfectades en un medi òptim, després d'haver estat privades de glutamina.

Dels quatre gens provats fins aquest moment, els resultats obtinguts indiquen que la sobreexpressió del gen *bhrf-1* proporciona l'efecte més significatiu sobre la inhibició de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5, suggerint la possibilitat d'utilitzar-lo en soques modificades genèticament per a la producció d'anticossos monoclonals.

A continuació, es mostren els resultats de l'exploració de la interferència de proteïnes inhibidores de les Caspases. Com es veurà més endavant, l'èxit en la inhibició de l'apoptosi en aquest punt permetria la possibilitat de crear molècules quimèriques capaces d'inhibir alhora a diferents nivells de la ruta bioquímica de l'apoptosi.

5.5.3. Inhibidors de Caspases: X-IAP i p35

Les construccions pcDNA3:*p35* i pcDNA3:*x-iap* van ser transfectades en diverses tandes diferents a l'hibridoma KB26.5. Malauradament, en cap cas no va ser possible obtenir transfectants. Com que podria donar-se el cas que les construccions continguessin algun error en la pauta de lectura es va procedir a la seqüenciació dels seus cDNA i, en el cas de la X-IAP, també es va realitzar la transcripció i traducció *in vitro* per comprovar que el producte gènic era del tamany esperat. Els resultats de les seqüenciacions foren els esperats i el tamany de la proteïna obtinguda per transcripció i traducció *in vitro* tenia també el tamany predit (veure Figura 5.12).

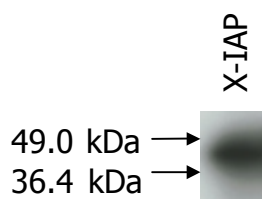


Figura 5.12. Transcripció i traducció *in vitro* de la construcció pcDNA3:*x-iap*. La banda obtinguda marcada amb S³⁴ té el tamany esperat, d'aproximadament 42 kDa.

Podria ser, doncs, que la construcció generada fos tòxica per a les cèl·lules. Encara que hi ha moltes altres possibilitats que poden considerar-se com que el promotor P_{CMV} no fos funcional o bé que la cassette amb la resistència a l'antibiòtic hagués patit alguna mutació en el procés d'obtenció de les construccions. De totes formes, més endavant en aquest mateix capítol, es mostren els resultats obtinguts amb construccions de p35 en un altre vector, pIRESpuo2, que tampoc va solucionar el problema de l'obtenció de transfectants (apartat 5.8.1).

Bo i això, no es van voler descartar aquestes proteïnes pel potencial que la literatura els ofereix com a inhibidores de les Caspases i protectores de l'apoptosi i, a partir d'aquí, el treball amb ells es va centrar en la X-IAP donat que sembla inhibir més fortament les Caspases 3, 7 i 9, que no pas p35. Així, es va treballar en l'obtenció d'una construcció que contigués únicament els dominis Bir2 i Bir3, responsables de la unió a les Caspases anteriorment esmentades.

5.5.4. X-IAP mínima

Estudis recents han permès conèixer quines són les regions de longitud mínima amb capacitat inhibidora (Sun et al., 1999 i 2000; Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001). A més a més, es coneix que el residu Asp²⁴² és una diana per a la proteòlisi per Caspases (Deveraux et al., 1999a). Amb aquesta informació, i a partir de la seqüència de la X-IAP, s'ha amplificat la regió corresponent als dominis Bir2 i Bir3 amb els encebadors mutagènics, la seqüència dels quals es detalla a l'apartat 7.6.4.1 del Capítol 7, de manera que el resultat ha estat l'obtenció de la regió de llargària mínima per a la inhibició de les Caspases 3, 7 i 9, i que hauria de ser resistent a l'acció de les cisteïna-proteases gràcies a la mutació D242A (veure la Figura 5.13).

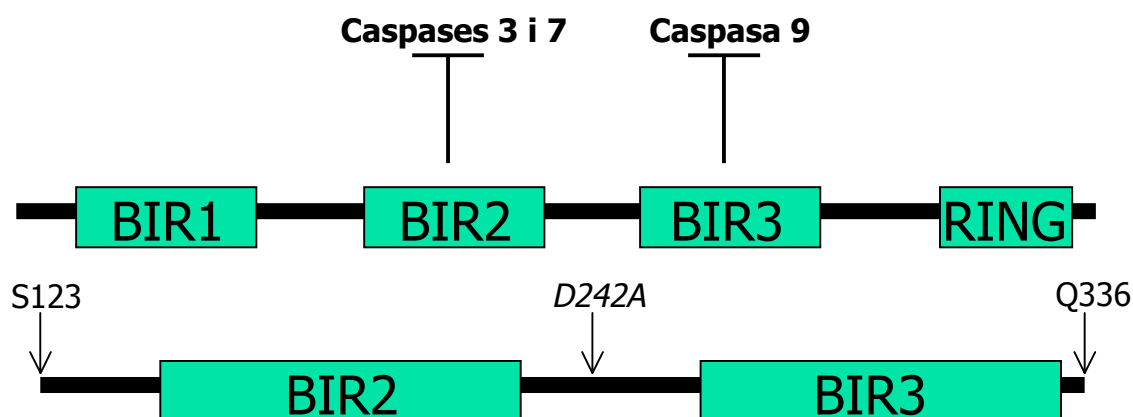


Figura 5.13. Estructura de la X-IAP i de la construcció X-IAP mínima que conté els dominis inhibidors Bir2 i Bir3 (Donatello). Per assegurar l'activitat inhibidora dels dominis Bir2 i Bir3, s'ha amplificat la seqüència compresa entre la Ser¹²³ i la Q³³⁶, donat que estudis recents semblen indicar que l'activitat inhibidora de la X-IAP vers les Caspases 3 i 7 és deguda a la regió d'unio entre dominis i no pas al propi domini Bir2 (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001).

La informació detallada de com es va generar la construcció de la seqüència de la X-IAP mínima mutada es troba al Capítol 7, de Materials i Mètodes. A partir d'aquest moment, cada cop que s'hagi de fer referència al mutant "Bir2-Bir3 (X-IAP) D242A", es farà amb el nom *Donatello*.

A la Figura 5.14, es mostren els resultats obtinguts en els estudis de transcripció i traducció *in vitro* que es van realitzar per assegurar que la seqüència de DNA generada pel mutant *Donatello* codificava per una proteïna del tamany esperat.



Figura 5.14. Transcripció i traducció *in vitro* del mutant *Donatello*. S'ha obtingut una molècula del tamany esperat, d'aproximadament 29 kDa.

Per comprovar l'efecte protector contra l'apoptosi de la X-IAP mínima, es va realitzar un experiment per triplicat utilitzant, com a control negatiu, cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3 nadiu i transfectants d'hibridoma del pcDNA3:*Donatello*.

Les cèl·lules van ser cultivades en flascons no agitats amb 10 mL de dos tipus diferents de medi (veure Taula 5.6): es va treballar amb medi DMEM 4% FCS, 0.3 mg·mL⁻¹ G418 sense glutamina. En tots els casos, la concentració d'inòcul fou 5.0x10⁵ cèl·lules viables·mL⁻¹. També es va preparar un control positiu per a cada transfectant amb medi complet DMEM 4% FCS i 0.3 mg·mL⁻¹ G418 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	Gln	construcció
control negatiu	-	pcDNA3
experiment 1	-	pcDNA3: <i>Donatello</i>
control positiu	+	pcDNA3
control positiu	+	pcDNA3: <i>Donatello</i>

Taula 5.6. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments amb els transfectants obtinguts de l'hibridoma KB26.5 amb els vectors pcDNA3 i pcDNA3:*Donatello*.

L'experiment de transferència *Western* per comprovar la sobreexpressió del mutant *Donatello* es mostra a la Figura 5.15.

