



Universitat de Girona

**ESTUDI DE L'ACCIÓ DE DIFERENTS
BLOQUEJADORS DE LAVIA ErbB EN LA
TERÀPIA ANTITUMORAL**

Laura FERRER SOLER

ISBN: 978-84-690-7683-5
Dipòsit legal: GI-I 100-2007



UNIVERSITAT DE GIRONA
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLÒGIA MOLECULAR
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

ESTUDI DE L'ACCIÓ DE DIFERENTS BLOQUEJADORS DE LA VIA ErbB EN LA TERÀPIA ANTITUMORAL.

Memòria presentada per optar al grau de Doctor.
Aquest treball s'ha realitzat en el marc del Programa de Doctorat de
Ciències: Química i Física dels Àtoms, les Biomolècules i els Materials
(Itinerari de Ciències de la Salut), de la Universitat de Girona i
l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona

Treball realitzat per Laura Ferrer i Soler,
sota la direcció del Dr. Rafael de Llorens Duran

Doctorant

Director

Laura Ferrer i Soler

Dr. Rafael de Llorens Duran

Girona, setembre de 2006

Allà on siguis... sé que te'n sentiràs orgullós.

Aquest treball te'l dedico a tu, pare.

AGRAÏMENTS

Ara sí, finalment ha arribat el moment. La tesi està acabada! Ha estat un llarg camí que ha durat uns quants anys i en el qual hi heu tingut cabuda moltes persones que heu posat el vostre granet de sorra per tal que avui pogués tancar aquest capítol de la meua vida. I és per això que a cada un de vosaltres us vull donar un GRÀCIES molt especial.

En primer lloc, vull agrair al Dr. Rafael de Llorens, en Rafa, l'oportunitat que em va donar, ja fa uns quants anys, per tal d'entrar al seu grup de recerca. Gràcies pel suport que m'has donat en tot moment, i per veure sempre el costat positiu dels resultats.

Al llarg d'aquests anys, he tingut l'oportunitat de treballar amb molta gent, i de tots ells n'he après quelcom. Els que he tingut més a prop han estat els companys de laboratori de Bioquímica del Càncer: amb ells vaig començar i amb ells he acabat el meu camí en aquest món de la recerca. Vull agrair molt especialment a la persona que em va guiar en els meus inicis, la Marta, i que sempre he sentit molt propera. Gràcies Marta per tot el teu suport dins i fora del laboratori, i per fer-me sentir que sempre tenia algú a qui recórrer quan he tingut algun dubte científic. A la M. Gràcia i a en Lluís els vull agrair tantes coses... Nois, amb vosaltres he passat moments molt agradables, i la veritat és que us trobo molt a faltar, tot i que tots tenim clar que els nostres camins havien de seguir direccions molt diferents de les que fa un temps estàvem seguint.

També vull donar les gràcies a tota la gent del Departament de Biologia per permetre'm treballar als seus laboratoris quan ho he necessitat i pels consells i ajuda que tothom, en un moment o altre, m'ha ofert. Gràcies especialment a l'altre grup de Bioquímica per tot el que n'he après i que m'han permès utilitzar. I gràcies, també, al Dr. Jesús Garcia-Gil pels seus savis consells, pel cop de mà amb el tema de l'edició i, per suposat, pels dinars que vàrem compartir!

I fora de la UdG també he tingut la sort de poder treballar amb gent fantàstica. La meua primera presa de contacte amb el "món exterior" va ser a l'IBF (em costa acostumar-me a dir IBB; per mi sempre serà l'IBF...!). Al Dr. Enrique Querol li agraeixo el fet d'haver-me acollit al seu laboratori i fer-me sentir com una més. I als companys de "Molecos", doncs què us haig de dir que no sapiguen... Va ser un any boníssim, segurament el millor de la meua etapa en el món de la recerca, tant pel munt de coses que vaig aprendre com per l'amistat que em vaig endur de tota la gent d'allà: la Rosa, la Mònica, l'Antonio, la Raquel, en Juan, en Miquel... Gràcies nois per ser com sou!

I la segona gran col·laboració ha estat amb l'ICO de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona, dirigit pel Dr. Ramon Colomer. A en Ramon li agraeixo l'oportunitat que m'ha donat de poder treballar amb tècniques i idees noves, i amb gent que són uns cracks! Gràcies, i gràcies també pel teu suport personal en els moments durs. I hi ha una persona molt especial amb qui he tingut la gran sort de treballar freqüentment, i amb qui he compartit feina i amistat molt sincera. Gràcies Alejandro per tot: per aprendre tant al teu costat, per compartir objectius científics i lluitar per ells, pel teu suport en els moments durs, per demostrar-me que ets un gran amic, i per tot el que tant tu com la Nöelle vàreu fer per nosaltres (sempre hi haurà una estrella que brillarà per vosaltres!).

Entremig, també he tingut l'oportunitat de treballar amb grups de recerca que m'han permès conèixer altres tècniques, punts de vista, maneres de treballar i veure les coses... en definitiva, que m'han enriquit molt! En especial vull agrair a la Dra. Virtudes Moreno i a la Dra. Virtudes Villegas tot el que m'han ensenyat i la bona predisposició que sempre m'han demostrat.

També hi ha hagut gent que ha passat pel laboratori durant un període curt de temps però que han deixat molta petja i amb qui tinc la sort de continuar mantenint una bona amistat. Em refereixo a l'Eider, aquella noia basca amb qui tan bé vaig congeniar i amb qui encara queden pendents unes

"tapilles" a Donosti; en Mukram, aquell noi tan singular però alhora tan agraït i bona persona; la Gwladys que va venir a prendre contacte amb el món de la recerca i a qui vaig tenir la sort de poder guiar en el seu treball; i a la Sílvia Moradell, amb qui vaig passar moltes hores davant una pantalla veient com apareixien els plasmidis entortolligats!

I fora del món científic, també hi ha hagut gent que m'ha ajudat molt en el dia a dia, en les estones d'oci, quan hem anat a esquiar, a fer cims, a baixar coves, a fer curses, a fer BTT (o almenys intentar-ho)... Sou gent que no pertanyeu a aquest món de la recerca, i precisament per això m'heu permès desconnectar de les tasques diàries i dels maldecaps, m'heu entès en moments de més pressió i estrès, però alhora heu sabut compartir amb mi les petites alegries quan una prova sortia bé o quan, com ara, us puc dir que ja he acabat aquest treball que durant tant de temps heu "sofert". A tots vosaltres, amics i companys, el gràcies és del tot merescut.

I per últim, la gent a qui més estimo, els més propers, els que sempre hi són... els de casa. Sabeu? Tenia ganes d'acabar la tesi per poder-vos-la dedicar, per dir-vos tot això que normalment ja us dic, però com a dedicatòria personal d'un esforç que heu viscut i del qual heu participat de primera mà.

A tu iaia, gràcies per haver cuidat de mi des que aixecava un pam de terra fins encara avui en dia.

A tu David, què et puc dir que no t'hagi dit ja? Gràcies per compartir la teva vida amb mi, per conèixer-me tan bé, per caminar plegats, per tenir objectius comuns, per viure intensament tots els moments, per les il·lusions posades en cada un dels instants que vivim plegats... Ets la persona que segurament ha viscut més de prop tot aquest treball i sempre has fet l'esforç per entendre-ho i donar-me el teu suport en tot moment. Gràcies ninu!

A tu mare, gràcies per l'inesgotable suport que sempre m'has donat i que em dones, per saber què penso i com em sento en tot moment només mirant-me als ulls o escoltant el to de veu, per estar tan a prop meu, per ser tan còmplice, per ser tan forta i tirar del carro de tots plegats, per tenir un cor tan gran, per l'estima... en definitiva, perquè tant tu com el pare sou els responsables que jo avui sigui aquí!

I a tu pare, et continuo sentint ben a prop. Sé que et sentiries orgullós de veure que aquest esforç s'ha traduït en el que tinc entre les mans. Tu que sempre t'havies interessat tant per com m'anaven les coses, per posar les teves esperances en una recerca que pogués ajudar a gent que patia com tu ho feies. Gràcies pare per continuar essent part de mi i donar-me valentia per afrontar els nous reptes.

A vosaltres quatre, David, iaia, pare i mare, us dedico aquest treball.

La vida és l'art de treure conclusions suficients a partir de
dades insuficients

(Samuel Butler)

És precisament la possibilitat d'arribar a realitzar un somni el
que fa que la vida sigui interessant

(*L'Alquimista*, Paulo Coelho)

Aquesta tesi s'ha realitzat al laboratori de Bioquímica del Càncer del departament de Biologia de la Universitat de Girona, gràcies a una Beca de Recerca (BR) de la Universitat de Girona i, anteriorment, gràcies a un contracte associat a un projecte del Fons Europeu pel Desenvolupament de les Regions (FEDER).

S'ha complementat amb una estada a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona, en concret al laboratori de Biologia Molecular dirigit pel Dr. Enrique Querol. També s'ha col·laborat amb el laboratori d'Oncologia Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia (ICO Girona) a l'hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, dirigit pel Dr. Ramon Colomer.

Els objectius d'aquest treball s'han emmarcat dins el següent projecte:

El inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) como antitumoral. Escalado a planta piloto de la producción de PCI recombinante y estudios necesarios para iniciar los ensayos de la fase preclínica. Projecte finançat pel Fons Europeu pel Desenvolupament de les Regions (FEDER) (1999-2000). Investigador Principal: Dr. Rafael de Llorens Duran.

ÍNDEX

ÍNDEX	I
QUADRES METODOLÒGICS	VII
ABREVIATURES	IX
RESUM	XIII
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. COMUNICACIÓ I DIVISIÓ CEL·LULAR.....	3
1.1.1. Comunicació cel·lular.....	3
1.1.2. El cicle cel·lular i la seva regulació.....	4
1.1.3. Mort cel·lular programada o apoptosi.....	6
1.2. EL CÀNCER.....	7
1.2.1. Introducció al càncer.....	7
1.2.1.1. La transformació cel·lular maligna.....	7
1.2.1.2. Invasivitat tumoral i metàstasi.....	8
1.2.1.3. Base molecular del càncer.....	9
1.2.1.4. Tipus de càncer.....	10
1.2.1.5. Epidemiologia i factors de risc.....	11
1.3. LA FAMÍLIA DE RECEPTORS ErbB I ELS SEUS L·LIGANDS.....	13
1.3.1. Els receptors erbB.....	13
1.3.2. Lligands.....	14
1.3.3. L'EGFR.....	17
1.3.3.1. Dimerització.....	18
1.3.3.2. Fosforil·lació.....	21
1.3.3.3. Internalització.....	23

1.3.4. La família de receptors ErbB i el càncer.....	25
1.3.5. Teràpies per combatre el càncer dirigides contra la via ErbB.....	26
2. OBJECTIUS.....	31
3. MATERIAL I MÈTODES.....	35
3.1. EQUIPAMENT I PRODUCTES QUÍMICS.....	37
3.1.1. Equipament.....	37
3.1.2. Productes químics.....	39
3.2. TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR.....	40
3.2.1. Material, medis i solucions.....	40
3.2.2. Línies cel·lulars.....	41
3.2.3. Manteniment dels cultius cel·lulars.....	42
3.2.4. Recompte del nombre de cèl·lules.....	43
3.2.5. Assaig de proliferació.....	44
3.3. TÈCNiques DE BIOQUÍMICA.....	46
3.3.1. Tècniques de quantificació de proteïna.....	46
3.3.1.1. Mètode de Bradford.....	46
3.3.1.2. Mètode espectrofotomètric.....	46
3.3.2. Obtenció de les mostres per l'anàlisi bioquímica.....	47
3.3.2.1. Tractament.....	47
3.3.2.2. Lisat cel·lular.....	47
3.3.2.3. Extracció nuclear.....	48
3.3.3. Estudi de l'activació dels receptors de la família EGFR.....	49
3.3.3.1. Transferència tipus Western.....	50
3.3.3.2. Estudi de la dimerització de l'EGFR.....	55

3.3.3.3. Cell-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	56
3.4. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	59
3.4.1. Material biològic i medis de cultiu.....	59
3.4.1.1. Soques i vectors.....	59
3.4.1.2. Medis de cultiu.....	60
3.4.1.3. Antibiótics.....	61
3.4.1.4. Condicions de cultiu.....	62
3.4.1.5. Conservació de soques i plasmidis.....	63
3.4.1.6. Mesura de la densitat òptica d'un cultiu.....	63
3.4.2. Mètodes de DNA recombinant.....	64
3.4.2.1. Obtenció de DNA dels vectors.....	64
3.4.2.2. Manipulació del DNA.....	65
3.4.2.3. Mètodes de clonatge.....	73
3.4.3. Tècniques de detecció d'RNA missatgers.....	76
3.4.3.1. Tractament de les cèl·lules.....	76
3.4.3.2. Extracció d'RNA total.....	76
3.4.3.3. Quantificació de l'RNA total.....	77
3.4.3.4. RT-PCR semiquantitativa.....	78
3.4.3.5. PCR a temps real.....	80
3.5. TÈCNiques DE TREBALL AMB PROTEÏNES.....	83
3.5.1. Expressió de proteïnes recombinants.....	83
3.5.1.1. Inoculació i creixement del cultiu.....	83
3.5.1.2. Inducció del cultiu.....	84
3.5.1.3. Fraccionament cel·lular.....	84
3.5.2. Purificació de proteïnes recombinants.....	87
3.5.2.1. Purificació de l'EGF a partir de la fracció intracel·lular soluble.....	87
3.5.2.2. Purificació de l'EGF a partir de la fracció intracel·lular insoluble.....	90

3.5.2.3. Purificació de l'EGF a partir de la fracció extracel·lular.....	93
3.5.3. Obtenció de variants proteiques mitjançant digestió proteolítica.....	95
3.5.3.1. Digestió proteolítica amb tripsina.....	95
3.5.3.2. Cromatografia de fase reversa Vydac C4 en sistema FPLC.....	96
4A. CAPÍTOL I.....	99
4A.1. INTRODUCCIÓ GENERAL.....	101
4A.1.1. EL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGF).....	101
4A.1.1.1. Estructura.....	101
4A.1.1.2. Distribució.....	102
4A.1.1.3. Funcions.....	103
4A.1.2. L'INHIBIDOR DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATAT (PCI).....	103
4A.1.2.1. Característiques generals.....	103
4A.1.2.2. Estructura tridimensional del PCI.....	105
4A.1.2.3. Aplicacions del PCI.....	106
4A.1.3. EL PCI COM AGENT ANTITUMORAL ANTECEDENTS DEL GRUP DE RECERCA	107
4A.1.4. PCI versus EGF.....	109
4A.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	113
4A.2.1. Clonatge, expressió i purificació de l'EGF en un sistema d'expressió intracel·lular bacterià.....	113
4A.2.1.1. Obtenció del gen de l'EGF.....	114
4A.2.1.2. Clonatge de l'EGF al vector pUC118.....	116
4A.2.1.3. Clonatge de l'EGF als vectors pET (pET21, pET22 i pET32).....	117
4A.2.1.4. Anàlisi de l'expressió d'EGF recombinant.....	118
4A.2.1.5. Purificació de l'EGF.....	121

4A.2.1.5.1. Purificació de l'EGF a partir de la construcció pET21-EGF.....	121
4A.2.1.5.2. Purificació de l'EGF a partir de la construcció pET32-EGF.....	123
4A.2.2. Anàlisi de l'activitat biològica dels EGF recombinants obtinguts.....	125
4A.2.2.1. Fosforil·lació.....	125
4A.2.2.2. Dimerització.....	126
4A.2.3. Disseny d'un mutant de l'EGF (EGF Truncat), expressió i purificació.....	127
4A.2.3.1. Obtenció del gen de l'EGF Truncat per mutagènesi dirigida.....	127
4A.2.3.2. Clonatge de l'EGF Truncat al vector pET21.....	129
4A.2.3.3. Expressió i purificació de l'EGF Truncat.....	130
4A.2.4. Confirmació de l'estructura tridimensional de l'EGF i l'EGF Truncat.....	131
4A.2.5. Anàlisi de l'activitat biològica de l'EGF Truncat.....	132
4A.2.5.1. Fosforil·lació.....	132
4A.2.5.2. Dimerització.....	133
4A.2.5.3. Proliferació cel·lular.....	135
4A.2.6. Clonatge, expressió i purificació de l'EGF en un sistema d'expressió extracel·lular bacterià.....	136
4A.2.6.1. Obtenció del gen de l'EGF.....	137
4A.2.6.2. Clonatge de l'EGF al vector pINIII OmpA3.....	138
4A.2.6.3. Expressió i purificació de l'EGF a partir de la construcció pINIII-EGF.....	139
4A.2.7. Anàlisi de la puresa i el plegament de l'EGF recombinant.....	141
4A.2.8. Anàlisi de l'activitat biològica de l'EGF recombinant.....	144
4A.2.8.1. Fosforil·lació.....	144
4A.2.8.2. Dimerització.....	144
4A.2.8.3. Proliferació.....	145
4A.2.9. Obtenció de variants de l'EGF.....	146
4A.2.9.1. Digestió de l'EGF recombinant amb tripsina i purificació de les variants obtingudes.....	147

