

---

# CAPÍTOL 6

## 6. CONCLUSIONS

---

### 6.1. CONCLUSIONS DEL TREBALL

Un dels principals problemes que presenta el cultiu de cèl·lules animals en bioreactors és l'activació d'un programa de mort cel·lular controlat genèticament per les pròpies cèl·lules i que condueix a la pèrdua dels cultius, tant en estratègies de cultiu en discontinu com en perfusió. La causa principal d'aquesta activació és l'exhauriment de nutrients essencials per a la cèl·lula. Per això, en aquest treball de tesi s'han explorat diferents possibilitats d'evitar l'activació de la mort per apoptosi. En base, el treball es va centrar en la reformulació del medi de cultiu per alentir el cicle cel·lular i, d'altra banda, protegir genèticament les cèl·lules de la mort per apoptosi. L'estudi dels mecanismes moleculars activats en aquest tipus de procés de destrucció cel·lular va permetre dissenyar i avaluar estratègies de sobreexpressió de gens antiapoptòtics en cèl·lules d'hibridoma murines.

Els resultats obtinguts en aquest treball permeten concloure que:

- Els hibridomes, com a cèl·lules tumorals que són, creixen de forma descontrolada, provocant la limitació de nutrients tant en cultius en perfusió com en discontinu o discontinu alimentat. Això condueix les cèl·lules a la seva mort per apoptosi. Dues

possibilitats per minimitzar el problema provocat per l'exhauriment de nutrients són, en primer lloc, el control sobre el cicle cel·lular per alentir la velocitat de divisió cel·lular just abans d'arribar a la limitació nutricional i, d'altra banda, la inhibició de la mort cel·lular programada, si és que la limitació d'algun dels nutrients ja s'ha produït.

- La reformulació del medi orientada a l'alentiment del cicle cel·lular dels híbridomes és una estratègia que permet evitar l'exhauriment de nutrients i l'acumulació de subproductes tòxics però, malauradament, els híbridomes endeguen al mateix temps el programa de mort cel·lular per apoptosi.
  
- L'ús d'inhibidors peptídics de les Caspases permet l'endarreriment de la mort dels cultius sota condicions inductores de l'apoptosi però el seu elevat cost fa inviable el seu ús en cultius a gran escala.
  
- Les especificitats per diferents Caspases que presenten els inhibidors peptídics sintètics permeten conèixer amb cert detall els mecanismes implicats en la ruta bioquímica de l'apoptosi activada en aquestes cèl·lules. Això fa possible el disseny d'una estratègia genètica per a la generació de noves línies cel·lulars d'híbridomes més resistents a l'apoptosi robustes capaces de sobreviure en condicions inductores de l'apoptosi. A partir de l'estudi de les principals vies a través de les quals es dona la inducció de l'apoptosi en l'híbridoma KB26.5, s'han identificat les millors dianes on aplicar una estratègia d'inhibició genètica. Els resultats obtinguts indiquen que la inhibició de la via de les Caspases en les seves etapes preliminars (Caspasa 9) és una alternativa que permetria retardar la mort dels cultius. Una altra possibilitat és l'actuació a nivell de mitocondri per impedir la formació de l'apoptosoma i la posterior activació de la Caspasa 9. Aquesta actuació s'hauria de realitzar sobre algun dels gens de la família del *bcl-2*.

- Tot i que la millor manera de retardar l'aparició de l'apoptosi en els cultius d'hibridomes és l'aplicació d'una estratègia adequada de perfusió, es poden donar situacions accidentals que generin la manca d'algun dels nutrients del medi i que d'aquesta manera afectin la viabilitat cel·lular. Per aquest motiu, és recomanable l'aplicació complementària de modificacions genètiques en la cèl·lula adreçades a intentar inhibir d'una manera efectiva l'aparició de la mort cel·lular per apoptosi. Aquestes estratègies també poden ser de gran utilitat a l'hora de retardar l'aparició de l'apoptosi en els cultius en discontinu, ja que permetrien allargar la durada dels cultius, millorant així el rendiment del procés.
  
- La intervenció genètica simultània sobre més d'un nivell de la ruta bioquímica de l'apoptosi mitjançant el que anomenem els *súperinhibidors* no ha permès sumar l'efecte dels seus components per separat. No obstant això, l'obtenció de molècules quimèriques amb diferents capacitats d'interferència en la complexa ruta bioquímica de l'apoptosi és l'eina que ha de permetre un bloqueig més efectiu de la mort cel·lular en cultius sotmesos a limitacions de nutrients.
  
- La reformulació del medi de cultiu s'hauria de combinar amb l'ús de línies cel·lulars modificades genèticament que sobreexpressessin membres de la família del Bcl-2, en especial BHRF-1, o *súperinhibidors*.
  
- L'apoptosi és un procés irreversible. Es poden aplicar modificacions al medi i genètiques a les cèl·lules que permetin endarrerir el procés i evitar que part de la població cel·lular dels cultius entri en la fase de compromís de la PCD però, a partir d'un cert temps de cultiu sota condicions inductores, és impossible la recuperació dels cultius, fins i tot en presència de molècules inhibidores de l'apoptosi.

## 6.2. PERSPECTIVES FUTURES

Aquest treball ha permès posar les bases per a la implementació a escala bioreactor de tècniques de perfusió bifàsica en cultius de línies cel·lulars animals. Com s'ha mostrat en aquest treball, les cèl·lules modificades genèticament són més resistents a la inducció de la mort per apoptosi en condicions de manca de nutrients però l'estabilització de l'expressió dels gens antiapoptòtics al llarg de les diferents generacions de cèl·lules és una qüestió que queda pendent de resoldre i que haurà d'investigar-se en un futur orientant l'estudi a la creació de nous vectors eucariotes capaços d'assegurar l'expressió dels gens inserits a les cèl·lules en el transcurs del bioprocés.. Així, el desenvolupament d'un sistema d'expressió estable al llarg del temps hauria de permetre assegurar la presència de la proteïna protectora en quantitats efectives després d'un nombre elevat de resembres.

També es recomana l'ús de vectors retrovírics, la transfecció dels quals en hibridomes es dona amb elevades eficiències i així es disminuiria el temps d'espera en el creixement dels clons i es facilitaria la seva obtenció.

Resulta d'especial interès la possibilitat d'emprar sistemes autoregulats de manera que l'expressió dels gens protectors es doni en moments molt concrets d'estrès cel·lular i no de creixement i producció. En aquest sentit, el proper pas és l'ús de tecnologies basades en la regulació de l'expressió gènica en cèl·lules animals (sistemes de regulació revisats recentment per Fussenegger, 2001).

S'aposta pel canvi del marcador de selecció per la glutamina sintetasa enlloc de la resistència a un antibiòtic per facilitar i abaratir el procés a gran escala.

L'eficàcia de la inhibició de l'aparició de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5 mitjançant l'ús d'inhibidors peptídics i la possibilitat de revertir el procés de mort un cop aquest ha estat activat suggereix la continuïtat de la recerca en aquest camp mitjançant la sobreexpressió de proteïnes víriques inhibidores de les Caspases activades durant la PCD, les anomenades IAP (Deveraux i Reed, 1999). El mecanisme de supressió de l'apoptosi desenvolupat per aquestes proteïnes es dona per inhibició directa i específica de les Caspases implicades en la iniciació de la cascada proteolítica i de les executores del procés de mort. Tot això fa pensar en l'ús d'aquestes proteïnes i en la seva combinació en molècules quimèriques (els anomenats *súperinhibidors*) amb

membres de la família del Bcl-2 (especialment, BHRF-1) per inhibir de forma efectiva i a diferents nivells la ruta bioquímica de l'apoptosi en l'hibridoma.

Els resultats obtinguts amb els homòlegs antiapoptòtics del Bcl-2 i el propi Bcl-2 obren les portes al treball futur en l'obtenció de clons i la caracterització dels nivells d'expressió dels gens antiapoptòtics, així com el seu efecte en la producció de l'anticòs, i en el comportament dins els bioreactors (velocitat de creixement i densitat cel·lular màxima).

Així doncs, existeixen diferents possibilitats per evitar l'aparició de l'apoptosi en els cultius cel·lulars. De totes maneres, fins al moment actual, l'aplicació per separat de cadascuna d'aquestes estratègies (sistemes d'operació en els cultius, modificacions genètiques, addició de substàncies químiques) únicament ha permès retardar durant unes hores la mort per apoptosi dels cultius, tot i que aquest retard ja garanteix substancials millores en la productivitat de les diferents biomolècules d'interès (Mastrangelo i Betenbaugh, 1998). Per aquest motiu és molt probable que la combinació de vèries d'aquestes estratègies sigui la manera més adequada per allargar encara molt més la durada dels cultius, tot i que és difícil que finalment s'acabi obtenint una estratègia que permeti assolir una inhibició completa i definitiva de l'apoptosi en els cultius cel·lulars ja que com es conclou en aquest treball l'apoptosi és un procés irreversible i sota condicions inductores es pot retardar la mort cel·lular però mai bloquejar-se indefinidament.

---

# MATERIALS I MÈTODES

---

# CAPÍTOL 7



## **7. MATERIALS I MÈTODES**

---

### **7.1. Consideracions generals de seguretat en laboratoris de Biologia Molecular i Cel·lular**

Els cultius de cèl·lules animals són molt susceptibles de patir contaminacions bacterianes o fúngiques, motiu pel qual es recomana treballar amb precaucions de manera que es garanteixi l'esterilitat. No obstant això, cal no oblidar en cap moment la seguretat de l'investigador que treballa al laboratori, degut a la possibilitat de patir accidents en la manipulació de productes químics o biològics en el seu treball diari.

En la memòria de la seva tesi, Tintó, 1999, introdugué un nou apartat al capítol de Materials i Mètodes on detallava normes de seguretat i higiene ambiental, i un llistat d'actituds i consideracions que permeten treballar al laboratori amb més seguretat i respecte amb el medi ambient. Recomano la seva lectura, així com la de les notes tècniques de prevenció 432-1996 i 433-1996 editades per l'*Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*. El seu seguiment hauria de permetre evitar accidents al laboratori. Val la pena recordar que, segons la Constitució Espanyola, la seguretat en el treball és una obligació legal i moral de l'empresa vers el treballador i el treballador té el dret i l'obligació de tenir cura de la seva pròpia seguretat. La Llei 31/1995, de prevenció de riscos laborals, inclou les administracions públiques dins l'àmbit

d'aplicació. És per això que la Universitat va crear l'Oficina de Seguretat i d'Higiene Ambiental (OSHA) perquè coordinés i apliqués tots els temes relacionats amb la política preventiva de la seguretat laboral.

Éssent conscient de les mancances que en temes de seguretat existeixen als laboratoris d'aquesta Universitat, vull acabar aquest apartat fent tres consideracions bàsiques a tenir en compte per evitar accidents al laboratori: conèixer els materials i productes amb els quals s'està treballant i prendre les mesures de precaució oportunes segons la seva perillositat; tenir en compte durant el disseny dels experiments a realitzar les limitacions en la seguretat dels laboratoris on treballem (poques campanes d'extracció de gasos, aireació insuficient en els laboratoris, manca de dipòsits de deixalles específiques, absoluta ignorància en temes d'ergonomia, etc.); i, finalment, no oblidar que abans que obtenir un bon resultat en un experiment, el més important és la nostra seguretat personal i la dels nostres companys.