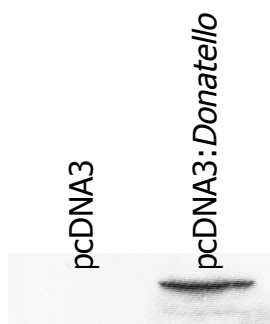


Figura 5.15. Transferència Western per a la detecció del mutant *Donatello*. Mitjançant l'ús de l'anticòs anti-myc, descrit al Capítol 7 de Materials i Mètodes, s'ha identificat l'expressió de la proteïna *Donatello* en els transfectants d'hibridoma (d'aproximadament 29 kDa).

A la Figura 5.16A, es mostren els resultats del seguiment de la viabilitat dels cultius control i dels transfectants pcDNA3:*Donatello*. Observi's l'efecte protector de l'apoptosi que ofereix aquest mutant. De totes formes, els resultats no són tan evidents com els obtinguts amb els membres protectors de la família del Bcl-2 (Figures 5.7A i 5.9A).

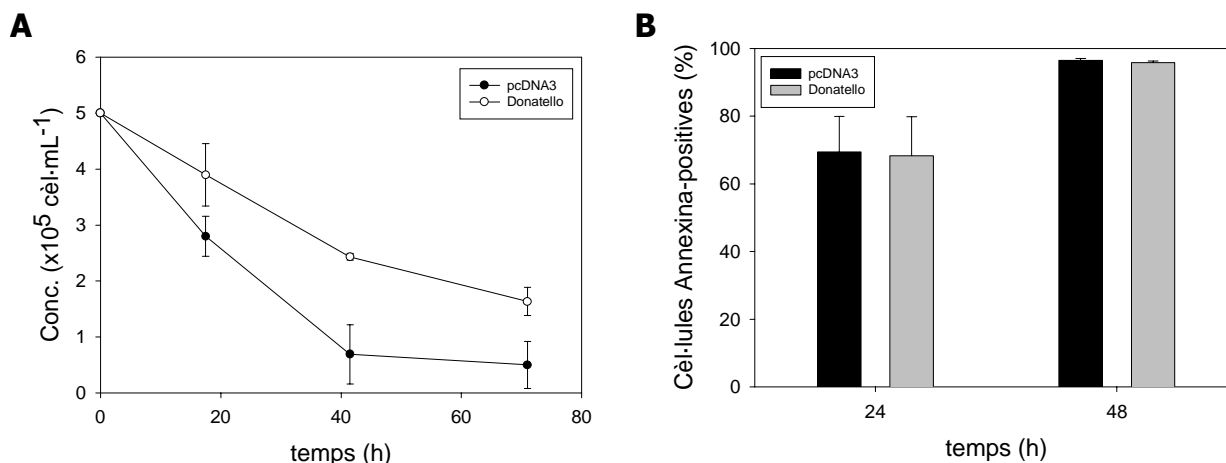


Figura 5.16. Evolució de la viabilitat i del percentatge de cèl·lules Annexina-positives dels transfectants del pcDNA3:*Donatello* respecte el cultiu control transfectat amb pcDNA3 buit en medis mancats de glutamina. Evolució de la densitat de cèl·lules viables (A) i percentatge de cèl·lules Annexina-positives (B).

Pel que fa a la detecció de cèl·lules apoptòtiques mitjançant Annexina-V-fluos (Figura 5.16B), no s'observa diferència significatives entre el cultiu control i el dels transfectants del mutant *Donatello* (69.4 ± 10.5 % del control respecte 68.3 ± 11.5 % del mutant, a les 24 hores; i 96.5 ± 0.5 % del control respecte 95.8 ± 0.5 % del mutant, a les 48 hores).

Si bé els efectes obtinguts en la inhibició amb el mutant *Donatello* no són tan espectaculars com aquells obtinguts amb la sobreexpressió dels gens de la família del Bcl-2, a més a més no fou possible recuperar la viabilitat dels cultius mancats de glutamina (veure Taula 5.7), sí que s'observa certa protecció en medis deprivats de glutamina.

Aquesta lleugera protecció podria explicar-se pel fet que si bé el mutant hauria d'inhibir les Caspases 3, 7 i 9, els valors d'aquesta inhibició només són millors als dels inhibidors peptídics utilitzats en el Capítol anterior per a la Caspasa 7 però no per a les Caspases 9 i 3, justament aquelles a les que s'atribueix un paper més important en la mort per apoptosi de l'hibridoma KB26.5 (els valors es mostraven a la Taula 4.10).

CULTIUS SENSE GLUTAMINA	temps (hores)		
	12	24	48
pcDNA3	+	-	-
pcDNA3: <i>Donatello</i>	+	-	-

Taula 5.7. Recuperació de la viabilitat de mostres extretes a diferents intervals de temps dels cultius de l'experiment de retorn amb els transfectants pcDNA3:*Donatello*. Els símbols emprats representen el següent: '+' per als cultius que recuperen la viabilitat en medi amb glutamina; '-' per als cultius que no són capaços de recuperar la viabilitat cel·lular en medi amb glutamina.

Per aquest motiu, es va voler sumar la capacitat inhibidora de les proteïnes antiapoptòtiques de la família del Bcl-2 amb la del mutant *Donatello*. Així, es va treballar en el que anomenem els *súperinhibidors*, és a dir molècules quimèriques que contenen els dominis inhibidors de Caspases i protectors de l'apoptosi a nivell mitocondrial de manera que es pugui obtenir una protecció eficaç a dos nivells diferents de la complexa ruta bioquímica de l'apoptosi.

En l'apartat següent es mostren les dues molècules generades que reuneixen aquestes característiques i els resultats obtinguts en l'hibridoma KB26.5.

5.6. Inhibició creuada: els *súperinhibidors*

Com s'ha explicat anteriorment, de cara a la protecció de l'apoptosi en cèl·lules d'hibridoma, s'ha volgut crear molècules quimèriques que tinguessin les característiques protectores dels membres de la família del Bcl-2 i les dels inhibidors de les Caspases. Per aquest motiu, s'han generat mutants quimèrics amb la seqüència *Donatello* i del Bcl-2.

5.6.1. Els mutants *Michelangelo* i *Leonardo*

Al començament d'aquest Capítol s'ha mostrat l'efecte protector del Bcl-2 en hibridomes en condicions de manca de nutrients. No obstant això, alguns treballs especulen que la funció antiapoptòtica del Bcl-2 depèn més de l'estat de fosforilació de la proteïna que no pas dels seus

nivells d'expressió (Srivastava et al., 1998; Chadebech et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Yokote et al., 2000; Breitschopf et al., 2000).

Per aquest motiu, a banda de generar una proteïna quimèrica *Donatello:Bcl-2*, es va voler estudiar l'efecte de la mutació dels residus Serina involucrats en el procés de regulació de forma que la seva fosforilació no sigui possible. En aquest mutant, s'ha volgut evitar la proteòlisi específica del residu Asp³⁴ del Bcl-2 per part de la Caspasa 3 que, un cop iniciada la PCD, provoca la inversió de la seva activitat protectora de l'apoptosi en promotora d'aquesta (Tanaka et al., 1992; Cheng et al., 1997a). Es pensa que aquest tall és necessari per a que les cèl·lules morin (Wang et al., 1999a). Per evitar això, s'ha generat un mutant que no pot ser proteolitzat per les Caspases: és el Bcl-2 (D34A/S70A/S87A) que es mostra a la Figura 5.17.

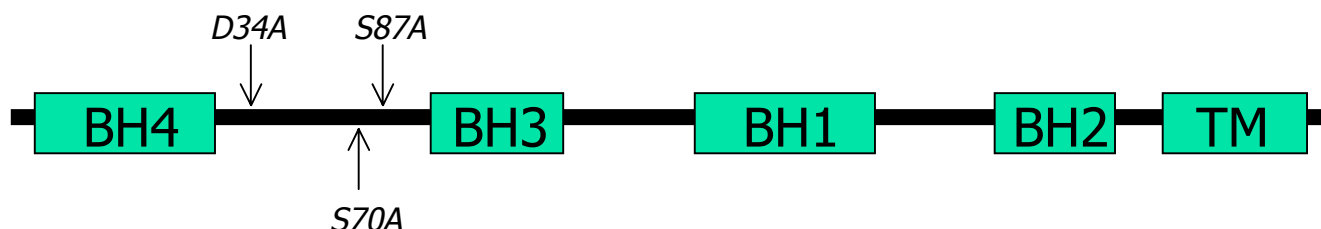


Figura 5.17. Dianes per la mutagènesi dirigida en el Bcl-2. Es representen els dominis BH1-4 i el domini transmembrana TM, juntament amb els punts de fosforilació (Ser⁷⁰ i Ser⁸⁷) i de proteolització per la Caspasa 3 (Asp³⁴).