4A.2.10. Anàlisi de l'activitat biològica de les variants truncades de l'EGF obtingudes per digestió amb tripsina.....	150
4A.2.10.1. Fosforil·lació.....	150
4A.2.10.2. Dimerització.....	151
4A.2.10.3. Internalització.....	152
4A.2.10.4. Proliferació cel·lular.....	153
4A.2.11. Resum de l'activitat bioquímica de totes les variants de l'EGF que s'han obtingut.....	154
4A.3. DISCUSSIÓ GENERAL.....	159
4A.4. CONCLUSIONS.....	164
4B. CAPÍTOL II.....	167
4B.1. INTRODUCCIÓ GENERAL.....	169
4B.1.1. ELS INHIBIDORS DE TIROSIN QUINASES.....	169
4B.1.1.1. Gefitinib.....	171
4B.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	176
4B.2.1. Caracterització de les línies cel·lulars.....	176
4B.2.2. Assaigs de proliferació.....	177
4B.2.2.1. Resposta a l'Iressa.....	180
4B.2.2.2. Resposta a PCI i Iressa.....	181
4B.2.2.3. Comparació de l'efecte induït per EGF i PCI.....	182
4B.2.3. Estudi de l'estimulació autocrina.....	183
4B.2.3.1. Resposta a l'Iressa.....	184
4B.2.3.2. Resposta al PCI.....	187
4B.3. DISCUSSIÓ GENERAL.....	190
4B.4. CONCLUSIONS.....	194
5. BIBLIOGRAFIA.....	195

QUADRES METODOLÒGICS

QUADRE 3.1. Material, medis i solucions utilitzats	40
QUADRE 3.2. Manteniment dels cultius.....	41
QUADRE 3.3. Recompte del nombre de cèl·lules.....	44
QUADRE 3.4. Assaig de proliferació.....	45
QUADRE 3.5. Quantificació de proteïnes mitjançant el mètode de Bradford.....	46
QUADRE 3.6. Obtenció del lisat cel·lular.....	48
QUADRE 3.7. Extracció nuclear.....	49
QUADRE 3.8. Electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-Page).....	51
QUADRE 3.9. Electrotransferència.....	52
QUADRE 3.10. Detecció immunològica amb anticossos específics.....	53
QUADRE 3.11. Extracció dels anticossos de revelat d'una membra de PVDF.....	54
QUADRE 3.12. Tinció amb blau de Coomassie.....	55
QUADRE 3.13. Tinció amb nitrat de plata.....	55
QUADRE 3.14. Inducció de la dimerització dels receptors i reacció d'entrecruament químic.....	56
QUADRE 3.15. Cell-ELISA.....	57
QUADRE 3.16. Composició dels medis de cultiu.....	61
QUADRE 3.17. Obtenció d'un glicerinat.....	63
QUADRE 3.18. Minipreparació de DNA plasmídic.....	65
QUADRE 3.19. Electroforesi en gel d'agarosa.....	66
QUADRE 3.20. Purificació de fragments de DNA.....	67
QUADRE 3.21. Determinació de la concentració de DNA mitjançant l'espectrofotòmetre.....	68
QUADRE 3.22. Determinació de la concentració de DNA mitjançant gel d'agarosa.....	68
QUADRE 3.23. Reacció d'amplificació en cadena o PCR.....	69
QUADRE 3.24. Lligació de fragments de DNA.....	71
QUADRE 3.25. Seqüenciació de DNA.....	73
QUADRE 3.26. Obtenció de cèl·lules competents.....	74
QUADRE 3.27. Transformació de cèl·lules competents.....	74
QUADRE 3.28. Extracció d'RNA.....	77
QUADRE 3.29. Quantificació d'RNA.....	77
QUADRE 3.30. RT-PCR (per a semiquantificació).....	78
QUADRE 3.31. Reacció d'amplificació en cadena (PCR) per a semiquantificació de l'RNA.....	79
QUADRE 3.32. RT-PCR (per a PCR a temps real).....	81
QUADRE 3.33. PCR a temps real.....	82
QUADRE 3.34. Obtenció de fraccions cel·lulars per a pET21b(+)-EGF i pET22b(+)-EGF.....	85

QUADRE 3.35. Obtenció de fraccions cel·lulars per a pET32b(+)-EGF.....	85
QUADRE 3.36. Obtenció de fraccions cel·lulars de pIN110mpA3-EGF.....	87
QUADRE 3.37. Cromatografia d'afinitat per níquel.....	89
QUADRE 3.38. Cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic.....	91
QUADRE 3.39. Cromatografia de gel filtració en sistema FPLC.....	93
QUADRE 3.40. Filtració tangencial.....	94
QUADRE 3.41. Digestió amb tripsina.....	95
QUADRE 3.42. Cromatografia de fase reversa en sistema FPLC.....	96

ABREVIATURES

A

A	adenina
A₅₅₀	absorbància a 550 nm
A₂₆₀	absorbància a 260 nm
A₂₈₀	absorbància a 280 nm
aa	aminoàcid
Abs	absorbància
Amp	ampicil·lina
AR	amfiregulina
ATCC	col·lecció tipus de cultius cel·lulars d'EE.UU.
ATP	adenosin trifosfat

B

BrEt	bromur d'Etidi
BSA	albúmina sèrica bovina
BTC	betacel·lulina

C

C	citosina
CdK	quinasa depenent de ciclina
cDNA:	àcid desoxiribonucleic complementari
cèl	cèl·lules
CPA	carboxipeptidasa A
CPB	carboxipeptidasa B

D

Da	daltons
dATP	deoxiadenòsid trifosfat
dCTP	deoxicitonòsid trifosfat
DEP	dietilpirocarbonat
dH₂O	aigua destil·lada
dGTP	deoxiguanòsid trifosfat

DMEM	medi d'Eagle modificat per Dulbecco
DMSO	dimetil sulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	deoxinucleòsid trifosfat
DO	densitat òptica
DTT	1,4-ditio-DL-treitol
dTTP	deoxitiminòsid trifosfat

E

ϵ	coeficient d'extinció molar
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
EGF	factor de creixement epidèrmic
EGFR	receptor del factor de creixement epidèrmic
ELISA	assaig enzimàtic per immunoabsorció
EM-MALDI TOF	espectrometria de masses, desorció/ionització mitjançant làser assistit per matriu, i per mitjà d'un analitzador TOF
EPI	epiregulina
ER	receptor d'estrògens
ErbB	receptor dels factors de creixement de la família de l'EGF

F

FBS	sèrum fetal boví
FPLC	cromatografia líquida d'alta precisió

G

G	guanina
g, mg, μg, ng	grams, miligrams, micrograms, nanograms

GAM-Po anticòs de cabra contra la regió constant de les immunoglobulines de ratolí, conjugat amb peroxidasa

GAPDH deshidrogenasa gliceraldehid 3 fosfat

GAR-Po anticòs de cabra contra la regió constant de les immunoglobulines de conill, conjugat amb peroxidasa

GPCR receptor associat a proteïna G

H

h hora(es)

HB-EGF factor de creixement d'unió a heparina tipus EGF

HER receptor dels factors de creixement de la família de l'EGF

His histidina

HPLC cromatografia líquida d'alta pressió

HRG heregulines

I

IC₅₀ concentració inhibidora 50%

IGF-1 factor de creixement insulínic

IgG immunoglobulina G

INS insulina

K

Kb quilo bases

KDa quilo daltons

L

LB Lúria-Bertani

M

M, mM, μ M molar, milimolar, micromolar

MAPK proteïna quinasa activada mitogènicament

Mab anticòs monoclonal

MCS lloc de clonatge múltiple

min minut

mL mililitre

mRNA àcid ribonucleic missatger

N

nm nanòmetres

NEUR neuregulina

NSCLC càncer de pulmó de cèl·lules no petites

O

o/n tota la nit

Oligo dT oligòmer de desoxitimidines

P

PAGE electroforesi en gel de poliacrilamida

pb parell de bases

PBS tampó fosfat salí

PCI inhibidor de carboxipeptidasa de patata

PCR reacció en cadena de la polimerasa

PDB banc de dades de proteïnes

PDGF factor de creixement derivat de plaquetes

Pi3K quinasa de fosfatidil inositol

PKC proteïna quinasa C

PLC γ fosfolipasa γ

PLEIO pleiotrofina

PM pes molecular

PMSF fenilmetilsulfonilfluorur

PTYR tirosines fosforil·lades

PVDF difluorur de polivinilidè

R

RIPA	assaig d'immunoprecipitació del receptor
RNA	àcid ribonucleic
RNAse	ribonucleasa
rpm	revolucions per minut
RT-PCR	reacció de transcripció associada a reaccions en cadena amb la polimerasa
RTK	receptor amb activitat quinasa

S

SDS	dodecilsulfat sòdic
SH2	homologia Src 2
STAT	transductors del senyal i activadors de la transcripció

T

T	timina
TBE	tampó àcid bòric, Tris i EDTA

TBP	proteïna d'unió a la seqüència TATA
TBST	tampó salí Tris amb 1% de Tween
TC	tampó de càrrega
TE	tampó Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N',-tetrametil-1,2-diaminoetà
TGF-α	factor de creixement transformant alfa
Tris	hidroximetilaminometà

U

U	unitats
U.V.	llum ultraviolada

V

v:v	relació volum-volum
v	versus

X

xg	força centrífuga relativa
-----------	---------------------------

RESUM

El càncer representa un dels problemes sanitaris més importants en el món desenvolupat. Són molts els esforços que es dediquen a la investigació d'aquesta malaltia, així com també al tractament. En els últims 30 anys s'ha fet un avenç important en el disseny de noves teràpies encaminades a tractar-lo. Tot i així, i excepte algun cas concret, no n'hi ha hagut cap que permetés curar-lo en el sentit més estricte de la paraula. La majoria dels tractaments o bé són preventius, en el cas de tumors extirpats i possiblement disseminats, o bé paliatius, en el cas de tumors ja disseminats a diverses parts del cos. En molts pocs casos el tractament es pot considerar curatiu. La realitat és que els efectes duren un període més o menys llarg de temps, però acaben apareixent resistències que fan que s'hagin de deixar d'aplicar i, si és el cas, substituir-los per un altre.

La via de transducció del senyal iniciada pels receptors de la família ErbB té un paper capdal en la majoria de carcinomes. En molts d'ells es troben sobreexpressats un o més receptors de la família, algun dels lligands que s'hi uneixen, o bé, i el que és més habitual, els dos fenòmens alhora. El fet d'esdevenir independent del seu entorn, fa que la cèl·lula tumoral pugui perpetuar-se sense fre. De fet, la via ErbB és una de les més estudiades i caracteritzades en relació amb el càncer. Durant la última dècada han aparegut al mercat diversos fàrmacs encaminats a bloquejar aquesta via: anticossos monoclonals, inhibidors de tirosin quinases, etc. Tots ells han tingut el seu impacte inicial però el pas del temps ha posat de manifest les mancances de cada un d'ells.

En aquest treball s'ha focalitzat l'interès en dos aspectes. Per una banda, el disseny de bloquejadors de la via ErbB en base als resultats que es tenen d'un antagonista natural com és el PCI (inhibidor de carboxipeptidasa de patata) i l'estudi del seu mecanisme d'acció, i per l'altra l'estudi de l'efecte combinatori de dos bloquejadors d'aquesta via i les possibles causes de les resistències aparegudes durant tractament.

L'inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) és una proteïna petita, inhibidora de proteases, que presenta un motiu estructural, "T-knot" que es troba present en factors de creixement com l'EGF o el TGF- α . Aquests factors de creixement de la família ErbB estan involucrats de forma molt directa en la progressió tumoral. S'ha demostrat que el PCI actua com un antagonista de la via ErbB per mitjà de la unió a l'EGFR però sense activar-lo. Un

dels problemes del PCI, però, és la baixa afinitat pel receptor en comparació amb el lligand natural, l'EGF. En aquest treball s'han dissenyat nous bloquejadors de la via ErbB partint de l'estructura de l'EGF per tal d'augmentar l'afinitat d'unió. Prèviament a l'obtenció d'aquests mutants s'ha clonat satisfactòriament l'EGF en un sistema d'expressió bacterià i s'ha posat a punt un protocol d'expressió i purificació, al final del qual s'ha obtingut un EGF ben plegat, actiu. El rendiment final ha estat satisfactori i ha permès poder disposar de prou molècula per dur a terme assajos posteriors. Pel que fa les variants obtingudes, s'ha determinat que, en general, tenen reduïda la capacitat d'inducció de fosforil·lació i dimerització però segueixen activant en cert grau la proliferació cel·lular. Tot i així, s'ha obtingut una variant, l'EGF Truncat, que tot i no estar correctament plegada, és la que ofereix uns millors resultats pel que fa reducció de l'activitat iniciada per la via ErbB.

En la segona part d'aquest treball, s'ha dut a terme un tractament combinat entre un antagonista de la via ErbB, el PCI, i un inhibidor de tirosin quinases d'aquesta mateixa via, l'Iressa el qual s'utilitza en tractaments quimioterapèutics de càncer de pulmó i mama. Tot i les bones expectatives que semblava oferir aquesta combinació, els resultats han posat de manifest que lluny d'haver-hi una sinèrgia, més aviat hi ha un antagonisme entre els dos tractaments. La clau es troba en el desenvolupament de resistències per part de les cèl·lules de carcinoma mamari en ser tractades amb algun dels dos compostos. S'ha demostrat, mitjançant anàlisi de l'expressió de lligands de la família ErbB, que quan es tracten les cèl·lules amb bloquejadors de la via ErbB apareixen unes resistències associades a l'expressió de més lligand per tal de compensar la disminució del total de receptor actiu a la membrana. Aquesta via sembla força efectiva, ja que s'observa una resistència evident al tractament. Aquesta és la primera vegada que s'associa de forma directa un tipus de tractament amb una resistència associada a l'activació de la producció autocrina de lligands, i representa un avenç prou important en la recerca oncològica encaminada a comprendre, i per tant intentar combatre, les fallides dels tractaments que s'estan aplicant actualment.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. COMUNICACIÓ I DIVISIÓ CEL·LULAR

1.1.1. Comunicació cel·lular

Els éssers pluricel·lulars van tardar bastant en evolucionar si es compara amb els unicel·lulars. Tot i que es fa difícil saber-ne la raó exacta, sembla ser que la qüestió està relacionada amb la necessitat que tenen els primers d'elaborar senyals que permetin a les cèl·lules comunicar-se entre sí, de tal manera que puguin coordinar el seu comportament en benefici de l'organisme com un tot. Aquesta comunicació és vital per tal de regular la divisió i coordinar, així, el desenvolupament i organització cel·lular. A més a més, també han de rebre estímuls constantment per tal de sobreviure.

Els senyals que es transmeten les cèl·lules solen ser químics. El procés consisteix en què una cèl·lula emissora emet un senyal, i aquest és rebut per una cèl·lula receptora la qual, i mitjançant unes proteïnes anomenades receptors que s'uneixen específicament al senyal o lligand, elaboren una resposta cel·lular específica. La resposta al senyal pot variar segons quina sigui la cèl·lula que el rebí, dels receptors que expressi i de la via de transducció del senyal que s'activi. Aquestes molècules extracel·lulars poden ser de naturalesa diferent: proteïnes, pèptids, àcids grassos, aminoàcids, nucleòtids, esteroides, i fins i tot gasos (Alberts i col., 1996). Els éssers pluricel·lulars utilitzen cinc vies diferents de transmissió de senyals extracel·lulars (figura 1.1):

Endocrina: les cèl·lules emissores secreten la molècula senyal (hormona) al torrent circulatori

Paracrina: la molècula senyal (factor local) és secretada per cèl·lules veïnes a la cèl·lula receptora. Molts factors de creixement i factors responsables de la inflamació actuen per aquesta via.

Autocrina: la mateixa cèl·lula és la que secreta i la que rep el senyal. Molts factors de creixement actuen, també, per aquesta via.

Juxtacrina: també es coneix com a dependent de contacte. La molècula senyal no és secretada sinó que es manté a la membrana de la cèl·lula emissora. El missatge, doncs, es transmet quan entren en contacte la molècula senyal, ancorada a la membrana de la cèl·lula emissora, i el receptor, ancorat a la membrana de la cèl·lula receptora. Aquest tipus

de transmissió del senyal es dóna, només, entre cèl·lules adjacents, i sol estar relacionat amb la supervivència.

Neuronal: el senyal extern és integrat per una neurona. Això genera uns impulsos elèctrics que estimulen la secreció de neurotransmissors que viatgen per l'espai intersinàptic i actuen sobre la cèl·lula diana.

