
REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

- ADAMS JM, CORY S (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326
- ALNEMRI ES, LIVINGSTON DJ, NICHOLSON DW, SALVESEN G, THORNBERRY NA WONG WW, YUAN J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171
- AL-RUBEAI M, SINGH RP (1998): Apoptosis in cell culture. *Curr. Op. Biotechnol.* 9, 152-156
- AL-RUBEAI M, SINGH RP, GOLDMAN MH, EMERY AN (1995): Death mechanisms of animal cell in conditions of intensive cell-culture systems. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 463-472
- ALTAMIRANO C (2000): Anàlisi del metabolisme de cèlulas CHO recombinantes y desenvolupament de estratègies de cultiu en mitjans definits. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona
- AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI DC (1997): A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917-21
- ARATHOON WR, BIRCH JR (1986): Large-scale cell culture in biotechnology. *Science* 232, 1390-1395
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K (1990): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York

REFERENCES

- BAILEY JE (1991): Towards a science of metabolic engineering. *Science* 252, 1668-1675
- BAISCH H, BOLLMANN H, BORNKESSELS (1999): Degradation of apoptotic cells and fragments in HL-60 suspension cultures after induction of apoptosis by camptothecin and ethanol. *Cell Prolif.* 32, 303-319
- BARNABÉ N, BUTLER M (1994): Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1235-1245
- BARTEK J, BARTOVA J, LUKAS J (1996): The Retinoblastoma protein and the Restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 805-814
- BAUM C, RICHTERS A, OSTERTAG W (1999): Retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, 605-612
- BIALIK S, GOTTLIEB T (2000): Death and the Dead Sea. *Cell Death Differ.* 7, 851-859.
- BIRCH JR (1997): Review of biotechnology-derived products in use and in development. *Eur. J. Parenteral Sci. Biotechnology* (special issue), 3-10
- BLANKENBERG FG, KATSIKIS PD, TAIT JF, DAVIS RE, NAUMOVSKI L, OHTSUKI K, KOPIWODA S, ABRAMS MJ, DARKES M, ROBBINS RC, MAECKER HT I STRAUSS HW (1998): In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *PNAS* 95, 6349-6354
- BLOEMKOLK JW, GRAY MR, MERCHANT F, MOSMANN TR (1992): Effect of temperature on hybridoma cell cycle and Mab production. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 427-431
- BODRUG SE, AIME-SEMPE C, SATO T, KRAJEWSKI S, HANADA M, REED JC (1995): Biochemical and functional comparisons of Mcl-1 and Bcl-2 proteins: Evidence for a novel mechanism of regulating Bcl-2 family protein function. *Cell Death Differ.* 2, 173-182
- BOMAN K, ZHENG L, HAMILTON R, VAN DE GOOR J (2001): Dissecting apoptosis in CHO cells. 17th ESACT Meeting, *Animal cell technology: from target to market* (Lindner-Olsson E., ed.). Kluwer Academic Publishers, Tylösand (Sweden)
- BOSSY-WETZEL E, GREEN DR (2000): Detection of apoptosis by Annexin V labeling. *Meth. Ezymol.* 322, 15-18
- BOSSY-WETZEL E, NEWMeyer DD, GREEN DR (1998): Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO* 17, 37-49
- BREITSCHOPF K, HAENDELER J, MALCHOW P, ZEITHER AM, DIMMELER S (2000): Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signalling pathway. *Mol. Cel. Biol.* 20, 1886-1896

REFERENCES

- BUDIARDJO I, OLOVER H, LUTTER M, LUO X, WANG X (1999): Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290
- BUMP NJ, HACKETT M, HUGUNIN M, SESHAGIRI S, BRADY K, CHEN P, FERENZ C, FRANKLIN S, GHAYUR T, LI P, LICARI P, MANKOVICH J, SHI L, GREENBERG AH, MILLER LK, WONG WW (1995): Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269, 1885-1888
- BUTLER JE, FELDBUSH TL, MCGIVERN PL, STEWART N (1978): The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): a measure of antibody concentration or affinity? *Immunochem.* 15, 131-136
- CAPLE MV, FLETCHER TR, OWENS WJ, HARADA S, WALTHALL BJ (1991): Optimal large scale hybridoma growth and monoclonal antibody production in a new biphasic serum-free media system. *J. Cell. Biol.* 115, 82
- CAMPMAJÓ C, CAIRÓ JJ, SANFELIU A, MARTINEZ E, ALEGRET S, GÒDIA F (1994): Determination of ammonium and L-glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis. *Cytotechnol.* 14, 177-182
- CHADEBECH P, BRICHESE L, BALDIN V, VIDAL S, VALETTE A (1999): Phosphorylation and proteasome-dependent degradation of Bcl-2 in mitotic-arrested cells after microtubule damage. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262, 823-827
- CHAI F, TRUONG-TRAN AQ, HO LH, ZALEWSKI PD (1999): Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immun. Cell Biol.* 77, 272-278
- CHAI J, SHIOZAKI E, SRINIVASULA SM, WU Q, DATAA P, ALNEMRI ES, SHI Y (2001): Structural Basis of Caspase-7 Inhibition by XIAP. *Cell* 104, 769-780
- CHARBONNEAU JR, GAUTHIER ER (2000): Prolongation of murine hybridoma cell survival in stationary batch culture by Bcl-xL expression. *Cytotechnol.* 34, 131-139
- CHENG E, NICHOLAS J, BELLOWS D, HAYWARD G, GUO H, REITZ M, HARDWICK J (1997b): A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *PNAS* 94, 690-694
- CHENG EH-Y, KIRSCH DG, CLEM RJ, RAVI R, KASTAN MB, BEDI A, UENO K, HARDWICK JM (1997a): Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968
- CHERNYAK BV, BERNARDI P (1996): The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur. J. Biochem.* 238, 623-630
- CHIOU SK, WHITE E (1998): Inhibition of ICE-like proteases inhibits apoptosis and increases virus production during adenovirus infection. *Virology* 244, 108-118

REFERENCES

- CHITTENDEN T, FLEMINGTON C, HOUGHTON AB, EBB RG, GALLO GJ, ELANGO VAN B, CHINNADURAI G, LUTZ RJ (1995a): A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 14, 5589-5596
- CHITTENDEN T, HARRINGTON EA, O'CONNOR R, FLEMINGTON C, LUTZ RJ, EVAN GI, GUILD BC (1995b): Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 733-736
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 162, 156-159
- CHOU JJ, MATSUO H, DUAN H, WAGNER G (1998): Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* 94, 171-180
- CLEARY ML, SMITH SD, SKLAR J (1986): Cell cloning and structural analysis of cDNAs For bcl-2 and a hybrid Bcl- 2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19-28
- CLEM RJ, CHENG EH, KARP CL, KIRSCH DG, UENO K, TAKAHASHI A, KASTAN MB, GRIFFIN DE, EARNSHAW WC, VELIUONA MA, HARDWICK JM (1998): Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *PNAS* 95, 554-559
- CLEM RJ, MILLER LK (1994): Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol. Cel. Biol.* 14, 5212-5222
- COHEN GM (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16
- COLLINS MK, PERKINS GR, RODRIGUEZ-TARDUCHY G, NIETO MA, LOPEZ-RIBAS A (1994): Growth factors as a survival factors: regulation of apoptosis. *BioEssays* 16, 133-138
- COTTER G, AL-RUBEAI M (1995): Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *TIBTECH* 13, 150-155
- CROOK NE, CLEM RJ, MILLER LK (1993): An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* 67, 2168-2174
- CRYNS V, YUAN J (1998): Proteases to die for. *Genes Dev.* 12,1551-1570
- de KONING W.J, WALSH GA, WRYNN AS, HEADON DR (1994): Recombinant reproduction. *Biotechnol.* 12, 988-992
- DECAUDIN D, GELEY S, HIRSDCH T, CASTEDO M, MARCHETTI P, MACHO A, KOFLER R, KROEMER G (1997): Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 57: 62-67
- DEMANGEL C, DUVAL D, GEAHEL I (1991): The role of dissolved oxygen in growth of animal cells. *Prod. Biol. Anim. Cells Cult.*. ESACT 10th Meeting, 256-258

REFERENCES

- DEVERAUX QL, LEO E, STENNICKE HR, WELSH K, SALVESEN GS, REED JC. (1999a): Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* 18: 5242-5251
- DEVERAUX QL, REED JC (1999): IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes. Dev.* 13, 239-52
- DEVERAUX QL, STENNICKE HR, SALVESEN GS, REED JC (1999b): Endogenous inhibitors of caspases. *J. Clin. Immunol.* 19: 388-398
- DEVERAUX QL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304
- DICKSON AJ (1998): Apoptosis regulation and its applications to biotechnology. *TIBTECH* 16, 339-342
- DUKE RC, COHEN JJ (1992): Morphological and biochemical assays of apoptosis. In K. Janssen (ed). *Current protocols in immunology*. Wiley, New York.
- DUTTON G (2001): Mab manufacturing concerns. *GEN* 21, 1
- EARNSHAW WC (1999): A cellular poison cupboard. *Nature* 397, 387-389
- EKERT PG, SILKE J, VAUX DL (1999): Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 6, 1081-1086
- EL-DEIRY WS, TOKIUNO T, VELCULESCU VE, LEVY DB, PARSONS R, TRENT JM, LIN D, MERCER WE, KINZLER KW, VOGELSTEIN B (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825
- ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA SA (1998): Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50
- EVAN G, LITTLEWOOD T (1998): A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317-1321
- EVERETT H, McFADDEN G (1999): Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 7, 160-165
- EWEN ME, SLUSS HK, WHITEHOUSE LL, LIVINGSTON DM (1993): TGF β inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74, 1009-1020
- FASSNACHT D, RÖSSING S, FRANEK F, AL-RUBEAI M, PÖRTNER R (1998): Effect of *Bcl-2* expression on hybridoma cell growth in serum-supplemented, protein-free and diluted media. *Cytotechnol.* 26, 219-225
- FASSNACHT D, RÖSSING S, SINGH RP, AL-RUBEAI M, PÖRTNER R (1999): Influence of *bcl-2* on antibody productivity in high cell density perfusion cultures of hybridoma. *Cytotechnol.* 30, 95-

FIGORE C, TREZEGUET V, LE SAUX A, ROUX P, SCHWIMMER C, DIANOUX AC, NOEL F, LAUQUIN GJ, BRANDOLIN G, VIGNAIS PV (1998): The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* 80, 137-150

FISCHER RP, JIN P, CHAMBERLIN HM, MORGAN DO (1995): Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell* 83, 47-57

FRANEK F (1995): Starvation-induced programmed death of hybridoma cells: Prevention by aminoacid mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 86-90

FRANEK F, DOLNIKOVA J (1991): Hybridoma growth and monoclonal antibody production in iron-rich protein-free medium: effect of nutrient concentration. *Cytotechnol.* 7, 33-38

FRANEK F, VOMASTEK T, DOLIKOVA J (1992): Fragmented DNA and apoptotic bodies document the programmed way of cell death in hybridoma cultures. *Cytotechnol.* 9, 117-123

FRESHNEY RI (1983): *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. AR Liss, Inc. New York

FRESHNEY RI (1986): *Animal cell culture: A practical approach*. IRL Press. Oxford, Washington DC

FUSSENEGER M (2001): The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol. Prog.* 17, 1-51

FUSSENEGER M, BAILEY JE (1998): Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology. *Biotechnol. Prog.* 14, 807-833

FUSSENEGGER M (2001): The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol. Prog.* 17, 1-51

FUSSENEGGER M, SCHLATTER S, DÄTWYLER D, MAZUR X, BAILEY JE (1998): Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Nat. Biotechnol.* 16, 468-472

GABERNET C (1999): Disseny d'estratègies per a la inhibició de l'apoptosi en cultius d'hibridomes. Treball experimental de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona

GÀMEZ X (2000): Estudi d'estratègies de cultiu per a cèl·lules animals, basades en eines d'instrumentació i control. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona

GAO CY, ZELENKA PS (1997): Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *BioEssays* 19, 307-315

GERVAIS JL, SETH P, ZHANG H (1998): Cleavage of CDK inhibitor p21 (Cip1/Waf1) by caspases

REFERENCES

- is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 24, 19207-19212
- GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW (1991): Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138
- GOTTLIEB RA (2000): Mitochondria: execution central. *FEBS Lett.* 482, 6-12
- GRAEBER TG, OSMANIAN C, JACKS T, HOUSMAN DE, KOCH CJ, LOWE SW, GIACCIA AJ (1996): Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91
- GREEN DR, REED JC (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312
- GURTU V, YAN G, ZHANG G (1996): IRES bicistronic vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 295-298
- HAASS C (1999): Apoptosis. Dead end for neurodegeneration? *Nature* 399, 204-207
- HARDWICK JM (2001): Apoptosis in viral pathogenesis. *Cell Death Differ.* 8, 109-110
- HARPER JW, ELLEDGE SJ, KEYOMARSI K, DYNLACHT B, TSAI L, ZHANG P, DOBTOWOLSKI S, BAI C, CONNELL-CROWLEY L, SWINDELL E, FOX MP, WEI N (1995): Inhibition of cyclin dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* 6, 387-400
- HAUSER H, WAGNER R (1997): *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*. Walter de Gruyter, Berlin
- HAWKINS CJ, UREN AG, HÄCKER G, MEDCALF RL, VAUX DL (1996): Inhibition of interleukin 1beta-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP. *PNAS* 93: 13786-13790
- HAY A., WASSARMAN DA., RUBIN GM. (1995): Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 83: 1253-1262
- HAYTER PM, CURLING EA, BAINES AJ, JENKINS N, SALMON I, STRANGE PG, TONG J, BULL AT (1992) Glucose limited chemostat culture of CHO cells producing recombinant human interferon- γ . *Biotechnol. Bioeng.* 39, 327-335
- HAYTER PM, CURLING EA, GOULD ML, BAINES, AJ, JENKINS N, SALMON I, STRANGE PG (1993): The effect of dilution rate on CHO cell physiology and recombinant human interferon- γ production in glucose limited chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 1077-1085
- HERBERG JA, PHILLIPS S, BECK S, JONES T, SHEER D, WU JJ, PROCHAZKA V, BARR PJ, KIEFER MC, TROWSDALE J (1998): Genomic structure and domain organisation of the human *Bak* gene. *Gene* 211, 87-94

REFERENCES

- HESSE F, WAGNER R (2000): Development and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *TIBTECH* 18, 173-180
- HILLER GW, CLARCK DS, BLANCH HW (1994): Transient responses of hybridoma cells in continuous culture to step changes in amino acid and vitamin concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 303-321
- HINDS PW, MITTNACHT S, DULIC V, ARNOLD A, REED SI, WEINBERG RA (1992): Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70, 993-1006
- HIRAI H, ROUSSEL MF, KATO JY, ASHMUN RA, SHERR CJ (1995): Novel INK4 proteins p19 and p18, are specific inhibitors of cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2672-2681
- HIRAMA T, KOEFFLER HP (1995): Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86, 841-854
- HIRSCH T, MARCHETTI P, SUSIN SA, DALLAPORTA B, ZAMZAMI N, MARZO I, GEUSKENS M, KROEMER G (1997): The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573-1581
- HOFFMANN A, NOLAN GP, BLAU HM (1996): Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette. *PNAS* 93, 5185-5190
- HOROWITZ JM, PARK SH, BOGENMANN E, CHENG JC, YANDELL DW, KAYE FJ, MINNA JD, DRYJA TP, WEINBERG RA (1992): Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *PNAS* 87, 2775-2779
- HU S, SNIPAS SJ, VINCENZ C, SALVESEN G, DIXIT VM (2000): Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.* 273, 29648-29653
- HUANG Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H (2001): Structural Basis of Caspase Inhibition by XIAP: Differential Roles of the Linker versus the BIR Domain. *Cell* 104, 781-790
- HUNOT S, FLAVELL R.A. (2001): Death of a monopoly? *Science* 292, 865-866
- HYUN HJ, SOHN J, AHN Y-H, SHIN H-C, KOH J-Y, YOON YH (2000): Depletion of intracellular zinc induces macromolecule synthesis- and caspase-dependent apoptosis of cultured retinal cells. *Brain Res.* 869, 39-48
- IMLER M, THOME M, HAHNE M, SCHNEIDER P, HOFMANN K, STEINER V, BODMER JL, SCHROTER M, BURNS K, MATTMANN C, RIMOLDI D, FRENCH LE, TSCHOPP J (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195
- IONOV Y, YAMAMOTO H, KRAJEWSKI S, REED JC, PERUCHO M (2000): Mutational

REFERENCES

inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *PNAS* 97, 10872-7

ITOH Y, VEDA H, SUZUKI E (1995): Overexpression of bcl-2, apoptosis suppressing gene: prolonged viable culture period of hybridoma and enhanced antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 48, 118-122

JOZA N, SUSIN SA, DAUGAS E, STANFORD WL, CHO SK, LI CY, SASAKI T, ELIA AJ, CHENG HY, RAVAGNAN L, FERRI KF, ZAMZAMI N, WAKEHAM A, HAKEM R, YOSHIDA H, KONG YY, MAK TW, ZUNIGA-PFLUCKER JC, KROEMER G, PENNINGER JM (2001): Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554

KASTAN MB, ONYEKWERE O, SINDRANSKY D, VOGELSTEIN B, CRAIG RW (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257

KHANIM F, DAWSON C, MESEDA C, DAWSON J, MACKETT M, YOUNG L (1997): BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. *J. Gen. Virol.*, 78, 2987-99

KIEFER MC, BRAUER MJ, POWERS VC, WU JJ, UMANSKY SR, TOMEI LD, BARR PJ (1995): Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736-739

KIMURA R, MILLER WM (1996): Inhibition of hybridoma growth and metabolism by elevated pCO₂. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc. 211 Meet.*, Pt.1, BIOT 127

KIRSCH DG, DOSEFF A, CHAU BN, LIM DS, DE SOUZA-PINTO NC, HANSFORD R, KASTAN MB, LAZEBNIK YA, HARDWICK JM (1999): Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 274, 21155-21161

KLAUSNER A (1993): Back to the future: biotech product sales 1983-1993. *Biotechnol.* 11, 35-37

KO Y-K, KIM EK, KIM T, PARK H, PARK H-S, CHOI E-J, KIM S (2001): Glutamine-dependent Antiapoptotic Interaction of Human Glutaminyl-tRNA Synthetase with Apoptosis Signal-regulating Kinase 1. *J. Biol. Chem.* 276, 6030-6036

KÖHLER G, MILSTEIN CC (1974): Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497

KOLENKO VM, UZZO RG, DULIN N, HAUZMAN E, BUKOWSKI R, FINKE JH (2001): Mechanism of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes. *Apoptosis* 6, 419-429

KOZAK M (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.