Amb l'objectiu de trobar una única molècula capaç d'aturar el senyal apoptòtic a diferents nivells, s'ha generat dues construccions que contenen els dominis Bir2 i Bir3 de la seqüència de la X-IAP i la mutació D242A, que la fa resistent a la proteòlisi per part de la Caspasa 3, fusionada amb les seqüències del Bcl-2 salvatge, en un cas; i amb el triple mutant del Bcl-2, en l'altre. Aquests mutants s'han generat de la manera en que es detalla al Capítol de Materials i Mètodes (apartat 7.6.4).

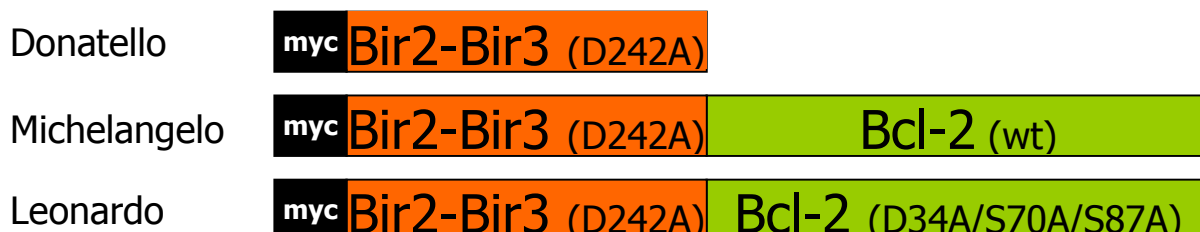


Figura 5.18. Esquema dels tres mutants generats en aquest treball amb l'objectiu de crear súperinhibidors. La fosforilació en la regió desestructurada del Bcl-2 compresa entre els dominis BH4 i BH3 pot modificar l'activitat dels membres de la família del Bcl-2. Per aquest motiu s'ha generat un mutant que no pot ser fosforilat en les Ser⁷⁰ i Ser⁸⁷ i que tampoc pot ser proteolitzat per la Caspasa 3 en l'Asp³⁴.

A la Figura 5.18, es representa de forma esquemàtica l'estructura dels mutants generats en aquesta part del treball en comparació amb el mutant *Donatello* amb el que s'havia treballat anteriorment.

Al ser molècules que contenen, en alguns casos, fins a quatre mutacions, es va verificar la seva seqüència mitjançant seqüenciació de les construccions generades i la transcripció i traducció *in vitro* (Figura 5.19), per assegurar la mida correcte de la proteïna codificada per cadascun dels mutants.

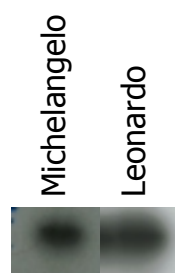


Figura 5.19. Comprovació de la mida de les construccions *Michelangelo* i *Leonardo* generades per *overlap* PCR (veure Materials i mètodes). Bo i haver realitzat la seqüenciació de les construccions generades, també s'ha realitzat la transcripció i traducció *in vitro* per comprovar que la mida de la proteïna obtinguda és l'esperada (d'aproximadament 54 kDa).

5.6.2. Efecte dels mutants en la protecció de l'apoptosi

Per comprovar l'efecte protector contra l'apoptosi dels mutants generats, es va realitzar un experiment de protecció de l'apoptosi per triplicat en medis mancats de glutamina (Taula 5.8). Com a control negatiu, es van emprar cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3 nadiu.

cultiu	Gln	construcció
control negatiu	-	pcDNA3
experiment 1	-	pcDNA3: <i>Michelangelo</i>
experiment 2	-	pcDNA3: <i>Leonardo</i>
control positiu	+	pcDNA3
control positiu	+	pcDNA3: <i>Michelangelo</i>
control positiu	+	pcDNA3: <i>Leonardo</i>

Taula 5.8. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments amb els transfectants obtinguts de l'hibridoma KB26.5 amb els vectors pcDNA3, pcDNA3:*Michelangelo* i pcDNA3:*Leonardo*.

Les cèl·lules van ser cultivades en flascons no agitats amb 10 mL de medi DMEM 4% FCS, 0.3 mg·mL⁻¹ G418 sense glutamina.

La concentració d'inòcul va ser de 5.0x10⁵ cèl·lules viables·mL⁻¹. També es va preparar un control positiu per a cada transfectant amb medi complet DMEM 4% FCS i 0.3 mg·mL⁻¹ G418

per verificar que l'inòcul creixia normalment en un medi amb tots els nutrients. Els resultats obtinguts en aquest control no han estat inclosos.

Els productes gènics *Michelangelo* i *Leonardo* es van comprovar per transferència *Western*, utilitzant l'anticòs anti-*myc* (Figura 5.20) com en el cas de la detecció de l'expressió del mutant *Donatello*, ja que tots ells contenen l'epítot *myc* a la seva seqüència.

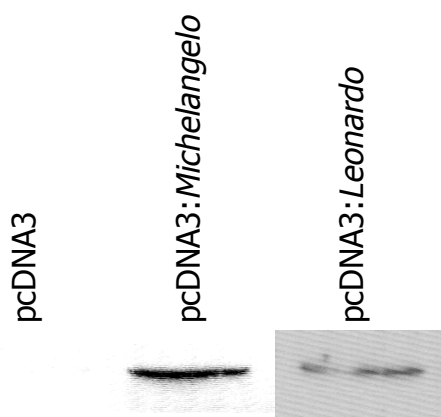


Figura 5.20. Detecció de la sobreexpressió dels mutants *Michelangelo* i *Leonardo* en els transfectants de l'hibridoma KB26.5. Bandes obtingudes amb l'anticòs anti-*myc* que detecta l'epítot *myc* incorporat en 5' a la seqüència dels mutants *Donatello* i *Michelangelo*. Ambdues tenen el mateix pes molecular, d'aproximadament 54 kDa.

A la Figura 5.21, es mostren els resultats en la viabilitat i translocació de fosfatidilserina en experiments realitzats amb els transfectants que expressen les construccions *Michelangelo* i *Leonardo* en condicions inductores de l'apoptosi per manca de glutamina.

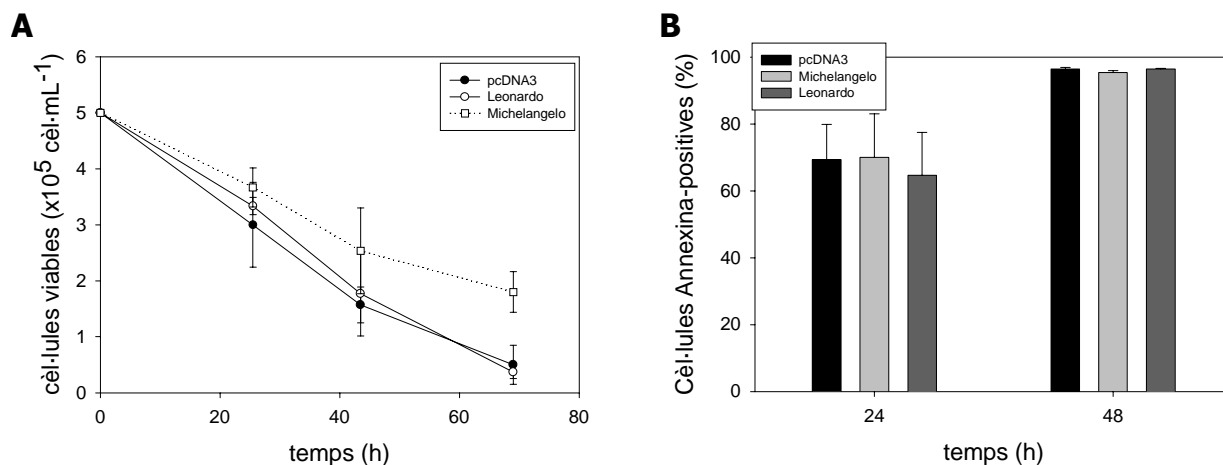


Figura 5.21. Resultats obtinguts en medis sense glutamina amb els transfectants pcDNA3:*Michelangelo*, pcDNA3:*Leonardo* i el control transfectat amb el vector pcDNA3 nadiu. A. Evolució de la concentració de cèl·lules viables; B. Percentatge de cèl·lules que presenten translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtingut per citometria de flux.