## **7.2. Línia cel·lular, conservació, medis i sistema de cultiu**

La línia cel·lular emprada en aquest treball, l'hibridoma KB26.5, prové de la fusió de cèl·lules de mieloma murines NS1 i limfòcits B murins Balb C i va ser cedida gentilment pels laboratoris Knickerbocker SAE (Barcelona). L'hibridoma KB26.5 produeix una immunoglobulina IgG<sub>3</sub> contra l'antigen A<sub>1</sub> d'eritròcits humans. Aquest anticòs monoclonal és utilitzat en la determinació del grup sanguini del sistema ABO humà.

La línia cel·lular es conserva en criotubs (Nunc) congelats en un contenidor de nitrogen líquid (Forma Scientific, CMR 8031, Cryomed) a -196°C. Abans de realitzar els experiments, s'ha de descongelar un dels criotubs i iniciar el cultiu en suspensió, del qual es fan resembres durant un període no superior a tres mesos. La preservació en nitrogen líquid de les sublínies obtingudes en aquest treball s'ha realitzat seguint el protocol estàndard amb DMSO (Sambrook et al., 1989). Un cop descongelades, les cèl·lules es cultiven en suspensió en flascons de 25 cm<sup>2</sup> i es resembren cada 2-3 dies, que és quan el cultiu es troba en plena fase exponencial, amb un inòcul de 2x10<sup>5</sup> cèl·lules viables·mL<sup>-1</sup> en 10 mL de medi DMEM base fresc (veure Taula 7.1). D'aquesta manera es proporciona de nou tots aquells nutrients que s'estaven exhaustint –glucosa, glutamina i altres aminoàcids, vitamines i components del sèrum– i s'eliminen els subproductes del metabolisme cel·lular que poden arribar a tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula a

concentracions elevades –com l’amoni i el lactat, que acidifiquen el medi (Ozturk et al., 1992). Aquests cultius permeten disposar sempre d’un estoc de cèl·lules a partir del qual es fan créixer els inòculs per iniciar els experiments.

COMPOST	mg·L <sup>-1</sup>	COMPOST	mg·L <sup>-1</sup>
<b>Sals inorgàniques</b>		<b>Aminoàcids</b>	
CaCl <sub>2</sub>	200	L-Arginina·HCl	84
Fe(NO <sub>3</sub> )·9H <sub>2</sub> O	0.1	L-Cistina·2HCl	62.57
KCl	400	Glicina	30
MgSO <sub>4</sub>	97.67	L-Histidina HCl·H <sub>2</sub> O	42
NaCl	6400	L-Isoleucina	105
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125	L-Leucina	105
<b>Vitamines</b>		L-Lisina·HCl	146
D-Acid pantotènic	4	L-Metionina	30
Clorur de colina	4	L-Fenilalanina	66
Acid Fòlic	4	L-serina	42
Inositol	7.2	L-Treonina	95
Nicotinamida	4	L-Triptòfan	16
Piridoxal·HCl	4	L-Tirosina	104.2
Riboflavina	0.4	L-Valina	94
Tiamina·HCl	4		

**Taula 7.1. Composició del medi base DMEM, Dulbecco’s Modified Eagle Medium (Biological Industries).**

Aquest medi conté substàncies imprescindibles per al creixement de l’hibridoma (Freshney, 1983 i 1986). Se suplementa amb 3.7 g·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> (Panreac) per mantenir el pH a un valor inicial de 7.1 (òptim requerit pel cultiu d’hibridomes); i roig de fenol com a indicador de pH (medi de color rosa quan pH > 7.6; vermell, si 7.6 > pH > 7.0; taronja, quan 7.0 > pH > 6.6; i groc, quan pH < 6.6). Amb unes concentracions inicials de glucosa 25 mM i L-glutamina 6 mM (Sigma), s’ha utilitzat per mantenir la línia cel·lular, fer créixer inòculs i realitzar experiments de cèl·lules en suspensió. S’esterilitza per filtració a través de membranes de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millipore) a l’interior d’una cambra de flux vertical (Telstar, AV-100). Posteriorment, s’ha suplementat el medi estèril de manera que s’obtinguin les següents concentracions finals: 2-4% (v/v) de FCS (Biological Industries), que aporta elements traça, factors de creixement i altres biomolècules no definides, essencials pel creixement de molts tipus de cèl·lules animals; 0.05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma), a partir d’una dissolució mare 0.1 M; 0.002 UI·mL<sup>-1</sup> insulina (Actrapid HM Novo), a partir d’una dissolució mare 4 UI·mL<sup>-1</sup> o 10 UI·mL<sup>-1</sup>. El medi es manté a 4°C en absència de llum durant un període no superior a dos mesos.

Per a la selecció de transfectants, segons quina sigui la resistència que ofereix el vector emprat, s’han utilitzat medis suplementats amb antibiòtic: G418 3 mg·mL<sup>-1</sup> (Roche) o puromicina 4 µg·mL<sup>-1</sup> (Alexis Biochemicals); o medis deficientes en L-Gln però suplementats amb L-Glu a 0.7355 g·L<sup>-1</sup> (5 mM) i L-Ala a 222.725 g·L<sup>-1</sup> (2.5 mM) per als transfectants amb plasmidis que contenen com a marcador de selecció el gen que codifica per la *glutamina sintetasa*.

Els sistemes de cultiu utilitzats en aquest treball han estat:

- FLASCONS DE CULTIU (Orange Scientifics) de 25 cm<sup>2</sup>, i de 260 cm<sup>2</sup>, amb filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus al tap per facilitar l’intercanvi de gasos amb l’exterior i permetre el control del pH a l’incubador de CO<sub>2</sub>. En aquests flascons s’han realitzat experiments amb cèl·lules en suspensió i les resembres de la línia cel·lular.

- PLAQUES DE CULTIU DE 6 I 12 POU (Orange Scientifics) per a volums de 2 mL de medi per pou. Han estat el sistema escollit per a realitzar les transfeccions de l'hibridoma.

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

Es controla l'esterilitat dels cultius mantenint alíquotes de medi sense cèl·lules a l'incubador i comprovant al microscopi l'absència de bacteris, llevats o fongs; i realitzant tests de micoplasmes amb kits comercials (Gibco).

### **7.3. Mètodes analítics**

#### **7.3.1. Recompte cel·lular**

El nombre de cèl·lules vives, mortes, totals i el percentatge de viabilitat que presenta el cultiu es calcula a partir del recompte a 100 augments mitjançant un microscopi invertit de contrast de fase (Nikon, TMS) i un hemacitòmetre (Neubauer Improved, Brand).

Per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, es tenyeixen amb una mescla 1:1 d'una dissolució de blau de tripà (Sigma) diluïda al 0.2% (v/v) en PBS 0.1 M (8g·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2g·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.8 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.2 g·L<sup>-1</sup> KCl) pH 7.4 o NaCl 0.9% (p/v) i la mostra cel·lular. El colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes i els dona un color blavós. Per contra, les cèl·lules vives es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant. Una gota de la dissolució es diposita a la zona de recompte de l'hemacitòmetre i es cobreix amb un cubreobjectes (Menzel-Gäser). A continuació, es realitza el recompte de cèl·lules vives i mortes en cadascun dels quatre camps. Els dos valors superior i inferior obtinguts es rebutgen, mentre que els altres dos es promitgen.

##### **7.3.1.1. Càlcul de la concentració cel·lular**

El càlcul de la concentració de cèl·lules present al cultiu es realitza mitjançant la següent fórmula (aplicable a cèl·lules viables i mortes):

$$[cèl/mL] = \frac{n_1 + n_2}{d \cdot V} = (n_1 + n_2) \cdot 10^4$$

on  $n_1$  i  $n_2$  són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps acceptats,  $m$  és el nombre de camps comptats i té un valor de 2,  $d$  és la dilució amb blau de tripà realitzada i és 0.5, i  $V$  és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de  $5 \times 10^{-5}$  mL.

### 7.3.1.2. Càlcul de la viabilitat cel·lular

Per a la seva obtenció, cal calcular prèviament el nombre total de cèl·lules (suma de vives i mortes), i posteriorment aplicar la fórmula següent:

$$Viabilitat(\%) = \frac{[cèl\ viables]}{[cèl\ totals]} \cdot 100$$

### 7.3.2. Anàlisi de les concentracions d'aminoàcids, amoni, glucosa i lactat

Les mostres dels cultius dels experiments, una vegada fet el recompte cel·lular, se centrifuguen a 500xg durant 5 minuts. Si es vol, es pot guardar el sobrenadant a  $-30^\circ\text{C}$  per a les posteriors anàlisis.

#### 7.3.2.1. Anàlisi de glutamina i altres aminoàcids per HPLC

L'anàlisi de la concentració d'aminoàcids i amoni es realitza per cromatografia líquida d'alta redissolució (HPLC), mitjançant una derivatització prèvia dels aminoàcids (Mètode de AccQ·Tag, Waters), prèvia a la seva separació. La majoria dels aminoàcids són molècules sense grups cromòfors i amb uns radicals de diferent naturalesa. Cal introduir als aminoàcids alguna modificació que permeti detectar-los amb suficient sensibilitat. Això s'aconsegueix mitjançant una reacció de derivatització en què cadascun dels aminoàcids s'uneix a un reactiu que en permet la seva posterior detecció. Seguidament, els aminoàcids derivatitzats se separen per cromatografia de fase reversa i són detectats, ja que absorbeixen llum en la zona ultraviolada.

Per a l'anàlisi d'aminoàcids i amoni, s'utilitza: un cromatògraf Waters LC Module I Plus; una columna de fase reversa (Waters, AccQ·Tag 150x3.9 mm, WAT052885); el *AccQ·Fluor Reagent Kit* (que conté: *Waters AccQ·Fluor Borate Buffer*, *Waters AccQ·Fluor Reagent Powder* i *Waters AccQ·Fluor Reagent Diluent*); i una dissolució patró de tots els aminoàcids i amoni de 0.1 mM i 1 mM de concentració, per poder efectuar els corresponents calibrats. A més d'això, es preparen

dues dissolucions patrons concentrades de Gln, Ala i amoni amb concentracions en el primer patró de 10, 5 i 10 mM; i, en el segon, de 5, 2.5 i 5 mM, respectivament.

Els eluents necessaris per a la separació dels aminoàcids i l'amoni són:

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

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

### **7.3.2.2. Determinació de la concentració de glucosa i lactat**

La determinació de glucosa i lactat es realitza amb un analitzador automàtic YSI (Yellow Springs Instrument, 2700 Select) basat en la detecció amperomètrica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produït per dos enzims immobilitzats (glucosa oxidasa i lactat oxidasa).

L'analitzador pren 55 µL de cada mostra i dona els valors de concentració de glucosa i lactat en (g·L<sup>-1</sup>). El rang de concentracions que pot mesurar l'aparell oscil·la de 0.05 a 20.0 g·L<sup>-1</sup> per a la glucosa i de 0.005 a 2.00 g·L<sup>-1</sup> per al lactat. Si s'ha de diluir la mostra, cal fer-ho en aigua ultrapura.

### **7.3.2.3. Determinació de la concentració d'anticòs monoclonal**

La concentració d'anticòs monoclonal es determina mitjançant la tècnica d'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Butler et al., 1978; Nellen, 1992). Concretament s'utilitza un ELISA indirecte; aquest mètode consisteix en fixar a un suport sòlid un anticòs (anti-IgG<sub>3</sub>) que reconegui l'anticòs problema (IgG<sub>3</sub>), i utilitzar un segon anticòs que reconegui també l'anticòs

problema però que porti lligat un enzim que catalitzi una reacció colorimètrica. La intensitat de color detectada és directament proporcional (dins d'un interval) a la concentració de l'anticòs problema.