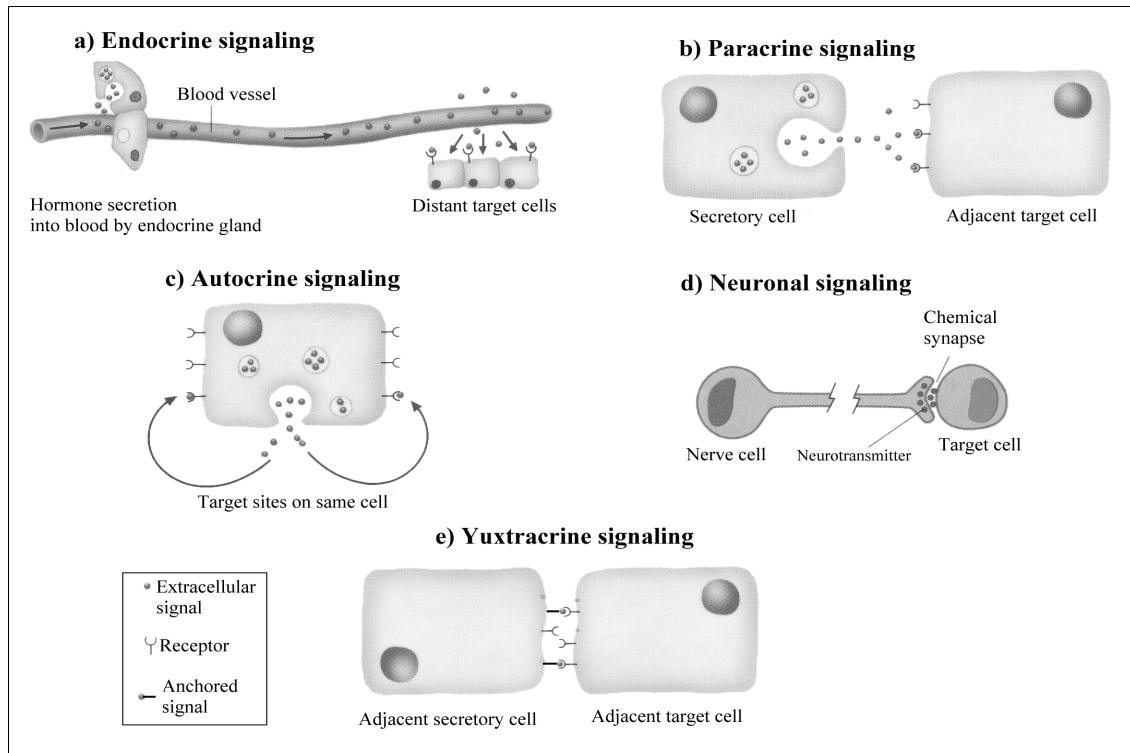


Figura 1.1. Mecanismes de transmissió de senyals cèl·lula-cèl·lula mitjançant productes extracel·lulars. a) endocrí, b) paracrí, c) autocrí, d) neuronal, e) juxtacrí (extret de Darnell i col., 1990)

1.1.2. El cicle cel·lular i la seva regulació

Tota cèl·lula, des de la unicel·lular més simple fins a la multicel·lular més complexa, té com a propietat fonamental i característica el fet de dividir-se. El procés global que inclou la proliferació es coneix com a cicle cel·lular, el qual consta de 4 fases (Alberts i col., 1996) (figura 1.2):

Mitosi: fase en la qual es dóna la divisió de la cèl·lula mare per tal de generar dues cèl·lules filles.

Fase S: també s'anomena fase de síntesi. Durant aquesta etapa es replica el material genètic.

Fase G1: període comprès entre el final de la mitosi i l'inici de la fase S.

Fase G2: període comprès entre el final de la fase S i l'inici de la mitosi.

Existeix una altra fase anomenada **G0** o **estat de quiescència** on la cèl·lula entra si en el medi no es donen les condicions adequades perquè pugui avançar en el cicle.

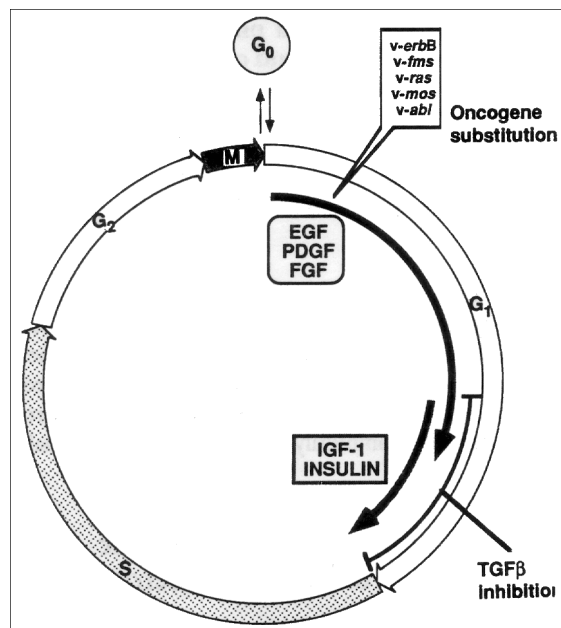


Figura 1.2. Factors de creixement necessaris durant el cicle cel·lular (extret d' Aaronson, 1991)

Al llarg del cicle cel·lular existeixen una sèrie de punts de control que la cèl·lula ha de superar si vol seguir avançant en ell. Un d'aquests punts es troba a la fase G₁, i és on s'avalua si la cèl·lula té la mida adequada, i si hi ha determinats factors al medi. Un altre punt de control es troba a la fase G₂, i en aquest es controla si el DNA s'ha duplicat correctament. Tot aquest control es fa a través de dues famílies de proteïnes: les quinases dependents de ciclins (Cdk) i les ciclins. Les ciclins s'uneixen a les Cdk i controlen la seva capacitat de fosforil·lació. L'activitat d'aquestes proteïnes assegura que abans d'entrar a la següent fase, l'anterior s'hagi completat correctament. Aquesta tasca la duen a terme mitjançant fosforil·lació de proteïnes clau que inicien o regulen les diferents

etapes. Així, el control de l'expressió de les ciclines i la inhibició de les quinases és el que regula el cicle cel·lular.

La sortida de les cèl·lules de l'estat G_0 i la posterior continuació del cicle cel·lular, és a dir, la proliferació, vénen determinades pels factors de creixement polipeptídics. La resposta mitogènica es dona en dues parts: pas de G_0 a G_1 per acció dels factors de competència i pas de G_1 a síntesi de DNA (fase S) per acció dels factors de progressió:

Els **factores de competència** calen, inicialment, durant varies hores pel pas a G_1 , ja que si la senyal s'interromp la cèl·lula torna a G_0 . Dins aquesta família destaquen el factor de creixement epidèrmic (EGF), el factor de creixement transformant ($TGF-\alpha$), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i el factor de creixement derivat de fibroblasts (FGF).

Els **factores de progressió** permeten a la cèl·lula passar de G_1 a la fase S. N'és un exemple el factor de creixement tipus insulínic (IGF-1).

Un cop la cèl·lula ha entrat a la fase S està compromesa a dividir-se. En el cas que no es superi el punt de control de G_2 , la cèl·lula morirà per apoptosi.

1.1.3. Mort cel·lular programada o apoptosi

Per tal que la cèl·lula pugui sobreviure i proliferar cal que li arribin estímuls externs de cèl·lules veïnes o bé de la matriu extracel·lular. Si no li arriben, es desencadena un procés de suïcidi cel·lular anomenat mort cel·lular programada o apoptosi. Aquest procés permet mantenir l'equilibri entre la proliferació i la mort cel·lular, el que es coneix com a homeòstasi.

El que diferencia l'apoptosi de la necrosi, l'altre procés de mort cel·lular, és el fet que en el primer s'evita la reacció inflamatòria i immunològica, ja que el contingut intracel·lular no s'aboca a l'exterior, mentre que en el segon sí.

Com a controladors més importants d'aquest procés destaquen les proteïnes p53, la pRb i la Bcl-2. També cal destacar que el cisplatí, un dels primers fàrmacs utilitzats en quimioteràpia i que actualment es continua administrant, és un agent inductor de l'apoptosi. S'ha demostrat molt efectiu en el tractament de tumors humans ja que és capaç

d'unir-se al DNA i alterar-ne l'estructura mitjançant la seva curvatura. El sistema de reparació del DNA, en el qual s'inclou la p53, és incapaç d'arreglar aquesta lesió i s'indueix l'apoptosi.

1.2. EL CÀNCER

1.2.1. Introducció al càncer

1.2.1.1. La transformació cel·lular maligna

Una població jeràrquica de cèl·lules és aquella en la qual n'hi ha un conjunt anomenades cèl·lules mare pluripotencials que estan en estat de repòs i només s'activen quan cal donar lloc a una població de cèl·lules progenitores. Aquestes poden proliferar donant lloc a cèl·lules funcionalment madures, necessàries per substituir les que s'han perdut durant determinats processos. Les cèl·lules mare pluripotencials poden autorenovar-se per substituir les que han quedat compromeses en una posterior diferenciació (figura 1.3). Aquest procés de desenvolupament requereix un estricte control per tal de mantenir equilibrats els processos de proliferació i diferenciació. Quan aquesta coordinació falla, apareix una cèl·lula amb un fenotip transformant que és el pas previ a l'aparició d'una cèl·lula tumoral, la qual es diferencia d'una de normal perquè té capacitat d'invasió d'altres teixits.

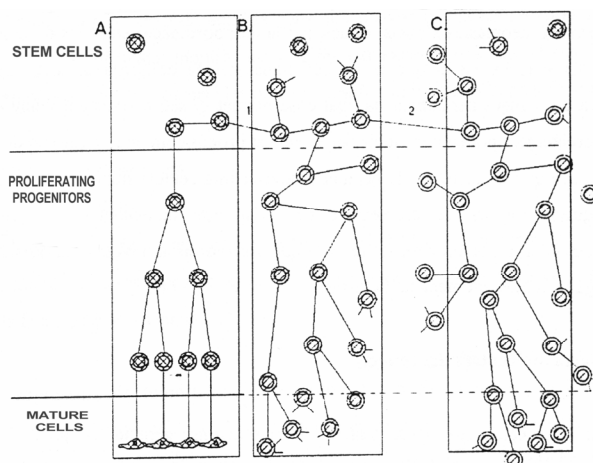


Figura 1.3. Esquema dels tres estats cel·lulars proliferatius de l'estat adult: regeneració (A), transformació (tumors benignes) (B) i tumors malignes (C) (extret de Cross i Dexter, 1991).

Les cèl·lules canceroses es caracteritzen perquè es poden reproduir contínuament, tot i que existeixin restriccions, i perquè envaeixen territoris reservats per a altres cèl·lules.

Tot i que una cèl·lula pot adquirir un fenotip transformant no sempre deriva en càncer. Si aquest creixement descontrolat es troba localitzat es parla d'un tumor benigne que es pot curar extirpant-lo quirúrgicament i aplicant, si cal, sessions de radioteràpia. Ara bé, si a més del creixement descontrolat, les cèl·lules són capaces d'envair altres teixits es parla de tumor maligne que sol ser tractat amb radioteràpia i quimioteràpia (a més de l'extirpació quirúrgica), i sol ser més difícil de curar. Actualment, i de cara a futures teràpies, s'està estudiant la possible aplicació de drogues que provoquin la diferenciació cel·lular. En casos en què la curació sembla impossible, hi ha tractaments que intenten pal·liar el dolor causat pel càncer.

1.2.1.2. *Invasivitat tumoral i metàstasi*

Tot procés cancerigen consta d'una sèrie d'etapes. En primer lloc s'inicia una proliferació controlada a la capa basal (figura 1.4 1). Les cèl·lules es desplacen cap a la superfície exterior mentre es van diferenciant a cèl·lules aplanades riques en queratina. Aquest fenomen es coneix com a displàsia i sol ser innocu i a vegades remet espontàniament (figura 1.4 2a). A vegades, però, les cèl·lules continuen proliferant fins a produir un carcinoma "in situ", en el qual les pautes de divisió i diferenciació estan molt afectades, i totes les capes de l'epiteli estan formades per cèl·lules indiferenciades en proliferació que solen ser molt variables en mida i cariotip. Tot i així, les cèl·lules anormals encara no han travessat la làmina basal i, per tant, encara hi ha curació per extirpació quirúrgica. Si no s'extirpés el tumor encara podria haver-hi curació per regressió espontània. Les cèl·lules travessen la làmina basal (figura 1.4 2b). Viatgen a través del teixit adjacent i poden arribar a un vas sanguini o limfàtic (normalment per angiogènesi), creuar-ne la làmina basal i l'endoteli i entrar a la circulació (figura 1.4 3). Un cop estan dins la circulació, la majoria són eliminades pel sistema immunitari. Ara bé, les que aconseguen escapar de la neutralització poden sortir de la circulació en una altra part del cos (figures 1.4 4 i 5) i sobreviure i proliferar de nou (figura 1.4 6). Aquest fenomen es coneix com a metàstasi, i representa un dels problemes més greus del càncer.

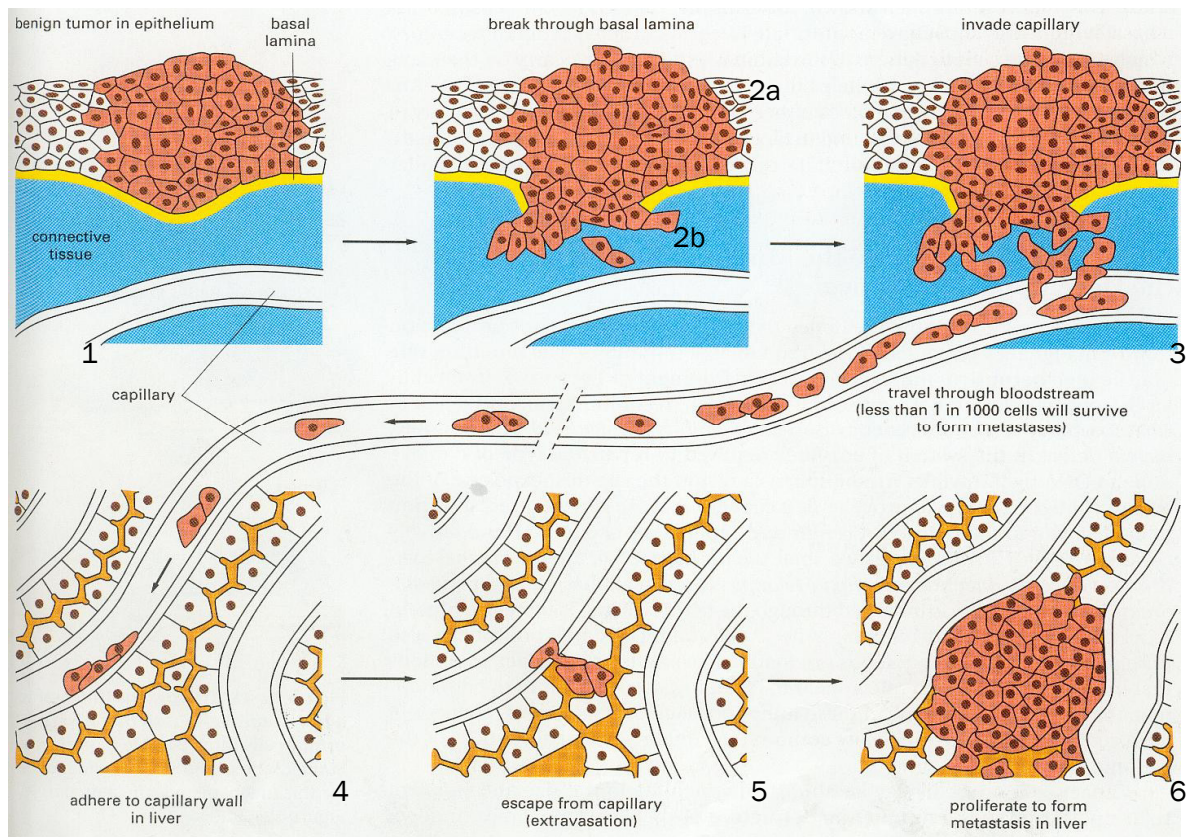


Figura 1.4. Etapes de disseminació d'un tumor des de l'òrgan d'origen fins a formar una metastasi en un altre òrgan del cos (extret d'Alberts i col., 1996).

1.2.1.3. Base molecular del càncer

Es diu que el càncer té un origen monoclonal perquè prové d'una anomalia que es produeix, inicialment, en una sola cèl·lula. Ara bé, una sola mutació no provoca la transformació maligna sinó que s'estima que calen entre 3 i 7 successos independents a l'atzar, cadascun amb baixa probabilitat, per tal que una cèl·lula normal es transformi en cancerosa (els números més baixos corresponen a leucèmies i els més alts a carcinomes). Aquestes mutacions poden aparèixer espontàniament, es poden heretar o bé poden ser promogudes per agents externs com són virus, radiacions i agents químics, els quals augmenten la freqüència de mutació.