Bo i el lleuger efecte en la protecció del nombre de cèl·lules viables que s'observa per als transfectants de la construcció pcDNA3:*Michelangelo*, no fou possible, recuperar els cultius cel·lulars després de les 24 hores de tractament en condicions inductores de l'apoptosi per manca

de glutamina (veure Taula 5.9). De fet, els resultats obtinguts en els estudis de translocació de fosfatidilserina mitjançant marcatge amb Annexina mostren un elevat nombre de cèl·lules Annexina-positives, similar a l'obtingut amb els transfectants del pcDNA3 nadiu (Figura 5.19B).

CULTIUS SENSE GLUTAMINA	temps (hores)		
	12	24	48
pcDNA3	+	-	-
pcDNA3: <i>Michelangelo</i>	+	-	-
pcDNA3: <i>Leonardo</i>	-	-	-

Taula 5.9. Recuperació de la viabilitat de mostres extretes a diferents intervals de temps dels cultius de l'experiment de retorn amb els transfectants pcDNA3:*Donatello*. Els símbols emprats representen el següent: '+' per als cultius que recuperen la viabilitat en medi amb glutamina; '-' per als cultius que no són capaços de recuperar la viabilitat cel·lular en medi amb glutamina.

Així doncs, bo i que les construccions quimèriques contenen les seqüències de la X-IAP mínima i Bcl-2, no fou possible sumar els seus efectes individuals observats en els apartats anteriors. Articles recent suggereixen que l'efecte inhibidor de la X-IAP és degut a les regions desestructurades que flanquegen els dominis Bir i no pas als propis dominis Bir2 i Bir3 (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001). En aquest treball de tesi, es va unir directament les seqüències del mutant Donatello i les de les dues formes del Bcl-2 (la nativa i la triple mutant) sense afegir-hi cap altra seqüència d'unió.

5.6.3. Avaluació de l'efecte dels *súperinhibidors*

Amb els resultats obtinguts, es pot concloure que l'acció individual del Bcl-2 és molt superior a la de la construcció quimèrica que inclou la seqüència del Bcl-2 i la dels dominis Bir2 i Bir3 de la X-IAP.

D'altra banda, les mutacions efectuades a la seqüència del Bcl-2 per evitar la fosforilació i la seva proteòlisi per les Caspases no han permès reduir la disminució de la viabilitat en els cultius de transfectants sotmesos a condicions d'inducció de l'apoptosi per manca de glutamina al medi.

La idea original de crear una única molècula quimèrica contenint la seqüència de dues proteïnes amb capacitat d'interferir en la ruta bioquímica de l'apoptosi en dos nivells diferents no ha donat el grau esperat de protecció de l'apoptosi en cultius d'hibridoma mancats de

glutamina. Això podria ser degut a la manca d'una seqüència d'unió entre la regió *Donatello* i la regió que conté la seqüència del Bcl-2, ja sigui el Bcl-2 natiu o bé el mutant D34A/S70A/S87A.

No obstant això, aquest treball obre les portes a estudis futurs amb més profunditat d'aquest tipus de molècules. Especialment, després d'observar els resultats obtinguts amb els transfectants de les construccions pcDNA3:*bhrf-1*. Aquest gen codifica per una proteïna que no pot ser proteolitzada per les Caspases i que ha demostrat protegir els hibridomes d'una forma molt més efectiva que no pas ho fa el Bcl-2, mantenint encara cert nombre de cèl·lules viables, a les 72 hores de cultiu en condicions inductores de l'apoptosi (Figura 5.9A en comparació amb Figura 5.7A). Així, es planteja, com a perspectiva futura, explorar el grau de protecció de l'apoptosi que ofereixen molècules quimèriques inhibidores de l'apoptosi amb BHRF-1.

Existeix un problema de fons en la sobreexpressió de gens, tant antiapoptòtics com de qualsevol altre tipus, i és la pèrdua de l'expressió al llarg del temps. Per això, aquí també s'ha volgut treballar amb sistemes d'expressió que assegurin l'estabilitat dels missatgers bo i realitzar un elevat nombre de resembres dels hibridomes transfectats. Això es pot aconseguir amb vectors multicistrònics (Fussenegger i Bailey, 1998).

5.7. Aplicacions de línies cel·lulars modificades genèticament amb gens protectors de l'apoptosi

La ruta de l'apoptosi és una característica intrínseca de les cèl·lules animals. El nostre estudi d'una línia cel·lular d'hibridoma posa de manifest la importància d'optimitzar el procés del cultiu, considerant la necessitat de control de la inducció de l'apoptosi en hibridomes de manera que sigui possible millorar la producció d'anticossos monoclonals dirigits al diagnòstic. Això incrementarà la supervivència cel·lular i la productivitat en els ambients altament estressants que s'originen en bioreactors a gran escala on les cèl·lules estan sotmeses a limitacions de nutrients i d'oxigen.

La supressió de l'apoptosi serà un pas important en el desenvolupament de processos on la proliferació cel·lular ha de ser controlada, permetent millores substancials en la productivitat específica.

En aquest treball s'ha avaluat la sobreexpressió de gens antiapoptòtics en híbridomes per a la creació de línies cel·lulars més resistents, capaces de sobreviure en condicions inductores de l'apoptosi dins els bioreactors. Com s'ha vist al Capítol 4, la mort per apoptosi és el principal inconvenient en les aproximacions de reformulació del medi dirigides a l'alentiment del cicle cel·lular en estratègies de perfusió bifàsica.

D'altra banda, aquestes condicions desfavorables pel creixement també poden ser provocades per accidents en el monitoratge i control del bioprocés encara que no es descarta que la protecció que ofereixen aquests gens pugui afavorir també la supervivència cel·lular en els processos de congelació/descongelació d'estocs de cèl·lules (Boman et al., 2001) així com una ràpida adaptació a medis de cultiu sense sèrum (Fassnacht et al., 1998).

5.8. Estabilitat de l'expressió en l'híbridoma: 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 degut a que se silencia l'expressió del gen d'interès, fet observat habitualment en cèl·lules animals transfectades (Hauser i Wagner, 1997). Això és degut a que el plasmidi pcDNA3 és 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.

Els mètodes estàndard utilitzats per a la generació de línies cel·lulars estables requereixen transfectar una línia cel·lular hoste amb dues cassettes d'expressió, contingudes en un únic vector o bé en dos de separats. Una cassette permet l'expressió de la proteïna d'interès i l'altra, del marcador de selecció. 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.

La pèrdua de l'expressió del gen d'interès porta a dirigir els esforços 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 multicistronics que garanteixin l'expressió simultània tant del marcador de selecció com del gen d'interès (Rees et al., 1996).

A la Figura 5.22, es mostra de forma esquemàtica el mecanisme d'actuació d'aquest tipus de vectors, que contenen IRES (*I*nternal *R*ibosomal *E*ntry *S*ites) a la seva seqüència.