S'utilitza la dissolució del substrat *Immunopure Microwell Peroxidase substrate kit* (Pierce) i els anticossos: Anti-IgG3 (The Binding Site, Sheep antimouse IgG3 affinity purified, AU276), que es dilueix 1:200 amb tampó de recobriment (fins 5 mg·mL<sup>-1</sup>) i s'en fan alíquotes de 5 mL cadascuna, que es guarden a -20 °C; Anti-IgG3-Enz (The Binding Site, *Sheep antimouse IgG3 affinity purified peroxidase conjugate*, AP276), que ve subministrat a una concentració de 1 mg·mL<sup>-1</sup> i es conserva a 4 °C; IgG3 patró (The Binding Site, Monoclonal antihuman IgG3, MCOO7) de l'isotip IgG3 de ratolí, que ve subministrat a una concentració de 0.2 mg·mL<sup>-1</sup> i es conserva a 4 °C.

Per procedir a la determinació de la concentració d'anticòs monoclonal, primerament es recobreixen les plaques de poliestirè de 96 pous de fons pla (Nunc) i es dilueix l'anti-IgG<sub>3</sub> amb tampó de recobriment (1.59 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93 g·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mL timerosal 0.01 % (v/v)) fins a una concentració de 1 µg·mL<sup>-1</sup>. S'afegeixen 100 µL per pou i es deixa la placa tota la nit (16-18h) a 4°C. L'endemà, es renta la placa tres vegades amb tampó de rentat (s'afegeixen 0.5 mL Tween-20 0.05 % (v/v) i 0.1 mL timerosal 0.01 % (v/v) per cada litre de PBS 0.1 M pH 7.4) per eliminar l'anticòs que no s'ha enganxat. Per realitzar el rentat, es buida el contingut dels pous invertint la placa i s'escorre bé aquesta picant sobre el paper de filtre. S'omple un recipient amb dissolució de rentat i se submergeix la placa en la dissolució per tal que s'omplin tots els pous i es deixa fora del recipient 1 minut. Es repeteix el procés tres vegades.

Per evitar la unió d'altres anticossos, la paret del pou és bloquejada amb albúmina afegint 100 µL de tampó de bloqueig (3 % (p/v) albúmina fracció V sense proteases (Pentex)) a cada pou i s'incuba 1 hora a 30°C en una cambra humida. Seguidament, es repeteix el mateix procediment de rentat descrit anteriorment i es preparen les dilucions dels patrons i les mostres de la forma com es detalla a continuació:

- CORBA PATRÓ: Es fa una dilució 1:1000 del patró (IgG<sub>3</sub>) amb tampó de dilució (1 % (p/v) albúmina) i, a continuació, es dilueix fins a 40 ng·mL<sup>-1</sup>. A partir d'aquesta dilució es preparen les concentracions: 20, 15, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.25, i 0.625 ng·mL<sup>-1</sup>.

- **MOSTRES:** Per tal que les mostres entrin en el rang de concentracions de la recta patró es dilueixen amb tampó de dilució en proporcions diferents depenent del temps del cultiu en què s'hagi tret cada mostra i per tant del nivell d'anticòs que en principi cal esperar.

A la Figura 7.1, es mostren les posicions on s'addicionen patrons i mostres. Pels patrons, s'afegeixen 100 µL de cada concentració als pous de les columnes 1 i 2, de manera que es tingui un duplicat de cada concentració. Pel que fa a les mostres, s'afegeixen 200 µL de cadascuna d'elles als pous A3-A10 i E3-E10, de manera que, tal i com s'havia fet amb els patrons, cada mostra sigui mesurada per duplicat.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20.0 ng·mL <sup>-1</sup>		MOSTRA 1		MOSTRA 3		MOSTRA 5		MOSTRA 7		BLANC	
B	10.0 ng·mL <sup>-1</sup>										BLANC	
C	5.0 ng·mL <sup>-1</sup>										BLANC	
D	1.25 ng·mL <sup>-1</sup>										BLANC	
E	15.0 ng·mL <sup>-1</sup>		MOSTRA 2		MOSTRA 4		MOSTRA 6		MOSTRA 8		BLANC	
F	7.5 ng·mL <sup>-1</sup>										BLANC	
G	2.5 ng·mL <sup>-1</sup>										BLANC	
H	0.625 ng·mL <sup>-1</sup>										BLANC	

**Figura 7.1. Distribució de les mostres i patrons en les plaques de 96 pous de l'assaig ELISA.**

A continuació, es realitzen tres dilucions dobles de cada mostra. Primerament, es transfereixen 100 µL dels 8 pous de la fila A que contenen les mostres a la fila B. El contingut de cada pou s'homogeneïtza amb una micropipeta (Brand, Transferpette-12).

Aquesta operació es repeteix pels 8 pous de la fila C i D. Els últims 100 µL de la fila D es descarten. Per a les mostres que estan a la fila E, se segueix el mateix procediment. D'aquesta forma, s'obtenen 4 concentracions diferents de cada mostra i així, molt probablement, alguna d'elles es trobarà dins del rang de mesura de la corba patró.

Es repeteix novament el procediment de rentat descrit anteriorment i, tot seguit, es dilueix l'anti-IgG<sub>3</sub>-Peroxidasa amb tampó de dilució (1 % (p/v) BSA en tampó de rentat) fins una concentració de 300 ng·mL<sup>-1</sup>. S'afegeixen 100 µL per pou i s'incuba la placa 1 hora a 30°C en una cambra humida.



Es realitza un nou rentat i es barregen volums iguals de *dissolució I* (tetrametilbenzidina (TMB)  $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i *dissolució II* ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0.02% en àcid cítric), just en el moment abans de ser utilitzades. S'afegeixen  $100 \mu\text{l}$  a cada pou i s'incuba la placa durant 30 minuts a temperatura ambient i protegida de la llum amb paper d'alumini.

La peroxidasa conjugada a l'anticòs catalitza la transferència d'electrons del TMB al peròxid d'hidrogen; aquesta reacció forma un producte colorat, la intensitat del qual és proporcional a la concentració de l'anticòs present. S'atura la reacció afegint  $100 \mu\text{L}$  d'àcid fosfòric 1 M a cada pou i es procedeix a la lectura a 450 nm del color groc resultant en l'espectrofotòmetre automàtic.

A partir de la recta de calibrat obtinguda amb les dissolucions patró el programa de l'espectrofotòmetre determina automàticament la concentració de les mostres problema. Aquest mètode té un error del 10% (Campmajó, 1995).

El programa utilitzat en l'espectrofotòmetre automàtic (Whitakker, Anthos 2001) per la lectura de plaques de 96 pous és el següent:

```
Measurement filter 450nm
Blankmode: Average of individual blank positions
Method: Quantitative evaluation, standard curve, concentration
Plate layout: Autoreplicates 2 wells per sample horizontal
Units of concentration: ng/ml
Curve-fit mode: linear/linear
Shaking: 1 sec, mode 1
```

#### **7.4. *E. coli* : soques, medis i sistemes de cultiu**

En aquest treball, han estat utilitzades les següents soques d'*Escherichia coli*: HB101 i TOP10 (Invitrogen). Ambdues tenen una elevada eficiència de transformació i han servit per a la manipulació i amplificació de plasmidis.

Els medis de cultiu utilitzats són: LB líquid ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'extracte de llevat,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  peptona, pH 7.2) i sòlid (LB líquid,  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar). En la selecció de clons que hagin incorporat el

plasmidi que els ofereixi resistència a algun antibiòtic, s'han emprat medis selectius amb ampicilina (concentració final de 50 mg·mL<sup>-1</sup>, Britapen) o kanamicina (concentració final de 10 mg·mL<sup>-1</sup>, Roche), segons correspongués, seguint les indicacions descrites per Sambrook et al., 1989.

Els cultius d'*E. coli* s'han realitzat en erlenmeyers de 50 mL i en càpsules de Petri amb 20-30 mL de medi LB sòlid. Les soques s'han mantingut en càpsules de Petri amb 20-30 mL de LB sòlid, cultivades després de la seva inoculació >18 hores a 37°C i, posteriorment, conservades a 4°C. És recomanable fer un subcultiu cada mes. De totes formes, de cada soca s'han conservat també cultius estoc glicerinatats d'1.5 mL en medi LB líquid al 15-20% de glicerol a -80°C (congelador Nuair, UN-6512E).

## **7.5. Extracció i purificació de material genètic**

### **7.5.1. Extracció i purificació de DNA plasmídic**

Segons la quantitat de DNA final a purificar, s'ha fet ús de diferents tipus de columnescontingudes en dos kits: *High Pure Plasmid kit* (Roche) per a preparacions de fins a 10 µg de DNA, i *QIAfilter Midiprep kit* (Qiagen) per a preparacions de fins a 100 µg de DNA i amb qualitat per a transfecció, seguint les especificacions dels proveïdors.

### **7.5.2. Extracció i purificació de DNA genòmic**

Per a l'obtenció de DNA genòmic s'utilitza un mètode molt ràpid que permet visualitzar la fragmentació típica de les cèl·lules que han mort per apoptosi (veure 7.13.2.2) i que es descriu a continuació.

Les mostres de  $5 \times 10^5$  cèl·lules, se centrifuguen a 500xg durant 5 minuts, s'elimina el sobrenedant, es resuspèn el botó de cèl·lules en 1 mL de PBS 0.1 M i se centrifuga de nou a 500xg durant 5 minuts. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en 0.5 mL de dissolució de lisi (0.59 g NaCl, 0.12 g Tris-HCl, 2.5 mL EDTA 0.1 M, pH 7.4, 5 mg tripsina i RNasa lliure de DNasa 1 g·mL<sup>-1</sup>) i s'incuba durant 1 hora a 37 °C. El lisat es tracta amb 10 µL d'acetat sòdic 3 M i 1 mL d'etanol absolut fred per a la precipitació del DNA. Se centrifuga a 1700xg durant 10 minuts. El sobrenedant es descarta i el botó es renta amb 800 µL d'etanol 70

% . Se centrifuga a 1700xg durant 5 minuts. L'etanol s'elimina i el tub Eppendorf amb la mostra es deixa uns minuts a temperatura ambient per evaporar l'etanol remanent, de manera que no interfereixi en la càrrega de la mostra al gel electroforètic. La visualització es realitza en un gel d'agarosa al 1.5 % seguint els passos descrits en l'apartat 7.8.1.

### 7.5.3. Extracció de RNA<sub>TOTAL</sub>

El protocol per a l'extracció de RNA<sub>TOT</sub> a partir de mostres de cèl·lules d'hibridoma és el descrit per Chomczynski i Sacchi, 1987, amb lleugeres modificacions. En base, es parteix de 10 mL de cultiu a una densitat de  $10^7$  cèl·lules·mL<sup>-1</sup>, se centrifuga durant 5 minuts a 500xg, el sobrenedant es decanta i es resuspèn el botó en 5 mL de *dissolució GI* (isotiocianat de guanidina 4 M, citrat sòdic 25 mM, sarcosil 0.5%, que es guarda a 4°C en una ampolla de vidre fosc i, abans de ser utilitzada, se li addicionen 0.72 mL de β-mercaptoetanol per cada 100 mL de dissolució). S'afegeixen 0.5 mL de NaAcO 2 M pH 4.0 i es barreja invertint el tub varies vegades.