La proliferació cel·lular incontrolada i la invasivitat, dues de les característiques principals del càncer, es poden assolir per dues vies mutacionals diferents:

Els **protooncogenes** representen una gran família de gens que faciliten la transformació tumoral. Molts d'ells codifiquen per components que ajuden a estimular la proliferació,

com són proteïnes de secreció, receptors transmembrana, proteïnes d'unió a GTP, quinases, proteïnes reguladores de gens, etc. Aquest tipus de mutació té un efecte dominant, per tant una sola mutació en una de les dues còpies del gen és suficient per manifestar l'alteració. El gen alterat s'anomena oncogen i l'allel normal és el corresponent protooncogen.

Els **gens supressors de tumors** estan implicats en el control negatiu de la proliferació cel·lular. Aquest tipus de mutació actua de manera recessiva i moltes vegades la pèrdua d'una còpia del gen, o fins i tot de les dues, normalment no és suficient, per ella mateixa, per causar càncer. Però sí que es dona un important augment de les mutacions, ja que la majoria d'aquests gens codifiquen per proteïnes de reparació del DNA i control del cicle cel·lular. Alguns dels gens supressors de tumors més coneguts són els del retinoblastoma i el de la p53.

1.2.1.4. Tipus de càncer

Els diferents tipus de càncer es classifiquen en tres categories: carcinomes, sarcomes i leucèmies. Els carcinomes tenen un origen epitelial, els sarcomes tenen el seu origen en el teixit conjuntiu i les leucèmies provenen de les cèl·lules hematopoiètiques.

El 90% dels càncers humans són carcinomes. Aquest percentatge tant elevat és degut al fet que la major part de la proliferació del cos es produeix a nivell dels epitelis i aquests, a més a més, són els que està més sotmesos a lesions físiques i químiques que afavoreixen el càncer. Aquest tipus de neoplàsia és la que presenta pitjor pronòstic ja que és la que origina metàstasis amb més facilitat. Els carcinomes que tenen més incidència són els de pulmó, mama, pròstata i colorectals (figura 1.5.).

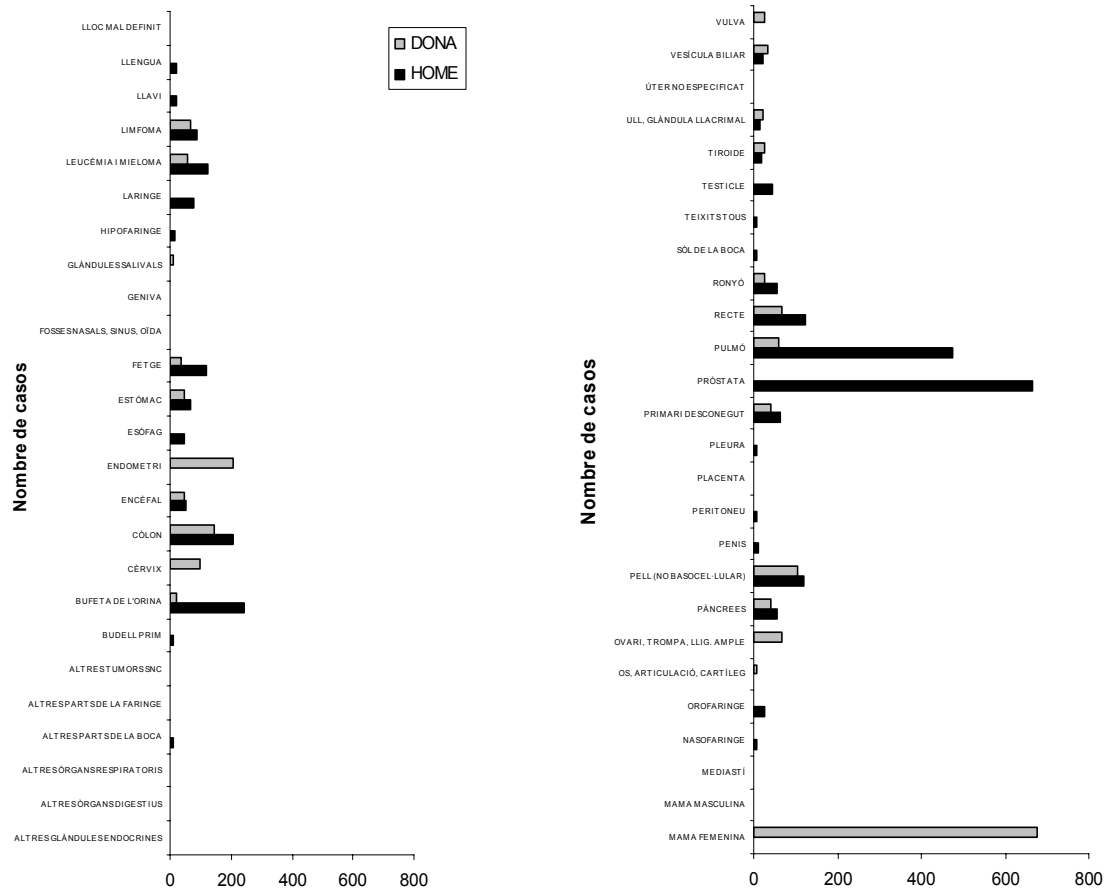


Figura 1.5. Incidència del càncer a Catalunya durant l'any 2004. Dades extretes de la base de dades de l'Institut Català d'Oncologia.

1.2.1.5. *Epidemiologia i factors de risc*

L'ambient en el qual un es mou és un factor molt important a l'hora de determinar la probabilitat de patir un determinat tipus de càncer. Durant molts anys s'han fet estudis epidemiològics que han posat de manifest que no totes les parts del món tenen els mateixos índexs d'incidència pel que fa neoplàsies (Cancer Facts & Figures 2006). Així doncs, i per posar un exemple, el càncers de còlon, mama i pròstata són molt més comuns als països desenvolupats que no pas als subdesenvolupats, probablement pels hàbits alimentaris i també per la contaminació atmosfèrica. En canvi, altres càncers intestinals estan més arrelats al món subdesenvolupat probablement pel tipus de cocció dels aliments. Pel que fa el càncer de pulmó s'observa que la incidència és força semblant als dos mons degut a la globalització del consum de tabac. També és curiós el fet que en un

estudi en el qual es va fer un seguiment de la incidència del càncer de mama en una població de dones japoneses que van emigrar als Estats Units, es va observar que la incidència de patir aquesta malaltia augmentava molt significativament en comparació amb la població de dones que no havia emigrat (Alberts i col., 1996). Aquest fet reforça molt la teoria que els factors ambientals i genètics que controlen el càncer juguen papers molt equitatius.

La Societat Americana del Càncer estima que el 2006 es diagnosticaran aproximadament 1.399.790 nous casos de càncer. D'aquests, 170.000 moriran de càncer de pulmó causat pel tabac. També es creu que un terç de les 564830 morts per càncer que estan previstes pel 2006 als Estats Units, ho seran a causa de la nutrició, la inactivitat física i el sobrepès o obesitat que d'altra banda podrien ser evitats. Altres tipus de càncer estan relacionats amb agents infecciosos com són el virus de l'hepatitis B (HBV), el papilomavirus humà (HPV), el virus de la immunodeficiència humana (VIH), entre d'altres, i també podrien ser previnguts mitjançant canvis de comportament, vacunes o antibiòtics. Pel que fa els càncers de pell, molts dels més d'un milió de casos que estan previstos per l'any 2006 podrien ser previnguts per mitjà de la utilització de protecció solar.

1.3. LA FAMÍLIA DE RECEPTORS ErbB I ELS SEUS LLIGANDS

Les cèl·lules estan contínuament exposades a diferents estímuls que van des de factors solubles endocrins o paracrins, fins a molècules provinents de cèl·lules veïnes. Durant el desenvolupament, l'expressió diferencial de gens i altres funcions prou importants són controlades per senyals entre cèl·lules. El flux d'informació des del medi extracel·lular fins a la cèl·lula és necessari per tal que el sistema funcioni. També és molt important que aquests senyals siguin correctament interpretats per la cèl·lula per tal d'aconseguir una resposta adequada (Singh i Harris 2005). En el cas dels tumors, per tal que puguin créixer, les cèl·lules han de ser capaces d'augmentar en nombre i de desplaçar-se a altres ambients i sobreviure-hi. Tot aquest control és dut a terme pels receptors de membrana. El grup més destacable és el format per les quinases que són les encarregades de modular moltes de les vies de transducció de la cèl·lula.

Els receptors tirosin quinasa es troben només en metazous a diferència d'altres famílies de receptors, sobretot serin i treonin quinasa, les quals es troben conservades en tots els eucariotes i fins i tot en organismes unicel·lulars. De receptors tirosin quinasa se n'han descrit almenys 60, i s'han dividit en famílies. Una de les més conegudes és la família erbB (Stein i Staros 2000; Bazley i col., 2005).

1.3.1. Els receptors erbB

Aquesta família consta de 4 receptors estructuralment força similars: EGFR/erbB-1, c-erbB-2/HER2, c-erbB-3/HER3 i c-erbB-4/HER4 (figura 1.8). Els 4 gens que donen lloc a aquestes proteïnes poden ser sotmesos a processos d'"splicing" per tal de generar diferents formes del mateix receptor (Yarden i Sliwkowski 2001; Bazley i col., 2005). D'entre aquests receptors, cal destacar HER2 al qual, fins al moment, no se li coneix cap lligand però que és la parella preferida pels altres receptors a l'hora de formar dímers, i HER3 que no té activitat tirosin quinasa.

De forma general, es pot dir que els receptors tirosin quinasa són enzims ancorats a la membrana cel·lular (figura 1.6). Tenen un domini transmembrana (curt i format per una única α -hèlix) que separa el domini quinasa intracel·lular (d'uns 600 aminoàcids i que inclou la quinasa en tirosines, les seqüències reguladores i les dianes de fosforil·lació), del

domini extracel·lular d'unió al lligand (d'uns 600-630 aminoàcids i ric en cisteïnes; dominis CR1 i CR2 molt conservats) (Singh i Harris 2005). En les formes madures del receptor, el domini està altament glicosilat. Això fa que la massa molecular augmenti i passi de 70 KDa (part proteica) a 170 KDa en el cas de l'EGFR i 185 KDa en el de HER2 (pes molecular aparent en un gel d'electroforesi SDS-Page).

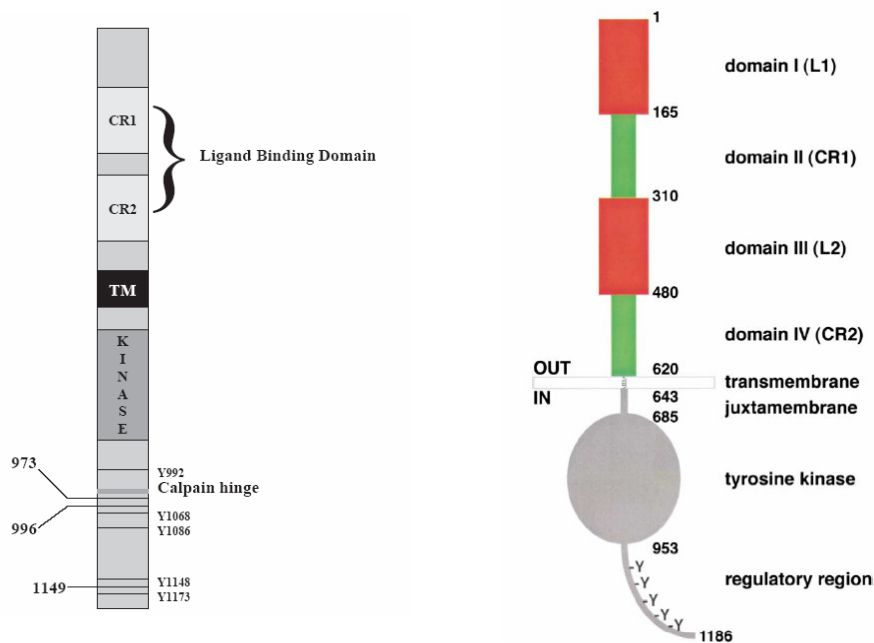


Figura 1.6. Representació gràfica de la forma madura del receptor d'EGF (EGFR). Es mostren els dominis estructurals i els elements de regulació. CR1 CR2 són els dos dominis rics en cisteïna i L1 i L2 són els dominis involucrats en la unió al lligand; TM és el domini transmembrana; la cua inclou el domini tirosina quinasa així com els residus tirosina que conformen la regió regulatòria del receptor (Y). (extret de Singh i Harris, 2005 (esquerra) i Burgess i col., 2003 (dreta)).

S'han identificat una àmplia gamma de lligands que poden unir-se al receptor i activar-lo. Mentre que la majoria són actius només en la seva forma soluble, alguns també ho són com a molècules precursoras transmembrana. L'activació dels RTKs indueix una activitat quinasa dirigida a residus de tirosina localitzats al mateix receptor (fenomen conegut com a transfosforil·lació), o bé a molècules de la cascada d'activació.

1.3.2. Lligands

Fins al moment, i en mamífers, s'han identificat 10 lligands per aquests receptors. Tots ells comparteixen una seqüència conservada de 6 cisteïnes que formen 3 ponts disulfur (figura 1.7), motiu conegut amb el nom de "T-knot" i que és crucial per la unió del lligand al

receptor. Els lligands es classifiquen d'acord al receptor al qual s'uneixen (Olayioye i col., 2000) (figura 1.8).

NRG-1 α	SHLVK C -AEKEK TFC CVNGG EC FMVKDLSNPS-----R YLCKC QPGFT GARC TENVPM
NRG-1 β	SHLVK C -AEKEK TFC CVNGG EC FMVKDLSNPS-----R YLCKC Q PNEFT GDRC QNYVMA
NRG-2 α	GHARK C -NETAKSY CV NGG V CYYIEGIN-----QL SCKC PN GFFG Q RCL EKLPL
NRG-2 β	GHARK C -NETAKSY CV NGG V CYYIEGIN-----QL SCKC Q PVGYT GDRC QQFAMV
EGF	NSDSE C -PLSHDGY CL H DGV CMYIEALD-----KYAC NC V VGY IG ERC QYRDLK
TGF- α	S HF N DC -PDSHT QFC PH-G TC R FLV QED-----K PAC V CH SGY VGAR CEHADLL
AMPHIREGULIN	K KK N PC -NA EFQ N FC I H -G ECK YIEHLE-----A VTCK Q Q E YFGER C G EK
HB-EGF	K KR D PC -L RKY K DFC I H -G ECK Y VK ELR-----A PS C IC H PGYH G ERC H GL SLP
BETACELLULIN	T H F S R C -P KQY K H Y C I H -G R C R F V DEQ-----T P S C I C E KGYF G ARC C ER VDLF
EPIREGULIN	V Q I T K C -S S D M D GY CL H-G Q C I Y L VDMR-----E K F C R C E V G Y T G L R C E H F P L T

Figura 1.7. Seqüència d'aminoàcids del domini EGF dels factors de creixement de la família de l'EGF. Extret de Tzahar i Yarden, 1998

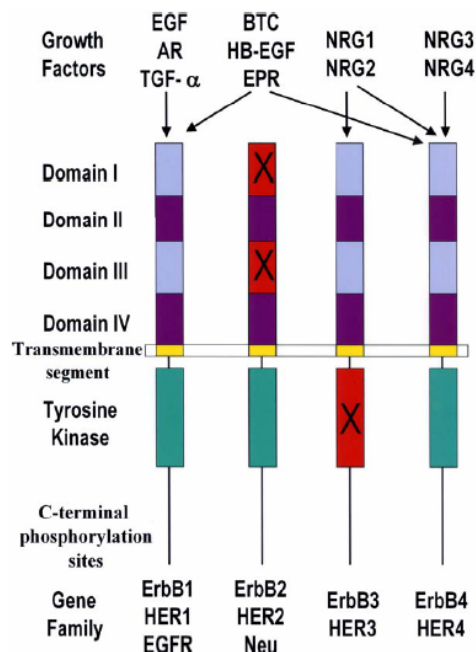


Figura 1.8. Lligands de la família ErbB i receptors als quals s'uneixen. Els dominis "no funcionals" d'ErbB2 i ErbB3 s'indiquen amb una X. (extret de Roskoski, 2004)

Molts d'aquests lligands s'expressen inicialment com a pro-formes ancorades a membrana en forma de proteïna transmembrana. Mitjançant el tall del domini extracel·lular s'obté la forma soluble d'aquest lligand. Els enzims encarregats de realitzar aquest tall són les metaloproteases (ADAM-17 talla el TGF- α , l'AR i HB-EGF) (Merlo-Suarez i col., 2001). El fet que s'hagi identificat més d'un enzim responsable del processament dels lligands, pot ser degut simplement a diferències entre línies cel·lulars. S'ha vist, també, que la inhibició d'aquests enzims inhibeix la migració i el creixement en línies cel·lulars dependents d'EGFR

(Singh i Harris 2005). Un cop alliberats, poden unir-se al receptor corresponent o bé quedar en forma de reservori units a proteoglicans de la superfície cel·lular (Falls 2003).