REFERÈNCIES

Nucl. Acids. Res. 15, 8125-8148

KOZOPAS KM, YANG T, BUCHAN HL, ZHOU P, CRAIG RW (1993): MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2, *PNAS* 90, 3516-3520

KROEMER G (1998): Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ.* 4, 443-456

KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHE-RIGON M (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev. Physiol.* 60, 619-642

KUMAR S (1997): The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 393-396

KUMAR S (1999): Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1060-1066

LANE DP (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16

LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM (1993): *Principios de Bioquímica, 2ª ed.* Ed. Omega, Barcelona.

LINDENBOIM L, HAVIV R, STEIN R (1998): Bcl-X_L inhibits different apoptotic pathways in rat PC12 cells. *Neuroscience Lett.* 253, 37-40

LIPPENS S, KOCKX M, KNAAPEN M, MORTIER L, POLAKOWSKA R, VERHEYEN A, GARMYN M, ZWIJSEN A, FORMSTECHEP P, HUYLEBROECK D, VANDENABEELE P, DECLERCQ W (2000): Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ.* 7, 1218-1224

LIU X, KIM CN, YANG J, JEMMERSON R, WANG X (1996): Induction of apoptotic program in cell free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157

LODISH H, DARNELL J, BALTIMORE D (1990): *Molecular Cell Biology.* Scientific American Books, Inc., New York

MACDONALD C (1990): Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10, 155-178

MARTENS DE, de GOOIJER CD, van der VELDEN-de GROOT CAM, BEUVER EC, TRAMPER J (1993) Effect of dilution rate on growth, productivity, cell cycle and size, and shear sensitivity of a hybridoma cell in a continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 429-439

MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, JÜRGENSMEIER JM, SUSIN SA, VIEIRA HLA, PRÉVOST M-C, XIE Z, MATSUYAMA S, REED JC, KROEMER G (1998): Bax and Adenine Nucleotide Translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-2030

MASSIMO N, SILINI E, KOZAK C, TSUJIMOTO Y, CROCE CM (1987): Molecular Analysis of

REFERENCES

- mbcl-2*: Structure and Expression of the Murine Gene Homologous to the Human Gene Involved in Follicular Lymphoma. *Cell* 49, 455-463
- MASTRANGELO AJ (1999): Inhibition of apoptosis in mammalian cell culture, pp. 162-185. En: *Cell Engineering* (Al-Rubeaid M, ed). Kluwer Academic Publishers, London
- MASTRANGELO AJ, BETENBAUGH MJ (1998): Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *TIBTECH* 16, 88-95
- MASTRANGELO AJ, HARDWICK JM, BEX F, BETENBAUGH MJ (2000a): Part I. Bcl-2 and Bcl-xL limit apoptosis upon infection with alphavirus vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 544-554
- MASTRANGELO AJ, HARDWICK JM, ZOU B, BETENBAUGH MJ (2000b): Part II. Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 555-565
- MAZUR X, EPPENBERGER HM, BAILEY JE, FUSSENEGGER M (1998a): A novel autoregulated proliferation-controlled production process using recombinant CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 144-50
- MAZUR X, FUSSENEGGER M, RENNER WA, BAILEY JE (1998b): Higher productivity of growth-arrested Chinese hamster ovary cells expressing the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Biotechnol. Prog.* 14, 705-13
- McKENNA AL, COTTER TG (2000): Inhibition of caspase activity delays apoptosis in a transfected NS/O myeloma cell line. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 165-176
- MCKENNA SL, CARMODY RJ, COTTER TG (1999): The regulation of apoptosis in animal cells, pp. 123-161. En: *Cell Engineering* (Al-Rubeai M, ed). Kluwer Academic Publishers, London
- McQUEEN A, BAILEY JE (1991): Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH. *Bioprocess Engin.* 6, 49-61
- MERCILLE S, MASSIE B (1994): Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1140-1154
- MERCILLE S, JOLICOEUR P, GERVAIS C, PAQUETTE D, MOSSER DD, MASSIE B (1999): Dose dependent reduction of apoptosis in nutrient limited cultures of NS/O myeloma cells transfected with the E1B-19K adenoviral gene. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 516-528
- MILSTEIN C (1980): Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243, 66-34
- MINN AJ, KETTLON CS, LIANG H, KELEKAR A, VANDER HEIDEN MG, CHANG, FESIK SW, FILL M, THOMPSON CB (1999): Bcl-XL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO J.* 18, 632-643
- MOELLERING BJ, TEDESCO JL, TOWNSEND RR, HARDY MR, SCOTT RW, PRIOR CP

REFERENCES

- (1990): Electrophoretic differences in a Mab expressed in three media. *BioPharm* 30-38
- MORGAN DO (1995): Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134
- MUCHMORE SW, SATTLER M, LIANG H, MEADOWS RP, HARLAN JE, YOON HS, NETTESHEIM D, CHANG BS, THOMPSON CB, WONG S, FESIK WF (1996): X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, and inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341
- MURAKAMI K, KONDO T, YANG G, CHEN SF, MORITA-FUJIMURA Y, CHAN PH (1999): Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 57, 289-299
- NEGOESCU A, LORIMER P, LABAT-MOLEUR F, DROUET C, ROBERT C, GUILLERMET C, BRAMBILLA C, BRAMBILLA E (1996): In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: Improvement and evaluation of cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 959-968
- NELLEN UR (1992): The ELISA test: a universal procedure for the identification of antigens on the basis of biotechnologically produced monoclonal antibodies information and school experiment. *Biotechnol. Edu.* 3, 107-112
- NETT-FIORDALISI MA, CERRETTI DP, BERSON DR, GILBERT DJ, JENKINS NA, COPELAND NG, BLACK RA, CHAPLIN DD (1992): Molecular cloning of the murine IL-1 beta converting enzyme cDNA. *J. Immunol.* 149, 3254-3259
- NEU J, SHENOY V, CHAKRABARTI R (1996): Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? *FASEB J.* 10, 829-37
- NEWMeyer DD, BOSSY-WETZEL E, KLUCK RM, WOLF BB, BEERE HM, GREEN DR (2000): Bcl-XL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ.* 7, 402-407
- NICHOLSON DW (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1028-1042
- NICOTERA P, LEIST M, FERRANDO-MAY E (1998): Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology Lett.* 102-103, 139-142
- NIGG EA (1995): Cyclin-dependent kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 17, 471-480
- OKITA H, UMEZAWA A, SUZUKI A, HATA J (1998): Up-regulated expression of murine Mcl1/EAT, a Bcl-2 related gene, in the early stage of differentiation of murine embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 335-341
- OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ (1993): Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619
- O'REILLY LA, PRINT C, HAUSMANN G, MORIISHI K, CORY S, HUANG DC, STRASSER A

REFERÈNCIES

- (2001): Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ.* 8, 486-94
- OZTURK SS, RILEY MR, PALSSON BO (1992): Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 418-431
- PARDEE AB (1989): G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608
- PAREDES C (1998): Anàlisi i redistribució dels fluxos metabòlics en cèl·lules animals. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona
- PAREDES C, PRATS E, CAIRÓ JJ, CORNUDELLA L, GÒDIA F (1999): Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnol.* 30, 85-93
- PAREDES C, SANFELIU A, CARDENAS F, CAIRÓ JJ, GÒDIA F (1998): Estimation of the intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances. *Enz. Micr. Tech.* 23, 187-198
- PASSINI CA, GOUCHEE CF (1989): Response of a mouse hybridoma cell line to heat shock, agitation and sparging. *Biotechnol. Prog.* 5, 175-188
- PASTORINI JG, SIMBULA G, YAMAMOTO K, GLASCOTT PA, ROTHMAN RJ, FARBER GL (1996): The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 271, 29792-29798
- PELLEGATA NS, ANTONIONO RJ, REDPATH JL, STANBRIDGE E (1996): DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *PNAS* 93, 15209-15214
- PEÑA J (1998): *Inmunología*. Ed. Pirámide S.A. Madrid
- PERANI A, SINGH RP, CHAUHAN R, AL-RUBAI M (1998): Variable functions of bcl-2 in mediating bioeator stress-induced apoptosis in hybridoma cells. *Cytotechnol.* 28, 177-188
- PETER M, HERSKOWITZ I (1994): Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79, 181-184
- PETROS AM, MEDEK A, NETTESHEIM DG, KIM DH, YOON HS, SWIFT K, MATAYOSHI ED, OLTERSDORF T, FESIK SW (2001): Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *PNAS* 98, 3012-3017
- PORTER AG (1999): Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 9, 394-401
- PRICE BJ (1987): Monoclonal antibodies: the coming revolution in diagnosis and treatment of human disease. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 96, 497-504.
- RAFF M (1998): Cell suicide for beginners. *Nature* 396, 119-22
- REED JC (1997): Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776

REFERENCES

- REED JC (1998): Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236
- REED JC, PATERNOSTRO G (1999): Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *PNAS* 96, 7614-7616
- REED JC, ZHA H, AIME-SEMPE C, TAKAYAMA S, WANG H-G (1996): Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. *Regulators of programmed cell death. Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation VI* (ed. Gupta i Cohen), pp 99-112. Plenum Press, New York
- REES S, COOTE J, STABLES J, GOODSON S, HARRIS S, LEE MG (1996): Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *BioTechniques* 20, 102-110
- REYNOLDS JE, LI J, CRAIG, EASTMAN A (1994): BCL-2 and MCL-1 expression in Chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine. *Exp. Cell. Res.* 225, 430-436
- REYNOLDS JE, YANG T, QIAN L, JENKINSON JD, ZHOU P, EASTMAN A, CRAIG RW (1994): Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 54, 6348-6352
- RIEDL SJ, RENATUS M, SCHWARZENBACHER R, ZHOU Q, SUN C, FESIK SW, LIDDINGTON RC, SALVESEN GS (2001): Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP *Cell* 104, 791-800
- ROBINSON DK, SEAMANS TC, GOULD SL, DISTEFANO DJ, CHAN CP, LEE DK, BIBILA T, GLAZOMITSKY K, MUNSHI S, DOUGHERTY B, O'NEIL-PALLADINO L, STAFFORD-HOLLIS J, HOLLIS GF, SILBERKLANG M (1994): Optimization of a fed-batch process for production of a recombinant antibody. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Proceedings of the Biochemical Engineering VIII Engineering Foundation Conference*
- ROSSÉ T, OLIVIER R, MONNEY L, RAGER M, CONUS S, FELLAY I, JANSEN B, BORNER C (1998): Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499
- ROY N, MAHADEVAN MS, MCLEAN M, SHUTLER G, YARAGHI Z, FARAHANI R, BAIRD S, BESNER-JOHNSTON A, LEFEBVRE C, KANG X (1995): The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80, 167-178
- SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99
- SAKAMURO D, SABBATINI P, WHITE E, PRENDERGAST GC (1997): The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15, 887-898
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York

- SANFELIU A (1995): *Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona
- SANFELIU A, CAIRÓ JJ, CASAS C, SOLÀ C, GÒDIA F (1996): Analysis of nutritional factors and physical conditions affecting growth and monoclonal antibody production of the hybridoma KB-26.5 cell line. *Biotechnol. Prog.* 12, 209-216
- SANFELIU A, PAREDES C, CAIRÓ JJ, GÒDIA F (1997): Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enz. Micr. Tech.* 21, 421-428
- SANFELIU A, STEPHANOPOULOS G (1999): Effect of glutamine limitation on the death of attached chinese hamster ovary cells. *Biotech. Bioeng.* 64, 46-53
- SCARLETT JL, MURPHY MP (1997): Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 418, 282-286
- SCHLOKAT U, HIMMELSPACH M, FALKNER FG, DORNER F (1997): Permanent gene expression in mammalian cells: gene transfer and selection. En *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production* (Hauser H i Wagner R, eds.), De Gruyter, Berlin 33-63
- SCHMID RD, KÜNNECKE W (1990): Flow injection analysis (FIA) based on enzymes or antibodies applications in the life sciences. *J. Biotechnol.* 14, 3-31
- SCHWARTZ S Jr, YAMAMOTO H, NAVARRO M, MAESTRO M, REVENTÓS J, PERUCHO M (1999): Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.* 59, 2995-3002
- SEIFERT DB, PHILLIPS JA (1999): The production of monoclonal antibody in growth-arrested hybridomas cultivated in suspension and immobilized modes. *Biotechnol. Prog.* 15, 655-666
- SHANKAR AH, PRASAD AS (1998): Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (supple), 447S-463S
- SHER CJ (1994): G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555
- SHER CJ, ROBERTS JM (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Develop.* 9, 1149-1163
- SIMPSON NH, MILNER AN, AL-RUBEAI M (1997): Prevention of hybridoma cell death by bcl-2 during sub-optimal culture conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 1-16
- SIMPSON NH, SINGH P, EMERY AN, AL-RUBEAI M (1998a): Bcl-2 over-expression reduces growth rate and prolongs G1 phase in continuous chemostat cultures of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 174-186

REFERENCES

- SIMPSON NH, SINGH P, PERANI A, GOLDENZON C, AL-RUBEAI M (1998b): In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the *bcl-2* gene. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 90-98
- SINGH RP, AL-RUBEAI M, GREGORY CD, EMERY AN (1994): Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 720-726
- SINGH RP, EMERY AN, AL-RUBEAI M (1996): Enhancement of survivability of mammalian cells by over expression of the apoptosis suppressor gene *bcl-2*. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 166-175
- SLEE EA, ADRAIN C, MARTIN SJ (1999): Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067-1074
- SLEE EA, COLIN A, MARTIN SJ (2001): Executioner Caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320-7326
- SLEE EA, HARTE MT, KLUCK RM, WOLF BB, CASIANO CA, NEWMAYER DD, WANG H, REED JC, NICHOLSON DW, ALNEMRI ES, GREEN DR, MARTIN SJ (1999): Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8 and-10 in a Caspase-9 –dependent Manner. *J. Cell Biol.* 144, 281-292
- SRIVASTAVA RK, SRIVASTAVA AR, KORSMEYER SJ, NESTEROVA M, CHO-CHUNG YS, LONGO DL (1998): Involvement of microtubules in the regulation of Bcl-2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biology* 18, 3509-3517
- STENNICKE HR, SALVESEN GS (1997): Biochemical characteristics of Caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* 272, 25719-25723
- STENNICKE HR; SALVESEN GS (1998): Properties of the caspases. *Biochem. Biophys. Acta* 1387, 17-31
- STENNICKE HR; SALVESEN GS (2000): Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochem. Biophys. Acta* 147, 299-306
- STRASSER A, O'CONNOR L, DIXIT VM (2000): Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 217-45
- STRYER L (1995): *Bioquímica. 4ª ed.* Ed. Reverté S.A., Barcelona
- STURM I, KOHNE CH, WOLFF G, PETROWSKY H, HILLEBRAND T, HAUPTMANN S, LORENZ M, DORKEN B, DANIEL PT (1999): Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J. Clin. Oncol.* 17, 1364
- SUN C, CAI M, GUNASEKERA AH, MEADOWS RP, WANG H, CHEN J, ZHANG H, WU W, XU N, NG SC, FESIK SW (1999): NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature.* 401, 818-822