S'afegeixen 5.5 mL de fenol saturat amb aigua tractada amb DEPC (preparat just abans de realitzar l'extracció de RNA) i 1 mL de cloroform i es barreja per inversió. S'agita la mescla durant un minut i es deixa reposar en gel durant 15 minuts. Aquest és el pas clau del procés donat que el pH àcid facilita que el DNA passi a la fase orgànica, mentre que el RNA es queda a la fase aquosa. Se centrifuga a 13000xg durant 20 minuts a 4°C. A continuació, es recull la fase aquosa, que es transfereix a un altre tub, on es barreja amb 1 volum d'isopropanol i es deixa precipitar durant un mínim de dues hores a -20°C. A continuació, se centrifuga a 13000xg durant 30 minuts a 4°C. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el precipitat en 0.5 mL de *dissolució GI*.

Es transfereix la suspensió a un tub Eppendorf i es resuspèn a temperatura ambient per tal d'aconseguir la màxima solubilització possible. Tot seguit, se centrifuga la mostra a 13000xg durant 1 minut i es passa el sobrenedant a un altre tub de manera que es descarti qualsevol sediment d'impureses. A continuació, s'afegeixen 0.5 mL d'isopropanol, es barreja bé i es deixa 1-2 hores precipitant a -20°C.

Se centrifuga la mostra a 13000xg durant 15 minuts, es renta el sediment amb 1 mL d'etanol 80% i se centrifuga novament a 13000xg durant 5 minuts. Es repeteix el rentat i centrifugat un

altre cop. Seguidament, es resuspèn el botó en 300 µL d'una dissolució 5 mM EDTA i 10 mM Tris-HCl. Si romanen restes de DNA, és possible que costi de dissoldre.

Després, s'addiciona 1 volum d'una barreja fenol:cloroform 1:1 i s'agita vigorosament durant 5 minuts. Se centrifuga la mostra a 13000xg durant 10 minuts i es recupera la fase aquosa a la qual s'afegeixen 1/10 del seu volum de NaAcO 3 M i 3 volums d'etanol absolut. Es deixa precipitant a -20°C un mínim de 4 hores i se centrifuga a 13000xg durant 30 minuts. Posteriorment, es renta el botó amb etanol fred al 80% sense agitar.

Finalment, s'asseca la mostra al buit i es redissol en aigua tractada amb DEPC i autoclavada i es procedeix a determinar l'espectre entre 220 i 320 nm (espectrofotòmetre Shimadzu UV-160) i els càlculs de la puresa<sup>†</sup> ( $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$ ) i concentració de la mostra ( $[RNA] = A_{260} \times \text{dilució} / 24$ ). La integritat del RNA es determina fent córrer la mostra en un gel a l'1.5% d'agarosa i, complementàriament, fent una anàlisi amb el BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies).

El material de vidre ha d'haver estat descontaminat a 200°C durant un mínim de 4 hores i l'aigua, tractada amb DEPC (Sigma) i, seguidament, autoclavada.

## **7.6. Amplificació enzimàtica de material genètic**

### **7.6.1. Amplificació per PCR**

La reacció en cadena de la polimerasa, o PCR, és una tècnica que utilitza l'activitat de les DNA polimerases termoestables en l'obtenció de grans quantitats de DNA, a partir de mostres que poden estar en l'ordre dels femtograms, i la realització de mutagènesi dirigida.

S'han utilitzat les polimerases *Pwo* (Roche), *Taq* (Progenetic) i *Pfu* (Stratagene) i s'han seguit les indicacions subministrades amb els enzims pels proveedors. S'ha utilitzat el termociclador *Gene Cycler* (BIORAD) i el programa següent, del qual únicament s'han modificat les  $T_h$ , segons les seqüències dels encebadors dissenyats (es parteix sempre de  $T_m - 5^\circ\text{C}$  i es va disminuint

---

<sup>†</sup>  $A_{260}/A_{280}=1.7-2.1$  (valors inferiors podrien indicar contaminació de la mostra amb proteïna);  $A_{260}/A_{230}=2.0$  (valors inferiors podrien indicar contaminació de la mostra per carbohidrats)

el valor de temperatura), i el temps d'elongació de la cadena, segons la longitud del fragment que es volia amplificar:

30x	95 °C	2 min
	95 °C	30 s
	Th	45 s
	72 °C	1 min (+ 1 min/kb)
	72 °C	10 min

Quan s'ha volgut reamplificar una banda, la reacció s'ha fet a partir del retall de banda en agarosa i amb el mateix programa descrit anteriorment però amb només 16-18 cicles.

És important tenir en compte que si es parteix d'una concentració de mostra massa gran, no sempre s'obté una correcta amplificació.

En tots els casos, s'ha fet ús del Servei de Seqüenciació i Síntesi d'Àcids Nucleics de la UAB, per a la seqüenciació dels productes de PCR obtinguts i verificar, així, la correcta seqüència dels gens esperats.

### 7.6.2. Amplificació per RT-PCR

Si bé totes les cèl·lules d'un mateix organisme contenen la mateixa informació genètica, la diferenciació en un tipus cel·lular implica la transferència d'informació des del DNA de forma regulada, mitjançant els processos de transcripció i traducció, d'uns gens determinats.

A partir dels mRNA generats, es tradueixen les proteïnes, peons essencials per al manteniment i replicació de l'estructura diferenciada característica d'un tipus cel·lular concret, que dirigiran el comportament de la cèl·lula en un ambient determinat.

Els reactius i la metodologia emprada per a l'aïllament de seqüències de mRNA són els indicats pel producte *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche), que utilitza l'activitat de la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosi aviària (AMV) per a la síntesi de la primera cadena de cDNA i una barreja de *Taq* i *Pwo* polimerases per a la seva amplificació. S'ha partit sempre de 5 µg de RNA<sub>TOT</sub>. S'ha utilitzat el termociclador *Gene Cyclor* (Biorad) i el programa següent, del qual únicament s'han modificat les T<sub>h</sub>, segons les seqüències dels encebadors

dissenyats, i el temps d'elongació de la cadena, segons la longitud del fragment que es volia amplificar:

	50 °C	30 min
	94 °C	2 min
10x	94 °C	20 s
	Th	45 s
	68 °C	1 min
25x	94 °C	20 s
	Th	45 s
	68 °C	1 fins a 3 min en gradient de temps
	68 °C	10 min

Es vol fer notar aquí que la mescla de reacció, a l'igual que en la PCR, accepta l'ús de DMSO i que, per l'aïllament del *bcl-2*, ha estat necessària l'addició de DMSO al 10% (v/v) final.

### 7.6.3. Disseny dels encebadors

Els encebadors que delimiten les regions codificants corresponents dels mRNA d'interès, que inclouen el codó d'iniciació de la traducció (AUG) i el de terminació (UGA, UAA, UAG), s'han dissenyat a partir de les seqüències conegudes dels gens estudiats i que estan disponibles al GenBank del NCBI, National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

En les RT-PCR, s'han usat encebadors perfectament complementaris a la seqüència dels missatgers que es volen aïllar (Taula 7.2). Ara bé, també s'han redissenyat alguns dels encebadors per tal de realitzar lligacions orientades en vectors d'expressió adients de la forma que es mostra a la Figura 7.2. En primer lloc, s'afegeixen quatre nucleòtids a l'atzar com a suport de l'enzim de restricció, de manera que tingués un tram de seqüència on recolzar-se i fer el tall de forma més eficient; seguidament, per assegurar uns bons nivells de transcripció, s'hi afegia la seqüència de Kozak, CCACC (Kozak, 1987); tot seguit, el codó d'iniciació de la traducció de la proteïna i 4 o cinc codons immediatament posteriors a aquest, procurant acabar sempre amb una G o C, que assegura un bon aparellament en 3', necessari per a la correcta elongació de la cadena en la reacció d'amplificació.



**Figura 7.2. Representació esquemàtica de l'estructura seguida en el disseny d'encebadors pensats per al clonatge orientat en vectors d'expressió.** En vermell, quatre nucleòtids a l'atzar; en verd, seqüència diana de l'enzim de restricció requerit; en blau, seqüència de Kozak; i, en negre, la zona codificant del gen.

<b><i>caspasa 1</i></b>	1213 pb
Líder	5' -GCATGGCTGACAAGATCCTGA-3'
Cua	5' -GTTTAATGTCCCAGGAAGAGG-3'
<b><i>caspasa 2</i></b>	1371 pb
Líder	5' -TGGAAATGGCGGCGCCGA-3'
Cua	5' -AGGCGGCATCACGTGGGT-3'
<b><i>caspasa 3</i></b>	931 pb
Líder	5' -GTGACCATGGAGAACAACAAAAC-3'
Cua	5' -CCCCAATCATTCCTCTAGTG-3'
<b><i>caspasa 9</i></b>	439 pb
Líder	5' -GGCCCTGGCCTTATGATGTTT-3'
Cua	5' -TAGTTGGCTACTCGCCATGGA-3'
<b><i>bcl-2</i></b>	711 pb
Líder	5' -ATGCGAATTCATGGCGCAGCCGGAG-3'
Cua	5' -CTCGAGTCACTTGTGGCCAGATA-3'
<b><i>bcl-x<sub>L</sub></i></b>	715 pb
Líder	5' -AATGTCTCAGAGCAACCGGGA-3'
Cua	5' -ACGGTCAGTGTCTGGTCACTT-3'
<b><i>bcl-w</i></b>	616 pb
Líder	5' -ATGGCGACCCAGCCTCAA-3'
Cua	5' -CCACCTGGCCCTAGACTTTC-3'
<b><i>mcl-1</i></b>	1015 pb
Líder	5' -GTCCGACCATGTTTGGCCTG-3'
Cua	5' -CCCCTATTGCACTCACAAGGC-3'
<b><i>bak</i></b>	616 pb
Líder	5' -AATGGCATCTGGACAAGGACC-3'
Cua	5' -CCGGGAGTCATGATCTGAAGA-3'
<b><i>bax</i></b>	589 pb
Líder	5' -AGCGGCAGTGATGGACGG-3'
Cua	5' -TCAGCCCATCTTCTTCCAGATG-3'
<b><i>bhrf-1</i></b>	610 pb
Líder	5' -GAATTCACCATGGCCTATTCAACAAGGGAGATACT-3'
Cua	5' -GCGGCCGCTTAGTGTCTTCCCTCTGGAGATAAAT -3'
<b><i>p35</i></b>	1008 pb
Líder	5' -CGGAATTCACCATGTGTGTAATTTTTCCGGTAGAAAT-3'
Cua	5' -CGGGATCCTTTAATTGTGTTTAATATTACATTTTTGTTGAGTGC-3'
<b><i>x-iap</i></b>	1490 pb
Líder	5' -CGGGATCCACCATGACTTTTAACAGTTTTGAAGGA-3'
Cua	5' -CGGGATCCAGACATAAAAAATTTTTGCTTGAAAGTAATGACTGTGTA-3'

**Taula 7.2. Seqüències d'encebadors.** Aquests encebadors van ser dissenyats per a l'aïllament per RT-PCR de cDNA endògens de l'hibridoma KB26.5 que codifiquen per proteïnes involucrades en la PCD i de gens vírics antiapoptòtics obtinguts per RT-PCR (*ksbcl-2*, de RNA<sub>TOT</sub> de cèl·lules Raji) i PCR (p35, de DNA genòmic del baculovirus *AcNPV*).

### 7.6.4. Mutagènesi dirigida

S'han utilitzat indistintament el sistema de l'*overlap* PCR, que es basa en l'amplificació per separat dels dos braços d'una seqüència de manera que s'origini una regió de la seqüència complementària entre ells i així es pugui dur a terme una nova reacció de PCR per unir els dos braços; i el *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), que es basa en la replicació completa del plasmidi on s'hi inclou la mutació puntual desitjada i seguidament es digereix el vector parental amb l'enzim de restricció *Dpn* I. Per a la mutagènesi dirigida, les reaccions de PCR s'han realitzat sempre amb les polimerases *Pfu* i *Pfu Turbo* (Stratagene), que ofereixen una gran fidelitat en el procés de còpia del DNA.