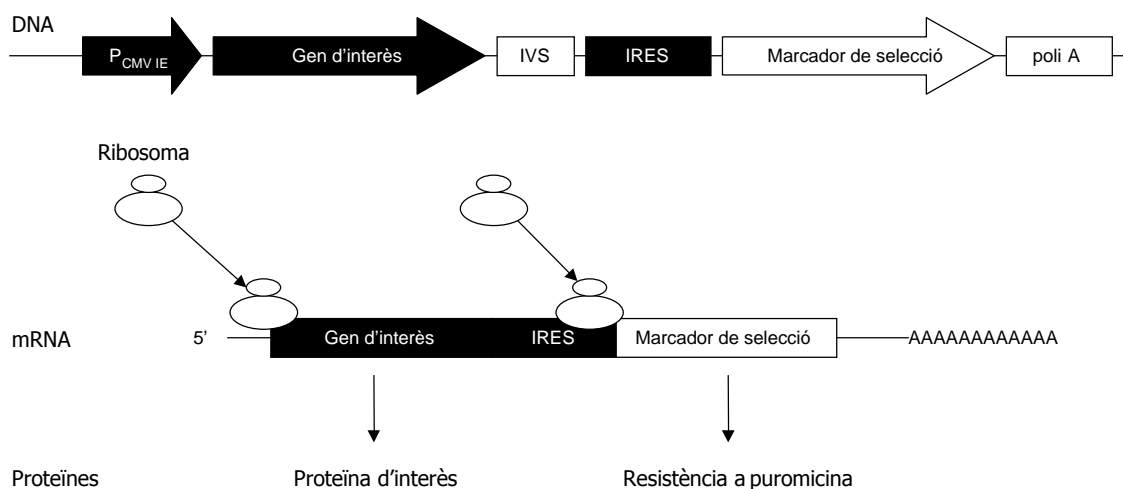


Figura 5.22. Diagrama esquemàtic de la traducció d'un mRNA bicistrònic. L'IRES del virus de l'encefalomiocarditis, *ECMV*, permet la traducció simultània de la proteïna d'interès i del marcador de selecció a partir del mateix mRNA. L'IVS correspon a un intró sintètic.

5.8.1. Ús de construccions bicistròniques en pIRESpuro2

Es van clonar els gens vírics repressors de l'apoptosi estudiats en aquest capítol (*bhrf1* i *ksbc1-2*; així com també *p35*, de la qual no s'havia aconseguit obtenir transfectants en les construccions generades en pcDNA3), amb l'objectiu d'estudiar la possibilitat d'estabilitzar l'expressió i, d'alguna manera, evitar la selecció clonal pel fet de poder treballar amb poblacions clonals mixtes que, a diferència dels transfectants obtinguts amb les construccions fetes en pcDNA3, expressessin totes elles el gen antiapoptòtic estudiat (noti's però que, bo i que totes aquelles cèl·lules que expressin la resistència a l'antibiòtic expressaran també el gen d'interès, els nivells d'aquest no tenen perquè ser els mateixos entre els diferents clons obtinguts i que, per tant, depenent del tipus d'estudi que es vulgui dur a terme, caldrà una posterior selecció de clons individuals).

El vector d'expressió escollit fou el pIRESpuro2 (Annex B), que es caracteritza per ser un vector amb IRES capaç de generar un missatger bicistrònic que conté un gen que confereix resistència a l'antibiòtic puromicina, a banda del lloc d'inserció del gen d'interès. Es va escollir la resistència a la puromicina, antibiòtic d'efecte ràpid, a diferència de la neomicina, perquè accelera l'obtenció de les poblacions clonals transfectades, ja que les cèl·lules que no han incorporat el plasmidi moren en un interval molt curt de temps (2-3 dies, respecte les 2-3 setmanes necessàries quan es treballa amb l'antibiòtic G418). Així doncs, a l'igual que s'havia

fet en el cas de G418, es va determinar, en primer lloc, la corba de viabilitat del cultiu d'hibridoma KB26.5 en presència de l'antibiòtic puromicina (Figura 5.23).

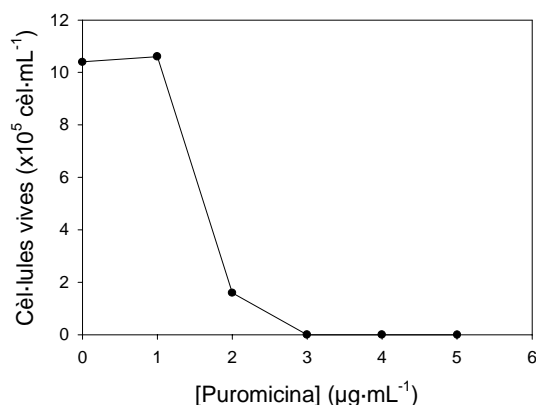


Figura 5.23. Corba de viabilitat del cultiu d'hibridoma KB26.5 en funció de la concentració de puromicina. Les dades han estat preses a les 48 hores de la inoculació del cultiu.

Un dels avantatges que ofereix l'ús d'aquest tipus de vectors és, doncs, la perdurabilitat de l'expressió del gen d'interès al llarg de les resembres i també l'eliminació de la necessitat de rastrejar un gran nombre de colònies per buscar un clon funcional.

Així, doncs, es van generar les construccions pIRESpuro2:*bhrf1*, pIRESpuro2:*ksbcl-2* i pIRESpuro2:*p35*, utilitzant les tècniques de Biologia Molecular que es detallen al Capítol 7, de Materials i Mètodes. Aquestes construccions van ser transfectades a l'hibridoma utilitzant el ractiu DMRIE-C (Life Technologies) de la mateixa manera que s'havia realitzat amb les construccions fetes en el vector pcDNA3 i amb els següents controls:

- **CONTROL DE CREIXEMENT:** Cèl·lules d'hibridoma sense transfectar en medi DMEM 4% FCS sense puromicina
- **CONTROL NEGATIU:** Cèl·lules sense transfectar en medi DMEM 4% FCS, $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromicina
- **CONTROL POSITIU:** Cèl·lules transfectades amb el vector pIRESpuro2 nadiu en medi DMEM 4% FCS, $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromicina

Els dos primers controls permeten realitzar el seguiment de l'evolució del cultiu cel·lular en un medi amb i sense puromicina. El darrer control va permetre comprovar la correcta expressió de la resistència a la puromicina continguda en el vector pIRESpuro2. La presència d'un clon es detecta fàcilment, ja que les cèl·lules no transfectades del cultiu moren en presència de l'antibiòtic puromicina.

Els resultats de transfecció de les diferents construccions van posar de manifest que únicament aquelles cèl·lules que havien incorporat el plasmidi pIRESpuro2 buit eren capaces de sobreviure en un medi que contingués puromicina. En canvi, les cèl·lules que havien incorporat les construccions pIRESpuro2:*bhrf1*, pIRESpuro2:*ksbcl-2* i pIRESpuro2:*p35* morien abans de permetre la visualització de clons al microscopi (Taula 5.8). Aquest fet va fer pensar que, molt probablement, les construccions bicistròniques afavorien uns nivells de sobreexpressió massa elevats d'aquests gens, per damunt de les concentracions tòxiques per a la cèl·lula o bé que les proteïnes antiapoptòtiques interferien en la traducció de la proteïna que confereix resistència a la puromicina.

Donat que en la metodologia de transfecció emprada, la puromicina s'afegeix 24 hores després de l'inici del procés, es va pensar que aquesta addició podria influir en els resultats obtinguts, ja que és possible que les cèl·lules transfectades amb les construccions plasmídiques pIRESpuro2:*bhrf1*, pIRESpuro2:*ksbcl-2* i pIRESpuro2:*p35* no disposin de temps suficient per a l'expressió del gen que confereix resistència a la puromicina, donat que el gen d'interès pot interferir en aquesta expressió. Per descartar aquesta possibilitat, es van transfectar les cèl·lules amb les construccions plasmídiques anteriors, afegint l'antibiòtic a les 48 i a les 72 hores. En aquests experiments, només es van obtenir transfectants del vector pIRESpuro2, en tots els casos (Taula 5.10). Això dóna força a la hipòtesi de la toxicitat de la sobreexpressió dels gens antiapoptòtics o bé de la interferència en la traducció del gen que confereix resistència a les cèl·lules respecte la puromicina. Cal destacar també que la baixa eficiència de transfecció de l'hibridoma KB26.5 (inferior al 4%) influeix negativament en l'obtenció de transfectants.

construcció	Addició de puromicina al medi (conc. final 3 µg·mL ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
pIRESpuro2	+	+	+
pIRESpuro2: <i>bhrf1</i>	-	-	-
pIRESpuro2: <i>ksbcl-2</i>	-	-	-
pIRESpuro2: <i>p35</i>	-	-	-

Taula 5.10. Resultats obtinguts en l'obtenció de transfectants amb els construccions fetes en el plasmidi bicistrònic pIRESpuro2. Es van realitzar diferents experiments en els quals es va addicionar l'antibiòtic puromicina al medi a les 24, 48 o 72 hores després de realitzada la transfecció. En tots els casos, únicament fou possible obtenir transfectants del cultiu control transfectat amb el vector pIRESpuro2 nadiu. La notació '+' indica que fou possible obtenir clons, mentre que '-' indica el contrari.