REFERÈNCIES

- SUN C, CAI M, MEADOWS RP, XU N, GUNASEKERA AH, HERRMANN J, WU JC, FESIK SW. (2000): NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.* 275, 33777-33781
- SURESHKUMAR GK, MUTHARASAN R (1991): The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 292-295
- SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G (1998): Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 151-165
- SUZUKI E, OLLIS DF (1990): Enhanced antibody production at slowed growth rates: experimental demonstration and a simple structured model. *Biotechnol. Prog.* 6, 231-236
- SUZUKI M, YOULE RJ, TJANDRA N (2000): Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654
- TAKAHASHI A, ALNEMRI ES, LAZEBNIK YA, FERNANDES-ALNEMRI T, LITWACK G, MOIR RD, GOLDMAN RD, POIRIER GG, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC (1996): Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *PNAS* 93, 8395-400
- TAKAHASHI K, TERADA S, UEDA H, MAKISHIMA F, SUZUKI E (1994): Growth rate suppression of cultured mammalian cells enhances protein productivity. *Cytotechnol.* 12, 1-18
- TANAKA ST, LOUIE DC, KANT JA, REED JC (1992): Frequent incidence of somatic mutations in translocated BCL2 oncogenes of non-hodgkin's lymphomas. *Blood* 79, 229-237
- TERADA S, KOMATSU T, FUJITA T, TERAKAWA A, NAGAMUNE T, TAKAYAMA S, REED JC, SUZUKI E (1999): Co-expression of bcl-2 and bag-1, apoptosis suppressing genes, prolonged viable culture period of hybridoma and enhanced antibody production. *Cytotechnol.* 31, 141-149
- THORNBERRY NA (1999): Caspases: A decade of death research. *Cell Death Differ.* 6, 1023-1027
- THORNBERRY NA, CHAPMAN KT, NICHOLSON DW (2000): Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Meth. Enz.* 322, 100-110
- THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y (1998): Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316
- THORNBERRY NA, RANO TA, PETERSON EP, RASPER DM, TIMKEY T, GARCIA-CALVO M, HOUTZAGER VM, NORDSTROM PA, ROY S, VAILLANCOURT JP, CHAPMAN KT, NICHOLSON DW (1997): A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907-17911
- TINTÓ A (1999): Millora de cultius in vitro d'hibridomes mitjançant el desenvolupament d'un sistema de perfusió i la inhibició de la mort cel·lular programada. Tesi doctoral, Universitat

Autònoma de Barcelona

TINTÓ A, CAIRÓ JJ, TELLO R, VILA P, GÒDIA F (1997): Apoptosis in hybridoma cells and its prevention by gene expression control, *European Workshop on Animal Cell Engineering*, Platja d'Aro, Spain

TINTÓ A, GABERNET C, VIVES J, PRATS E, CORNUDELLA L, CAIRÓ JJ, GÒDIA F (1999): Caracterització morfològica del procés d'apoptosi en una línia cel·lular d'hibridoma. I Jornades de Microscòpia Confocal de la UAB. Servei de Microscòpia Electrònica. Bellaterra, UAB

TOYOSHIMA H, HUNTER T (1994): p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74

ULRICH E, KAUFFMANN-ZEH A, HUEBER AO, WILLIAMSON J, CHITTENDEN T, MA A, EVAN G (1997): Gene structure, cDNA sequence, and expression of murine Bak, a proapoptotic Bcl-2 family member. *Genomics* 44, 195-200

UREN AG., PAKUSCH M., HAWKINS CJ, PULS KL., VAUX DL. (1996): Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *PNAS* 93, 4974-4978

VAN DE CRAEN, VAN LOO G, PYPE S, VAN CRIEKINGE W, VAN DEN BRANDE I, MOLEMANS F, FIERS W, DECLERCQ W, VANDENABEELE P (1998): Identification of a new caspase homologue: caspase-14. *Cell Death Differ.* 5, 838-846

VARFOLOMEEV EE, SCHUCHMANN M, LURIA V, CHIANNILKULCHAI N, BECKMANN JS, METT IL, REBRIKOV D, BRODIANSKI VM, KEMPER OC, KOLLET O, LAPIDOT T, SOFFER D, SOBE T, AVRAHAM KB, GONCHAROV T, HOLTSMANN H, LONAI P, WALLACH D (1998): Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-76

VAUX DL, CORY S, ADAMS JM (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B-cells. *Nature* 335, 440-442

VERBERT A (1996): The fascinating challenge to mimic nature in producing recombinant glycoproteins. *Chimica oggi.* 14, 9-14

VIVES J (1999): Modulació del flux glucolític en cèl·lules d'hibridoma mitjançant una estratègia de RNA antisentit. Treball experimental de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona

VIVES J, GABERNET C, PRATS E, CAIRÓ JJ, CORNUDELLA L, GÒDIA F (2001a): Genetic strategies for apoptosis protection of hybridoma cells based on expression of cellular and viral proteins. 17th ESACT Meeting, *Animal cell technology: from target to market* (Lindner-Olsson E., ed.). Kluwer Academic Publishers, Tylösand (Sweden)

VIVES J, JUANOLA S, GABERNET C, PRATS E, CAIRÓ JJ, CORNUDELLA L, GÒDIA F (2001b): Estratègies genètiques basades en la sobreexpressió de proteïnes endògenes i víriques per

REFERÈNCIES

inhibir l'apoptosi en cèl·lules d'hibridoma. XVIII Jornades de Biologia Molecular i del Desenvolupament de la Societat Catalana de Biologia, Canet de Mar (Spain)

WALDMANN TA (1991): Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 252, 1657-1662

WANG E, MARCOTTE R, PETROULAKIS E (1999a): Signaling pathway for apoptosis: a racetrack for life or death. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 32/33, 95-102

WANG W, POST JI, DOW KE, SHIN SH, RIOPELLE RJ, ROSS GM (1999b): Zinc and Copper inhibit nerve growth factor-mediated protection from oxidative stress-induced apoptosis. *Neuroscience Lett.* 259, 115-118

WEINBERG RA (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330

WERNER RG, WALZ F, NOÉ W, KONRAD A (1992): Safety and economic aspects of continuous mammalian cell cultures. *J. Biotechnol.* 22, 51-68

WOO RW, MCLURE KG, LEES-MILLER SP, RANCOURT DE, LEE PWK (1998): DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 394, 700-704

WURM F, BERNARD A (1999): Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Cur. Op. Biotechnol.* 10, 156-159

WYLLIE AH (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous nuclease activation. *Nature* 284, 555-556

XIE L, WANG DIC (1994a): Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1175-1189

XIE L, WANG DIC (1994b): Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. *Cytotechnol.* 15, 17-19

YAMAMOTO K, ICHIJO H, KORSMEYER SJ (1999): BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G₂/M. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8469-8478

YAN W, SAMSON M, JEGOU B, TOPPARI J (2000): Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Mol. Endocrinol.* 14, 682-99

YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG T, JONES DP, WANG X (1997): Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* 275, 1129-1136

YELTON DE, SCHARFF MD (1981): Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 657-680

YOKOTE H, TERADA T, MATSUMOTO H, KAKISHITA K, KINOSHITA Y, NAKAO N,

REFERENCES

- NAKAI K, ITAKURA T (2000): Dephosphorylation-induced decrease of anti-apoptotic function of Bcl-2 in neuronally differentiated P19 cells following ischemic insults. *Brain Res.* 857, 78-86
- YUAN J (1995): Molecular control of life and death. *Curr, Opin, Cell Biol.* 7, 211-214
- ZHANG Z (1998): Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395, 698-702
- ZHOU P, QIAN L, KOZOPAS KM, CRAIG RW (1997): Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 89, 630-643
- ZHOU W, REHM J, HU W (1995): High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 46: 579-587
- ZHUANG J, DINSDALE D, COHEN GM (1998): Apoptosis, in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential. *Cell. Death Differ.* 5, 953-962

ABREVIATURES I SÍMBOLS

ABREVIATURES I SÍMBOLS

%GC	percentatge de les bases nitrogenades Guanina i Citosina en una seqüència nucleotídica
³⁵S	Sofre isòtop 35
A	Adenina
A₂₃₀	Absorbància a 230 nm
A₂₆₀	Absorbància a 260 nm
A₂₈₀	Absorbància a 280 nm
aa	aminoàcid
Ac-DEVD-cmk	Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-clorometilcetona
AcNPV	Virus de la polihedrosi nuclear d' <i>Autographa californica</i>
AIF	<i>Apoptosis Inductor Factor</i>
Ala	Alanina
ANT	<i>Adenine Nucleotide Translocator</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparragina

Asp	Àcid aspàrtic
ATP	5'-trifosfat d' Adenosina
BH	<i>Bcl-2 homology domains</i>
BHRF1	Proteïna inhibidora de l'apoptosi del virus d'Epstein-Barr
BSA	Albúmina de sèrum boví
C	Citosina
CAD	<i>Caspase Activated DNase</i>
CAK	<i>Cdk Activating Kinase</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
Cdk	<i>Cyclin Dependent Kinases</i>
Cdki	<i>CDK Inhibitors</i>
cDNA	DNA complementari
CED	<i>Caenorhabditis elegans cell death gene</i>
CIP	Fosfatasa alcalina
Cys	Cisteïna
dATPs	Trifosfat de desoxiadenina
dCTPs	Trifosfat de desoxicitosina
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DEPC	Dietilpirocarbonat
dGTP	Trifosfat de desoxiguanina
DMEM	Medi d'Eagle modificat per Dulbecco
DMRIE-C	bromur de (1,2-dimeiristoloxipropil-3-dimetil-hidroxiethylamoni) en una formulació liposòmica contenint colesterol
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTP	5'-trifosfat de desoxinucleòtid
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfat de desoxitimina
dUTP	Trifosfat de desoxiuracil
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EGF	<i>Epidermis Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

EMCV	Virus de l'encefalomiocarditis
FCS	Sèrum fetal de vedella
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G	Guanina
Gln	Glutamina
Glu	Àcid glutàmic
Gly	Glicina
h	hora
HEPES	Àcid N-2-hidroxiètilpiperazina-N'-3-propasulfònic
HHV8	Herpesvirus 8 humà
His	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de pressió elevada
IAP	<i>Inhibitor Apoptosis Protein</i>
ICAD	<i>Inhibitor of CAD</i>
K_i	constant d'inhibició
kDa	quilodalton
KS	Sarcoma de Kaposi
MAb	<i>Anticòs monoclonal</i>
mRNA	RNA missatger
N	Necròtiques
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NVA	No viables apoptòtiques
O₂	Oxigen
OPA	o-ftalaldehid
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
PARP	Polimerasa de ploi-ADP-ribosa
pb	parell de bases
PBS	Dissolució salina tamponada amb fosfats
PCD	<i>Programmed Cell Death</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDGF	<i>Platelet Differentiation Growth Factor</i>
pol	Polimerasa
pRB	Proteïna de Retinoblastoma

PT	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa prèvia
SDS	Lauril sulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida contenint SDS
Ser	Serina
T	Timina
TAE	Tampó Tris-Acètic-EDTA
TBE	Tampó Tris-Bòric-EDTA
TdT	Transferasa desoxinucleotídica terminal
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
THF	Tetrahidrofurà
Thr	Treonina
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRIS	Tris[hidroximetil]- aminometà
TUNEL	<i>TdT-mediated X-dUTP nick end labeling</i>
Tyr	Tirosina
VA	Viabls apoptòtiques
Val	Valina
VDAC	<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>
VEB	Virus Epstein Barr
VNA	Viabls no apoptòtiques
X-IAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
z-VAD-fmk	N-benzioxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona
z-YVAD-cmk	N-benzioxicarbonil-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona
$\Delta\Psi_m$	Potencial mitocondrial de transmembrana

ANNEXOS

ANNEX A

SEQUÈNCIES CODIFICANTS DELS mRNA DELS GENS ESTUDIATS

En aquest Annex es mostren, en primer lloc, els cDNAs que codifiquen per a proteïnes endògenes involucrades en la PCD (els gens protectors *bcl-2*, *bcl-x*, *bcl-w*, *mcl-1*, i *x-iap*; i els gens promotors: *bax*, *bak*, *caspasa 1*, *caspasa 2*, *caspasa 3*, i *caspasa 9*) i, seguidament, els cDNAs de proteïnes víriques protectores de l'apoptosi que també han estat estudiades en aquest treball (*bhrf-1*, *p35* i *ksbcl-2*). D'aquestes darreres: *bhrf-1* fou aïllat a partir d'una extracció de RNA_{TOT} d'un limfoma de Burkitt transformat amb virus Epstein-Barr; la seqüència de la *p35* fou amplificada per PCR a partir d'una mostra de DNA genòmic del nucleopolièdrovirus *Autographa californica* cedida gentilmente per la Dra. M. Carmen Vela (Ingenasa): la seqüència del *ksbcl-2* fou alliberada amb *Bgl* II d'un vector pSG-5 que contenia aquest cDNA amb un HA-tag en 5', cedit gentilmente per la Dra. J-M. Hardwick (John Hopkin's Hospital). Per a cada seqüència, s'inclou el codi d'accés al GenBank i la zona de reconeixement dels encebadors emprats per a la seva amplificació per RT-PCR a partir del RNA total extret de mostres de l'hibridoma KB26.5. Les seqüències completes dels encebadors es troben a l'apartat 7.6.3. del capítol de Materials i Mètodes.

A N N E X A : SEQUÈNCIES DELS GENS ESTUDIATS

A1. bcl-2 (*Mus musculus*) Ref.: NM_009741

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCGCAAG CCGGGAGAAC AGGGTATGAT AACCGGGAGA TCGTGATGAA GTACATACAT TATAAGCTGT CACAGAGGGG CTACGAGTGG
100      110      120      130      140      150      160      170      180
GATGCTGGAG ATGCGGACGC GGCGCCCTG GGGGCTGCCC CCACCCCTGG CATCTTCTCC TTCCAGCCTG AGAGCAACCC AATGCCCGCT
190      200      210      220      230      240      250      260      270
GTGCACCGGG AGATGGCTGC CAGGACGTCT CCTCTCAGGC CCCTCGTTGC CACCGCTGGG CCTGCGCTCA GCCCTGTGCC ACCATGTGTC
280      290      300      310      320      330      340      350      360
CATCTGACCC TCCGCCGGGC TGGGGATGAC TTCTCTCGTC GCTACCGTCG TGACTTCGCA GAGATGTCCA GTCAGCTGCA CCTGACGCC
370      380      390      400      410      420      430      440      450
TTCACCGCGA GGGGACGCTT TGCCACGGTG GTGGAGGAAC TCTTCAGGGA TGGGGTGAAC TGGGGGAGGA TTGTGGCCTT CTTTGAGTTC
460      470      480      490      500      510      520      530      540
GGTGGGGTCA TGTGTGTGGA GAGCGTCAAC AGGGAGATGT CACCCCTGGT GGACAACATC GCCCTGTGGA TGACTGAGTA CCTGAACCGG
550      560      570      580      590      600      610      620      630
CATCTGCACA CCTGGATCCA GGATAACGGA GGCTGGGATG CCTTTGTGGA ACTATATGGC CCCAGCATGC GACCTCTGTT TGATTCTCC

                                     711
640      650      660      670      680      690      700      710
TGGCTGTCTC TGAAGACCTT GCTCAGCCTG CCCTGGGTCG GGGCCTGCAT CACTCTGGGT GCATACCTGG GCCACAAGTG A

```

A2. *bcl-x* (*Mus musculus*) Ref.: M_009743

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGTCTCAGA GCAACCGGGA GCTGGTGGTC GACTTCTCTCT CCTACAAGCT TTCCCAGAAA GGATACAGCT GGAGTCAGTT TAGTGATGTC

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
GAAGAGAATA GGACTGAGGC CCCAGAAGAA ACTGAAGCAG AGAGGGAGAC CCCCAGTGCC ATCAATGGCA ACCCATCCTG GCACCTGGCG

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
GATAGCCCGG CCGTGAATGG AGCCACTGGC CACAGCAGCA GTTTGGATGC GCGGGAGGTG ATTCCCATGG CAGCAGTGAA GCAAGCGCTG

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
AGAGAGGCAG GCGATGAGTT TGAAGTGGG TACCGGAGAG CGTTCAGTGA TCTAACATCC CAGCTTCACA TAACCCAGG GACCGCGTAT

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
CAGAGCTTTG AGCAGGTAGT GAATGAACTC TTTCCGGATG GAGTAAACTG GGGTCGCATC GTGGCCTTTT TCTCCTTTGG CGGGGCACTG

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
TGCGTGGAAA GCGTAGACAA GGAGATGCAG GTATTGGTGA GTCGGATTGC AAGTTGGATG GCCACCTATC TGAATGACCA CCTAGAGCCT

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
TGGATCCAGG AGAACGGCGG CTGGGACACT TTTGTGGATC TCTACGGGAA CAATGCAGCA GCCGAGAGCC GGAAAGGCCA GGAGCGCTTC

      640     650     660     670     680     690     700     710 713
AACCCTGGT TCCTGACGGG CATGACTGTG GCTGGTGTGG TTCTGCTGGG CTCACTCTTC AGTCGGAAGT GACCAGACAC TGA