Una bona forma d'entendre l'activació d'aquests receptors, via la unió a un lligand, i en conseqüència de les vies de transducció del senyal corresponents (figura 1.9), és el que s'explica a continuació i que es basa en el model de les 3 capes (Gullick 2001).

La primera capa és l'extracel·lular i està formada pels lligands, i ve determinada tant per la seva concentració com biodisponibilitat. Aquests dos paràmetres determinaran si els receptors de membrana, els quals formen part de la segona capa, dimeritzaran i s'activaran. Si la informació a la primera capa és suficient per tal d'induir la dimerització dels receptors, i per tant inducció de l'activitat catalítica, la tercera capa, formada pels segons missatgers intracel·lulars, podrà unir-se a determinats llocs del receptor i iniciar, així, la cascada de senyalització.

A continuació, es procedirà a explicar en més detall aquest procés d'activació dels receptors de la família erbB, en concret l'EGFR el qual ha estat objecte d'estudi en aquest treball.

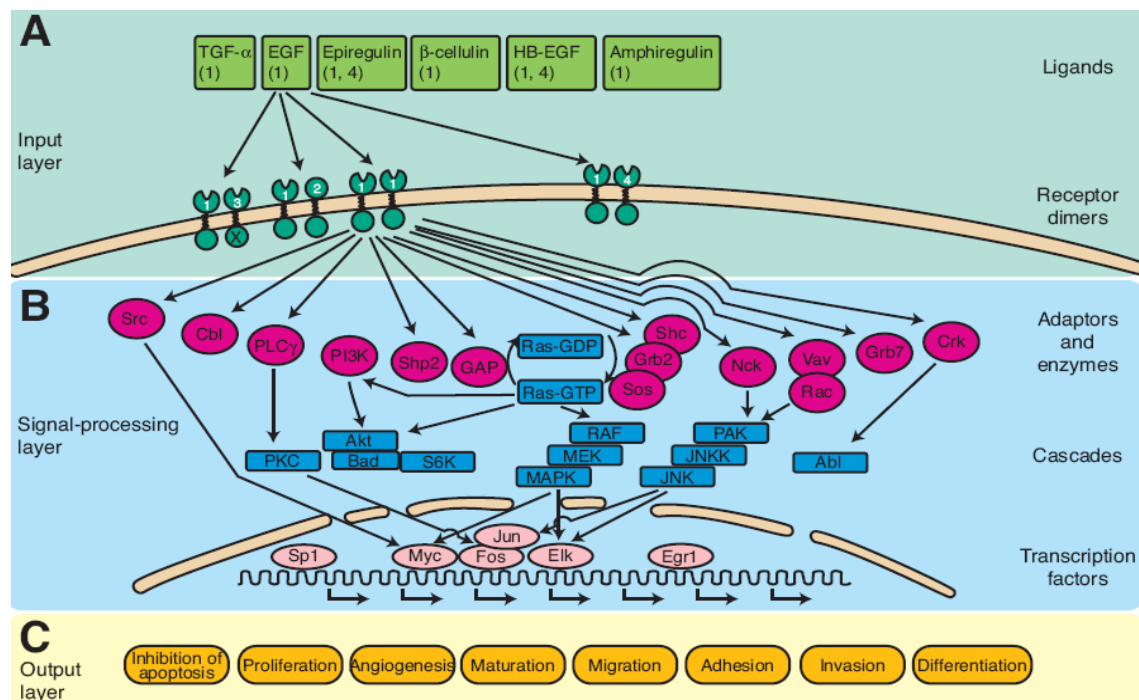


Figura 1.9. Vies d'activació iniciades pels receptors i lligands de la família ErbB. Possibles combinacions d'homò i heterodímers dels ErbBs, principals molècules efectores i respostes cel·lulars finals (extret d'Arteaga, 2002).

1.3.3. L'EGFR

L'EGFR va ser el primer receptor de membrana que es va associar al càncer (Cohet i col., 1960; Carpenter i Cohen, 1978) en descriure's la seva regulació negativa en fibroblasts infectats amb virus oncogènics (Todaro i col., 1978). Les troballes inicials que indicaven que l'EGFR era un receptor tirosin quinasa depenent de lligand (Ushiro i Cohen 1980) i que el producte de l'oncogen v-erbB en el virus de l'eritroblastosi aviar era una forma truncada de l'EGFR (Downward i col., 1984) van revolucionar tant l'estudi dels factors de creixement com del càncer. Ara se sap que molts tipus de carcinomes són alimentats per l'activació de la via EGFR, la qual pot venir donada tant per la mutació del receptor (Humphrey i col., 1990; Junbluth i col., 2003) la sobreexpressió (Arteaga, 2002), o bé per l'estimulació via els "loops autocrins" (Sizeland i Burges 1992) (veure apartat 1.1 i figura 1.1). S'estima que en les cèl·lules normals, l'expressió d'EGFR va dels 40.000 als 100.000 receptors per cèl·lula, mentre que en situació tumoral aquestes xifres poden augmentar diversos ordres de magnitud: per exemple, algunes línies cel·lulars de càncer de mama poden tenir prop de 2×10^6 EGFR per cèl·lula (Kondapaka i col., 1997; Ennis i col., 1991; Herbst i col., 2003)

L'EGFR pertany a la família de receptors tirosin quinasa, com ja s'ha comentat, i es troba en forma de monòmer a la membrana de les cèl·lules, quan està inactiu. Un cop el lligand s'ha unit a la seva part extracel·lular, es produeix la dimerització i transfosforil·lació del domini intracel·lular (figura 1.10).

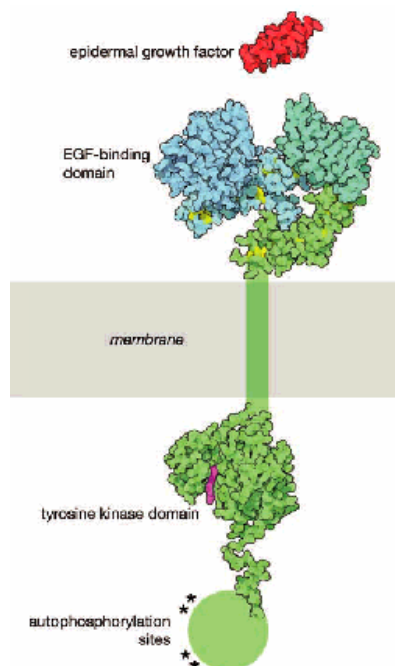


Figura 1.10. Representació estructural de l'EGFR. Quan l'EGF no està unit al receptor aquest es troba en forma inactiva incapaç de dimeritzar. En groc es mostren els residus de cisteïna presents a les zones riques en cisteïna del domini extracel·lular de l'EGFR. L'EGF s'uneix a la cova situada a la part superior del receptor. En lila es mostra el domini tirosin quinasa, i en forma d'estrelles s'indiquen els residus tirosina (extret de Goodsell, 2003)

1.3.3.1. Dimerització

Un dels passos claus en l'activació del receptor és la dimerització. La primera hipòtesi que es va desenvolupar per explicar aquest procés consistia en què l'EGF s'unia simultàniament a dos receptors i permetia, d'aquesta manera, l'estabilització del dímer (Groenen i col., 1994; Gullick 1994; Lemmon i col., 1997; Tzahar i col., 1997). Aquesta hipòtesi es coneix amb el nom de bivalència i parteix de la base d'altres lligands com per exemple l'hormona del creixement humana (hGH) la qual forma un complex 1:2 amb les regions extracel·lulars de dos receptors de hGH (de Vos i col., 1992). Altres estudis van proposar que la unió al receptor per part del lligand es faria en forma dimèrica, és a dir, que dos lligands units s'unirien a dos receptors i d'aquesta manera afavoririen la dimerització d'aquests.

En el cas de l'EGFR, però, està ben establert que dos molècules de lligands (que es troben en forma de monòmers) estan units a dos receptors (Domagala i col., 2000; Lemmon i col., 1997; Odaka i col., 1997).

Recentment s'han dut a terme estudis per cristal·lografia de raigs X que han permès aprofundir més en el coneixement estructural d'aquesta proteïna (Burgess i col., 2003; Ferguson i col., 2003; Ferguson 2004). S'ha determinat que el domini extracel·lular consta de 4 subdominis que contenen dos dominis rics en cisteïna i el domini d'unió al lligand. Les altres parts medien la dimerització del receptor i la interacció amb altres proteïnes de membrana. La cua C-terminal conté cinc motius de fosforil·lació els quals s'uneixen a proteïnes que contenen dominis SH2 o PTB (unió per fosfotirosina), tres motius d'internalització així com d'activació proteolítica i degradació.

L'estructura tridimensional d'un EGFR sol unit a un EGF ha mostrat que la dimerització és mediada exclusivament pel receptor (Garrett i col., 2002; Ogiso i col., 2002) (figura 1.11). El lligand s'uneix als dominis I i III alhora. Aquesta unió altera la disposició espacial dels dominis I i II. En el receptor no activat, el domini II està unit al IV i el braç de dimerització està enterrat, i per tant no pot interaccionar amb l'altre receptor. A més a més, els dominis I i III estan massa lluny l'un de l'altre perquè un mateix lligand s'uneixi a tots dos. La interacció del lligand als dominis I i III requereix d'un gir de 130°C per part dels dominis I i II, que dóna lloc a una conformació estesa, i trenca la unió dels dominis II i IV i per tant permet que el braç de dimerització estigui lliure per interaccionar amb un receptor adjacent.

Els contactes del lligand amb el domini I són principalment estructurals, mentre que la unió al domini III depèn més d'aminoàcids específics. En concret, l'arginina 42 i la leucina 48 del TGF- α , i l'arginina 41 i la leucina 47 de l'EGF estan altament conservades ja que són les responsables d'aquesta interacció amb aminoàcids del domini III de l'EGFR.

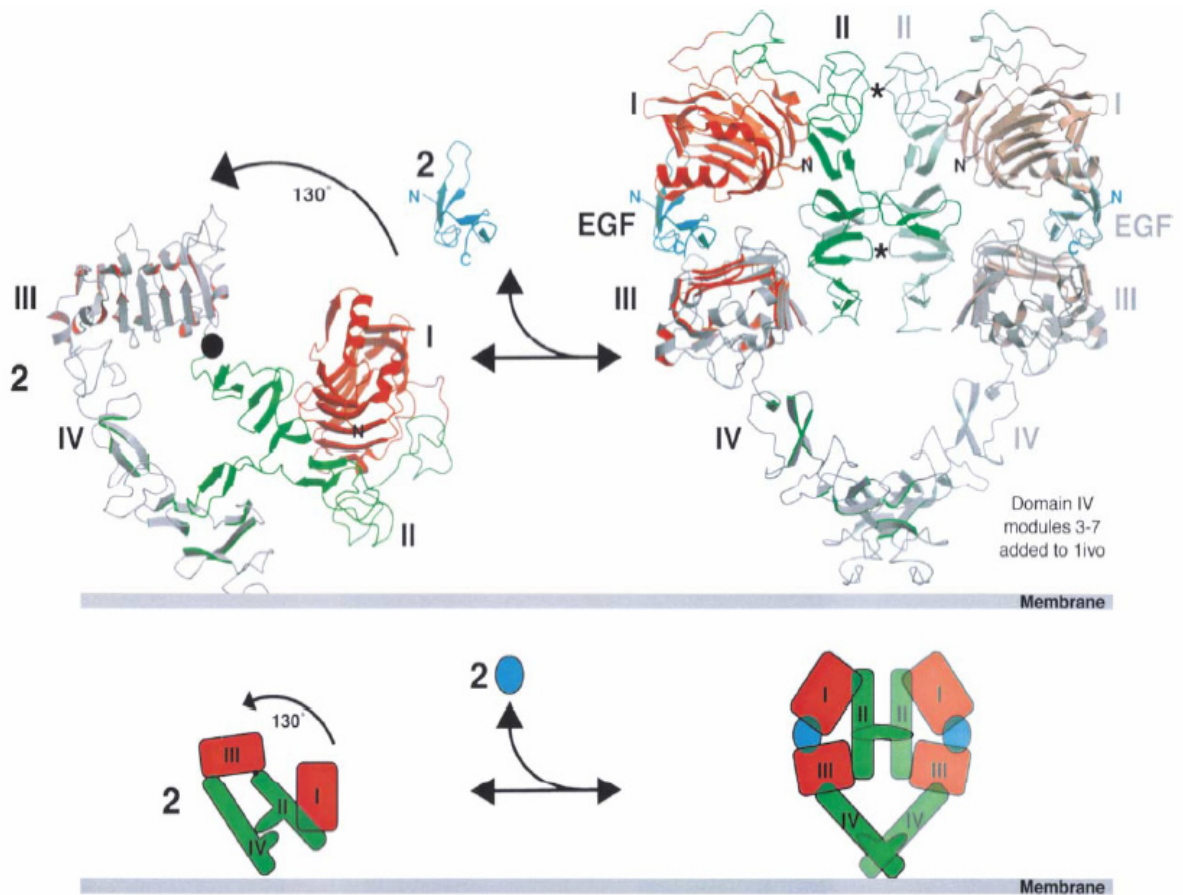


Figura 1.11. Representació esquemàtica dels canvis conformacionals induïts pel lligand que es donen a l'EGFR monòmer i en la dimerització. Al panell superior es mostra el fenomen en esquelets i al panell inferior en forma de dibuix. La part esquerra correspon al monòmer plegat i inactiu, mentre que la part dreta correspon al dímer de receptors desplegat. I, II, III i IV són els dominis de la part extracel·lular de l'EGFR; en concret els dominis I i III es mostren en vermell-gris, i els dominis II i IV en verd-gris. Les estrelletes indiquen els contactes establerts entre els dos dominis II dels EGFR que formen el dímer. El lligand, EGF, es mostra de color blau (extret de Burgess i col., 2003).

Ara bé, l'estructura que s'ha observat per cristal·lografia, tot i proporcionar informació molt solvent de com s'estabilitza el dímer de receptors, no permet explicar com la unió del lligand dirigeix aquesta dimerització. Podria ser que la unió del lligand als dominis I i III alhora provocaria una reorientació d'aquests dos dominis que afavoriria el canvi

conformacional del receptor. L'exposició del braç de dimerització, tot i ser clarament necessària per tal que es doni la dimerització, no és suficient. Això s'ha pogut veure perquè mutants de l'EGFR als quals els falta part del domini IV no són capaços d'estabilitzar els dos receptors.

S'estima que el 95% dels receptors es troben en forma inactiva i un 5% en forma activa. El tant per cent de molècules en forma activa augmenta en afegir lligand el qual s'uneix, preferencialment, a la forma activa. L'EGFR es troba en formes d'elevada i baixa afinitat en una relació de 95:5. S'ha suggerit que la forma de baixa afinitat consisteix en l'EGF unit als dominis I o III, i la d'elevada afinitat a l'EGF unit a ambdós dominis I i II de la forma activa (Carpenter 1987; Burgess i col., 2003).

La dimerització es pot donar entre dos receptors iguals, homodimerització, o bé diferents, heterodimerització (Graus-Porta i col., 1997). Aquest últim cas, permet diversificar i expandir molt el tipus de senyal generat per un receptor. L'erbB-2 és la parella preferida pels altres receptors de la família a l'hora de formar dímers ja que augmenta la taxa de reciclatge, estabilitat i potència de senyal comparat amb els homodímers, per exemple, d'EGFR.

Com ja s'ha comentat, aquest receptor, l'erbB-2, té una sèrie de característiques que el fan diferent dels altres receptors de la família. Una d'elles, ja esmentada, és el fet que no té lligand conegut. En termes estructurals, l'erbB-2 té una configuració que s'assembla a la de l'EGFR quan està obert (després de la interacció amb el lligand), per tant semblaria ser que sempre està en forma autoactivada. A més a més, no hi ha unió entre els dominis II i IV, i és més, tres dels set residus importants per estabilitzar l'EGFR i l'erbB-3 inactius, són diferents en l'erbB-2. Els dominis I i III es disposen de tal manera que sembla que vulguin emular el paper jugat pel lligand (Burgess i col., 2003). Totes aquestes observacions semblen donar una explicació a per què a aquest receptor no se li ha pogut identificar, fins ara, cap lligand.

L'erbB-2 és la parella preferida pels altres receptors a l'hora de formar un dímer (Graus-Porta i col., 1997; Tzahar i col., 1997). El fet que de forma constitutiva adopti una configuració oberta, amb el braç de dimerització exposat, fa pensar que sempre està disposat a homo o heterodimeritzar amb altres receptors que han estat activats via la unió del lligand. Això podria explicar el paper clau de l'erbB-2 en la transformació maligna (Burgess i col., 2003). A més a més, el fet d'heterodimeritzar amb l'erbB-2 manté els

receptors més temps a membrana, per tant el senyal perdura més, ja que aquest receptor redueix la taxa de degradació dels dímers activats (Worthylake i col., 1999).

1.3.3.2. Fosforil·lació

La part C-terminal de l'EGFR té una funció reguladora important on s'hi distingeixen tres dominis força conservats (Bazley i Gullick, 2005).