Així doncs, tot i que els vectors bicistrònics assegurin l'expressió constant del gen d'interès, en aquest cas, les construccions amb el plasmidi pIRESpuro2 no van oferir els resultats esperats. Malgrat això, els vectors multicistrònics són una eina que cal no descartar pel fet que ofereixen la possibilitat d'estabilitzar el missatger.

5.8.2. Generació de vectors bicistrònics amb el gen de la glutamina sintetasa

Com s'ha comentat en aquest Capítol, a diferència de la majoria de mRNA eucariòtics en els quals els ribosomes escanegen l'extrem 5' fins arribar al codó d'iniciació, els ribosomes tenen la capacitat d'iniciar la traducció en punts d'entrada interns dels mRNA de picornavirus, com ara el virus de l'encefalomiocarditis (ECMV), en el que s'anomenen seqüències IRES. Aquests elements poden ser eliminats del seu virus inicial i units a d'altres gens per generar RNA policistrònics. Els vectors que contenen IRES són de gran utilitat per a la ràpida i eficient generació de línies cel·lulars estables en mamífers (Gurtu et al., 1996).

Al no haver obtingut els resultats esperats amb el vector bicistrònic pIRESpuro2, es va generar un vector bicistrònic que, enlloc de contenir la resistència a un antibiòtic, conferís a la cèl·lula la possibilitat de créixer en absència d'algun component essencial del medi.

El treball realitzat en l'estudi de l'apoptosi de l'hibridoma ha permès identificar la glutamina com a aminoàcid clau en la formulació del medi de cultiu. La seva poca solubilitat i el consum desmesurat que els hibridomes tenen d'aquest aminoàcid en les condicions de cultiu provoquen un exhauriment que, al seu torn, engega la mort per apoptosi d'aquestes cèl·lules.

Els hibridomes murins no expressen el gen de la glutamina sintetasa, enzim que permet la síntesi de glutamina a partir d'àcid glutàmic i que ha mostrat ser de gran utilitat en treballs anteriors d'optimització de l'ús de les fonts de carboni i nitrogen en l'hibridoma KB26.5 (Paredes et al., 1999).

Això permet reformular el medi de cultiu, tot eliminant la glutamina i afegint-hi glutamat que, al ser una molècula carregada, és captada per la cèl·lula només quan és requerida per aquesta, ja que la seva internalització és dependent d'energia (Stryer, 1995).

Així, s'ha treballat en la generació dels plasmidis bicistrònics pIRESGS i pIRES-revGS, que duen com a marcador de selecció el cDNA de la glutamina sintetasa sense cap resistència a

antibiòtics, que d'altra banda són agressius per a les cèl·lules (veure Figura 5.22). Aquelles cèl·lules que no hagin incorporat el vector moriran per apoptosi induïda per manca de glutamina al medi de cultiu.

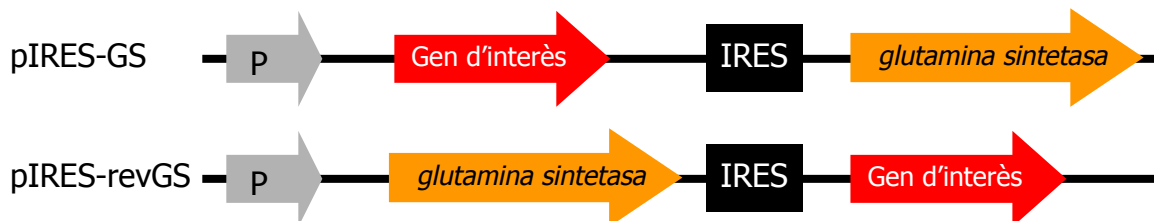


Figura 5.24. Estructura de la regió que codifica pels gens d'interès i el marcador de selecció en els vectors pIRES-GS i pIRES-revGS. El protocol seguit per a la generació del vector pIRES-GS es mostra al subapartat 7.7.1 del Capítol 7, de Materials i Mètodes.

Tal i com es mostra a la Figura 5.24, s'han generat dos vectors en els quals el marcador de selecció es troba en posicions diferents respecte la seqüència IRES. S'ha fet així per evitar que la traducció del gen d'interès pugui afectar la traducció del gen de la glutamina sintetasa. Encara que això no descarta que es doni la mateixa interferència però al revés, és a dir, que la traducció del marcador de selecció interfereixi en l'entrada dels ribosomes en l'element IRES i que això no permeti la traducció del gen antiapoptòtic d'interès.

El vector pIRES-GS nadiu va ser transfectat en l'hibridoma KB26.5 i s'han obtingut clons en medi DMEM 4 % FCS on la glutamina havia estat substituïda per glutamat, com s'explica amb més detall al Capítol 7, de Materials i Mètodes.

La baixa eficiència de transfecció dels hibridomes (del 2 al 4%, per a l'hibridoma KB26.5) només permet avaluar l'efecte d'aquests gens mitjançant estudis d'expressió estable. A menys que una població pura de cèl·lules sigui requerida per estudis d'expressió, els vectors bicistrònics pIRES-GS i pIRES-revGS prometen ser una eina molt potent que permet l'ús de poblacions clonals mixtes de cèl·lules que sobrevisquin en medis amb glutamat. Això permet l'estalvi de temps i mà d'obra durant la generació de línies cel·lulars estables, i elimina la necessitat del crivellatge d'un gran nombre de colònies en la identificació dels clons positius (Gurtu et al., 1996). Endemés, el preu del medi de cultiu no s'encareix ja que no es fa necessària l'addició d'antibiòtics com G418 o puomicina, si no únicament el canvi de glutamina per glutamat.

Treballar amb poblacions clonals de cèl·lules amb baixa eficiència de transfecció que hagin incorporat vectors multicistrònics per expressar el gen d'interès, encara que amb nivells

d'expressió diferents entre clons, és comparable a l'ús de tecnologies d'expressió transient que alguns autors utilitzen amb línies cel·lulars fàcilment transfectables, fins i tot a gran escala per a la producció de proteïnes recombinants (revisat per Wurm i Bernard, 1999).

5.9. Valoració global del treball realitzat

El cultiu de cèl·lules animals en suspensió en bioreactors de tanc agitat, ja sigui en discontinu o discontinu alimentat, són l'opció escollida en la producció comercial de proteïnes terapèutiques i de diagnòstic a nivell industrial. En alguns casos, la producció podria incrementar-se escalant l'operació, encara que això encareix notablement el cost del procés. Com a alternativa, existeix la possibilitat d'augmentar la producció mitjançant la intensificació del cultiu emprant una varietat de tècniques que permeten la retenció de les cèl·lules dins del bioreactor, mentre el cultiu és perfusionat amb medi fresc. El medi gastat és eliminat a la mateixa velocitat, mantenint així un volum de cultiu baix i constant. Com a resultat d'això, en bioreactors relativament petits, s'assoleixen elevades densitats cel·lulars i títols del producte.

Una de les característiques típiques d'aquests sistemes és la presència de grans quantitats de cèl·lules mortes, que limita el progrés del cultiu per dos motius: en primer lloc, per la necessitat de ràpides velocitats de divisió cel·lular per substituir les cèl·lules mortes, que fan reduir la productivitat específica; i, d'altra banda, l'alliberament de proteases, DNA i altres components cel·lulars, que porten a la degradació del producte d'interès i compliquen la seva purificació.