```

A3. *bcl-w* (*Mus musculus*) Ref.: NM_007537

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCGACCC CAGCCTCAAC CCCAGACACA CGGGCTCTAG TGGCTGACTT TGTAGGCTAT AAGCTGAGGC AGAAGGGTTA TGTCTGTGGA
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
GCTGGCCCTG GGAAGGCC AGCCGCCGAC CCGCTGCACC AAGCCATGCG GGCTGCTGGA GACGAGTTTG AGACCCGTTT CCGCCGCACC
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
TTCTCTGACC TGGCCGCTCA GCTACACGTG ACCCCAGGCT CAGCCCAGCA ACGCTTCACC CAGGTTTCCG ACGAACTTTT CCAAGGGGGC
      280     290     300     310     320     330     340     350     360
CCTAACTGGG GCCGTCTTGT GGCATTCTTT GTCTTTGGGG CTGCCCTGTG TGCTGAGAGT GTCAACAAAG AAATGGAGCC TTTGGTGGGA
      370     380     390     400     410     420     430     440     450
CAAGTGCAGG ATTGGATGGT GGCCTACCTG GAGACACGTC TGGCTGACTG GATCCACAGC AGTGGGGGCT GGGCGGAGTT CACAGCTCTA
      460     470     480     490     500     510     520     530     540
TACGGGGACG GGGCCCTGGA GGAGGCACGG CGTCTGCGGG AGGGGAAGTG GGCATCAGTG AGGACAGTGC TGACGGGGGC CGTGGCACTG

      550     560     570     580     582
GGGGCCCTGG TAACTGTAGG GGCCTTTTTT GCTAGCAAGT GA (*)

```

(*) Per l'amplificació d'aquest cDNA, es va emprar la seqüència 3' immediatament posterior al codó d'aturada del gen (veure la seqüència de l'encebador a l'apartat de Materials i Mètodes)

A4. *mcl-1* (Mus musculus) Ref.: U35623

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGTTTGCC TGCGGAGAAA CGCGGTCATC GGCTTGAACC TGTACTGCGG CGGCGCCAGC CTCGGCGCGG GCGGCGGTTC TCCGGCAGGG
100      110      120      130      140      150      160      170      180
GCGCGCCTGG TGGCCGAGGA GGCCAAGGCG CGGCGCGAGG GGGGAGGGGA GGCCGCCCTG CTGCCC GGCG CGCGGGTGGT CGCCCCGGCC
190      200      210      220      230      240      250      260      270
CCGCCCGTGG GCGCCGAGGA CCCCAGCGTC ACCGCGTCCG CCGAAAGGCG GCTGCATAAG TCGCCC GGCG TCCTCGCCGT GCCGCCCGAG
280      290      300      310      320      330      340      350      360
GAGATGGCCG CGTCGGCCGC CGCCGCCATC GTGTCTCCGG AGGAGGAACT GGACGGCTGC GAGCCGGAGG CCATCGGCAA GCGCCCGGCC
370      380      390      400      410      420      430      440      450
GTGCTGCCCC TCCTGGAGCG CGTGAGCGAG GCGGCCAAGA GCTCCGGGGC CGACGGCTCT CTGCCCTCCA CGCCGCCGCC GCCCGAGGAG
460      470      480      490      500      510      520      530      540
GAAGAGGACG ACCTATACCG CCAGTCGCTG GAGATCATCT CGCGCTACTT GCGGGAGCAG GCGACCGGCT CCAAGGACTC GAAGCCTCTG
550      560      570      580      590      600      610      620      630
GGCGAGGCGG GCGCGGCGGG CCGGAGAGCG CTGGAGACCC TCGGGCGCGT GGGCGACGGC GTGCAGCGCA ACCACGAGAC GGCCTTCCAG
640      650      660      670      680      690      700      710      720
GGCATGCTCC GGAAACTGGA CATTAAAAAC GAAGGCGATG TTAAATCTTT TTCTCGAGTA ATGGTCCATG TTTTCAAAGA TGGCGTAACA
730      740      750      760      770      780      790      800      810
AACTGGGGCA GGATTGTGAC TCTTATTTCT TTCGGTGCCT TTGTGGCCAA ACACTTAAAG AGCGTAAACC AAGAAAGCTT CATCGAACCA
820      830      840      850      860      870      880      890      900
TTAGCAGAAA CTATCACAGA TGTTCTTGTA AGGACGAAAC GGGACTGGCT TGTCAAACAA AGAGGCTGGG ATGGGTTTGT GGAGTTCTTC
910      920      930      940      950      960      970      980      990
CACGTACAGG ACCTAGAAGG CGGCATCAGA AATGTGCTGC TGGCTTTTGC GGGTGTGCT GGAGTAGGGG CTGGTCTGGC ATATCTAATA
996
AGATAG (*)

```

(*) Per a l'amplificació d'aquest cDNA, es va emprar la seqüència 3' immediatament posterior al codó d'aturada del gen (veure la seqüència de l'encebador a l'apartat de Materials i Mètodes)

A N N E X A : SEQUÈNCIES DELS GENS ESTUDIATS

A5. bak (*Mus musculus*) Ref.: NM_007523

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCATCTG GACAAGGACC AGTCCCCCG AAGGTGGGCT GCGATGAGTC CCCGTCCCCT TCTGAACAGC AGGTTGCCCA GGACACAGAG

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
GAGGTCTTTC GAAGCTACGT TTTTACCTC CACCAGCAGG AACAGGAGAC CCAGGGGCGG CCGCCTGCCA ACCCCGAGAT GGACAACCTTG

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
CCCCTGGAAC CCAACAGCAT CTTGGGTCAG GTGGGTCGGC AGCTTGCTCT CATCGGAGAT GATATTAACC GGCCTACGA CACAGAGTTC

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
CAGAATTTAC TAGAACAGCT TCAGCCCACA GCCGGGAATG CCTACGAACT CTTACCAAG ATCGCCTCCA GCCTATTTAA GAGTGGCATC

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
AGCTGGGGCC GCGTGGTGGC TCTCCTGGGC TTTGGCTACC GTCTGGCCCT GTACGTCTAC CAGCGTGGTT TGACCGGCTT CCTGGGCCAG

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
GTGACCTGCT TTTGGCTGA TATCATACTG CATCATTACA TCGCCAGATG GATCGCACAG AGAGCGGTT GGGTGGCAGC CCTGAATTTG

      550     560     570     580     590     600     610     620     627
CGTAGAGACC CCATCCTGAC CGTAATGGTG ATTTTGGTG TGGTCTGTT GGGCCAATTC GTGGTACACA GATTCTTCAG ATCATGA

```

A N N E X A : SEQUÈNCIES DELS GENS ESTUDIATS

A6. *bax* (*Mus musculus*) Ref.: NM_007527

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGACGGGT CCGGGGAGCA GCTTGGGAGC GCGGGGCCCA CCAGCTCTGA ACAGATCATG AAGACAGGGG CCTTTTGGCT ACAGGGTTTC

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
ATCCAGGATC GAGCAGGGAG GATGGCTGGG GAGACACCTG AGCTGACCTT GGAGCAGCCG CCCCAGGATG CGTCCACCAA GAAGCTGAGC

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
GAGTGTCTCC GGCGAATTGG AGATGAACTG GATAGCAATA TGGAGCTGCA GAGGATGATT GCTGACGTGG ACACGGACTC CCCCCGAGAG

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
GTCTTCTTCC GGGTGGCAGC TGACATGTTT GCTGATGGCA ACTTCAACTG GGGCCGCGTG GTTGCCCTCT TCTACTTTGC TAGCAAAGTG

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
GTGCTCAAGG CCCTGTGCAC TAAAGTGCCC GAGCTGATCA GAACCATCAT GGGCTGGACA CTGGACTTCC TCCGTGAGCG GCTGCTTGTC

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
TGGATCCAAG ACCAGGGTGG CTGGGAAGGC CTCCTCTCCT ACTTCGGGAC CCCACATGG CAGACAGTGA CCATCTTTGT GGCTGGAGTC

      550     560     570     579
CTCACCGCCT CGCTCACCAT CTGGAAGAAG ATGGGCTGA

```

A N N E X A : SEQUÈNCIES DELS GENS ESTUDIATS

A7. *x-iap* (*Mus musculus*) Ref.: U88990

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGACTTTTA ACAGTTTTGA AGGAACTAGA ACTTTTGTAC TTGCAGACAC CAATAAGGAT GAAGAATTTG TAGAAGAGTT TAATAGATTA
100      110      120      130      140      150      160      170      180
AAAACATTTG CTAACTTCCC AAGTAGTAGT CCTGTTTCAG CATCAACATT GGC GCGAGCT GGGTTTCTTT ATACCGGTGA AGGAGACACC
190      200      210      220      230      240      250      260      270
GTGCAATGTT TCAGTTGTCA TCGCGCAATA GATAGATGGC AGTATGGAGA CTCAGCTGTT GGAAGACACA GGAGAAATATC CCCAAATTGC
280      290      300      310      320      330      340      350      360
AGATTTATCA ATGGTTTTTA TTTTGAAAAT GGTGCTGCAC AGTCTACAAA TCCTGGTATC CAAAATGGCC AGTACAAATC TGAAAATGT
370      380      390      400      410      420      430      440      450
GTGGGAAATA GAAATCCTTT TGCCCTGAC AGGCCACCTG AGACTCATGC TGATTATCTC TTGAGAATCG GACAGGTGTG AGATATTTCA
460      470      480      490      500      510      520      530      540
GACACCATAT ACCCGAGGAA CCCTGCCATG TGTAGTGAAG AAGCCAGATT GAAGTCATTT CAGAACTGGC CGGACTATGC TCATTTAACC
550      560      570      580      590      600      610      620      630
CCCAGAGAGT TAGCTAGTGC TGGCCTCTAC TACACAGGGG CTGATGATCA AGTGCAATGC TTTTGTGTG GGGGAAAAC GAAAAATTGG
640      650      660      670      680      690      700      710      720
GAACCTGTG ATCGTGCCTG GTCAGAACAC AGGAGACACT TTCCCAATTG CTTTTTTGTT TTGGGCCGGA ACGTTAATGT TCGAAGTGAA
730      740      750      760      770      780      790      800      810
TCTGGTGTGA GTTCTGATAG GAATTTCCCA AATTCAACAA ACTCTCCAAG AAATCCAGCC ATGGCAGAAT ATGAAGCACG GATCGTTACT
820      830      840      850      860      870      880      890      900
TTTGGAACAT GGACATCCTC AGTTAACAAG GAGCAGCTTG CAAGAGCTGG ATTTTATGCT TTAGGTGAAG GCGATAAAGT GAAGTGCTTC
910      920      930      940      950      960      970      980      990
CACTGTGGAG GAGGGCTCAC GGATTGGAAG CCAAGTGAAG ACCCCTGGGA CCAGCATGCT AAGTGCTACC CAGGGTGCAA ATACCTATTG
1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
GATGAGAAGG GGCAAGAATA TATAAATAAT ATTCATTTAA CCCATCCACT TGAGGAATCT TTGGGAAGAA CTGCTGAAAA AACACCACCG
1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
CTAACTAAAA AAATCGATGA TACCATCTTC CAGAATCCTA TGGTGCAAGA AGCTATACGA ATGGGATTTA GCTTCAAGGA CCTTAAGAAA
1180     1190     1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
ACAATGGAAG AAAAAATCCA AACATCCGGG AGCAGCTATC TATCAC TTGA GGTCTGATT GCAGATCTTG TGAGTGCTCA GAAAGATAAT
1270     1280     1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350
ACGGAGGATG AGTCAAGTCA AACTTCATTG CAGAAAGACA TTAGTACTGA AGAGCAGCTA AGGCGCCTAC AAGAGGAGAA GCTTTCCAAA
1360     1370     1380     1390     1400     1410     1420     1430     1440
ATCTGTATGG ATAGAAATAT TGCTATCGTT TTTTTTCCTT GTGGACATCT GGCCACTTGT AAACAGTGTG CAGAAGCAGT TGACAAATGT
1450     1460     1470     1480     1490     1491
CCCATGTGCT ACACCGTCAT TACGTTCAAC CAAAAAATT TTAGTCTTA G

```

A8. caspasa 1 (*Mus musculus*) Ref.: L28095

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCTGACA AGATCCTGAG GGCAAAGAGG AAGCAATTTA TCAACTCAGT GAGTATAGGG ACAATAAATG GATTGTTGGA TGAACTTTTA

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
GAGAAGAGAG TGCTGAATCA GGAAGAAATG GATAAAATAA AACTTGCAAA CATTACTGCT ATGGACAAGG CACGGGACCT ATGTGATCAT

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
GTCTCTAAAA AAGGGCCCCA GGCAAGCCAA ATCTTTATCA CTTACATTTG TAATGAAGAC TGCTACCTGG CAGGAATTCT GGAGCTTCAA

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
TCAGCTCCAT CAGCTGAAAC ATTTGTTGCT ACAGAAGATT CTAAAGGAGG ACATCCTTCA TCCTCAGAAA CAAAGGAAGA ACAGAACAAA

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
GAAGATGGCA CATTTCCAGG ACTGACTGGG ACCCTCAAGT TTTGCCCTTT AGAAAAAGCC CAGAAGTTAT GGAAAGAAAA TCCTTCAGAG

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
ATTTATCCAA TAATGAATAC AACCACTCGT ACACGTCTTG CCTCATTAT CTGCAACACA GAGTTTCAAC ATCTTTCTCC GAGGGTTGGA

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
GCTCAAGTTG ACCTCAGAGA AATGAAGTTG CTGCTGGAGG ATCTGGGGTA TACCGTGAAA GTGAAAGAAA ATCTCACAGC TCTGGAGATG

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
GTGAAAGAGG TGAAAGAATT TGCTGCCTGC CCAGAGCACA AGACTTCTGA CAGTACTTTC CTTGTATTCA TGTCTCATGG TATCCAGGAG

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
GGAATATGTG GGACCACATA CTCTAATGAA GTTTCAGATA TTTTAAAGGT TGACACAATC TTTCAGATGA TGAACACTTT GAAGTGCCCA

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
AGCTTGAAAG ACAAGCCCAA GGTGATCATT ATTCAGGCAT GCCGTGGAGA GAAACAAGGA GTGGTGTGTG TAAAAGATTC AGTAAGAGAC

      910     920     930     940     950     960     970     980     990
TCTGAAGAGG ATTTCTTAAC GGATGCAATT TTTGAAGATG ATGGCATTAA GAAGGCCCAT ATAGAGAAAAG ATTTTATTGC TTTCTGCTCT

     1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
TCAACACCAG ATAATGTGTC TTGGAGACAT CCTGTCAGGG GCTCACTTTT CATTGAGTCA CTCATCAAAC ACATGAAAAGA ATATGCCTGG

     1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
TCTTGTGACT TGGAGGACAT TTTCAGAAAAG GTTCGATTTT CATTTGAACA ACCAGAATTT AGGCTACAGA TGCCCACTGC TGATAGGGTG

     1180     1190     1200     1209
ACCCTGACAA AACGTTTCTA CCTCTTCCCG GGACATTAA