El programa informàtic utilitzat per al reconeixement de les mutacions puntuals originades mitjançant múltiple aparellament de la seqüència original i els productes de seqüenciació ha estat el Clustal W v1.81([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)).

#### 7.6.4.1. Encebadors mutagènics

Els oligonucleòtids mutagènics (Sigma, Roche) han estat dissenyats a partir de les seqüències que es troben dipositades al GenBank i les seves seqüències es detallen a la Taula 7.3.

##### *x-iap*

D242A (líder)	5' -CTTAATATTTCGAAGTGAATCT <b>G</b> CAGCTGTGAGTTCTGATAGG-3'
D242A (cua)	5' -CTTAATATTTCGAAGTGAATCT <b>G</b> CAGCTGTGAGTTCTGATAGG-3'

##### *bcl-2*

D34A (líder)	5' -GAGTGGGATGCGGGAG <b>G</b> CTGTGGGCGCCGCGCCC-3'
D34A (cua)	5' -GGGCGCGGCGCCAC <b>A</b> GCTCCCGCATCCCCTC-3'
S87A (líder)	5' -GCGGGCCTGCGCTC <b>G</b> CCCCGCTGCCACCTGTG-3'
S87A (cua)	5' -CACAGGTGGCAGCGGG <b>G</b> CGAGCGCAGGCCCCCGC-3'

**Taula 7.3. Seqüències dels encebadors emprats en la mutagènesi dirigida de la X-IAP i el Bcl-2.** En negreta s'indica el codó mutat que passa a ser Ala enlloc d'Asp o Ser, segons el cas.

#### 7.6.4.2. Donatello

Per a l'amplificació del fragment que conté els dominis Bir2 i Bir3 de la X-IAP, s'han utilitzat els encebadors que es mostren a la Taula 7.4. 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*.

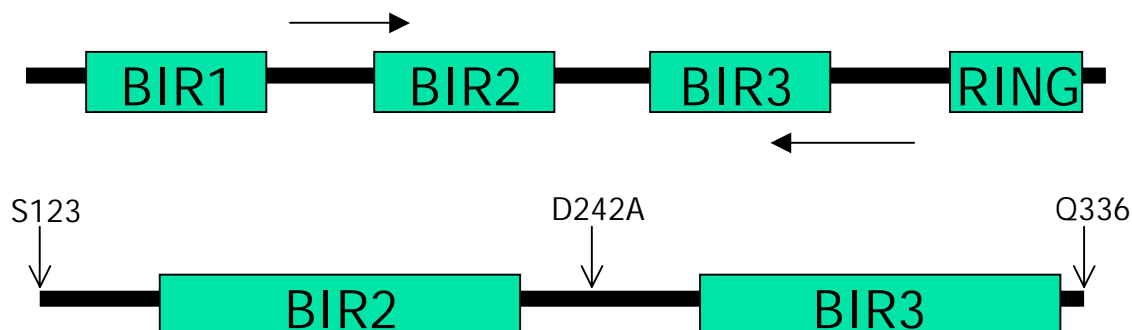
##### *Donatello*

Líder	5' -GGAATTCAGAGATCATTTTGCCTTAGACA -3'
Cua	5' -CGTACTCGAGTCATTGTCCCTTCTGTTCTAACAG -3'

**Taula 7.4. Seqüències dels encebadors emprats per a l'amplificació del mutant *Donatello*.**



La seqüència *Donatello* va ser clonada en *EcoR I/Xho I* en el vector pcDNA3-myc (la informació del qual es troba detallada al subapartat 7.6.2) per tal d'afegir-li l'epítot *myc* en 5'. A la Figura 7.3, es detalla l'estructura d'aquest mutant i el seu origen.



**Figura 7.3. Representació esquemàtica de la regió de la X-IAP amplificada per a la generació de la construcció *Donatello*.** Per a la mutació D242A, s'han emprat els encebadors mutagènics mostrats al subapartat anterior.

### 7.6.4.3. *Michelangelo*

Per a l'amplificació del fragment que conté els dominis Bir2 i Bir3 de la X-IAP per a la unió a la seqüència del Bcl-2 natiu i del propi Bcl-2 natiu, s'han utilitzat els encebadors que es mostren a la Taula 7.5.

#### ***Donatello***

Líder	5' - GGAATTCAGAGATCATTTCCTTAGACA -3'
Cua (unió a <i>bcl-2</i> )	5' - CTCCCAGCGTGCGCCATAGTAGTTCTTACCAGACAC -3'

#### ***bcl-2***

Líder (unió a <i>Donatello</i> )	5' - GTGTCTGGTAAGAACTACTATGGCGCACGCTGGGAG -3'
Cua	5' - GCTACTCGAGTCACTTGTGGCCCAGATGGACCAG -3'

**Taula 7.5. Seqüències dels encebadors emprats per a la generació del mutant *Michelangelo*.**

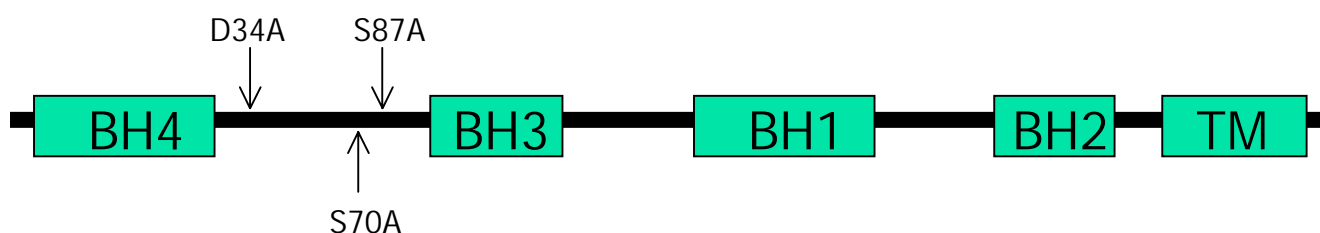
La unió amb la seqüència *Donatello* amb la seqüència *bcl-2* es va realitzar per tècniques d'*overlap* PCR utilitzant els encebadors líder d'amplificació de *Donatello* (Taula 7.5) i cua d'amplificació de Bcl-2 (Taula 7.5). Posteriorment, aquesta seqüència va ser aïllada, purificada i clonada en el vector d'expressió eucariota pcDNA3-myc en *EcoR I/Xho I* (veure subapartat 7.7.3 i Annex B), per afegir-hi en 5' la seqüència que codifica per l'epítot *myc*, que permet la detecció de la seva expressió mitjançant l'ús d'un anticòs anti-*myc* (veure subapartat 7.16.7). Les condicions d'amplificació han estat sempre  $T_h = 50\text{ }^\circ\text{C}$  i en presència de 10% DMSO.

A partir d'aquest moment, qualsevol referència al mutant *Donatello*:Bcl-2 es farà amb el nom *Michelangelo*.

#### 7.6.4.4. Leonardo

El Bcl-2 triple mutant D34A/S70A/S87A fou obtingut per tècniques de *overlap* PCR utilitzant els encebadors mutagènics mostrats a l'apartat 7.6.4.1. Un cop generada la seqüència mutada, es va unir a la seqüència *Donatello* (la informació corresponent a aquesta seqüència es troba al subapartat 7.6.4.2.) seguint el mateix protocol que pel mutant *Michelangelo*.

Les condicions d'amplificació foren sempre  $T_h = 50\text{ }^\circ\text{C}$ , en presència de 10% DMSO.



**Figura 7.4. Representació esquemàtica de l'estructura del Bcl-2.** S'hi representen les posicions del residu D34, diana de la Caspasa 3, i dels residus Ser 70 i 87, involucrats en la regulació per fosforilació de l'activitat d'aquesta proteïna protectora de l'apoptosi.

El mutant *Donatello*:Bcl-2(D34A/S70A/S87A) s'ha anomenat *Leonardo*. i, a l'igual que els altres mutants, ha estat clonat en *EcoR I/Xho I* en el vector d'expressió de mamífers pcDNA3-myc, les característiques del qual es mostren a l'Annex A.

#### 7.6.5. Processament de les seqüències de DNA i proteïnes

La detecció de les dianes de restricció prèvia a la manipulació genètica de les seqüències dels gens escollits en aquest treball s'ha realitzat amb els programes *DNAassist* 1.01 (Hugh Patterson) i *DNAstrider* 1.2.

### 7.7. Plasmidis utilitzats

Per a la construcció dels vectors recombinants amb els gens escollits, es va partir dels plasmidis pcDNA3 (Invitrogen), pIRESneo (Clontech), pIRESpuro2 (Clontech), pIRES2EGFP (Clontech) i pEE12 (Lonza Biologics). A l'Annex B, es dona més informació de cadascun d'ells.

#### 7.7.1. Construcció del vector pIRES-GS.

Per a la construcció d'un vector bicistrònic que contingués el gen de la *glutamina sintetasa* (GS), es va digerir el vector pIRESneo (Clontech) amb *Sma I* i *Xba I*, i s'hi va clonar el gen de la

GS amplificat per PCR i contingut en el vector pEE12 (Lonza Biologics), en presència de 10% DMSO, i amb els següents encebadors: 5'-ACCCGGGATGGCCACCTCAGC-3' (líder) i 5'-GTCTAGATTAGTTTTTGTATTGGAAGGGCTCGTCGC-3' (cua).

Aquest vector va ser construït amb la intenció de trobar una forma d'assegurar l'expressió estable de gens en hibridomes sense haver d'afegir antibiòtics al medi. Cal recordar que a nivell de formulació de medis de cultiu, és preferible eliminar o canviar components d'aquests que no pas afegir-hi compostos, que moltes vegades encareixen el preu del procés de producció a gran escala.

### **7.7.2. Vector pcDNA3-myc**

El vector pcDNA3-myc conté la seqüència que codifica l'epítot *myc* entre les dianes de restricció *Hind* III i *EcoR* I i fou cedit gentilment pel Dr. John C. Reed. Va ser generat pel Dr. Ryosuke (The Burnham Institute) a partir d'un fragment amplificat per PCR que codifica per aquest epítot i va ser clonat entre les dues dianes de restricció esmentades, conservant la resta de la seqüència del vector. Així, s'obtingueren les construccions pcDNA3-myc-*Donatello*, pcDNA3-myc-*Michelangelo* i pcDNA3-myc-*Leonardo*. El mapa del vector es troba detallat a l'Annex B.

### **7.7.3. Representació gràfica dels vectors generats**

Per a la representació gràfica dels vectors de partida i els nous vectors generats, s'ha utilitzat el programari Plasmid 1.02/3.7 1996 (realitzat per Kivirauma T, Oikari P, Saarela J, del Department of Biotechnology, University of Kuopio, Finland).

## **7.8. Purificació i separació del material genètic**

### **7.8.1. Separació del material genètic per electroforesi en gels d'agarosa**

Els àcids nucleics per aplicacions tant analítiques com preparatives se separen mitjançant l'electroforesi en gels d'agarosa amb TAE (Tris 40 mM, àcid acètic 20mM i EDTA 2mM) pH 8.1.