El primer domini (domini juxtamembrana, JM) és necessari per tal que la proteïna quinasa C (PKC) s'hi uneixi i, d'aquesta manera, atenuï el senyal activat pel lligand.

El segon domini (no catalític) conté els sis llocs d'autofosforil·lació en tirosines: 1068, 1148, 1173, 1086, 992 i 1045. Aquests residus són necessaris per agrupar proteïnes adaptadores o efectores com la Grb2 o la fosfolipasa C γ (PLC), respectivament, les quals s'uneixen a l'EGFR mitjançant dominis del tipus SH2 ("src homology 2") o PTB (phosphotyrosine binding). S'ha observat que depenent del lligand que s'uneix al receptor, les tirosines que es fosforil·len són diferents (Guo i col., 2003). Fins al moment només s'han identificat aquestes 6 tirosines, i quan s'han substituït per fenilalanina no s'ha detectat fosforil·lació en l'EGFR (Bishayee i col., 1999). Hi ha altres tirosines a la part intracel·lular del receptor (Tyr845, 891 920, 954, 974 i 1101) que poden ser fosforil·lades per altres quinases com les Src (Bishayee 2000) (figura 1.12):.

El tercer domini (tirosin quinasa, SH1) és el responsable de mediar la transfosforil·lació dels 6 residus de tirosina.

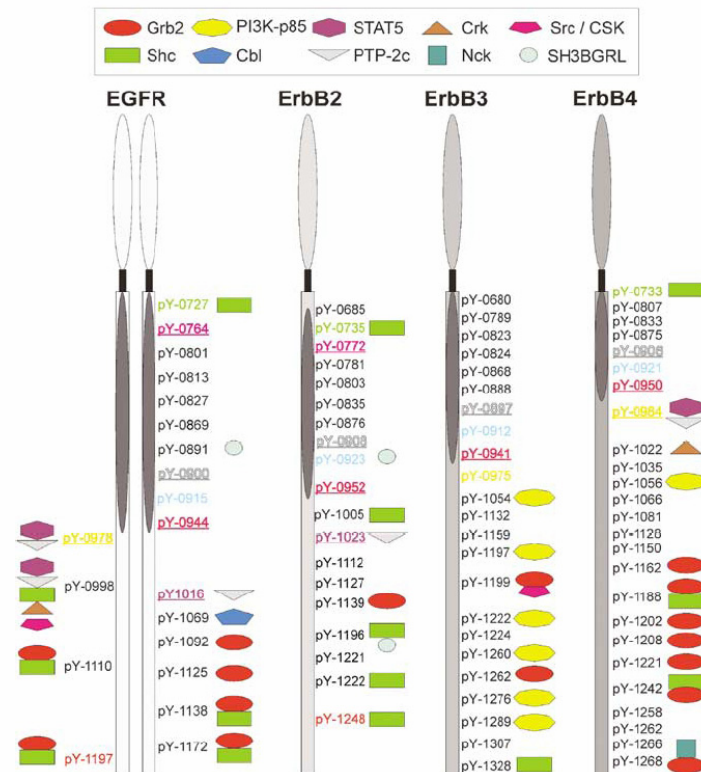


Figura 1.12. Receptors de la família ErbB i els residus de tirosina que són fosforilats. Les diverses formes i colors representen les vies de transducció iniciades en ésser fosforilada cada una d'aquestes tirosines.

Hi ha estudis que semblen indicar que, tot i que a la majoria de RTKs els cal la fosforilació per activar el domini catalític (Hubbard i Till 2000; Dibb i col., 2004), l'EGFR seria una excepció ja que per tal d'activar el domini catalític i la transfosforilació solament li caldria la dimerització (Mohammadi i col., 1993; Sherrill 1997).

Hi ha d'altres estudis que proposen l'EGFR com un receptor atípic basant-se en l'estructura que adopta la part intracel·lular. Mentre que la part extracel·lular de l'EGFR presenta una sèrie d'interaccions entre dominis les quals determinen un estat d'autoinhibició, la part intracel·lular corresponent al domini tirosin quinasa es caracteritza per l'absència d'interaccions autoinhibitòries (Stamos i col., 2002). El domini quinasa de molts receptors RTKs es troba inactivat fins el moment en què el lligand entra en contacte amb la part extracel·lular. Aquesta estructura que adopten inhibeix la unió de substrats susceptibles a ser fosforilats (Huse i Kuriyan 2002). Ara bé, el domini tirosin quinasa de l'EGFR és un cas atípic pel fet que no requereix que s'activi el domini de fosforilació per tal que sigui actiu (Gotoh i col., 1992). És a dir, adopta permanentment una conformació estructural que li permet ser actiu. En aquest punt, sorgeix la pregunta de quin paper juga el lligand en l'activació d'aquest domini. S'ha suggerit que la funció del lligand podria ser

l'estabilització del dímer de receptors i la selecció del tipus de substrat que serà fosforilat per les quinases del receptor (Burgess i col., 2003).

Sigui com sigui, el que està força clar és que cada residu de tirosina està dissenyat per interaccionar amb una única gamma de proteïnes, també anomenades segons missatgers, i per tant de donar una resposta o altra a la senyal rebuda (Carraway i Cantley 1994; Alroy i Yarden 1997; Olayioye i col., 2000). Alguns d'aquests segons missatgers són: PLC γ , MAPK, PI3K/Akt, JAK-STAT, etc. (figura 1.9).

1.3.3.3. Internalització

Després de la unió del lligand, els homo o heterodímers seran internalitzats en major o menor grau, en unes vesícules recobertes de clatrina mitjançant un procés anomenat encocitosis mediada per lligand (Carpenter 2000; Ceres i Schmid 2000; Prenzel i col., 2001; Sorkin, 2001) (figura 1.12). Aquest procés permet l'atenuació del senyal generat a la membrana. Depenent del tipus cel·lular, s'estima que entre 5 i 90 minuts després de la unió del lligand, la fosforil·lació va disminuint gradualment fins a esdevenir indetectable mitjançant les tècniques més comunament utilitzades (Hearp i col., 1995).

Per tal que sigui internalitzat, el receptor, un cop activat, recluta una proteïna anomenada c-Cbl (procés anomenat ubiquitinació) necessària per la formació d'una vesícula d'internalització (Hynes i col., 2001). Els receptors internalitzats continuen essent enzimàticament actius, hiperfosforil·lats i associats a proteïnes de transducció del senyal (Wiley i col., 2001) Tot i així, el senyal transmès des dels endosomes d'internalització és qualitativament diferent al generat a la membrana plasmàtica. En concret, s'ha vist que l'EGFR no és capaç d'activar la via PLC γ quan està essent internalitzat (Singh i Harris 2005) (figura 1.13).

S'ha comprovat que l'EGFR, un cop activat, i a diferència d'altres receptors de la mateixa família, és ràpidament internalitzat i degradat (Baulida i col., 1996). La ruta que seguiran els receptors un cop internalitzats dependrà de la naturalesa de cada un: bé poden ser reciclats o bé poden ser degradats. El pH de la vesícula d'internalització és lleugerament àcid, per tant els complexos que siguin estables en aquestes condicions, com és el cas d'EGF unit a EGFR, seran degradats i s'observarà una davallada a membrana. D'altra banda, lligands com el TGF- α o les NRG, com que no són tan estables a pH àcids, es desfan molt aviat del receptor i això afavoreix el reciclatge d'aquest a membrana (Olayioye i

col., 1998). En aquest cas, el senyal mitogènic és més potent (Waterman i col., 1998). HER-2 també afavoreix el reciclatge o fins i tot la no internalització de receptors (siguin homo o heterodímers) enfront de la degradació, segurament pel fet que la seqüència C-terminal del receptor permet una unió feble amb la c-Cbl.

Estudis recents semblen indicar que l'EGFR arriba fins a nucli i allí podria actuar com a factor de transcripció de gens relacionats amb la resposta cel·lular desencadenada pel propi receptor unit al lligand, o bé el seu propi gen (Johnson i col., 2004; Lin i col., 2001; Waugh i Hsuan 2001). D'altres autors (Lo i col., 2005) han presentat resultats que semblen indicar que l'EGFR no actuaria en sí mateix com a factor de transcripció sinó que s'associaria a complexos proteics del nucli i regularia, de forma indirecta, la transcripció gènica. Aquest fenomen obre noves perspectives en la comprensió del mecanisme d'actuació de la família de receptors ErbB.

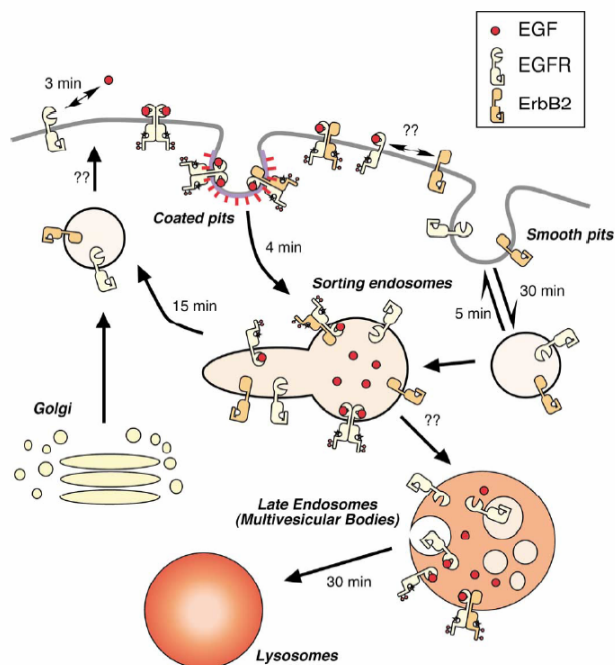


Fig 1.12. Internalització dels receptors ErbB. Després de la unió del lligand amb el receptor aquests són internalitzats mitjançant el recobriments de les vesícules d'internalització amb clatrina. Un cop dins, les vesícules perden el recobriments de clatrina i esdevenen endosomes primaris. Aquest compartiment madura i es transforma en un cos multivesicular on, juntament amb els endosomes primaris, surten els receptors pel seu reciclatge a membrana o bé per la seva degradació. Així mateix, es mostra l'escala temporal de tots aquests esdeveniments. (extret de Wiley, 2003)

1.3.4. La família de receptors ErbB i el càncer

El paper jugat pels receptors ErbB i els seus lligands en la patogènesi dels carcinomes humans ha estat confirmada per molts estudis els quals han posat de manifest que en la patologia ve associada a diverses situacions com pot ser, per exemple, la sobreexpressió d'aquestes proteïnes (Normanno i col., 2006).

De mitjana, entre el 50 i 70% dels carcinomes de pulmó, còlon i mama expressen EGFR o ErbB-3. L'expressió d'ErbB-2 sembla més restringida i només un 30% dels tumors de mama l'expressen. Pel que fa l'ErbB-4, sembla expressar-se en un 50% dels càncers de mama i en un 22% dels de còlon. Tot i que l'expressió d'aquestes proteïnes s'ha vingut associant a un pitjor pronòstic de la malaltia, l'eficàcia de predicció en base a aquests receptors encara no s'ha demostrat formalment, i la veritat és que hi ha estudis que es contradiuen mútuament (Gullick 1990; Ravdin i Chamness 1995).

S'ha demostrat amplifacació gènica de l'EGFR en diferents tipus de tumors, i sol estar associada a la sobreexpressió proteica, tot i que la sobreexpressió d'EGFR en absència d'amplifacació gènica també ha estat descrita (Salomon i col., 1995; Normanno i col., 2003). També cal destacar les mutacions en l'EGFR. Per exemple, el 33% dels casos de glioblastoma multiforme (GBM) que presenten amplifacació del gen de l'EGFR, també presenten diferents tipus de mutacions, d'entre les quals la més comuna és la EGFRVIII (més del 50% dels casos). Aquesta mutació consisteix en la delecció dels exons del 2 al 7 de la regió extracel·lular i com a conseqüència genera un receptor al qual li manquen els residus del 6 al 276 de l'ectodomini i està permanentment activat (Kuan i col., 2001). Aquesta mutació, tot i que és molt important en els GBM, també s'ha descrit en carcinomes de mama, pulmó i ovari (Pedersen i col., 2001).

Un altre tipus d'alteracions recentment detectades són les petites deleccions o mutacions puntuals al domini tirosin quinasa de l'EGFR (dels exons 18 al 21), en pacients amb NSCLC (Lynch i col., 2004; Paez i col., 2004; Pao i col., 2004). Sembla que la freqüència les mutacions ronda el 17% del total de pacients afectats per aquesta malaltia, i són més freqüents en persones asiàtiques (33.4%) en comparació amb no asiàtiques (5.5%), i també més predominants en dones que en homes (38.7% vs 10%). El descobriment d'aquesta subpoblació de casos de NSCLC ha suposat una certa revolució en el tractament d'aquesta patologia, sobretot en l'ús d'inhibidors tirosin quinasa.

L'expressió d'EGFR ha estat associada a la resistència tant a quimioteràpia com a teràpies hormonals. S'ha determinat que les vies de transducció del senyal via factors de creixement interaccionen de forma molt important amb el senyal generat pels estrògens, en línies cel·lulars de càncer de mama (Kurokawa i Arteaga 2001). En línies cel·lulars de càncer de mama resistents al tamoxifen s'ha observat una regulació positiva de la via EGFR (Wakeling i col., 2001). Per tal que una cèl·lula pugui esdevenir resistent a la via hormonal, una de les alternatives que ha de contemplar és la dependència de la via EGFR. Així doncs, el tractament amb agents antihormonals, com és el tamoxifen, afavoriria l'aparició de vies d'escapament com pot ser la sobreexpressió o major dependència de la via EGFR.

En altres casos la malignitat també pot venir associada a l'existència dels anomenats "loops autocrins" (apartat 1.1 i figura 1.1). Es tracta de l'autofabricació per part de la cèl·lula tumoral de factors de creixement que ella mateixa utilitza. Això la fa més independent i, en molts casos, lliure de la necessitat de sobreexpressar receptors a membrana i, per tant, afavoreix el creixement incontrolat del tumor (Salomon i col., 1995).

1.3.5. Teràpies per combatre el càncer dirigides contra la via ErbB

Ja s'ha comentat que l'EGFR va ser el primer receptor associat al càncer. Les neoplàsies que normalment estan vinculades a la disregulació d'aquest receptor inclouen les de pulmó, còlon i mama, entre d'altres. Aquests tipus de càncers es troben entre els més prevalents en tot el món. És per això que si els inhibidors d'aquesta via fossin eficaços tan sols un 10%, el nombre de casos potencialment curables seria d'aproximadament 50.000 per any, només als Estats Units. Molts laboratoris estan desenvolupant inhibidors de la via ErbB, i experimentant amb diferents combinatòries que ataquin, alhora, diferents vies de transducció del senyal i que per tant puguin fer més exitós el tractament. L'objectiu final és convertir aquesta malaltia que avui en dia és letal en molts casos, en crònica o indolora, mitjançant l'administració d'aquestes teràpies.

S'han desenvolupat diverses estratègies encaminades al bloqueig de la via de transducció del senyal iniciada pels receptors ErbB i, en conseqüència, per regular o inhibir els seus efectes. Les més conegudes són els anticossos monoclonals dirigits contra la part

extracel·lular del receptor, i els compostos petits que interfereixen amb l'activitat tirosin quinasa intracel·lular del mateix receptor. També s'inclouen en aquesta categoria els bloquejadors o antagonistes, les toxines conjugades a d'altres proteïnes i els RNA d'interferència. El fet que el mode d'actuació d'aquestes molècules difereixi molt del de les teràpies convencionals, quimioteràpia i radioteràpia, fa que sigui interessant combinar-los per tal d'obtenir efectes additius o, en el millor dels casos, sinèrgics.

Els anticossos mostren més afinitat pel receptor en comparació amb els compostos petits (Mendelsohn 2001) i per tant se'n necessita menys quantitat per tal d'inhibir la cèl·lula tumoral. Ara bé, han de ser administrats via intravenosa, mentre que els compostos petits poden ser administrats oralment. A més, presenten una sèrie d'inconvenients i és que poden generar una resposta immunològica que pot comportar una ineficàcia del tractament, i es mostren inefectius contra formes truncades de l'EGFR (EGFR VIII present al glioblastoma). El modus d'actuació dels anticossos sembla que podria ser de dues maneres. Una primera hipòtesi és que competissin físicament pel lloc d'unió al receptor amb el lligand (s'unirien, per tant, pel mateix lloc). Una segona hipòtesi és que s'unissin al domini III del receptor i no permetessin a aquest domini interaccionar amb el lligand i el domini I i, per tant, afavorir la dimerització (Ferguson 2004)

A continuació s'enumeren alguns exemples de cada grup de teràpies:

- **Anticossos (mAb):**

Trastuzumab (Herceptin). Anticòs monoclonal de ratolí que ha estat humanitzat. Va aprovar-se pel tractament d'aquells càncers de mama que sobreexpressen erbB-2 el 1998. S'utilitza sol o en combinació amb altres drogues en càncers metastàtics. S'administra setmanalment via intravenosa. Un dels efectes secundaris més importants que presenta és la cardiopatia (un 5% de les pacients tractades n'han sofert); el cor conté receptors HER-2 i HER-4 tot i que no es coneix amb massa detall el mecanisme que desencadena la patologia cardíaca. L'epítop d'aquest anticòs és l'extrem carboxiterminal del domini IV del receptor tipus 2 (Cho i col., 2003; Roskoski 2004). El domini IV no participa en la dimerització del receptor per tant l'efectivitat d'aquest no s'explica per un bloqueig d'aquest procés. Ara bé, sembla que el domini IV conté un lloc de tall per les metaloproteases. Un cop el domini extracel·lular és tallat, els dominis transmembrana i intracel·lular dels receptors dimeritzen i activen la tirosin quinasa (Molina i col., 2001). Per tant, la

reducció del senyal generat per l'erbb-2 i la citotoxicitat cel·lular depenent de l'anticòs, semblen explicar, en part, l'acció terapèutica de l'Herceptin.