```

A9. caspasa 2 (*Mus musculus*) Ref.: NM_007610

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCGCGGC CGAGCGGGAG GTCGCAGTCC TCCCTGCACA GGAAGGGGCT GATGGCGGCT GACAGGAGGA GCAGGATTTT GGCAGTGTGT
100      110      120      130      140      150      160      170      180
GGAATGCATC CTGACCACCA GGAAACACTG AAAAAGAATC GAGTGGTGCT GGCCAAGCAG CTGTGTGCTGA GCGAGCTGTT AGAACACCTC
190      200      210      220      230      240      250      260      270
CTAGAGAAGG ACATTATCAC TTTGGAAATG AGGGAGCTCA TCCAGGCCAA AGGGGGCAGT TTCAGCCAGA ATGTGGAAct CCTCAACCTG
280      290      300      310      320      330      340      350      360
CTGCCAAAGA GAGGACCCCA GGCTTTTGAT GCCTTCTGTG AAGCCCTGCG GGAGACCAGG CAGGGTCACT TGGAAGACTT ACTGCTCACA
370      380      390      400      410      420      430      440      450
ACCCTCTCAG ATATTTCAGCA CGTACTCCCA CCGTTGAGCT GTGACTATGA CACAAGTCTC CCTTTCTCGG TGTGTGAGTC CTGCCCTCCT
460      470      480      490      500      510      520      530      540
CACAAGCAGC TCCGCCTATC CACAGATGCT ACGGAACACT CCTTAGATAA TGGTGATGGT CCTCCCTGTC TTCTGGTGAA GCCATGCACT
550      560      570      580      590      600      610      620      630
CCTGAGTTTT ACCAGGCACA CTACCAGCTG GCCTATAGGT TGCAATCTCA GCCCCGTGGC TTGGCACTGG TGCTGAGCAA TGTGCACTTC
640      650      660      670      680      690      700      710      720
ACTGGAGAGA AAGACCTGGA ATTCCGCTCT GGAGGGGATG TGGACCACAC TACTCTAGTC ACCCTCTTCA AGCTTTTGGG CTACAATGTC
730      740      750      760      770      780      790      800      810
CATGTGCTAC ATGACCAGAC CGCACAGGAA ATGCAAGAGA AACTTCAGAA TTTTGCACAG TTACCTGCAC ACCGGGTCAC AGACTCCTGC
820      830      840      850      860      870      880      890      900
GTAGTGGCAC TCCTCTCACA TGGTGTGGAA GGTGGCATCT ATGGTGTAGA TGGCAAActG CTTCAGCTCC AAGAGGTTTT TCGACTTTTT
910      920      930      940      950      960      970      980      990
GACAATGCTA ACTGTCCAAG TCTACAGAAC AAGCCAAAAA TGTCTTCAT CCAAGCATGT CGTGGAGATG AGACAGATAG AGGTGTGCGAC
1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
CAGCAAGATG GAAAGAACCA CACACAATCC CCTGGATGTG AGGAGAGTGA TGCTGGCAA GAGGAGTTGA TGAAGATGAG ACTGCCTACT
1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
CGCTCAGACA TGATATGTGG CTATGCTTGC CTTAAAGGTA ATGCTGCCAT GCGGAACACC AAACGGGGTT CCTGGTACAT TGAGGCCCTC
1180     1190     1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
ACTCAGGTGT TCTCTGAAAG AGCTTGTGAC ATGCACGTGG CCGACATGCT TGTTAAGGTG AATGCCCTTA TCAAGGAGCG TGAAGGCTAT
1270     1280     1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350
GCCCTGGCA CAGAATTCCA CCGATGCAAG GAGATGTCTG AGTACTGTAG TACTCTGTGC CAGCAActCT ACCTGTTCCC AGGCTACCCA
1359
CCCACGTGA

```

A10. caspasa 3 (*Mus musculus*) Ref.: Y13086

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGAGAACA ACAAAACCTC AGTGGATTCA AAATCCATTA ATAATTTTGA AGTAAAGACC ATACATGGGA GCAAGTCAGT GGACTCTGGG

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
ATCTATCTGG ACAGTAGTTA CAAAATGGAT TATCCTGAAA TGGGCATATG CATAATAAAT AATAATAAGA ACTTCCATAA GAGCACTGGA

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
ATGTCATCTC GCTCTGGTAC GGATGTGGAC GCAGCCAACC TCAGAGAGAC ATTCATGGGC CTGAAATACC AAGTCAGGAA TAAAAATGAT

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
CTTACTCGTG AAGACATTTT GGAATTAATG GATAGTGTTC CTAAGGAAGA TCATAGCAAA AGGAGCAGCT TTGTGTGTGT GATTCTAAGC

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
CATGGTGATG AAGGGGTCAT TTATGGGACA AATGGGCCCTG TTGAAC TGAA AAAGTTGACT AGCTTCTTCA GAGGCGACTA CTGCCGGAGT

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
CTGACTGGAA AGCCGAAACT CTTCATCATT CAGGCCTGCC GGGGTACGGA GCTGGACTGT GGCATTGAGA CAGACAGTGG GACTGATGAG

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
GAGATGGCTT GCCAGAAGAT ACCGGTGGAG GCTGACTTCC TGTATGCTTA CTCTACAGCA CCTGGTTACT ATTCTGGAG AAATTCAAAG

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
GACGGGTCGT GGTTCATCCA GTCCCTTTGC AGCATGCTGA AGCTGTACGC GCACAAGCTA GAATTTATGC ACATTCTCAC TCGCGTTAAC

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
AGGAAGGTGG CAACGGAATT CGAGTCCTTC TCCCTGGACT CCACTTTCCA CGCAAAGAAA CAGATCCCCT GTATTGTGTC CATGCTCAGC

      820     830     834
AAAGAACTGT ACTTTTATCA CTAG

```

A11. caspasa 9 (*Mus musculus*) Ref.: NM_015733

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGACGAGG CGGACCGGCA GTCCTGCGG CGATGCAGGG TGCGCCTAGT GAGCGAGCTG CAAGTCGCGG AGCTCTGGGA CGCTCTGCTG

     100     110     120     130     140     150     160     170     180
AGTCGAGAGC TCTTCACGCG CGACATGATC GAGGATATTC AGCAGGCAGG ATCTGGGTCT CGGCGGGATC AGGCCAGGCA GCTGGTCACA

     190     200     210     220     230     240     250     260     270
GACCTTGAGA CCCGAGGGAG GCAGGCCCTT CCTCTCTTCA TCTCCTGCTT AGAGGACACA GGCCAAGGCA CCCTGGCTTC ACTCTGCAA

     280     290     300     310     320     330     340     350     360
AGCGGTCGGC AAGCAGCCAA GCAGGATCCA GAGGCTGTTA AACCCCTAGA CCACCTGGTG CCTGTGGTCC TGGGACCAAT GGGACTCACA

     370     380     390     400     410     420     430     440     450
GCAAAGGAGC AGAGAGTAGT GAAGCTGGAG CCGTCACAGC CTGCCGTGGG AAACCTCACC CCAGTGGTGC TGGGGCCAGA AGAGCTCTGG

     460     470     480     490     500     510     520     530     540
CCTGCTCGGC TCAAGCCAGA GGTTCCTCAGA CCAGAAACAC CCAGGCCGGT GGACATTGGT TCTGGCGGAG CTCATGATGT CTGTGTTCCA

     550     560     570     580     590     600     610     620     630
GGGAAGATCA GGGGACATGC AGATATGGCA TACACCCTGG ATTCCGGATCC CTGTGGCCAC TGCCTCATCA TCAACAATGT GAACTTCTGC

     640     650     660     670     680     690     700     710     720
CCTTCTCGG GGCTCGGCAC ACGCACGGGC TCCAACCTGG ACCGTGACAA ACTTGAGCAC CGATTCCGCT GGCTGCGCTT CATGGTGGAG

     730     740     750     760     770     780     790     800     810
GTGAAGAACG ACCTGACTGC CAAGAAAATG GTCACGGCTT TGATGGAGAT GGCACACCGG AACCACCGTG CCCTGGACTG CTTTGTGGTG

     820     830     840     850     860     870     880     890     900
GTCATCCTCT CTCATGGGTG CCAGGCCAGC CACCTCCAGT TCCCAGGTGC TGTCTATGGG ACAGATGGAT GCTCCGTGTC CATTGAGAAA

     910     920     930     940     950     960     970     980     990
ATTGTGAATA TCTTCAACGG GAGCGGCTGC CCCAGCCTGG GAGGGAAGCC CAAGCTCTTC TTCATCCAGG CCTGCGGTGG TGAGCAGAAA

    1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
GACCATGGCT TTGAGGTGGC CTGCACTTCC TCTCAAGGCA GGACCTTGGG CAGTGACTCT GAGCCAGATG CTGTCCATA TCAGGAAGGC

    1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
CCAAGGCCCT TGGACCAGCT GGATGCTGTG TCAAGTTTGC CTACCCCCAG TGACATCCTT GTGCCTACT CCACCTCCC AGGTTTGTGTC

    1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
TCCTGGAGGG ACAAGAAAAG TGGCTCCTGG TACATCGAGA CCTTGGATGG CATTCTGGAG CAGTGGGCTC GCTCTGAAGA CCTGCAGTCC

    1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
CTCCTTCTCA GGGTCGCCAA TGCTGTTTCT GAGAAAGGGA CTTACAAGCA GATTCTGGC TGTTTTAACT TCCTCCGAA AAAGCTGTTT

    1360  1365
TTTAAACTT CATGA

```


A12. *bhrf-1* (Herpesvirus humà de tipus 4) Ref.: M17416

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCCTATT CAACAAGGGA GATACTGTTA GCCCTGTGTA TACGGGACAG TCGTGTGCAT GGAAATGGTA CCCTGCATCC TGTGTTGGAG

     100     110     120     130     140     150     160     170     180
CTAGCAGCAA GAGAAACACC TCTCCGCCTT TCGCCAGAGG ACACTGTAGT TCTGCGTTAT CATGTGTTGC TTGAGGAGAT AATTGAACGA

     190     200     210     220     230     240     250     260     270
AATTCAGAGA CATTTACAGA AACTTGGAAC AGATTTATAA CACACACCGA ACATGTGGAT CTGGATTTTA ACTCAGTATT TTTAGAGATA

     280     290     300     310     320     330     340     350     360
TTTCACCGTG GAGACCCAAG CCTTGGGCGC GCGTTGGCCT GGATGGCCTG GTGCATGCAT GCCTGCAGGA CATTGTGTTG TAACCACTCT

     370     380     390     400     410     420     430     440     450
ACTCCTTACT ATGTTGTGGA CCTGTCAGTT CGTGGGATGT TAGAAGCCAG CGAAGGCCTG GATGGTTGGA TTCATCAACA GGGCGGCTGG

     460     470     480     490     500     510     520     530     540
TCTACATTAA TTGAAGACAA CATTCTGGA TCCAGAAGGT TTAGCTGGAC TTTGTTTCTT GCTGGACTGA CTTTGAGTCT GTTAGTTATA

     550     560     570     576
TGTAGTTATT TATTTATCTC CAGAGGAAGA CACTAA

```

A13. p35 (Autographa californica nucleopolihedrovirus) Ref.: NC_001623(*)

(*) ORF comprès entre 116492 a 117391

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGTGTGTAA TTTTCCGGT AGAAATCGAC GTGTCCAGA CGATTATTCG AGATTGTCAG GTGACAAAC AAACCAGAGA GTTGGTGTAC
100      110      120      130      140      150      160      170      180
ATTAACAAGA TTATGAACAC GCAATTGACA AAACCCGTTTC TCATGATGTT TAACATTTTCG GGCCTTATAC GAAGCGTTAC GCGCAAGAAC
190      200      210      220      230      240      250      260      270
AACAAATTTGC GCGACAGAAT AAAATCAAAA GTCGATGAAC AATTTGATCA ACTAGAACGC GATTACAGCG ATCAAATGGA TGGATTCCAC
280      290      300      310      320      330      340      350      360
GATAGCATCA AGTATTTTAA AGATGAACAC TATTCGGTAA GTTGCCAAAA TGGCAGCGTG TTGAAAAGCA AGTTTGCTAA AATTTTAAAG
370      380      390      400      410      420      430      440      450
AGTCATGATT ATACCGATAA AAAGTCTATT GAAGCTTACG AGAAATACTG TTTGCCAAAA TTGGTCGACG AACGCAACGA CTTACTACGTG
460      470      480      490      500      510      520      530      540
GCGGTATGCG TGTGGAAGCC GGGATTTGAG AACGGCAGCA ACCAAGTGCT ATCTTTTCGAG TACAACCCGA TTGGTAACAA AGTTATTGTG
550      560      570      580      590      600      610      620      630
CCGTTTGCTC ACGAAATTAA CGACACGGGA CTTTACGAGT ACGACGTCGT AGCTTACGTG GACAGTGTGC AGTTTGATGG CGAACAATTT
640      650      660      670      680      690      700      710      720
GAAGAGTTTG TGCAGAGTTT AATATTGCCG TCGTCGTTCA AAAATTCGGA AAAGGTTTTA TATTACAACG AAGCGTCGAA AAACAAAAGC
730      740      750      760      770      780      790      800      810
ATGATCTACA AGGCTTTAGA GTTTACTACA GAATCGAGCT GGGCAAATC CGAAAAGTAT AATTGGAAAA TTTTTGTAA CGGTTTTATT
820      830      840      850      860      870      880      890      900
TATGATAAAA AATCAAAAGT GTTGTATGTT AAATTCACA ATGTAAGTAG TGCACTCAAC AAAAATGTAA TATTAACAC AATTAATAA

```

A14. *ksbcl-2* (Herpesvirus humà tipus 8) Ref.: U67773

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGACGAGG ACGTTTTGCC TGGAGAGGTG TTGGCCATTG AAGGGATATT CATGGCCTGT GGATTAAACG AACCTGAGTA CCTGTACCAT

     100     110     120     130     140     150     160     170     180
CCTTTGCTCA GCCCTATTAA GCTATACATC ACAGGCTTAA TGCAGAGACAA GGAGTCTTTA TTCGAGGCCA TGTTGGCTAA TGTGAGATTT

     190     200     210     220     230     240     250     260     270
CACAGCACCA CCGGTATAAA CCAGCTTGGG TTGAGCATGC TGCAGGTTAG CGGCGATGGA AACATGAACT GGGGGCGAGC CCTGGCTATA

     280     290     300     310     320     330     340     350     360
CTGACCTTTG GCAGTTTTGT GGGCCAGAAG TTATCCAACG AACCTCACCT GCGAGACTTT GCTTTGGCCG TTTTACCTGT ATATGCGTAT

     370     380     390     400     410     420     430     440     450
GAAGCAATCG GACCCAGTG GTTTCGCGCT CGCGGAGGCT GCGGAGGCCT GAAGGCGTAT TGTACACAGG TGCTTACCAG AAGAAGGGGA

     460     470     480     490     500     510     520     528
CGGAGAATGA CAGCGCTATT GGAAGCATT GCATTATTGG CCACTATATT GGCAGCGGTC GCGATGAGCA GGAGATAA

```

ANNEX B

MAPES DE VECTORS

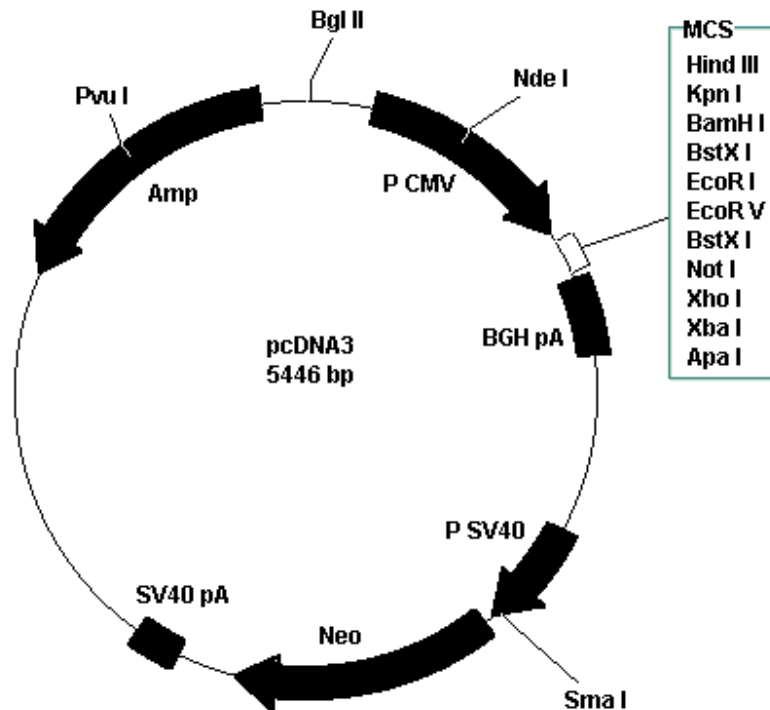
En aquest Annex, es mostren els mapes dels vectors generats així com els esquelets dels vectors que es van emprar com a punt de partida per crear-los. Per al clonatge dels diferents gens amb els quals s'ha treballat en aquesta tesi, es van utilitzar les tècniques i metodologies pròpies de la Biologia Molecular que s'especifiquen al Capítol 7, de Materials i Mètodes.

Per a la representació gràfica dels vectors i de les construccions, es va utilitzar el programa Plasmid 1.02/3.7 1996 (realitzat per Kivirauma T, Oikari P, Saarela J, del Department of Biotechnology, University of Kuopio, Finland).