La mostra es mescla amb tampó de càrrega 10x (glicerol 50% i una punta d'espàtula d'Orange G) i es carrega en un gel d'agarosa a la concentració requerida per a la correcta separació dels fragments de DNA de la mostra (Sambrook et al., 1989)

Per a la determinació dels tamanys moleculars, s'han emprat marcadors de pesos moleculars de diferents rangs de tamany (Roche, Fermentas) de forma que les bandes de les mostres es trobessin entre les d'aquests marcadors.

Les bandes de DNA es visualitzen amb un transil·luminador d'UV (TFX-20M) a una longitud d'ona de 302 nm. Cal no oblidar l'ús d'ulleres de protecció. Les fotografies obtingudes dels gels s'han realitzat amb les càmeres Polaroid DS43 i Kodak DC120, i el tractament d'imatges s'ha fet amb el programa Photoshop v5.5 (Adobe).

### **7.8.2. Purificació de bandes de DNA**

Els fragments de DNA es recuperen tallant la banda d'interès i purificant-la amb columnes *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen) seguint les especificacions del proveïdor. Aquest és un mètode senzill i ràpid que permet una elevada recuperació de fragments d'un tamany superior als 100 pb.

### **7.8.3. Quantificació de la concentració de DNA**

En aquest treball s'ha fet ús de dos mètodes per a la quantificació de DNA. L'un, que tan sols ofereix valor orientatiu, es basa en la comparació visual de la intensitat de lluminositat de la banda obtinguda en la mostra respecte les intensitats de les bandes obtingudes pels patrons de tamany molecular, de concentració i tamany coneguts. L'altra, molt més acurat, s'obté a partir de la lectura de l'absorció a 260 nm ( $[DNA] \text{ (mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = (A_{260} \times \text{dilució})/20$ ) determinada amb un espectrofotòmetre (Shimadzu UV-160A) o bé mitjançant l'ús del BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies), que també es basa en mètodes de separació electroforètics i quantificació espectrofotomètrica de productes de PCR i de restricció enzimàtica.

## **7.9. Modificacions enzimàtiques del DNA**

Tant per al clonatge dels gens en vectors d'expressió com per a la comprovació de l'orientació, un cop clonats, ha calgut fer ús d'enzims de restricció (Roche, Pharmacia, New England Biolabs,

Fermentas) amb els seus respectius tampons de reacció. En alguns casos s'han generat extrems roms a partir de fragments digerits amb enzims de restricció que originen extrems cohesius. Això s'ha aconseguit utilitzant la polimerasa del fag T4 (Pharmacia) que reomple els extrems 3' del DNA en presència de dNTPs. És necessari que hi hagi un excés de nucleòtids ja que l'enzim pot tenir activitat exonucleàsica 3' si aquests manquen.

Quan es clona amb extrems roms, s'han de desfosforilar els extrems 5' del DNA plasmídic amb la *fosfatasa alcalina*, CIP (Roche) per prevenir el relligament dels plasmidis linearitzats per enzims de restricció.

La lligació de fragments de DNA és una tècnica utilitzada per unir inserts a plasmidis. L'enzim utilitzat per portar a terme aquesta reacció és la lligasa de T4 (Pharmacia, Fermentas, Roche, New England Biolabs). L'enzim requereix la presència d'ATP, que ja s'inclou en el tampó de lligació.

En aquells casos on s'han detectat problemes en el clonatge d'inserts, s'ha fet ús del TOPO Cloning kit (Invitrogen), que assegura, mitjançant l'ús de topoisomerases unides als extrems del vector pcDNA4 linearitzat, la ràpida i eficient lligació de fragments de DNA amplificats per PCR amb *Taq* polimerasa.

### **7.10. Transcripció i traducció *in vitro***

Les reaccions de transcripció i traducció *in vitro* s'han realitzat pels productes de mutagènesi dirigida com a control de la correcta construcció dels mutants. Ha estat una forma de confirmar els resultats obtinguts per seqüenciació de DNA, de manera que es tingués una prova definitiva de que la proteïna esperada era traduïda i que tenia el tamany molecular esperat.

Per fer això, s'ha emprat el *TNT T7 Quick kit* (Promega), que conté tots els components de reacció en un únic tub on només cal afegir-hi [<sup>35</sup>S]-Metionina i la mostra de DNA. El procés seguit és el descrit en les instruccions subministrades pel proveïdor.

Els productes de traducció obtinguts se separen en un gel desnaturalitzant de poliacrilamida contenint SDS, que posteriorment s'asseca a 65 °C durant 1.5 hores i es visualitza amb pel·lícules de radiografia (Kodak) després d'una exposició de 16-18 hores a -80 °C.

### **7.11. Transformació**

Les cèl·lules bacterianes competents per a la posterior transformació s'han preparat mitjançant el mètode del clorur càlcic. La transformació es basa en el mètode clàssic descrit per Sambrook et al., 1989, sense cap modificació. Únicament es vol fer notar aquí que s'ha observat major eficiència de transformació usant dissolucions de clorur càlcic filtrades a través de filtres de 0.22 µm de tamany de porus, enlloc d'autoclavades.

### **7.12. Transfecció**

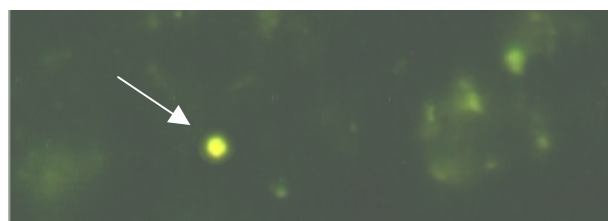
L'estudi de la regulació i expressió gènica en cèl·lules eucariotes requereix del desenvolupament de mètodes per a transferir DNA dins d'aquestes cèl·lules. Existeixen diferents metodologies: l'ús de fosfat de calci o altres cations divalents, polications, liposomes, retrovirus, microinjeccions i electroporacions.

#### **7.12.1. Reactiu de transfecció**

En aquest treball, s'ha fet ús del reactiu DMRIE-C (Life Technologies), que és el que millors resultats d'eficiència de transfecció (2-4 %) oferia en l'hibridoma KB26.5<sup>‡</sup>. A les 48 hores després de la transfecció, s'afegeix la puromicina a una concentració final de 3 µg·mL<sup>-1</sup>. En el cas de la neomicina, degut a la lentitud del seu efecte en les cèl·lules, s'afegeix immediatament després d'haver realitzat la transfecció a una concentració final de 3 mg·mL<sup>-1</sup>.

Ha calgut optimitzar alguns paràmetres de les condicions de transfecció: les quantitats de reactiu DMRIE-C i de DNA plasmídic, i el temps d'incubació del complex format pel DMRIE-C amb el DNA.

Per dur a terme l'optimització, es van transfectar cèl·lules d'hibridoma KB26.5 amb el plasmidi pIRES2EGFP, que conté el gen que codifica per a la proteïna fluorescent EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) que emet fluorescència verda (a  $\lambda=508$  nm) al ser irradiada amb llum ultraviolada. Per tant, aquelles cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi podran ser detectades per microscòpia de fluorescència (Figura 7.5). A continuació, es mostren les condicions òptimes per dur a terme les transfeccions.



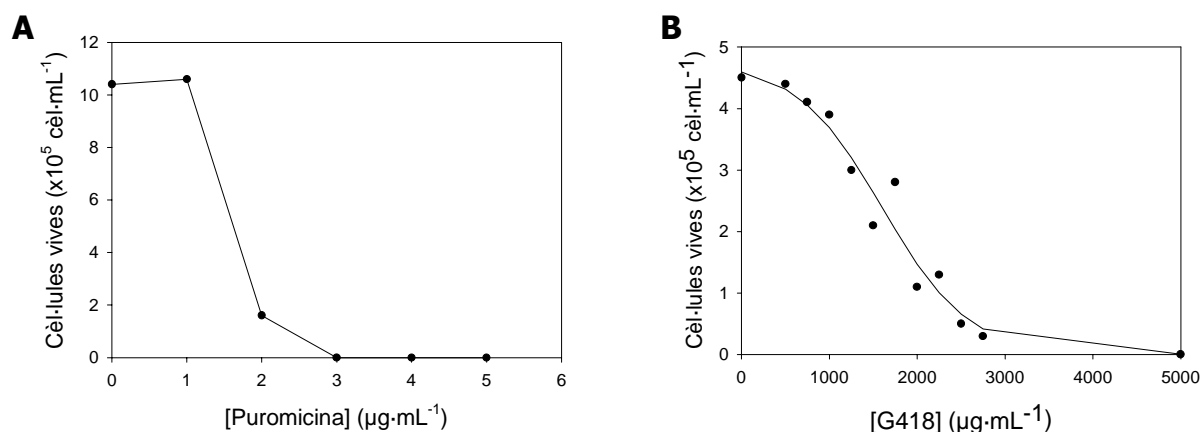
Paràmetre	Rang	Valor òptim
Reactiu DMRIE-C	2-12 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$
DNA plasmídic	1-4 $\mu\text{g}$	4 $\mu\text{g}$
Temps d'incubació DMRIE-C:DNA	15-45 min	45 min

**Figura 7.5. Optimització dels paràmetres de transfecció de l'hibridoma KB26.5.** A l'esquerra, fotografia obtinguda per microscòpia de fluorescència (Microscopi d'epifluorescència Olympus BX60 amb filtre triple DAPI/Texas Red/FITC) on s'aprecia una cèl·lula d'hibridoma transfectada amb el vector pIRES2-EGFP. A la Taula de la dreta, es mostren els paràmetres optimitzats.

### 7.12.2. Determinació de les concentracions òptimes del marcador de selecció

Les concentracions de puomicina i neomicina necessàries per a la correcta selecció de les cèl·lules que han incorporat el DNA plasmídic es van determinar experimentalment.

A la Figura 7.6, es mostren les corbes de mort obtingudes en ambdós casos.



**Figura 7.6.** Corbes de mort de cultius d'hibridoma KB26.5 incubats en medis que contenen concentracions gradualment més elevades de (A) puomicina i (B) neomicina. Les dades han estat preses a les 48 hores de l'inici del cultiu.

‡ També s'han provat els reactius FuGENE (Roche) i SuperFect (Qiagen) però els resultats no han estat tan satisfactoris com amb DMRIE-C (Life Technologies).

### **7.12.3. Seguiment de la transfecció**

En cada tanda de transfecció s'afegeixen tres controls:

- Cèl·lules d'hibridoma sense transfectar cultivades en un medi DMEM 4% FCS sense marcador de selecció, per comprovar que els cultius creixen normalment
- Cèl·lules tractades de la mateixa manera que les cèl·lules transfectades però sense la incorporació de cap DNA i cultivades en un medi DMEM 4% FCS amb l'antibiòtic que s'utilitzi com a marcador de selecció, per comprovar que aquelles cèl·lules que no han incorporat el vector que conté el gen que confereix resistència al marcador de selecció emprat acaben morint
- Cèl·lules transfectades amb els vectors pIRESpuro2 o pcDNA3, i cultivades en un medi DMEM 4% FCS amb marcador de selecció, respectivament. Aquest control permet observar l'expressió correcta de la resistència al macador de selecció

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

## **7.13. Tècniques per a la detecció de l'apoptosi en l'hibridoma**

Mitjançant una gran varietat de tècniques, qualitatives i quantitatives, s'ha fet el seguiment directe i indirecte dels canvis morfològics i bioquímics que es donen durant el procés d'apoptosi en l'hibridoma.