Com s'ha mostrat en la Introducció d'aquesta memòria, els estudis realitzats amb anterioritat en el grup de recerca on s'emmarca aquest treball experimental demostren que la majoria de situacions d'estrès en les que es troben les cèl·lules en l'ambient del bioreactor condueixen a la inducció d'un mecanisme actiu de mort, controlat genèticament, anomenat apoptosi. Això es deu a que les cèl·lules animals són extremadament sensibles al seu ambient i responen a la limitació d'oxigen, a l'exhauriment de nutrients i sèrum, i a les elevades concentracions de subproductes tòxics del metabolisme cel·lular activant un mecanisme de mort controlat per gens cel·lulars, factors de transcripció, enzims i molècules de senyalització, que culmina en uns canvis morfològics perfectament coneguts i fàcilment identificables, que són responsables de la seva mort i destrucció (Mastrangelo i Betenbaugh, 1998).

En la majoria de casos, l'activació de la maquinària apoptòtica es dona per la interrupció de les principals vies metabòliques de la cèl·lula, tal i com es mostra de forma esquemàtica a la Figura 5.25.

La majoria de les complicacions que comporta la mort cel·lular en els bioreactors sorgeixen de la naturalesa tumoral de les línies cel·lulars emprades en la producció d'anticossos monoclonals i d'altres proteïnes terapèutiques. El consum descontrolat de nutrients i la constant divisió dins els bioreactors condueix els cultius a les limitacions físiques que provoquen l'acumulació de cèl·lules mortes.

Per aquest motiu, les estratègies de cultiu en perfusió són les més adequades, ja que reproduïxen més fidelment les condicions en què es troben les cèl·lules en els organismes pluricel·lulars; és a dir el manteniment de concentracions de precursors i l'aport constant de nutrients i eliminació de subproductes. De totes maneres, fins i tot en cultius en perfusió, s'arriba a limitacions d'algun dels nutrients essencials per la cèl·lula, endegant inevitablement la mort cel·lular que condueix a la pèrdua del cultiu.

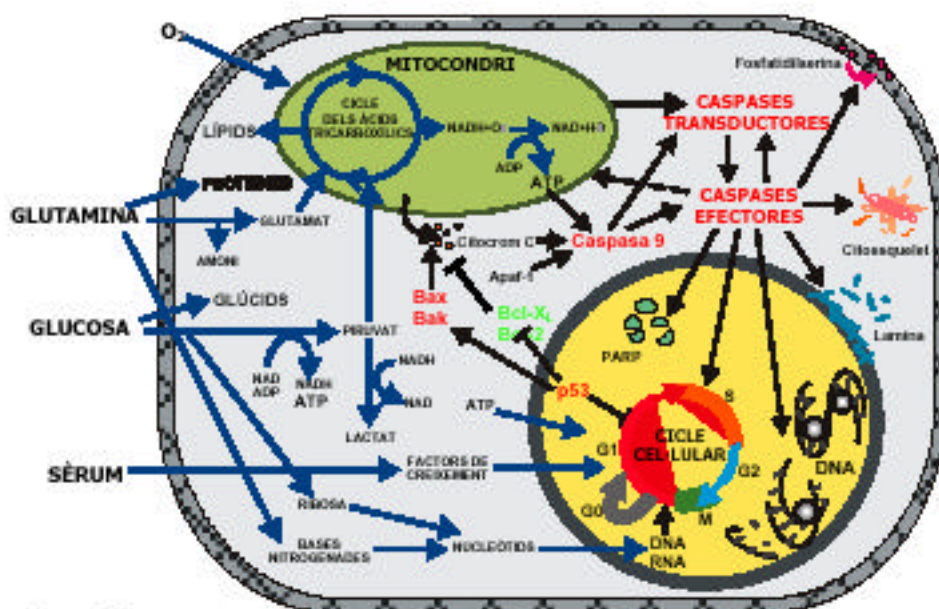


Figura 5.25.

Figura 5.25. Esquema dels processos d'execució de l'apoptosi en l'híbridoma KB26.5.

Així, en aquest treball de tesi, es proposa com a solució l'avaluació del que han de ser les bases d'una estratègia de cultiu en perfusió bifàsica. En una primera fase, de creixement exponencial, les cèl·lules disposarien de tots els requeriments nutritius mentre que, una vegada assolida la densitat cel·lular desitjada, es perfusionaria un medi de cultiu modificat que permetés aturar o alentir el cycle cel·lular. Aquesta proposta permetria evitar la limitació de la concentració de nutrients i, com a conseqüència, l'acumulació de cèl·lules mortes.

L'aturada o alentiment del cycle cel·lular s'ha aconseguit mitjançant la substitució o reducció de determinats components del medi de cultiu. Així, la substitució de la glucosa per una font de carboni alternativa, com és la fructosa, permet mantenir constant el nombre de cèl·lules vives. Això mateix s'obté reduint tant les concentracions de fosfats com de sèrum en el medi. Ara bé, els millors resultats s'obtenen reduint la concentració de sèrum al medi. Malauradament, tots aquests canvis en la formulació del medi provoquen encara un cert augment del nombre de cèl·lules no viables que, com s'ha demostrat al Capítol 4, moren per apoptosi. Probablement, això sigui degut a la interrupció dels diferents processos que permeten l'obtenció de l'energia i els precursors necessaris per duplicar el material genètic i generar cèl·lules noves (veure Figura 5.25).

Donada la importància de l'apoptosi en moltes patologies com són les malalties autoimmunitàries, neurodegeneratives o càncer, els mecanismes moleculars de l'apoptosi han estat estudiats en profunditat, sobretot en el transcurs de la darrera dècada. Com a conseqüència d'això, hi ha hagut un progrés ràpid en el coneixement de la regulació d'aquest tipus de mort. El treball que aquí es presenta està basat en l'aplicació d'aquest coneixement al control de l'apoptosi en el cultiu de línies cel·lulars de rellevància industrial.

Així, en aquesta tesi, s'han estudiat les principals vies de transmissió del senyal apoptòtic en una línia cel·lular d'hibridoma per, d'aquesta manera, determinar dianes per a una intervenció genètica adreçada a aturar temporalment l'apoptosi.

En primer lloc, s'ha estudiat el paper del mitocondri, punt central en la transmissió del senyal de mort cap a les molècules executores de l'apoptosi i on hi realitzen la seva funció reguladora els membres de la família del Bcl-2. S'ha determinat que la inducció de l'apoptosi per manca de nutrients desencadenava la sortida del Citocrom c de l'espai intermembrana mitocondrial al citoplasma. Aquests resultats concorden amb els esdeveniments descrits en altres línies

cel·lulars, i permet establir l'alliberament del Citocrom c com a factor clau en la transmissió del senyal apoptòtic cap a la via de les Caspases pel que s'anomena la *via intrínseca* de l'apoptosi.

A més a més, s'ha constatat en l'hibridoma KB26.5, l'expressió dels gens proapoptòtics *bax* i *bak* i dels gens protectors *bcl-2*, *bcl-x_L*, *mcl-1*, i *bcl-w*. Aquests darrers han estat clonats en vectors d'expressió eucariotes per al seu ús en la generació de noves línies cel·lulars modificades, en les quals es pretén desplaçar l'equilibri existent entre molècules pro- i antiapoptòtiques cap a la supervivència dels cultius.

Altrament, la importància de les Caspases en l'execució del procés apoptòtic en l'hibridoma KB26.5 ha quedat palesa en experiments realitzats amb pèptids inhibidors de diferents subfamílies de cisteïna-proteases. Aquestes molècules inhibidores contenen la seqüència d'aminoàcids reconeguda per les Caspases i una modificació química en un extrem que permet la seva unió irreversible a la proteïna, bloquejant així l'activitat catalítica (Thornberry i Labzebnik, 1998).