B1. pcDNA3 (Invitrogen)

Els productes de PCR i RT-PCR obtinguts en aquest treball es van clonar en el plasmidi pcDNA3. Es tracta d'un vector comercial de 5446 pb dissenyat per a l'expressió gènica en hostes eucariotes. Conté un promotor i una seqüència de poliadenilació eucariota entre els quals s'insereix la seqüència desitjada. També té un marcador de selecció eucariota que li confereix resistència a la G418. Tant el promotor com la seqüència de poliadenilació provenen del virus SV40. El fragment de DNA inserit es troba sota el control del promotor de Citomegalovirus (CMV), que assegura un elevat nivell d'expressió en un gran nombre de cèl·lules animals, mentre que el senyal de poliadenilació dels mRNA transcrits és el de l'hormona bovina del creixement (BGH).

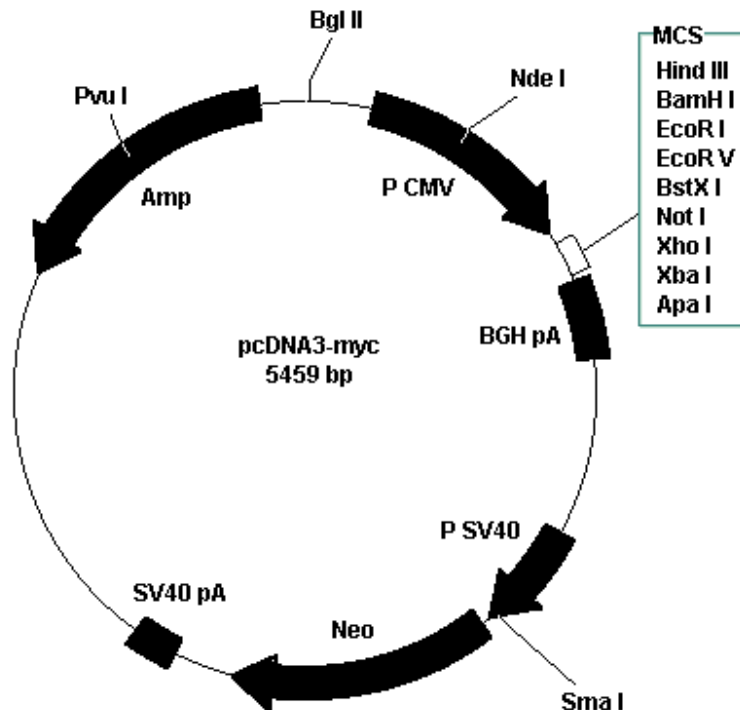
El plasmidi pcDNA3 es pot replicar en *E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació ColE1. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a 50 µg·mL⁻¹.



B2. pcDNA3-myc (Ryosuke)

El vector pcDNA3-myc és una variant del pcDNA3 que conté la seqüència que codifica l'epítot *myc* entre les dianes de restricció *Hind* III i *Eco*R I. Va ser generat pel Dr. Ryosuke (The Burnham Institute) i cedit gentilmente pel Dr. Reed The Burnham Institute) a partir d'un fragment amplificat per PCR que codifica per aquest epítot i que va ser clonat entre les dues dianes de restricció esmentades, conservant la resta de la seqüència del vector.

A l'igual que el plasmidi pcDNA3 del qual prové, el pcDNA3-myc es pot replicar en *E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació ColE1. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a 50 µg·mL⁻¹.

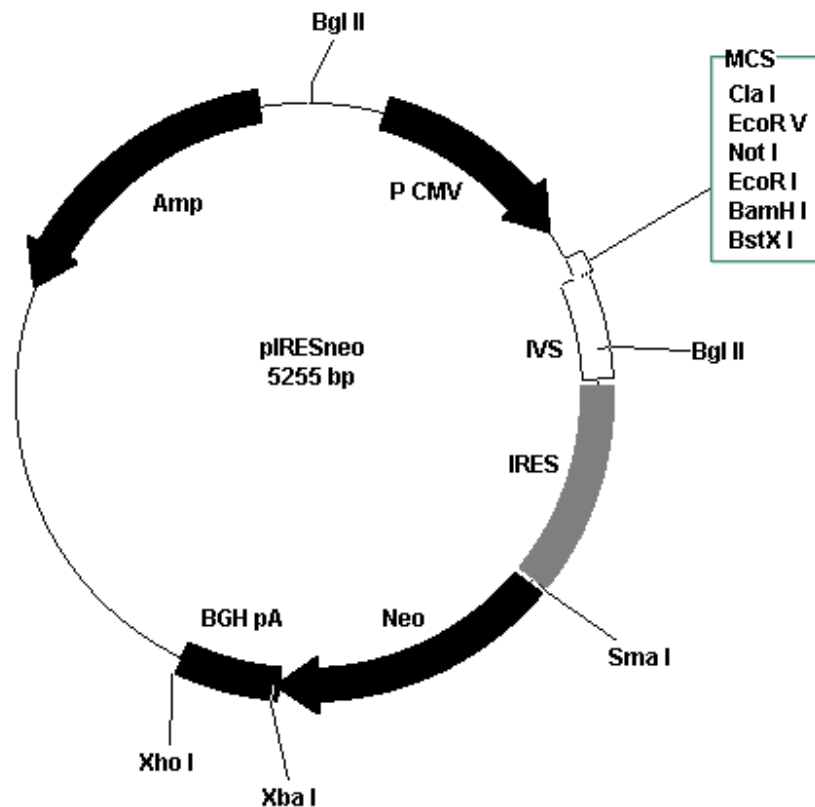


B3. pIRESneo (Clontech)

Per a la generació d'un vector bicistrònic que contingüés el gen de la glutamina sintetasa enlloc de la resistència a un antibiòtic, es va partir del vector bicistrònic pIRESneo (Clontech). Aquest tipus de vectors es caracteritzen per contenir una seqüència IRES (*Internal Ribosomal Entry Sites*) provinent del virus encefalomiocarditis *ECMV*, que 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.

Els missatgers transcrits contenen un gen que els confereix resistència a la neomicina i el gen d'interès. D'aquesta manera, la cèl·lula que incorpori el vector sobreviurà en un medi amb G418 ja que expressarà el gen que li confereix resistència a aquest antibiòtic, així com el gen d'interès. L'avantatge d'utilitzar aquests vectors rau en el fet que les modificacions genètiques introduïdes en la cèl·lula animal perduren al llarg del temps i s'elimina la necessitat de crivellar un gran nombre de colònies per buscar clons funcional.

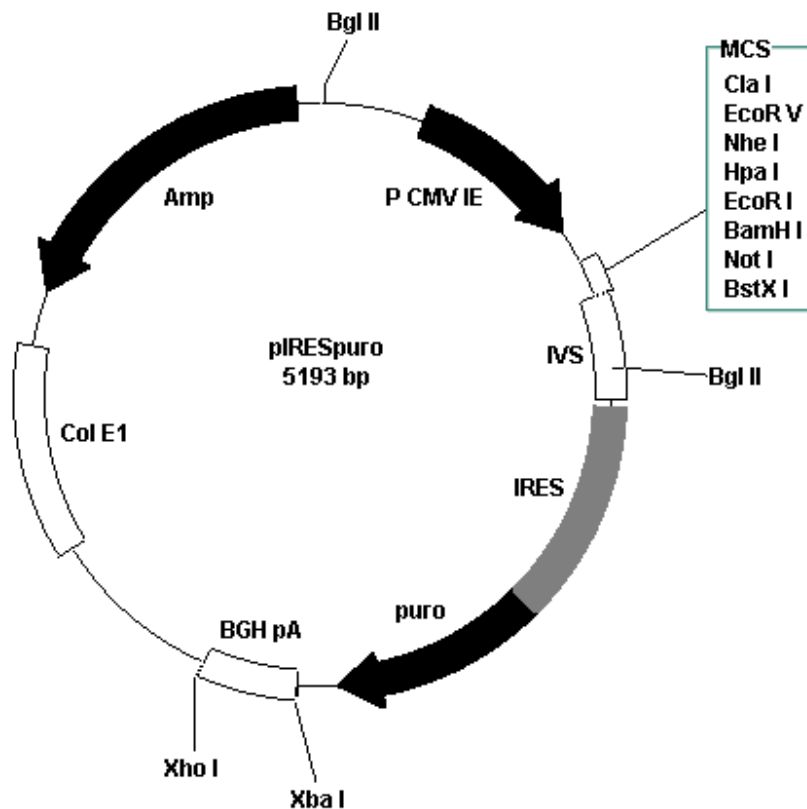
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.



B4. pIRESpuro2 (Clontech)

En l'intent d'estabilització de l'expressió en l'hibridoma KB26.5, es va escollir el vector bicistrònic pIRESpuro2, 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. En aquest cas, 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). A l'igual que el pIRESneo, el pIRESpuro2 conté una seqüència IRES del virus encefalomiocarditis *ECMV* que permet la traducció simultània de la proteïna d'interès i del marcador de selecció a partir d'un únic mateix mRNA. L'IVS correspon a un intró sintètic.

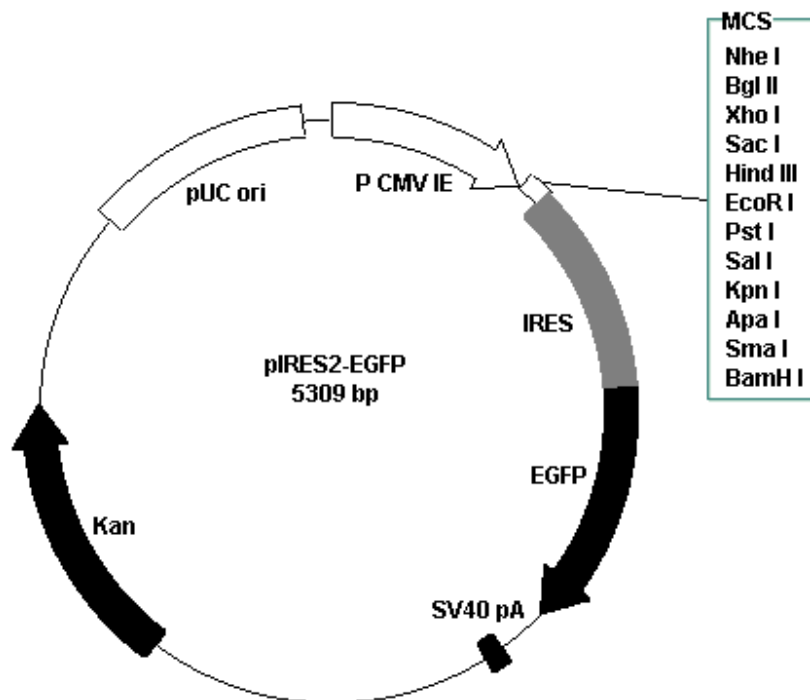
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



B5. pIRES2-EGFP (Clontech)

Per a la determinació de l'eficiència de transfecció, es va fer ús del vector pIRES2-EGFP, que conté la seqüència que codifica per a la proteïna fluorescent EGFP. D'altra banda, aquest vector es caracteritza per generar missatgers bistrònics, com ho feien pIRESneo i pIRESpuro2, i per permetre la creació de construccions quimèriques amb la EGFP.

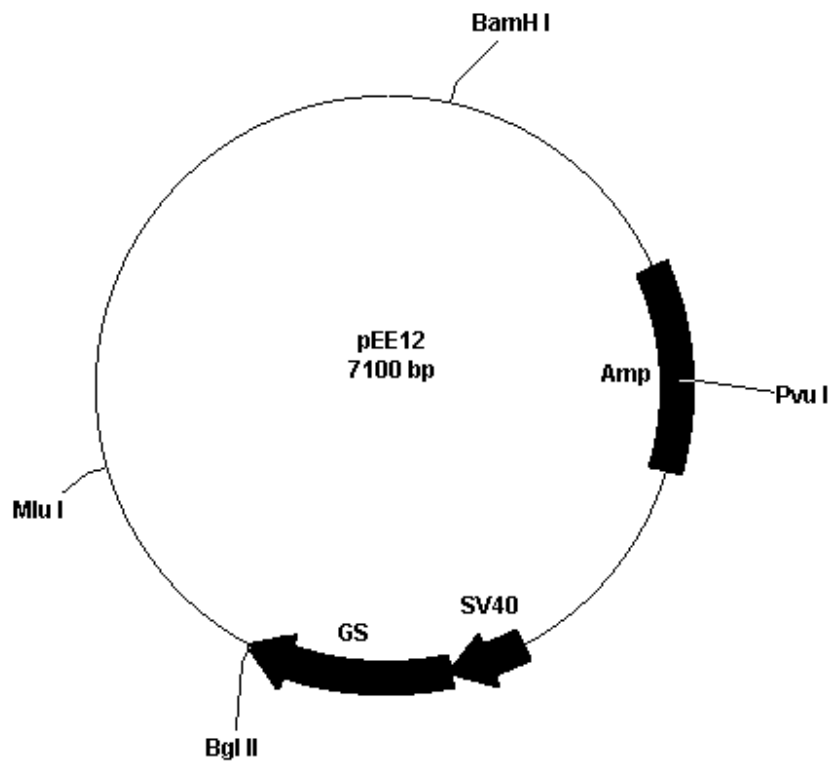
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús de kanamicina $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



B6. pEE12 (Lonza Biologics)

La font del gen *glutamina sintetasa* per a la síntesi del vector pIRES-GS fou el vector pEE12 (Lonza Biologics).

Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



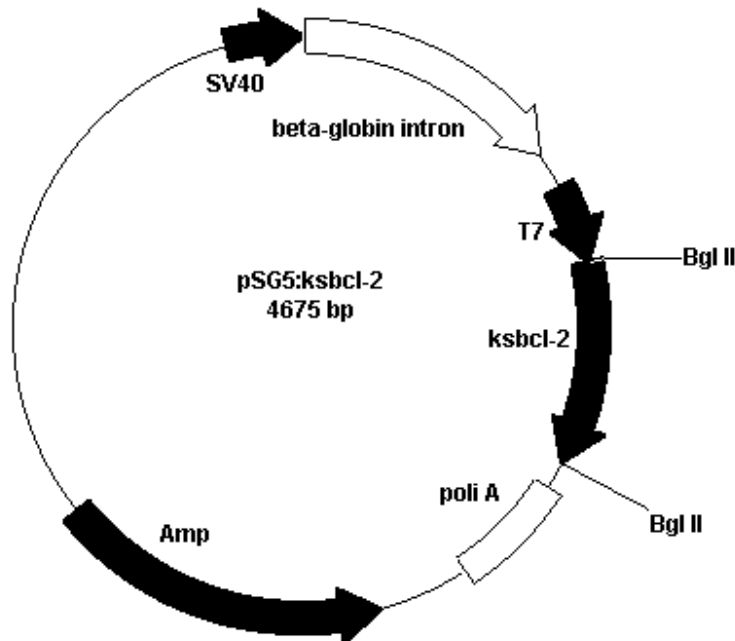
B7. pSG5:ksbcl-2 (Dr. Jean M. Hardwick)

El cDNA codificant del KSBcl-2, membre de la família del Bcl-2, va ser gentilment cedit per la Dra. J-M. Hardwick, inserit en el vector pSG5 (Stratagene) amb la seqüència que codifica per l'epítot HA en 5'.

La seqüència codificant per a l'epítot HA que ha estat afegit en 5' al cDNA del KSBcl-2 es mostra a continuació.