IMC-225 (Cetuximab o Erbitux). Anticòs monoclonal de ratolí que ha estat humanitzat, contra l'ectodomini de l'EGFR. Aquest anticòs s'uneix al receptor amb una afinitat molt elevada, semblant a la de l'EGF i TGF- α , i competeix amb el lligand per la unió al receptor. En concret s'ha determinat que s'uneix al domini III de l'EGFR (Li i col., 2005). Actualment està en fase clínica per NSCLC i càncers de cap i coll (Dancey i col., 2003). Ha estat aprovat per la FDA, en combinació amb l'irinotecan (un inhibidor de la DNA topoisomerasa), pel tractament del càncer colorectal metastàtic.

Omnitarg (Pertuzumab). Anticòs monoclonal de ratolí que ha estat humanitzat, contra el domini II de l'ErbB2 que està permanentment en forma activa. Evita l'homo i heterodimerització induïda per l'ErbB2. S'està utilitzant en pacients amb càncers de mama que sobreexpressen ErbB2 i que no responen al tractament amb Herceptin. I és que, a diferència de l'Herceptin, el Pertuzumab bloqueja l'heterodimerització de l'ErbB2 amb l'ErbB3 que s'ha vist que és una de les combinacions mitogèniques més potents (Agus i col., 2002).

- **Petits compostos inhibidors de l'activitat tirosin quinasa (TKIs).** Aquestes molècules s'anomenen anilinoquinazolines i són inhibidors competitiu reversibles de l'ATP (Fry i col., 2003). A continuació s'esmenten els més innovadors, tot i que s'explicaran amb més detall a la introducció del capítol II dels resultats i discussió.

ZD1839 (Iressa o Gefitinib): específic per EGFR

OSI-774 (Erlotinib o Tarceva): específic per EGFR

STI-571 (Imatinib o Gleevec): específic per la quinasa c-ABL

GSK572016 (Lapatinib): dual per EGFR i HER-2

- **Antagonistes.** Concretament en aquest treball s'ha focalitzat l'esforç en obtenir un antagonista de l'EGF així com provar l'activitat i potencial antitumoral d'un ja conegut, el PCI. Fins al moment, l'antagonista més ben descrit de l'EGFR és l'Argos. Aquesta proteïna s'ha vist que és un antagonista natural de l'EGFR de mosca (DER). El

mecanisme d'acció d'Argos es basa en la unió a DER i inhibició de la dimerització (Jin i col., 2000).

2. OBJECTIUS

L'objectiu global d'aquest treball ha estat l'estudi del mecanisme d'acció de diferents bloquejadors de la via ErbB, així com les possibles aplicacions en la teràpia antitumoral. Aquest objectiu s'ha desglossat en dues parts:

1. Disseny de bloquejadors de la via ErbB a partir de l'estructura de l'EGF:
 - Clonatge de l'EGF en un sistema d'expressió bacterià
 - Posada a punt d'un sistema d'expressió i purificació d'EGF recombinant
 - Disseny, obtenció i purificació de variants de l'EGF
 - Estudi del mecanisme molecular d'acció de les variants de l'EGF (inducció de la fosforil·lació, dimerització, internalització i proliferació cel·lular)

2. Estudi de l'efecte combinatori del tractament amb dos bloquejadors de la via ErbB: Iressa i PCI.
 - Caracterització de les línies cel·lulars de càncer de mama
 - Efecte del tractament amb Iressa i/o PCI en la proliferació cel·lular
 - Estudi del mecanisme de resistència de les cèl·lules al tractament amb Iressa i/o PCI

3. MATERIAL I

MÈTODES

3.1. EQUIPAMENT I PRODUCTES QUÍMICS

3.1.1. Equipament

Durant la realització d'aquest treball s'han emprat de manera rutinària els aparells i utilitatge que es detallen a la taula 2.1.:

Aparell	Model	Marca i País
Agitadors magnètics	Agimàtic-NM	Selecta, Espanya
	A-163	SBS Instrument, Espanya
	SM1	Stuart Scientific, Regne Unit
Agitador de plaques	Rotamax 120	Heidolph, Alemanya
Agitador rotatori de tubs	Movil-Rod	Selecta P, Espanya
Agitador vòrtex	Genie-2	Rubilabor, Espanya
Aparell d'ultrafiltració d'aigua	Milli-RO	Millipore, EUA
	Milli-Q	Millipore, EUA
Autoclaus	AE-75	Raypa, Espanya
	140 L2	Matachana, Espanya
Balances	FY-300	Salter, Japó
	ER-120 ^a	Salter, Japó
	R200D	Sartorius, Alemanya
	PT1200	Sartorius, Alemanya
Banys termostàtics	S-543	Selecta, Espanya
	Precistem	Selecta, Espanya
	92617	Bioblock, França
	TE-8A	Techne, Espanya
Bloc termostàtic	Telectron-100	Selecta, Espanya
Bomba de buit	-	Dinko Instruments, Espanya
Campanes de flux laminar vertical	BIO 48M	Cultek, Espanya
	CAM 1400-I	Telstar, Espanya
Centrífuga d'ependorfs refrigerada	Dicigen-R	Alresa, Espanya
Centrífuga de tubs refrigerada	Digicen-R	Alresa, Espanya

Centrífuga Sorvall	RC5C i rotors SS34, GSA i GS3	Sorvall, EUA
Congelador -20°C / nevera 4°C	Greenfresh ART866G	Balay, Espanya / Whirpool, Alemanya
Congelador -80°C	Ultralow freezer	Nuaire, Japó
Cubetes d'electroforesi per a gels d'agarosa	Mini-Subcell	BioRad, Espanya
Equip de nitrogen líquid		Abelló Oxigen Linde, Espanya
Espectrofotòmetres	Cary 1E	Varian, Austràlia
	CE6602	Cecil, Anglaterra
Estufes de cultius	I-280	Raypa, Espanya
Estufa d'assecat	206	Selecta, Espanya
Fonts d'alimentació per electroforesi	PowerPac300	BioRad, EUA
	EPS200	Pharmacia Biotech, Suècia
	2297 Macrodrive 5	LKB, Suècia
GradiFrac		Pharmacia Biotech
FPLC	P-900 i UV-900	Pharmacia Biotech
Hemocitòmetre	Neubauer improve	Afora, Espanya
Impressora per lector de plaques	Stylus Color 200	Hewlett Packard, Espanya
Incubadora amb camisa d'aigua	Hotcold UM	Selecta, Espanya
Incubadora de cultius de CO ₂	FunctionLine	Heraeus, Espanya
Lector de microplaques de 96 pouets	ELX800	Biotek, EUA
Liofilitzador	Cryodos	Telstar, Espanya
Microones	M704	Philips, Alemanya
Micropipetes i multicanals	-	Finnpipette, Finlàndia
		Eppendorf Iberica, Espanya
Microscopi invertit contrast de fases	-	Zeiss, Alemanya
pHmetre	micropH2000	Crisón, Espanya
Sistema d'anàlisi d'imatge	Gelprinter Plus	TDI, Espanya
Termocicladors	Personal Cyclor	Biometra, Alemanya
	PTC-150	PCR MJ Research, EUA
Transil·luminadors de llum UV	TM-36	Ultraviolet Products, EUA
	TC-365-A	Ultraviolet Products, EUA

Ultrasonicador	Labsonic-2000	B.Braun, Alemanya
----------------	---------------	-------------------

Taula 2.1. Material bàsic

3.1.2. Productes químics

Els reactius que s'han utilitzat de manera general durant aquest treball han estat de grau analític, procedents de les cases comercials Fluka (Suïssa), Merck (Alemanya), Serva (Alemanya) i Sigma Chemicals Co. (Espanya). Pel que fa els productes d'ús més específic, la seva procedència s'indica a mesura que apareixen en el text.

3.2. TÈCNIQUES DE CULTIU CEL·LULAR

En la majoria d'experiments realitzats en el present treball s'han utilitzat cèl·lules tumorals humanes en cultiu. El material necessari i el manteniment general d'aquests cultius es detalla a continuació.

3.2.1. Material, medis i solucions

QUADRE 3.1. Material, medis i solucions utilitzats

Material de plàstic

Criotubs de 1.2 mL (Nunc, Dinamarca)
 Filtres 0.22 µm de baixa adsorció de proteïnes (Nalgene, Anglaterra)
 Flascons Roux de cultiu de plàstic estèrils de 25 i 75 cm² (T/25 i T/75 respectivament) (Nunc, Dinamarca)
 Plaques de cultiu de plàstic estèrils de 100 cm² (T100) (Nunc, Dinamarca)
 Plaques de 96 pouets de fons pla (Nunc, Dinamarca)
 Pipetes de 2, 5 i 10 mL estèrils (Nunc, Dinamarca)
 Tubs de centrífuga estèrils de 15 i 50 mL (Nunc, Dinamarca)

Medis i solucions

Blau de Tripà (Merck, Alemanya)
 DMEM Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) líquid, 4500 mg/l glucosa, glutamax, piruvat sòdic (Gibco BRL Life Technologies, EUA)
 DMSO (Dimetil sulfòxid) (Merck, Alemanya)
 EGF en pols (factor de creixement epidèrmic) (R&D, Anglaterra)
 Iressa (Astra Zeneca, EUA)
 Herceptin (Roche Diagnostics, Alemanya)
 FBS (sèrum fetal boví) (Gibco BRL Life Technologies, EUA)
 Trypsin-EDTA (Gibco BRL Life Technologies, EUA)
 Antibiotic / Antimycotic Solution (penicil·lina 10000 U/mL, estreptomina 10000 µg/mL, amfotericina B 25 µg/mL). Per suplementar els medis, es dilueix 10 vegades ja que ve concentrat (Gibco BRL Life Technologies, EUA)

Preparació de medis i solucions

EGF: es dissolen 100 µg d'EGF en àcid acètic 10 mM amb 0.2% BSA fins a una concentració 100 µg/mL en condicions estèrils. D'aquesta barreja es fan alíquotes que es guarden a -80°C i que es descongelen just abans de fer-les servir. Les dilucions posteriors cal que es facin en presència de BSA per evitar l'adsorció de les molècules d'EGF a les parets de plàstic del tub o eppendorf. Aquestes dilucions es fan amb el propi medi de cultiu.

PCI: dissolt en PBS. Es filtra i es manté a 4°C si s'ha d'utilitzar al cap de pocs dies i si no, en cas contrari, se'n fan alíquotes i es mantenen a -20°C.

Iressa: dissolució 10 mM en etanol. Es manté alíquotat a -20°C.

Herceptin: dissolució 20833 µg/mL en PBS. Es manté durant, com a màxim 1 mes, a 4°C.

Medi incomplet: DMEM Glutamax suplementat amb antibiòtic.

Medi 0.5% FBS: Medi incomplet amb 0.5% de sèrum fetal boví (FBS)

Medi complet: Medi incomplet amb 10% de sèrum fetal boví (FBS)

Medi de congelació: Medi incomplet amb 10% de sèrum fetal boví i 10% DMSO

PBS o tampó fosfat salí: NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 7.5 mM, NaH₂PO₄ 2.5 mM, pH 7.2

3.2.2. Línies cel·lulars

Per a l'elaboració d'aquest estudi s'ha treballat amb les següents línies cel·lulars:

Capan-1: ATCC n° HTB-79. Línia d'adenocarcinoma pancreàtic humà. Establerta per Fogh i col. (1977a i b) a partir d'una metàstasi de fetge d'un adenocarcinoma pancreàtic d'un home de 40 anys blanc i de tipus sanguini A⁺. La morfologia cel·lular és epitelial i la citopatologia "in vitro" va determinar un adenocarcinoma de cèl·lules molt diferenciades.

A431: ATCC n° CRL-1555. Línia cel·lular humana de carcinoma epidermoide. Establerta per Giard. i col. (1973) a partir d'un carcinoma epidèrmic de vulva en una pacient de 85 anys. Cal destacar que presenta sobreexpressió d'EGFR.

MDA-MB-231: ATCC n° HTB-26. Línia cel·lular humana de càncer de mama. Establerta per R. Cailleau i col. (1977) a partir d'un adenocarcinoma de mama d'una pacient de 51 anys. No presenta receptor d'estrògens però és sensible a determinades hormones, i té nivells moderats de receptor d'EGFR.

MDA-MB-468: ATCC n° HTB-132. Línia cel·lular humana de càncer de mama. Establerta per R. Cailleau i col. (1977) a partir d'una efusió pleural d'un adenocarcinoma mamari metastàtic d'una pacient negra de 51 anys. Presenta nivells molt elevats d'EGFR.

MCF-7: ATCC n° HTB-22. Línia cel·lular humana de càncer de mama. Establerta per Soule i col. (1973) a partir d'una efusió pleural d'un adenocarcinoma d'una pacient de 69 anys. Aquesta línia manté moltes característiques de l'epiteli mamari diferenciat, incloent la capacitat de processar l'estradiol a partir dels receptors d'estrògens citoplasmàtics i la capacitat de formar agrupacions tridimensionals. Presenta nivells molt baixos d'EGFR.

SKBr-3: ATCC n° HTB-30. Línia cel·lular humana de càncer de mama. Establerta per G. Trempe i L. J. Old (1970) a partir d'una efusió pleural d'un adenocarcinoma de mama metastàtic d'una pacient de 43 anys. Presenta sobreexpressió de HER2 i nivells baixos d'EGFR, i és hormonoindependent.

BT-474: ATCC n° HTB-20. Línia cel·lular humana de càncer de mama. Establerta per Lasfargues i col. (1978) a partir d'un carcinoma mamari ductal, invasiu i sòlid, d'una pacient de 60 anys. Presenta sobreexpressió de HER2 i és hormonodependent.

3.2.3. Manteniment dels cultius cel·lulars

Les cèl·lules de les línies utilitzades s'han cultivat rutinàriament en medi complet en flascons de cultiu estèrils. Els flascons s'han mantingut en un incubadora a 37°C, 5% CO₂ i humitat relativa del 80%. S'han deixat créixer les cèl·lules fins un 75% de confluència, canviant el medi segons les necessitats del cultiu (cada 3 o 4 dies). Una vegada s'ha arribat a la confluència desitjada, les cèl·lules s'han tripsinitzat per tal de realitzar nous subcultius i per congelar-ne una part, si es vol. Així es disposa d'una reserva de cada línia cel·lular en N₂ líquid.

En la congelació de les línies cel·lulars s'ha utilitzat un medi que conte dimetilsulfòxid (DMSO) el qual fa que el citoplasma es comporti com un gel durant la congelació evitant, així, la formació de cristalls que podrien trencar les cèl·lules.

QUADRE 3.2. Manteniment dels cultius

Procés de tripsinització

El procés de tripsinització inclou els següents passos (volums per flascons de 25 cm²):

1. Es retira el medi del flascó aspirant amb una pipeta de vidre estèril connectada a una trampa de buit.
2. Es netegen les cèl·lules amb 1.5 mL de PBS durant 1 min. Es retira la dissolució salina. Aquest rentat permet eliminar les restes de medi amb sèrum que quedin en el cultiu.
3. S'afegeixen al flascó 1.5 mL de tripsina i es col·loca a l'incubadora fins que s'observi, al microscopi invertit, que les cèl·lules comencen a desenganxar-se (adopten una morfologia rodona i refringent). Normalment calen 1 o 2 min. Per acabar de desenganxar-les es dona un copet s al flascó. La reacció s'atura en afegir al flascó el doble de volum de medi complet.
4. Es recull el medi amb les cèl·lules i es centrifuga en un tub cònic estèril a 1700 rpm durant 5 min en una centrifuga refrigerada.
5. S'elimina el sobrenedant, es resuspèn el sediment en medi complet i es sembren nous flascons.