### **7.13.1. Tècniques quantitatives**

#### **7.13.1.1. Marcatge amb Annexina-V-Fluos i quantificació per citometria de flux**

Aquest mètode permet detectar el procés de translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana cel·lular, que es dona durant els estadis preliminars de l'apoptosi, mitjançant el marcatge específic d'aquest fosfolípid de membrana amb una proteïna marcada amb un fluorocrom que hi té una alta especificitat d'unió anomenada Annexina-v-Fluos (Roche). La conjugació de l'annexina a una fluoresceïna permet la quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten aquesta translocació per citometria de flux (Blanckenberg et al., 1998).



Primerament, se centrifuga a 500xg durant 5 minuts el volum de cultiu necessari per obtenir un nombre total de  $3 \times 10^5$  cèl·lules. Es descarta el sobrenadant i es resuspenen les cèl·lules en 1 mL de tampó PBS 0.1M pH 7.4. Les cèl·lules es tornen a centrifugar a 500xg durant 5 minuts.

Es descarta el sobrenadant i es resuspenen les cèl·lules amb 50  $\mu\text{L}$  de dissolució de diluent ( $2.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $8.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  CaCl<sub>2</sub> anhidre,  $0.55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  HEPES) i, posteriorment, s'afegeixen 50  $\mu\text{L}$  més de la dissolució Annexina-V-Fluos (Roche) 2% (aquest reactiu s'aliquota i es guarda a  $-30^\circ\text{C}$  en absència de llum; en el moment de realitzar l'anàlisi, es dilueixen 10  $\mu\text{L}$  en 0.5 mL de dissolució de dilució).

Les cèl·lules es deixen en contacte amb la dissolució final d'anexina 1% durant uns 15 minuts en absència de llum. Després, es realitza la lectura de la mostra al citòmetre de flux (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Per processar les anàlisis de les mostres, s'utilitza el programa CellQUEST (Becton-Dickinson).

### **7.13.1.2. Quantificació per microscòpia de fluorescència de morfologies cel·lulars**

A conseqüència de la desestructuració del citoesquelet provocada per l'activació de proteases específiques durant el progrés de la PCD, la cèl·lula adopta unes morfologies característiques observables per microscòpia òptica.

La quantificació del nombre de cèl·lules que presenten una morfologia determinada i la fragmentació del DNA es realitza mitjançant l'observació al microscopi de fluorescència de la mostra tenyida amb bromur d'etidi i taronja d'acridina.

A una mostra de 75  $\mu\text{L}$  del cultiu, s'hi addicionen 3  $\mu\text{L}$  de la dissolució de tinció (0.5 mL de dissolució de taronja d'acridina  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en PBS 0.1 M pH 7.4 filtrada a  $0.22 \mu\text{m}$ , i 0.5 mL de dissolució de bromur d'etidi  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Bioprobes). La mostra es diposita en un hemacitòmetre per tal de poder fer el recompte de cèl·lules.

Mitjançant l'observació al microscopi de fluorescència (Olympus BH-2) amb llum ultraviolada a través d'un objectiu de 40 augments es quantifica el percentatge de morfologies viables, viables apoptòtiques, no viables apoptòtiques i necròtiques (Tintó, 1999).

## **7.13.2. Tècniques qualitatives**

### **7.13.2.1. Visualització de l'apoptosi per microscòpia confocal**

Aquest mètode permet visualitzar diferents talls o plans de l'interior de les cèl·lules i detectar l'aparició de morfologia apoptòtica, mitjançant un microscopi òptic làser confocal (LEICA TCS 4D). Així, s'han visualitzat alteracions característiques de la PCD fent ús de diferents marcatges amb compostos que emeten fluorescència a diferents longituds d'ona. En concret, s'han estudiat els canvis estructurals que es donen durant l'evolució de l'apoptosi en la cèl·lula mitjançant el marcatge amb annexina i amb una mescla de bromur d'etidi i taronja d'acridina, ambdós descrits anteriorment en l'apartat 7.13.1.

La fragmentació del DNA s'ha observat mitjançant una tècnica de marcatge enzimàtic anomenada TUNEL que permet detectar l'aparició de fragments de DNA bicatenaris mitjançant la unió de desoxioligonucleòtids marcats amb una molècula fluorescent als extrems 3' del DNA degradat. En base, es parteix d'una mostra que contingui aproximadament  $3 \times 10^5$  cèl·lules·mL<sup>-1</sup>. Se centrifuga a 300xg durant 5 minuts i s'elimina el medi. S'hi addicionen 0.5 mL de dissolució de fixació PLP (paraformaldehid al 4%, lisina i periodat) i es fixen les cèl·lules durant 30 minuts a temperatura ambient. Se centrifuga la mostra a 300xg durant 5 minuts i s'elimina el fixador. El botó es resuspèn en 0.5 mL de PBS 0.1 M i es torna a centrifugar la mostra a 300xg durant 5 minuts. El PBS s'elimina i es resuspenen les cèl·lules amb Tritó X-100 0.1% durant 5 minuts a temperatura ambient per tal de permeabilitzar les cèl·lules. Se centrifuguen les cèl·lules a 300xg durant 5 minuts, s'elimina el sobrenadant i s'incuben les cèl·lules en 50 µL de la barreja de reacció –enzim transferasa i dUTP conjugat amb fluoresceïna (Promega) – durant 60 minuts a temperatura ambient. Es renten les cèl·lules dues vegades tot entrifugant-les a 300xg durant 5 minuts, eliminant el sobrenadant i resuspenent-les de nou en 0.5 mL de PBS. Finalment, se centrifuguen a 300xg durant 5 minuts, s'elimina el sobrenadant i es resuspenen les cèl·lules en 100 µL de PBS per a poder muntar en el portaobjectes. Les mostres s'observen al microscopi òptic làser confocal (LEICA TCS 4D).

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

Durant el procés de la PCD, s'activen tota una sèrie d'endonucleases que processen el DNA bicatenari en les posicions internucleosòmiques produint fragments de DNA de longituds múltiples de 180 parells de bases. La fragmentació del DNA genòmic es pot visualitzar fent una

extracció d'aquest a partir del cultiu estudiat i realitzant una electroforesi en gel d'agarosa d'aquesta mostra obtinguda com s'explica a l'apartat 7.8.1. El patró electroforètic observat és molt característic, similar a una escala.

### **7.13.2.3. Anàlisi del potencial intermembrana mitocondrial**

Aquesta tècnica permet determinar si els mitocondris de les cèl·lules mantenen intacte el seu potencial intermembrana durant el procés d'execució de l'apoptosi i si, per tant, encara estan capacitats per realitzar la seva funció energètica.

El producte utilitzat, *Mito Tracker Green<sup>TM</sup>* (Sigma), pot travessar les membranes lípidiques cel·lulars i unir-se a la proteïna Citocrom oxidasa (COX) present a la membrana dels mitocondris que mantenen funcional la cadena transportadora d'electrons. La presència d'un fluorocrom unit a la molècula permet visualitzar les cèl·lules amb mitocondris actius per microscòpia de fluorescència o confocal.

El marcatge de les cèl·lules es porta a terme afegint 10 µL d'una dissolució de *Mito Tracker Green<sup>TM</sup>* 10 µM en 1 mL del cultiu cel·lular i deixant incubar 20 minuts a 37°C. Aquest producte es pot addicionar directament al medi de cultiu, amb o sense sèrum, sense afectar els resultats de l'assaig. La concentració cel·lular recomanada és d'aproximadament  $5 \times 10^5$  cèl·lules·mL<sup>-1</sup>.

La visualització s'ha dut a terme en el microscopi òptic làser confocal (LEICA TCS 4D).

### **7.13.2.4. Detecció de l'alliberament de Citocrom c de mitocondri a citoplasma**

L'alliberament de Citocrom c del mitocondri ha estat detectat per transferència *Western* basant-se en el fraccionament cel·lular de la població estudiada, que és sotmesa a un procés de lisi amb un tampó que manté intacta l'estructura mitocondrial però que disgrega la membrana plasmàtica. La centrifugació del lisat obtingut permet la separació dels mitocondris (en el botó) del citoplasma (en el sobrenedant). La detecció de Citocrom c per *immunoblotting* en ambdues fraccions indica si aquest ha estat alliberat en les condicions a què s'ha sotmès el cultiu original.

El lisat s'obté centrifugant a temperatura ambient una població inicial de  $1 \times 10^6$  cèl·lules. A partir d'aquí, cal treballar sempre a 4°C. Es renten les cèl·lules amb PBS (4°C), es resuspèn el botó en 75 µL de tampó de lisi durant 30 segons, se centrifuga el lisat obtingut 2 minuts a

12000xg i es resuspèn el botó en 200  $\mu\text{L}$  de tampó SB 1x. Es recuperen 65  $\mu\text{L}$  de sobrenedant i s'hi addicionen 21.5  $\mu\text{L}$  de SB 4x (200 mM Tris pH 6.8, 40 % glicerol, 8 % SDS) per tal que quedi 1x concentrat. Es bullen les mostres durant 10 minuts i es quantifica la proteïna pel mètode MICRO-BCA (Pierce), contenint àcid bicinconínic. La quantificació per aquest mètode no es veu interferida per la presència de SDS en el tampó SB.

Es preparen alíquotes de les diferents mostres amb la mateixa quantitat de proteïna per a ser sotmeses a una electroforesi SDS-PAGE, a cada alíquota se li addiciona el volum necessari de tampó de càrrega 10x concentrat (DTT 1M, 1% blau de bromofenol) per a què quedi a una concentració final 1x.

Les mostres són carregades en un gel d'electroforesi SDS-PAGE al 15 % (veure apartat 7.15) i es transfereix el gel a una membrana de difluorur de polivinilidè (PVDF, Millipore) o nitrocel·lulosa (Biorad) segons el protocol descrit per Sambrook et al., 1989 (veure apartat 7.15).

La detecció del Citocrom c, de 15 kDa, es realitza mitjançant un anticòs policlonal de conill anti-Citocrom c (veure 7.16.6). La seva detecció quimioluminescent es fa amb un anticòs secundari anti-Ig de conill conjugat amb peroxidasa tal i com es descriu a l'apartat 7.16.

#### **7.14. Extracció i quantificació del contingut total de proteïna d'un cultiu d'hibridomes**

La proteïna total d'una mostra de cèl·lules s'extreu amb l'ús de tampó de lisi SB (Tris-HCl 25 mM pH 6.8, sacarosa 250 mM, EDTA 1mM) o RIPA (Igepal CA-630 1%, desoxicolat sòdic 0.5% i SDS 0.1%, en PBS) amb un combinat d'inhibidors de proteases (Digitonina 0.1%, DTT 1 mM, PMSF 0.1 mM, Leupeptina 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Pepstatina 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Aprotinina 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Bentamidina 1 mM, Ortovanadat 1 mM) i es determina la seva concentració amb el reactiu MICRO-BCA (Pierce) mesurant l'absorbància a 550 nm. Per determinar si hi interfereix el tampó de lisi, també s'afegeix a les mostres.

La reacció es realitza en plaques d'ELISA. Es quantifica la proteïna de cada mostra per duplicat a partir de dilucions de 1:200. La recta patró (2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 i 1

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) es realitza amb BSA (Pierce) i SB o RIPA, segons sigui el protocol de purificació utilitzat, diluïdes d'acord amb la dilució aplicada a les mostres. La quantificació es realitza a partir de 125  $\mu\text{L}$  de mostra amb 125  $\mu\text{L}$  de reactiu a cada pou de la placa d'ELISA. Per fer-ho, s'agita la placa durant 30 segons, s'incuba 30 minuts a 60°C i es deixa refredar a temperatura ambient (>15 minuts). La lectura de l'absorbància es fa a 550 nm.