----- HA-tag ----- Bgl II →
 ATGGCG**TACCATACGATGTTCCAGATTACGCT**AGCTTG**AGATCT**ACCATGGACG

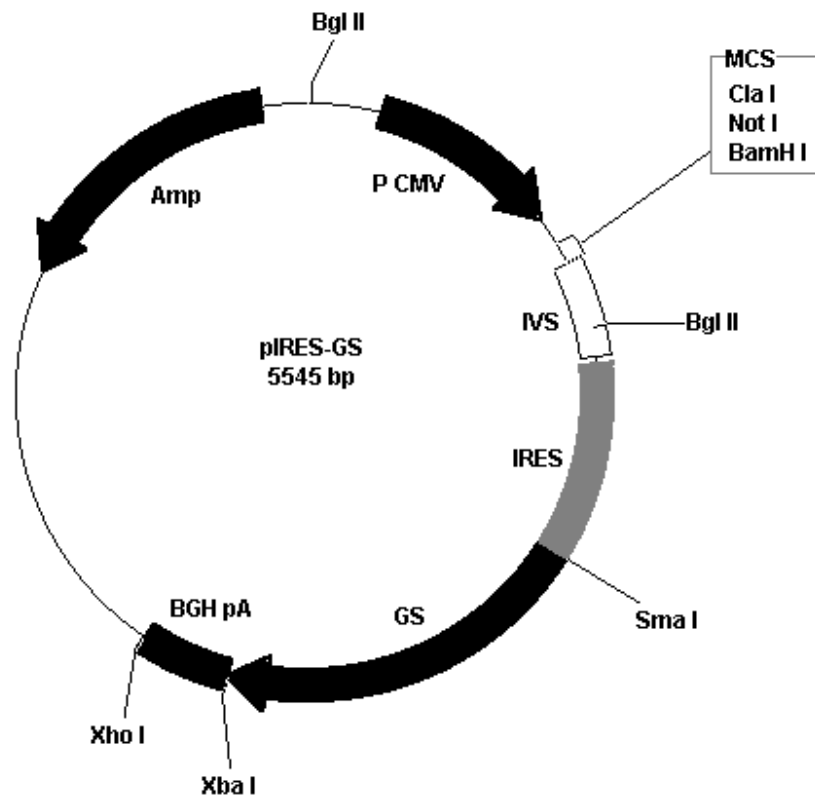
De totes formes, a l'alliberar l'insert amb *Bgl* II per subclonar-lo en altres vectors, es perd l'HA-tag, a menys que no es realitzi una amplificació per PCR amb un encebador que inclogui la zona 5' que codifica per l'HA-tag.



B8. pIRES-GS

En aquest treball, s'ha generat un nou vector bicistrònic que té com a marcador de selecció el gen de la *glutamina sintetasa*. Aquesta estratègia aprofita que l'hibridoma KB26.5 és deficient en aquest gen i, com a conseqüència, no pot realitzar la reacció catalitzada per la GS. Això permet seleccionar les cèl·lules que han incorporat el plasmidi, substituint del medi la glutamina pel glutamat. Els detalls de la seva síntesi s'especifiquen a l'apartat 7.7.1. d'aquesta memòria.

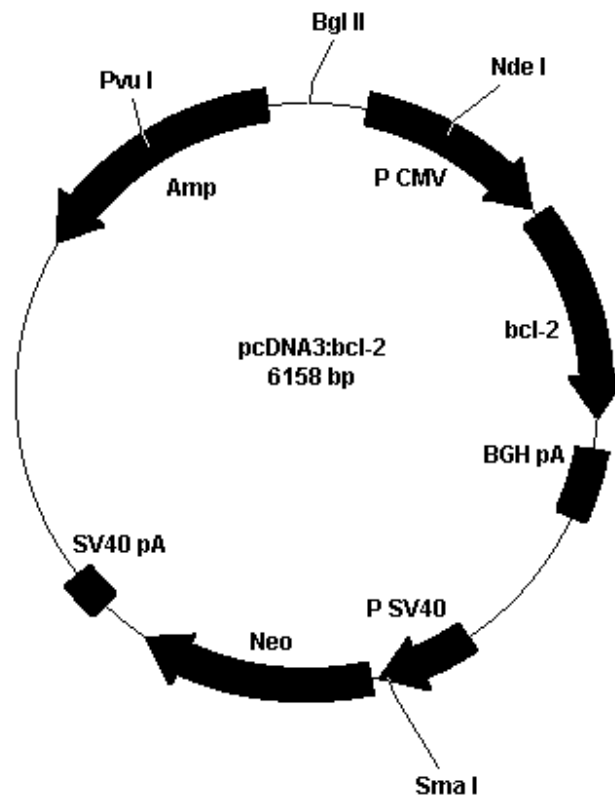
A l'igual que el plasmidi pIRESneo del qual prové, el pIRES-GS es pot replicar en *E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació Col E1. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



B9. pcDNA3:*bcl-2*

El gen que codifica per la proteïna protectora de l'apoptosi Bcl-2 humana fou clonada en el vector pcDNA3 en *EcoR I/Xho I*.

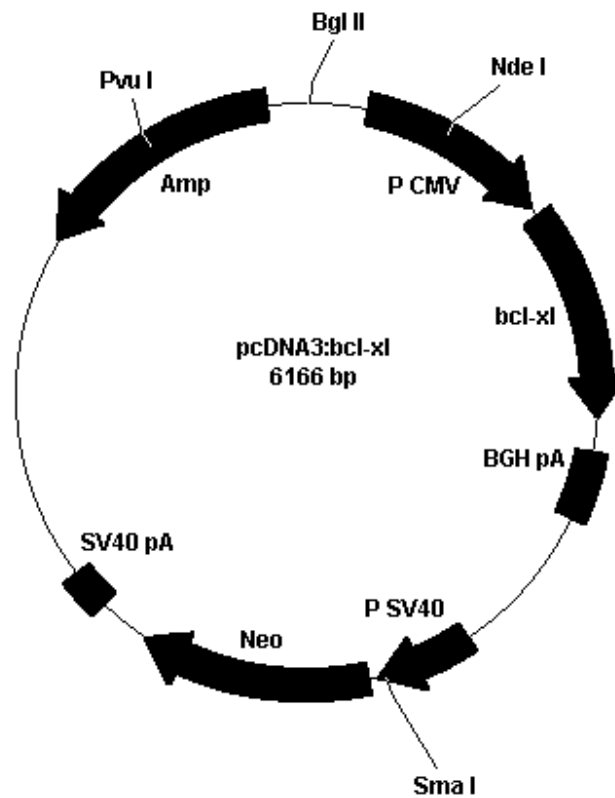
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B10. pcDNA3:*bcl-x_L*

El gen que codifica per la proteïna inhibidora de Caspases X-IAP humana fou clonada en el vector pcDNA3 en *EcoR I/Xho I*.

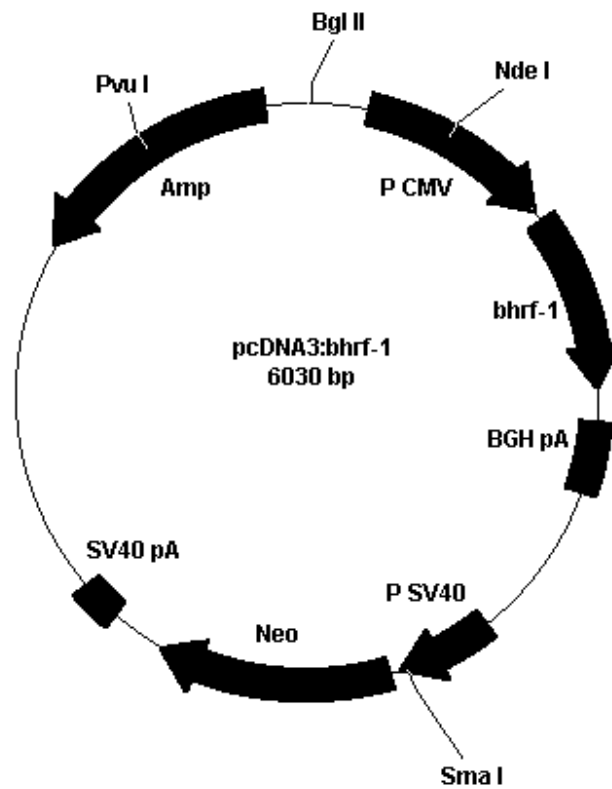
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B11. pcDNA3:bhrf-1

El cDNA del Bak obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA del propi hibridoma KB26.5 fou clonat en el vector pcDNA3.

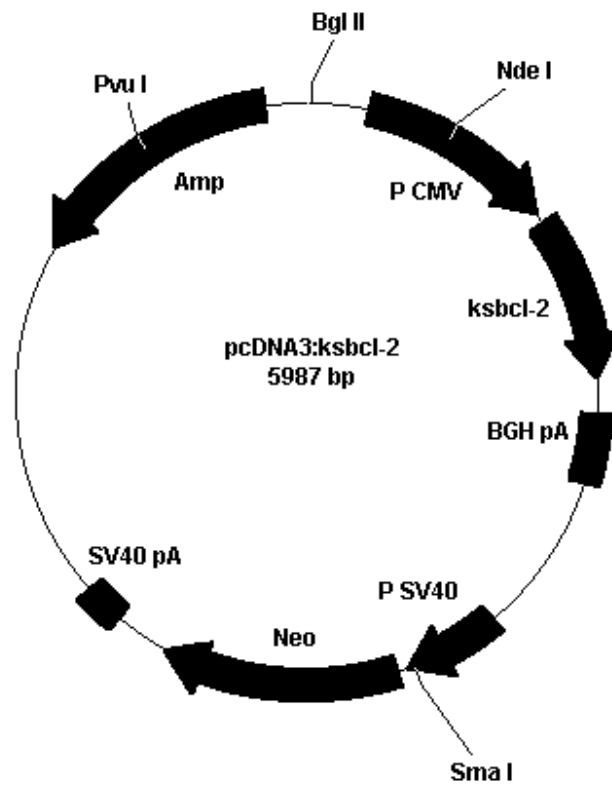
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B12. pcDNA3:*ksbcl-2*

El cDNA del gen que codifica pel *ksbcl-2*, alliberat per digestió amb *Bgl* II del vector pSG5:*ksbcl-2* (veure subapartat B7), fou clonat en el vector pcDNA3.

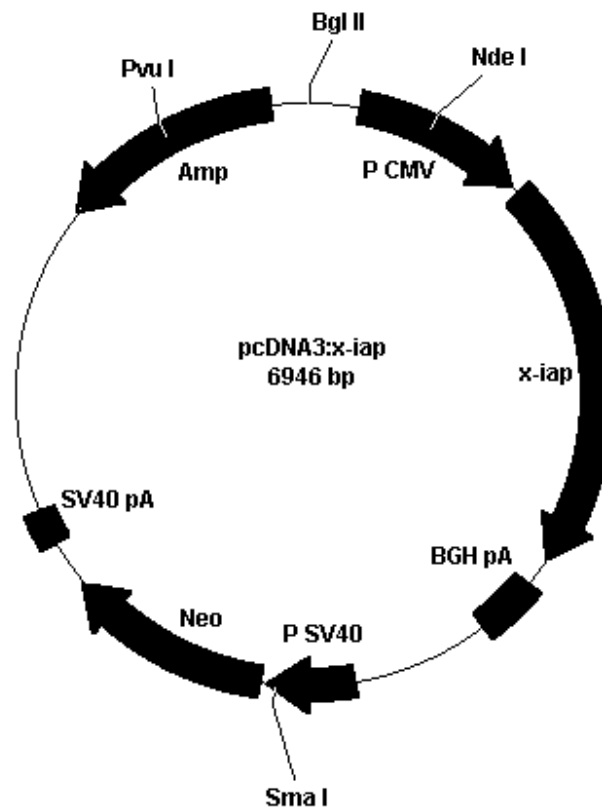
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B13. pcDNA3:*x-iap*

El cDNA del gen endogen *x-iap*, obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA total extretes del propi hibridoma KB26.5, fou clonat en el vector pcDNA3.

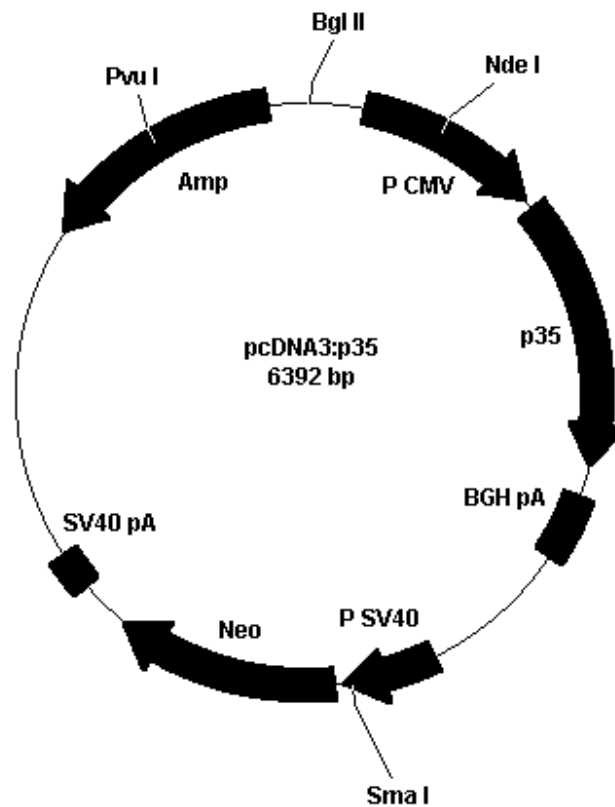
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B14. pcDNA3:p35

El cDNA del gen víric *p35*, obtingut per PCR a partir de mostres de DNA genòmic del baculovirus *AcMNPV*, fou clonat en el vector pcDNA3.

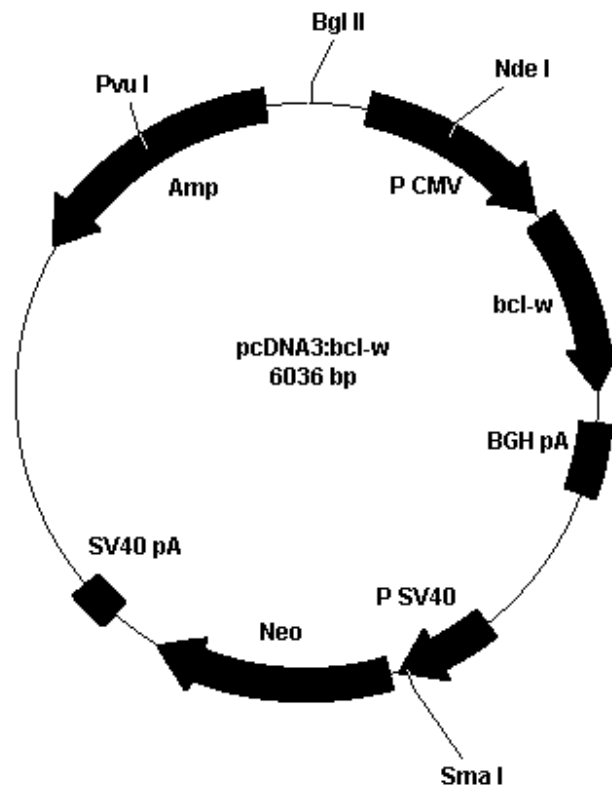
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B15. pcDNA3:*bcl-w*

El cDNA del gen protector de l'apoptosi *bcl-w*, obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA total del propi hibridoma KB26.5, fou clonat en el vector pcDNA3.

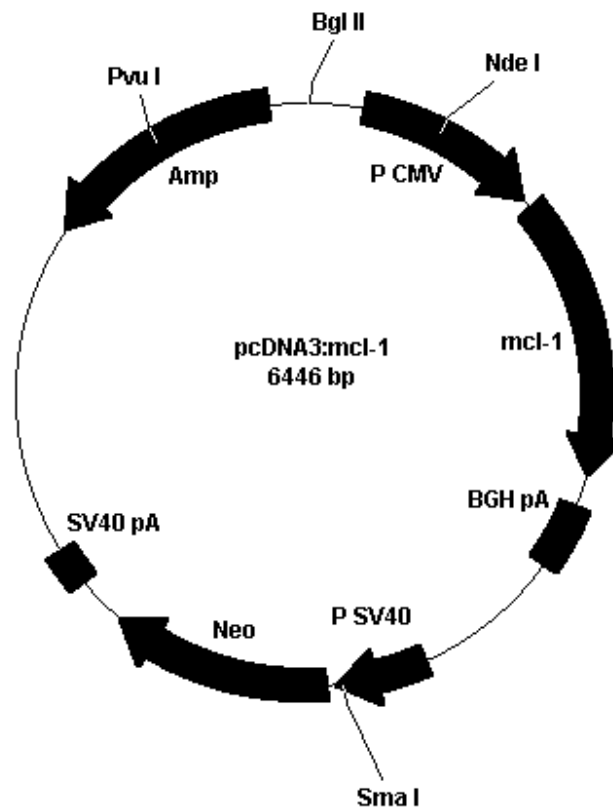
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a 50 µg·mL⁻¹. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és 3 mg·mL⁻¹ (veure Figura 5.5).



B16. pcDNA3:*mcl-1*

El cDNA del gen protector de l'apoptosi *mcl-1*, obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA total del propi hibridoma KB26.5, fou clonat en el vector pcDNA3.