Els resultats obtinguts han posat de manifest que la inhibició de les Caspases 3, 7 i 9 permet no només retardar la mort dels cultius si no també recuperar-los fins a 36 hores després d'haver induït la mort per manca de glutamina. Aquest fet coincideix amb l'ordre jeràrquic acceptat actualment en el qual l'activació de la Caspasa 9 es dona com a conseqüència de l'alliberament del Citocrom c de mitocondri (Budihardjo et al., 1999; Slee et al., 1999). Posteriorment, la Caspasa 9 activa les Caspases 3 i 7, que juguen un paper clau en l'execució dels processos autodestructius de la cèl·lula. La inhibició de les Caspases 3 i 7 amb el pèptid Ac-DEVD-cmk resulta menys eficient en el retard de l'apoptosi que quan es tracten els cultius d'hibridoma amb l'inhibidor z-VAD-fmk. Així doncs, malgrat que la via d'inducció de l'apoptosi sembla tenir com a punt de partida l'activació de la Caspasa 9, la cèl·lula disposa de mecanismes paral·lels a través dels quals és capaç de culminar el procés d'apoptosi independentment de les Caspases, donat que el bloqueig assolit amb l'ús simultani d'ambdós inhibidors peptídics no és suficient per aturar la mort per apoptosi un cop superada la protecció inicial en condicions inductores de l'apoptosi.

No obstant això, els resultats obtinguts amb aquestes substàncies químiques són molt positius donat que ofereixen la possibilitat de retardar la mort del cultiu i de rescatar-los de la mort una vegada transcorregut un apreciable interval de temps en condicions desfavorables. Malauradament, tot i que l'ús d'inhibidors químics és una de les pràctiques més habituals en el

tractament de malalties relacionades amb l'apoptosi, la seva aplicació resulta poc aconsellable per volums de cultiu propis d'un bioreactor, ja que pocs micrograms d'aquestes molècules acostumen a tenir un cost econòmic molt elevat (Fussenegger i Bailey, 1998).

Els efectes de la combinació d'inhibidors peptídics suggereixen la via de les Caspases com a punt clau per al bloqueig de l'apoptosi. Per aquest motiu, a partir dels resultats d'aquesta part del treball es va plantejar l'ús d'estratègies d'inhibició genètica a dos nivells diferents: sobre membres iniciadors de la ruta de les Caspases i en la protecció de l'alliberament del Citocrom c de mitocondri.

En la literatura, trobem nombrosos treballs on es mostren els resultats d'estudis de sobreexpressió del gen antiapoptòtic *bcl-2* en línies cel·lulars d'interès industrial. En canvi, no és tan conegut l'efecte d'altres proteïnes homòlogues que poden tenir un efecte similar o, inclús, millor. Entre les diferents possibilitats que existeixen, es va decidir sobreexpressar els cDNA que codifiquen per Bcl-2 i per Bcl-X_L, així com els cDNAs dels seus homòlegs vírics KSBcl-2 i BHRF-1, per evitar l'alliberament del Citocrom c de mitocondri, donat que l'actuació en aquest nivell resulta molt atractiva perquè es troba en un punt previ a l'activació de les Caspases; i la sobreexpressió de la X-IAP i p35 per a la inhibició de les Caspases 9, 3 i 7.

El sistema d'expressió utilitzat és crític. La baixa eficiència de transfecció dels hibridomes (es va determinar que era inferior al 4%, en el cas de l'hibridoma KB26.5) només permet avaluar l'efecte d'aquests gens mitjançant estudis d'expressió estable.

Els resultats obtinguts en experiments de protecció de l'apoptosi induïda per manca de glutamina en el medi de cultiu en poblacions mixtes de transfectants del Bcl-2 i d'homòlegs endògens i vírics han evidenciat la capacitat protectora que tenen aquestes proteïnes i han permès alentir la disminució de la viabilitat provocada per l'exhauriment de nutrients al medi respecte els cultius control. Endemés, la sobreexpressió dels cDNA que codifiquen per Bcl-2, Bcl-X_L, KSBcl-2 i BHRF-1 ha permès també recuperar la viabilitat cel·lular de cultius que havien estat sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi durant 48 hores.

Aquests resultats tan positius, en especial els obtinguts amb els transfectants del gen víric *bhrf-1*, que mostra una protecció molt clara en els experiments de seguiment de la viabilitat cel·lular en condicions de manca de glutamina, evidencien el gran potencial que tenen les línies cel·lulars

animals modificades genèticament en el seu cultiu en bioprocessos de producció de molècules d'interès industrial.

Ara bé, és sabut que els nivells d'expressió dels gens estudiats es perden en funció del nombre de resembres realitzades (Hauser i Wagner, 1997). Així doncs, es fa necessari l'ús de vectors d'expressió que s'integrin en regions amb elevada taxa de transcripció i amb una alta estabilitat en el temps. Una possibilitat és l'ús de retrovirus per introduir la seqüència de DNA desitjada a la cèl·lula. Aquesta opció resulta molt efectiva ja que garanteix l'estabilització del missatge genètic, però requereix d'una infraestructura específica de la que no es disposa en el laboratori on s'ha realitzat el treball que es presenta aquí i d'un procediment metodològic acurat per a la prevenció de possibles riscos relacionats amb la salut del personal investigador (Baum et al., 1999).

D'altra banda, això mateix pot assolir-se mitjançant l'ús de vectors multicistrònics, que permeten la transcripció conjunta i consecutiva del gen d'interès i del marcador de selecció en el mateix missatger (Fussenegger i Bailey, 1998).

Malauradament, els intents realitzats en aquest treball per estabilitzar l'expressió dels gens antiapoptòtics mitjançant l'ús del vector bicistrònic pIRESpuro2 no han donat els resultats esperats.

De totes formes, els coneixements adquirits del metabolisme de l'hibridoma i dels seus mecanismes d'inducció de l'apoptosi, han permès dissenyar i generar vectors bicistrònics que enlloc de contenir un marcador de selecció que confereixi resistència a un antibiòtic, que és sempre un agent tòxic per la cèl·lula, contenen en la seva seqüència el gen de la glutamina sintetasa, que permet als hibridomes que incorporin aquests vectors sobreviure en medis on, enlloc de glutamina, hi hagi glutamat.

Aquest canvi en la formulació del medi no suposa l'addició d'antibiòtics que, d'altra forma, no podrien ser utilitzats a escala industrial, degut al seu elevat cost.

En resum, el treball de tesi que es presenta en aquesta memòria neix de la impossibilitat de garantir concentracions adequades de tots els nutrients essencials per a la cèl·lula quan s'assoleixen densitats molt elevades dins els bioreactors.

La forma més adequada d'allargar la vida dels cultius passa per l'aplicació d'estratègies de perfusió, que supleixin la manca de nutrients i evitin l'acumulació de subproductes cel·lulars, tot garantint la supervivència de les cèl·lules i assolint uns nivells de producció més eficients del producte d'interès.

L'aturada del cicle cel·lular permet treballar amb elevades concentracions de cèl·lules sense que s'esgotin els nutrients subministrats en el medi de cultiu però s'indueix la mort per apoptosi. Aquest tipus de mort cel·lular programada genèticament i que es desenvolupa per unes vies bioquímiques establertes, ha estat cartografiada i s'hi han identificat possibles nivells on realitzar modificacions genètiques que permetin alentir el procés de mort cel·lular.

Això ha estat assolit mitjançant la sobreexpressió de gens homòlegs al Bcl-2, obtenint-se els resultats més clars en cèl·lules que sobreexpressen el gen víric *bhrf-1*. Aquests resultats demostren la possibilitat d'incorporar una *vàlvula* de seguretat genètica que permeti retardar la mort per apoptosi d'aquelles cèl·lules que d'altra banda morien i s'acumularien en el bioreactor i, a més a més, rescatar de l'apoptosi cultius que, per causes accidentals inherents a la metodologia emprada en el monitoratge i control del bioprocés o per limitacions físiques de subministrament de nutrients, factors de creixement i oxigen, es vegin sotmesos a condicions inductores de l'apoptosi. Així, aquest treball contribueix a la creació d'un sistema de cultiu més robust que evitaria l'enorme pèrdua de rendibilitat en el procés d'obtenció del producte desitjat que es dona quan un cultiu entra en la fase de mort per apoptosi.