Seguidament, es pot realitzar el càlcul de la concentració de proteïna a partir del pendent de la recta la recta patró, sabent que la relació absorbància:concentració de proteïna és descrita per l'equació següent:

$$\text{O.D.} = \epsilon \beta [\text{concentració}] + \text{interferència}$$

on la interferència es determina per l'absorbància observada en el tampó de lisi a 550 nm. El pendent  $\epsilon\cdot\beta$  es determina a partir de la recta patró.

### 7.15. SDS-PAGE

La separació electroforètica de proteïnes s'ha realitzat en gels desnaturalitzants de poliacrilamida al 12% i al 15% contenint SDS, segons els tamanys de les bandes a separar. En base, s'ha seguit el protocol detallat per Sambrook et al., 1989, i les condicions de la Taula 7.4 per a la preparació dels gels (extreta dels mateixos autors).

El suport utilitzat per a la preparació dels gels i la separació electroforètica de les proteïnes ha estat un equip MiniProtean III (Biorad) i una font PowerPac 300 (Biorad). Normalment, les mostres de proteïnes s'han separat a voltatge constant de 150 V.

Per al reconeixement del tamany de les bandes obtingudes s'utilitzen marcadors de tamany molecular conegut (Biorad).

En el cas d'aquells gels SDS-PAGE que seran utilitzats per a la transferència a membranes de nitrocel·lulosa per a la posterior detecció de bandes de proteïnes per transferència *Western*, es van emprar marcadors de pes molecular pre-tenyits que comprenen un rang molt ampli de mides moleculars (Biorad).

	12%	15%	<i>stacking</i>
H <sub>2</sub> O	3.3 mL	2.3 mL	2.1 mL
30% acrilamida-bis	4.0 mL	5.0 mL	500 µL
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	
1.5 M Tris pH 6.8			380 µL
10% SDS	0.1 mL	0.1 mL	30 µL
10% persulfat d'amoni	0.1 mL	0.1 mL	30 µL
TEMED	4 µL	4 µL	3 µL

**Taula 7.4. Dissolucions per a la preparació dels gels separador i empaquetador de l'electroforesi de proteïnes.** Els valors mostrats estan calculats per a la preparació de 10 mL de gel separador al 12 o al 15% i de 3 mL de gel de *stacking*.

### 7.16. Transferència *Western*

La tècnica de transferència *Western* permet la detecció específica de proteïnes mitjançant l'ús d'anticossos. Aquesta ha estat una tècnica clau per esbrinar l'expressió de proteïnes involucrades en la PCD de l'hibridoma. Els revelats s'han dut a terme en una cambra fosca il·luminada amb una làmpada vermella de 10 W, i on s'han utilitzat un agitador orbital (Heidolph), cubetes on dipositar-hi l'aigua per rentar els films i les dissolucions reveladora (B&W Paper Developer, Neutol Liquid NE, Agfa) i fixadora (B&W fixer, Agefix, Agfa). S'han utilitzat cassettes (Amersham Life Science) i pel·lícules de radiografia (Amersham Life Science).

Les proteïnes separades per SDS-PAGE es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa 0.45 µm (Biorad) aplicant un amperatge constant de 400 mA durant 1.5 hores (PowerPac 300, Biorad), en l'interior d'una cambra freda. Seguidament, es bloqueja aquesta membrana amb TBST (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, Tween 0.1%), o PBST (8g·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2g·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.8 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.2 g·L<sup>-1</sup> KCl, Tween 0.1%) pH 7.4, amb 5% de llet en pols (Nestlé) o BSA 1% (en PBST o TBST), durant la nit agitant a 4°C.

A l'endemà, es renta tres vegades durant 5 minuts amb TBST o PBST, i s'incuba 3 hores amb l'anticòs primari (a una dil·lució 1:100-1:500 en TBST o PBST, depenent de l'anticòs). Seguidament, es realitzen tres rentats de 5 minuts en TBST o PBST, i s'incuba 1 hora amb l'anticòs secundari (a una dil·lució 1:1000 en TBST o PBST).

Finalment, es realitzen els tres darrers rentats de 5 minuts en TBST o PBST, i es procedeix a la detecció quimioluminiscent mitjançant els reactius pico o femto (Pierce), segons la intensitat de

banda esperada. És recomanable fer vàries exposicions de diferents temps i així veure en quin dels casos s'aconsegueix visualitzar millor les bandes en les pel·lícules autoradiogràfiques.

#### **7.16.1. Anticòs anti-Caspasa 2**

L'anticòs emprat per a reconèixer la Caspasa 2 és un anticòs policlonal de conill, el sc-623 (Santa Cruz Biotech), que reconeix el precursor de la Caspasa 2 de ratolí, de 48 kDa.

#### **7.16.2. Anticòs anti-Caspasa 3**

L'anticòs emprat per a reconèixer la Caspasa 3 és un anticòs policlonal de conill, sc-7148 (Santa Cruz Biotech), que reconeix el precursor de la Caspasa 3 de ratolí, rata i humans, de 32 kDa, així com les subunitats p11 i p20.

#### **7.16.3. Anticòs anti-Caspasa 9**

L'anticòs emprat per a reconèixer la Caspasa 9 és un anticòs policlonal de conill, sc-7885 (Santa Cruz Biotech), que reconeix el precursor de la Caspasa 9 de ratolí, rata i humans, d'aproximadament 47 kDa, així com la subunitat p10.

#### **7.16.4. Anticòs anti-Bcl-x**

L'anticòs emprat per a reconèixer el Bcl-x és un anticòs policlonal de conill, PC67 (Oncogene), que reconeix la regió compresa entre els aminoàcids 201 i 216 del Bcl-x de ratolí, rata i humans. Això permet reconèixer el Bcl-x<sub>L</sub>, d'aproximadament 27 kDa, però també és possible obtenir un lleuger senyal degut al moderat reconeixement d'aquest anticòs respecte el Bcl-x<sub>S</sub>.

#### **7.16.5. Anticòs anti-Bcl-2**

L'anticòs emprat per a reconèixer el Bcl-2 és un anticòs policlonal de conill, sc-783 (Santa Cruz Biotech). Aquest anticòs permet reconèixer una banda d'aproximadament 26 kDa.

#### **7.16.6. Anticòs anti-Citocrom c**

L'anticòs emprat per a reconèixer el Citocrom c és un anticòs policlonal de conill anti-Citocrom c (Oncogene) que reconeix la forma desnaturalitzada del Citocrom c de rata, ratolí i humà. Aquesta banda migra a aproximadament 15 kDa.

### **7.16.7. Anticòs anti-myc**

La identificació per transferència Western de les proteïnes que coneten l'epítot Myc a la seva seqüència s'ha dut a terme amb l'anticòs policlonal de conill sc-789 (Santa Cruz Biotech).

### **7.16.7. Anticòs secundari**

En aquest treball s'ha utilitzat l'anticòs IgG<sub>conill</sub> Mouse Anti-rabbit IgG (H+L) (Pierce), que està conjugat amb l'enzim peroxidasa, permetent d'aquesta forma la detecció quimioluminiscent de les bandes reconegudes pels anticòs primaris.

## **7.17. Preparació de medis de cultiu amb inhibidors de l'apoptosi**

En alguns dels experiments, es van utilitzar inhibidors químics de l'apoptosi. Habitualment, aquestes substàncies són poc hidrosolubles. Es van dissoldre en el medi de cultiu amb l'ajut de petites quantitats de dissolvents no aquosos. El procediment metodològic emprat per preparar aquests medis es descriu a continuació.

### **7.17.1. z-VAD-fmk**

En un tub Eppendorf es pesa 1 mg del pèptid z-VAD-fmk (Bachem AG) ( $453.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) amb una balança de precisió. Seguidament, s'afegeixen 10  $\mu\text{L}$  de metanol i, amb l'ajut d'una micropipeta, s'homogenitza fins que tot el pèptid s'hagi dissolt. A continuació, s'afegeixen mica a mica els 10  $\mu\text{L}$  anteriors en 22 mL de medi DMEM sense glutamina i sense suplementar amb sèrum per obtenir una concentració de 100  $\mu\text{M}$ . El medi es va agitant amb una espàtula per tal d'evitar que el pèptid s'agregui i precipiti. Seguidament, s'esterilitza el medi filtrant-lo a través de filtres de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Finalment, se suplementa el medi amb sèrum i es realitzen les dilucions necessàries per obtenir els diferents medis amb la concentració d'inhibidor requerida per l'experiment.

### **7.17.2. Ac-DEVD-cmk**

En un tub Eppendorf, es pesen 2.4 mg del pèptid Ac-DEVD-cmk (Bachem AG) ( $643.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) amb una balança de precisió. Seguidament, s'afegeixen 10  $\mu\text{L}$  d'àcid acètic al 50% (v/v) i amb l'ajut d'una micropipeta s'homogenitza fins que tot el pèptid s'hagi dissolt. A continuació, s'afegeixen mica a mica els 10  $\mu\text{L}$  anteriors en 12.5 mL de medi DMEM sense glutamina i sense



suplementar amb sèrum per una concentració final de 300  $\mu\text{M}$ . El medi es va agitant amb una espàtula. Donat que el pH del medi s'acidifica molt, cal equilibrar-lo novament a 7.2 amb NaOH 30% (p/v). Seguidament, s'esterilitza per filtració a 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) i, finalment, se suplementa amb sèrum i es realitzen les dilucions necessàries per a l'obtenció dels diferents medis amb la concentració d'inhibidor requerida per a cada experiment.

### **7.17.3. z-YVAD-cmk**

En un tub Eppendorf, es pesen 2 mg del pèptid z-YVAD-cmk (Bachem AG) ( $541 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) amb una balança de precisió. Seguidament, s'afegeixen 10  $\mu\text{L}$  de DMSO i amb l'ajut d'una micropipeta s'homogeneïtza fins que tot el pèptid s'hagi dissolt. A continuació, s'afegeix mica a mica els 10  $\mu\text{L}$  anteriors en 12.5 mL de medi DMEM sense glutamina i sense suplementar amb sèrum. El medi es va agitant amb una espàtula. El medi s'esterilitza mitjançant filtració a través de filtres de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamany de porus (Millipore). Seguidament, se suplementa el medi amb sèrum i es realitzen les dilucions necessàries per obtenir els diferents medis amb la concentració d'inhibidor requerida per l'experiment.

### **7.17.4. Medis amb $\text{ZnSO}_4$**

Els medis preparats per als experiments de protecció de l'apoptosi amb  $\text{Zn}^{2+}$  han estat preparats a partir de la sal  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . La dissolució d'aquesta sal de zinc comporta acidificació, de manera que abans de realitzar els experiments, es deixaven a l'incubador els flascons que havien de ser emprats. D'aquesta manera, el pH era tamponat gràcies al tampó bicarbonat i l'atmosfera de  $\text{CO}_2$ .

## **7.18. Preparació de medis modificats per a l'aturada del cicle cel·lular**

### **7.18.1. Medi base**

Es prepara segons s'indica a la Taula 7.1 d'aquest capítol sense afegir-hi cap dels components que es volen comprovar en els experiments d'aturada de cicle cel·lular.

### **7.18.2. Suplements**

Es preparen els suplements de galactosa, fructosa, glucosa i fosfats a una concentració 10x: 45  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , per a les fonts de carboni; i 1.09  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , per als fosfats. La resta de reactius (Sigma) es

preparen a les concentracions que s'especifiquen en cada cas (veure Capítol 4). Es filtren totes elles a 0.22  $\mu\text{m}$ .

### **7.19. Estudi del cicle cel·lular per citometria de flux**

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

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

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

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