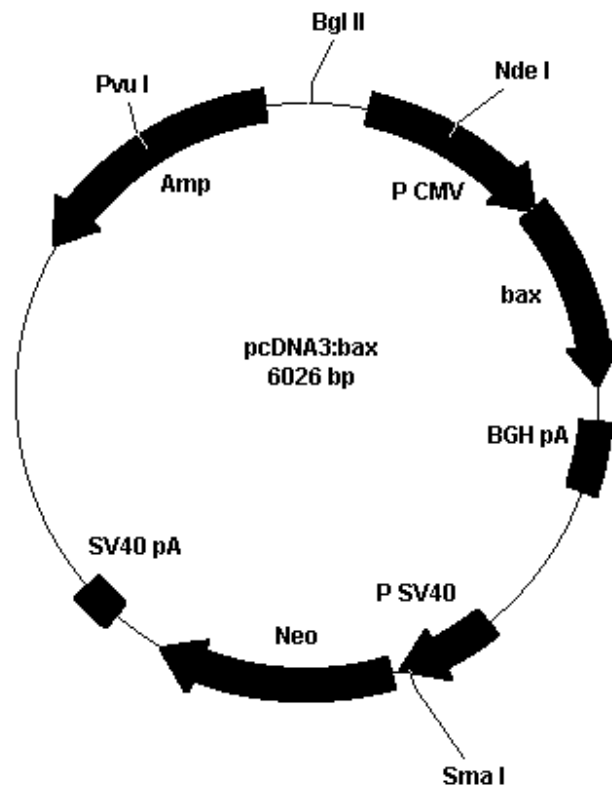
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B17. pcDNA3:bax

El cDNA del gen proapoptòtic endogen *bax*, obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA total del propi hibridoma KB26.5, fou clonat en el vector pcDNA3.

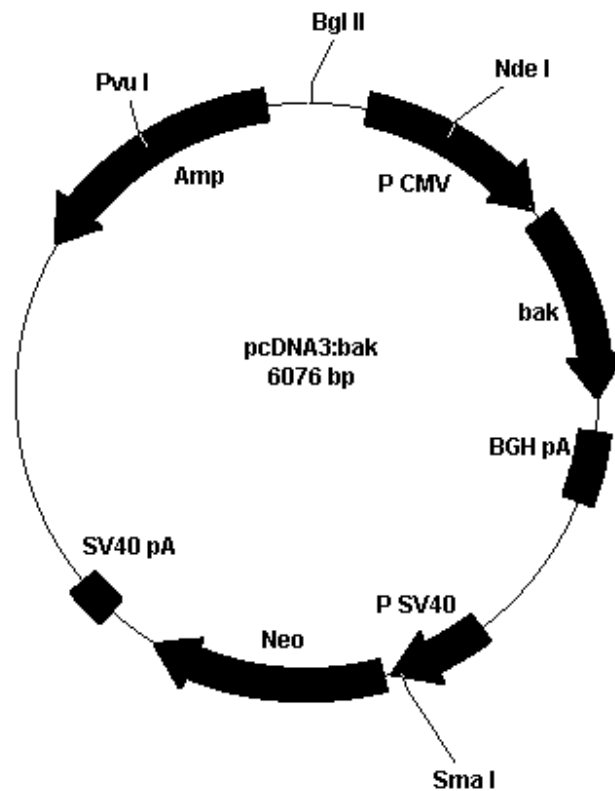
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B18. pcDNA3:*bak*

El cDNA del gen proapoptòtic endogen *bak*, obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA total del propi hibridoma KB26.5, fou clonat en el vector pcDNA3.

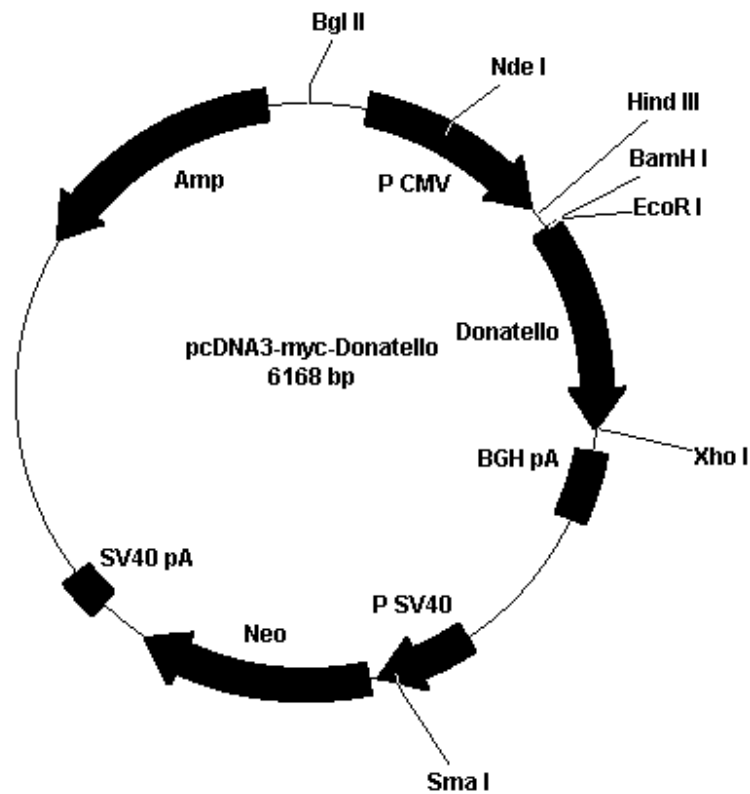
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B19. pcDNA3:myc-Donatello

La construcció *Donatello* va ser clonada en el vector pcDNA3-myc, incloent-li així la seqüència de l'epítot *myc*.

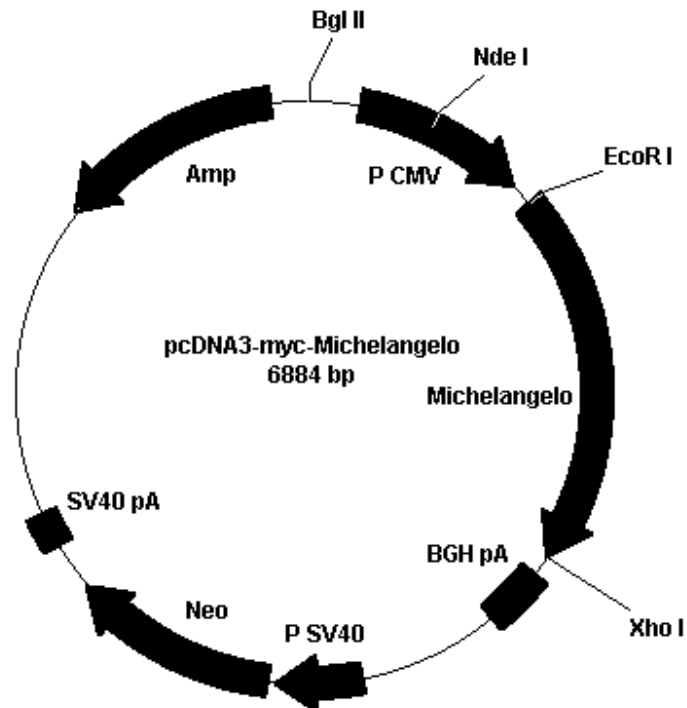
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B20. pcDNA3:myc-Michelangelo

La construcció *Michelangelo* va ser clonada en el vector pcDNA3-myc, incloent-li així la seqüència de l'epítot *myc*.

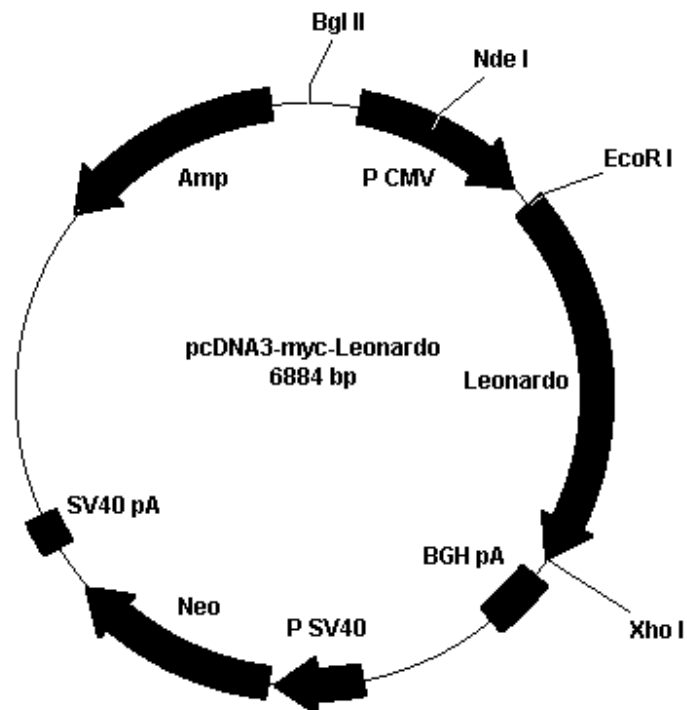
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B21. pcDNA3:myc-Leonardo

La construcció *Leonardo* va ser clonada en el vector pcDNA3-myc, incloent-li així la seqüència de l'epítip *myc*.

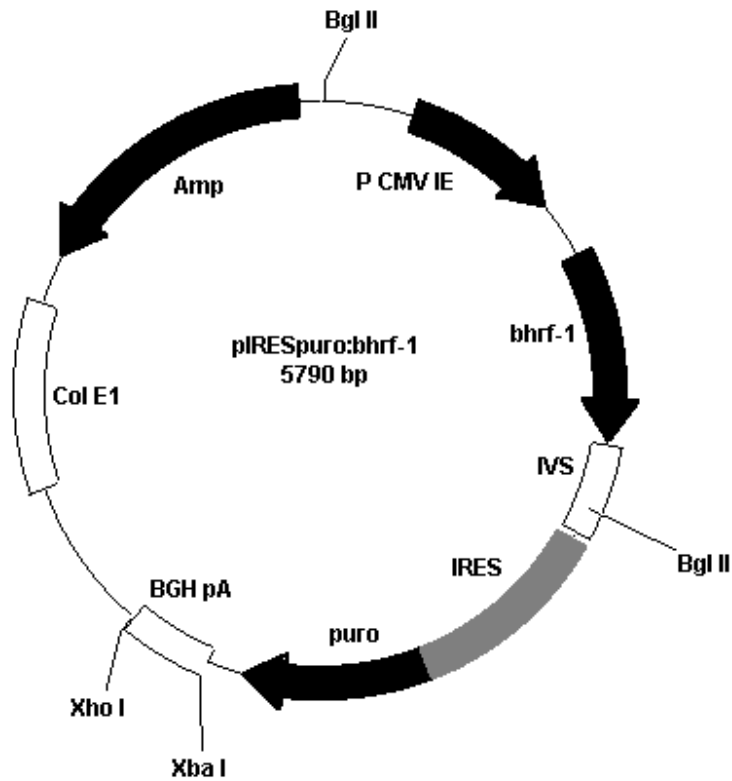
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic G418 òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.5).



B22. pIRESpuro2:*bhrf-1*

El cDNA del gen *bhrf-1* obtingut per RT-PCR a partir de mostres de RNA de cèl·lules Raji d'un limfoma de Burkitt fou clonat en el vector pIRESpuro2. Això permet l'expressió d'un missatger bicistrònic que conté la seqüència d'aquest gen antiapoptòtic i de la resistència a la puromicina.

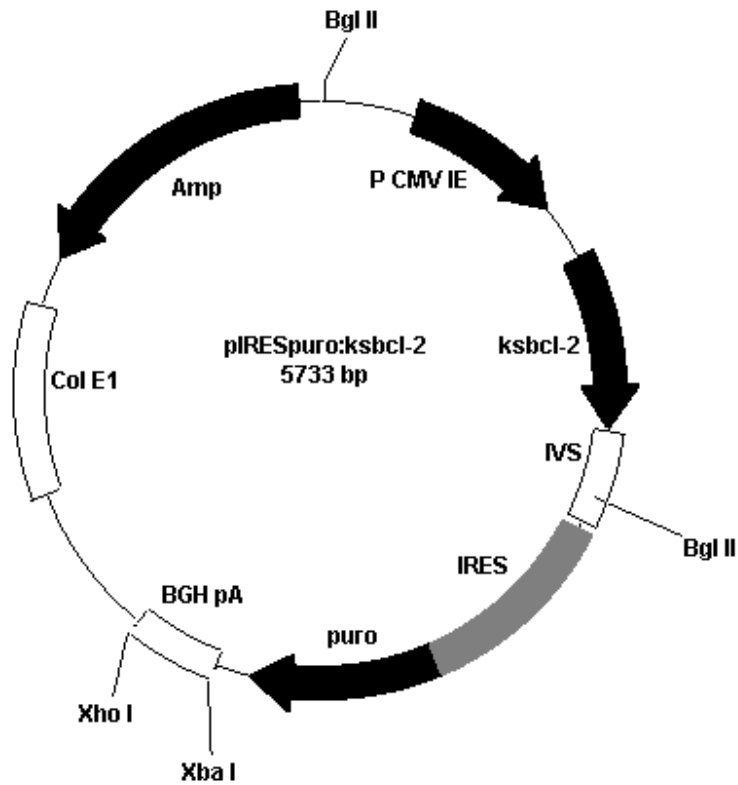
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a 50 µg·mL⁻¹. La concentració d'antibiòtic puromicina òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és 3 µg·mL⁻¹ (veure Figura 5.21).



B23. pIRESpuro2:ksbcl-2

El cDNA del gen víric *ksbcl-2*, obtingut per digestió amb *Bgl* II del vector pSG5:*ksbcl-2* (veure subapartat B7), fou clonat en el vector pIRESpuro2. Això permet l'expressió d'un missatger bicistrònic que conté la seqüència d'aquest gen antiapoptòtic i de la resistència a la puromicina.

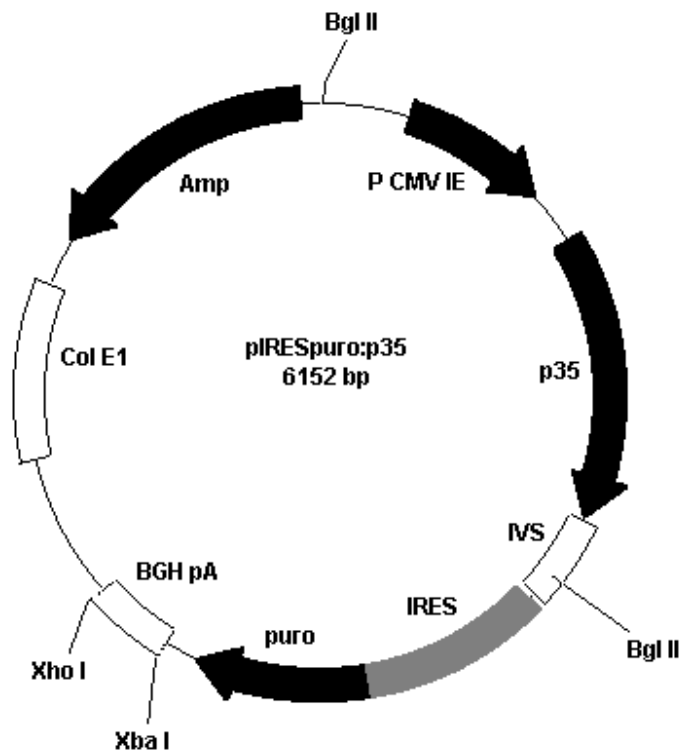
Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a 50 µg·mL⁻¹. La concentració d'antibiòtic puromicina òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és 3 µg·mL⁻¹ (veure Figura 5.21).



B24. pIRESpuro2:p35

El cDNA del gen *p35* obtingut per PCR a partir de mostres de DNA genòmic del baculovirus *ACMNPV* fou clonat en el vector pIRESpuro2. Això permet l'expressió d'un missatger bicistrònic que conté la seqüència d'aquest gen antiapoptòtic i de la resistència a la puromicina.

Aquest plasmidi es pot replicar en *E. coli*. La selecció de les colònies que han incorporat el vector es realitza mitjançant l'ús d'ampicil·lina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentració d'antibiòtic puromicina òptima de treball en cèl·lules d'hibridoma és $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (veure Figura 5.21).



ANNEX C

RECURSOS A LA XARXA

www.apoptosis-db.org	Base de dades de proteïnes involucrades en el procés de mort per apoptosi
www.ncbi.nlm.nih.gov	Base de dades de seqüències nucleotídiques, proteïques, articles i programes en línia com BLAST
www.ebi.ac.uk	Programes <i>on-line</i> de gran utilitat, com és el cas de ClustalW per a l'alineament de seqüències
www.copewithcytokines.de	COPE Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia
www.gcg.com	Paquet de programes de biologia molecular GCG
www.bib.uab.es	Pàgina web de les Biblioteques de la UAB, des d'on es pot consultar el catàleg i sol·licitar còpies de documents
decomate.uab.es	Biblioteca virtual de la Universitat Autònoma de Barcelona
www.bib.uab.es/ciencies/rvdiq.htm	Catàleg de la UAB amb accés a les edicions electròniques de revistes d'interès en el camp de les ciències experimentals i enginyeries