Procés de congelació

1. Es tripsinitzen les cèl·lules tal com s'ha descrit.
2. Es centrifuguen 5 min a 1700 rpm en una centrifuga refrigerada.
3. S'aspira el sobrenedant i es resuspèn el precipitat de cèl·lules en medi complet.
4. Es reparteixen les cèl·lules en alíquotes de 0.9 mL en criotubs i s'hi afegeixen 0.1 mL de DMSO.
5. Es congelen els criotubs durant 2 h a -20°C, 24 h a -80°C i després es transfereixen a un tanc de nitrogen líquid (-196°C).

Procés de descongelació

1. Es treuen les cèl·lules del nitrogen líquid i es descongelen ràpidament en un bany a 37°C.
2. Una vegada s'ha desfet el gel, es recull el medi amb les cèl·lules i es col·loca en un tub de centrifuga estèril de 15 mL.
3. S'afegeix, gota a gota, medi incomplet fred fins a un volum de 6 mL, tot agitant enèrgicament després d'afegir cada gota per tal d'homogeneïtzar la barreja. Aquest procés és necessari per tal de dissoldre de manera lenta el DMSO que contenen les cèl·lules.
4. Es centrifuga a 1700 rpm durant 5 min en una centrifuga refrigerada.
5. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el sediment en medi complet. Tot seguit es traspassen les cèl·lules a un flascó.

3.2.4. Recompte del nombre de cèl·lules

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode de recompte directe de cèl·lules amb un hemocitòmetre (o cambra de Neubauer) el qual permet, en qualsevol moment del cultiu, comptar el nombre de cèl·lules i conèixer-ne la seva viabilitat. Aquesta tècnica s'ha utilitzat de manera rutinària en el manteniment dels cultius cel·lulars i en l'inici dels diferents assajos per sembrar el nombre adequat de cèl·lules a les plaques o flascons. Es basa en l'ús del microscopi invertit, una cambra de recompte i blau de tripà, colorant que permet diferenciar les cèl·lules vives de les mortes.

Quan s'han dut a terme assajos de proliferació en placa de 96 pouets, s'ha utilitzat el recompte indirecte amb sals de tetrazoli per tal de quantificar la proliferació de les cèl·lules com a conseqüència del tractament. El mètode es basa en la reducció de l'MTT, per part de les cèl·lules metabòlicament actives i mitjançant enzims deshidrogenasa, per obtenir NADH i el NADPH. El compost obtingut és el formazan el qual forma uns precipitats de color lila que seran posteriorment solubilitzats amb DMSO. La coloració es quantifica en un lector de microplaques.

QUADRE 3.3. Recompte del nombre de cèl·lules

Recompte directe amb hemocitòmetre

El procediment per realitzar el recompte directe i conèixer, així, la viabilitat i el número de cèl·lules en qualsevol moment del cultiu inclou els següents passos:

1. Tripsinització de les cèl·lules segons allò descrit en el quadre 2.2.
2. Un cop resuspeses en 1 mL de medi, es pren una alíquota de 10 μ l i es col·loca en un eppendorf. S'afegeixen 10 μ l de blau de tripà i es barreja. Es dipositen 10 μ l de la barreja en un hemocitòmetre. Les cèl·lules vives s'observen com esferes refringents i clares, mentre que les mortes s'observen opaques i tenyides de blau, ja que el colorant només és capaç de penetrar en aquestes últimes.
3. Es compten el total de les cèl·lules de la zona W de l'hemocitòmetre sota el microscopi invertit (veure figura 2.1.), diferenciant les vives de les mortes. Les cèl·lules comptades es converteixen en cèl·lules per mL multiplicant la xifra obtinguda per 1×10^4 (factor de correcció de volum) i per 2 (factor de la dilució feta pel recompte). La viabilitat es calcula dividint el número de cèl·lules vives pel total de cèl·lules contades i multiplicant per 100.

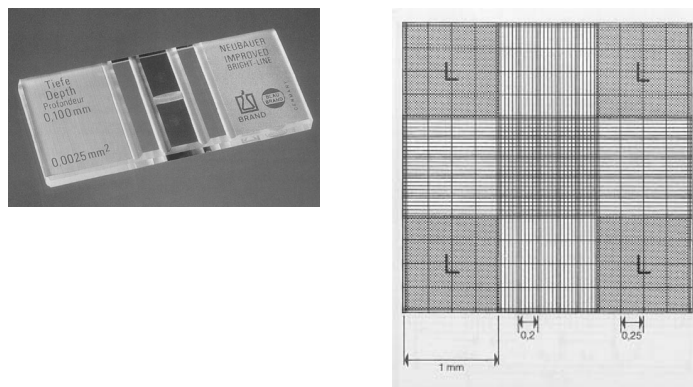


Fig 2.1. Cambra de Neubauer i esquema de la zona de comptatge

Recompte indirecte amb sals de tetrazoli

Material

Plaques de 96 pouets de fons pla (Nunc, Dinamarca)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, Espanya)

DMSO (dimetilsulfòxid) (Sigma, Espanya)

Protocol

1. S'aspira el medi de cultiu de cada un dels pouets.
2. S'afegeixen 100 μ l de medi complet a cada pouet, i tot seguit 10 μ l de la dissolució de MTT 0.5%. Tot això es fa evitant que la llum incideixi directament sobre la placa, ja que l'MTT és fotosensible.
3. S'incuba la placa a 37°C durant 1 h i 30 min.
4. Passat aquest temps, s'aspira el medi, i s'observa la formació d'un precipitat de color lila.
5. Es resuspèn el precipitat amb 100 μ l de DMSO.
6. Es llegeix l'absorbància a 570 nm.

3.2.5. Assaig de proliferació

Per tal d'estudiar l'efecte de factors de creixement (EGF i els seus derivats, PCI) i de fàrmacs (Iressa, Herceptin) en la proliferació de cèl·lules canceroses, s'han realitzat diferents tipus d'assaig de proliferació basats en l'esquema temporal d'aplicació del tractament.

QUADRE 3.4. Assaig de proliferació**DIA 1**

1. Es tripsinitzen els flascons de les línies cel·lulars que es volen assajar i es fa un recompte amb blau de tripà.
2. Es sembren en una placa de 96 pouets el nombre de cèl·lules adequat en funció del tipus de tractament i de la línia cel·lular, i per tal que aguantin tot el període sense arribar a estar massa confluents, en medi complet.

En el cas de tractaments a 72 h (estudis de l'acció de l'EGF recombinant i les seves formes derivades)

DIA 2

3. S'extreu el medi dels pouets i es fa un rentat amb PBS temperat per tal d'eliminar les restes de sèrum. S'afegeix el tractament corresponent en medi 0.5% FBS a cada pouet. Es fan 6 rèpliques de cada tractament.

DIA 5

4. Es revela la placa mitjançant el recompte indirecte amb sals de tetrazoli (quadre 2.3.).

En el cas de l'aplicació d'un pre-tractament de 3 dies seguit d'un tractament de 6 dies (combinació EGF o PCI amb Iressa o Herceptin).

DIA 2

3. S'extreu el medi dels pouets i es fa un rentat amb PBS temperat. S'afegeix el pre-tractament (EGF o PCI) en medi 0.5% FBS a cada pouet. Es fan 3 rèpliques de cada tractament.

DIA 5

4. Es fa canvi de medi i es torna a afegir el mateix pre-tractament a cada pouet.

DIA 8

5. Es fa canvi de medi, i s'aplica el tractament (Iressa o Herceptin) en medi 0.5% FBS a cada pouet.

DIA 11

6. Es revela la placa mitjançant el recompte indirecte amb sals de tetrazoli (quadre 2.3.).

3.3. TÈCNiques DE BIOQUÍMICA

3.3.1. Tècniques de quantificació de proteïna

Al llarg de tot aquest treball s'han utilitzat diferents mètodes de quantificació de proteïnes en funció de les característiques de la mostra que es volia quantificar i del tampó amb el qual estava diluïda.

3.3.1.1. *Mètode de Bradford*

L'estimació de la quantitat de proteïna total en els lisats cel·lulars s'ha realitzat utilitzant una adaptació del mètode de Bradford (1976). Aquest mètode es basa en el canvi del màxim d'absorció, de 465 a 595 nm, que pateix el colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 (en dissolució àcida) quan s'uneix a proteïna, utilitzant albúmina sèrica bovina (BSA) com a patró. La determinació es realitzà en plaques de 96 pouets i es va llegir l'absorbància a 630 nm en el lector de microplaques.

QUADRE 3.5. Quantificació de proteïnes mitjançant el mètode de Bradford

Material i dissolucions

Plaques de 96 pouets sense tractament (Costar, EEUU.).

Reactiu de Bradford (Bio-Rad, EEUU.).

BSA 0.1 mg/mL en aigua milliQ.

Protocol

1. A partir de la dilució 0.1 mg/mL de BSA, es preparen 300 μ l de les següents concentracions de BSA: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 35 μ g/mL, de les quals se n'afegiran 80 μ l a cada pouet, fent-ne duplicats.
2. En pouets de la mateixa placa de 96 s'han de col·locar, per duplicat, 80 μ l de la mostra directa o diluïda.
3. S'afegeix a cada pouet 20 μ l de la dissolució de Bradford sense diluir i, posteriorment, s'homogeneïtza la barreja pujant i baixant el líquid amb una micropipeta.
4. Es llegeix l'absorbància a 630 nm en el lector de microplaques, entre 2 minuts i una hora després d'haver fet la barreja.
5. Es construeix una recta de regressió que relacioni la concentració de BSA i l'absorbància a 630 nm, a la qual s'interpolaran les absorbàncies de les mostres de les quals es vol conèixer la concentració de proteïna.

3.3.1.2. *Mètode espectrofotomètric*

La concentració d'EGF i PCI recombinants així com de les formes truncades de l'EGF obtingudes per digestió enzimàtica o per mètodes recombinants, s'ha calculat amb aquesta tècnica. Segons la llei de Lambert-Beer on $A_{280} = \epsilon_{280} \times c \times l$, coneixent l'absorbància a 280 nm (zona de l'espectre electromagnètic on absorbeixen les proteïnes),

“l” que és la longitud del pas de llum de la cubeta de l'espectrofotòmetre, i “ ϵ ” que és el coeficient d'extinció molar a 280 nm propi de cada proteïna (aquest valor s'ha calculat, per cada proteïna, a partir d'un programa informàtic ubicat a la pàgina web: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/rpg/proteincalculator.htm>)

3.3.2. Obtenció de les mostres per l'anàlisi bioquímic

En tots els estudis bioquímics que s'han dut a terme ha calgut, en primer lloc, fer un lisat cel·lular dels cultius per tal de recuperar les cèl·lules i, posteriorment, s'ha utilitzat la tècnica de transferència tipus *Western blot* seguida d'una immunodetecció amb anticossos per tal de detectar específicament la proteïna que es volia estudiar.

3.3.2.1. Tractament

En tots els tractaments que s'han aplicat, excepte en el cas en què s'ha estudiat la dimerització del receptor la qual s'explica més endavant, ha calgut, prèviament, deixar les cèl·lules durant 16 h sense FBS ja que aquest conté factors de creixement que en el moment de l'anàlisi podrien emascarar l'efecte de l'EGF o les respectives variants que s'han afegit, que són, en definitiva, factors de creixement. Per tant, un cop les cèl·lules han arribat a una confluència òptima per a ser tractades, que s'estima que és al voltant del 60-70%, se'ls ha retirat el medi complet i se'ls ha afegit medi incomplet durant 16 h. Passat aquest temps, se'ls ha retirat aquest medi, se'ls n'ha afegit de fresc (medi incomplet) i s'ha aplicat el tractament durant el temps establert pel protocol. En el cas de la fosforilació s'ha mantingut durant 10 min, mentre que per detectar si el receptor ha internalitzat s'ha mantingut durant 25 min. Aquests valors temporals s'han establert després de fer moltes proves per tal de trobar a quin temps s'obtenia la màxima fosforilació o internalització.

3.3.2.2. Lisat cel·lular

Aquesta tècnica permet lliurar les cèl·lules i separar-ne la fracció citoplasmàtica i membranosa de la nuclear. El pèllet que es descarta, però, no conté només fracció nuclear sinó que és possible que també contingui restes de citoplasma. Per tant, no és un protocol suficient a l'hora d'aïllar de forma específica el nucli cel·lular.

QUADRE 3.6. Obtenció del lisat cel·lular**Material i dissolucions**

Aprotinina 1.9 mg/mL (Sigma, Espanya).

Filtre 0.22 µm de baixa retenció de proteïnes (Nalgene, Anglaterra).

Xeringues d'insulina amb agulla incorporada (Rubilabor, Espanya)

Leupeptina: es prepara una dissolució mare 10 µg/µL dissolt en aigua i es guarda a -20°C (Sigma, Espanya).

PBS

PMSF (fenilmetilsulfonilfluorur) (Sigma, Espanya).

Rascador de cèl·lules (Sigma, Espanya).

Tampó de lisis RIPA B incomplet: 20 mM tampó fosfat sòdic pH 7.4, 1% Tritó X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA.

Tampó fosfat sòdic 1 M pH 7.4. Es prepara barrejant 19 mL de NaH₂PO₄ 1 M amb 8 mL de Na₂HPO₄ 1 M.

Vanadat sòdic 250 mM, es conserva a -20°C (Sigma, Espanya).

RIPAB Complet

1. Es prepara una dissolució de PMSF 200 mM en etanol absolut.
2. S'afegeix, al RIPA B incomplet, PMSF a una concentració final 5 mM. Cal que totes dues solucions estiguin temperades abans de barrejar-les per evitar la formació de precipitats (en el cas que se'n formin es pot escalfar la barreja a 50-60°C fins que desapareguin).
3. S'ajusta el pH a 7.4 amb NaOH 1 M, i es filtra la dissolució a través d'un filtre 0.22 µm.
4. S'afegeix aprotinina a l'1% v:v, 10 µg/mL de leupeptina, 250 µg/mL de vanadat sòdic.
5. El RIPA B complet es guarda en gel.

Protocol

1. Després del tractament, es renten dues vegades les cèl·lules amb PBS fred (4°C).
2. S'afegeix RIPAB complet (volum segons el tipus de placa o flascó), i es mantenen les cèl·lules en gel fins al moment del seu processament.
3. Es desenganxen les cèl·lules amb un rascador i es transfereix la dissolució a un eppendorf fred.
4. S'homogeneïtza amb una xeringa d'insulina, tot pujant i baixant uns 8-10 cops, i evitant que l'agulla es col·lapsi o que es formi massa escuma.
5. Es centrifuguen les mostres a 10000 xg durant 10 min a 4°C.
6. Es descarta el sediment i es passa el sobrenedant, el qual conté la fracció citoplasmàtica i les membranes cel·lulars, a un nou eppendorf.
7. Es determina la concentració de proteïna per Bradford (Apartat 2.3.1.1.), diluint les mostres i afegint a la recta patró de BSA la part equivalent de RIPA B de la dilució, ja que tant el detergent com els inhibidors de proteases interfereixen en el resultat.
8. Es calcula la concentració de proteïna total del lisat, es preparen les mostres i es conserven a -80°C. De la mostra restant, és millor fer-ne alíquotes per tal d'evitar molts cicles de congelació i descongelació, i guardar-les a -80°C.

3.3.2.3. Extracció nuclear

Per tal d'obtenir de forma pura la fracció nuclear de les cèl·lules i evitar d'aquesta manera la contaminació amb d'altres fraccions cel·lulars, s'ha dut a terme aquest protocol mitjançant la utilització d'un kit comercial.

QUADRE 3.7. Extracció nuclear

Abans de començar l'extracció dels nuclis cal haver fet, prèviament, el tractament de les mostres i la tripsinització, seguida de dos rentats del pèl·let amb PBS fred. Aquestes cèl·lules es poden utilitzar immediatament o bé es poden guardar a -80°C fins al moment de la seva utilització.

Material i dissolucions

Nuclear Extraction Kit (Chemicon International, EUA)
Xeringues d'insulina amb agulla incorporada (Rubilabor, Espanya)
Adaptador d'agitació orbital del vòrtex (Rubilabor, Espanya)

Protocol

1. S'estima el volum de pèl·let cel·lular: una placa T100 equival a 75 µL de pèl·let. A partir d'aquí tots els volums faran referència a aquest valor.
2. S'afegeixen 5 volums de tampó de lisi citoplasmàtica fred al qual, prèviament, se li ha afegit DTT 0.5 mM i 1:1000 de la barreja d'inhibidors de proteases.
3. Es resuspèn el pèl·let tot pipetejant molt suaument.
4. S'incuba la suspensió cel·lular en gel durant 15 min.
5. Es centrifuga la suspensió durant 5 min. a 250 rpm i a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pèl·let en dos volums de tampó de lisi citoplasmàtica fred.
6. Per mitjà de la utilització d'una xeringa d'insulina amb agulla incorporada, es lisen les cèl·lules tot pujant i baixant la suspensió cel·lular unes 8-10 vegades. Cal evitar que l'agulla es col·lapsi i que no es formi massa escuma.
7. Es centrifuga la suspensió durant 20 min. a 7400 rpm i a 4°C.
8. El sobrenedant conté la porció citosòlica del lisat cel·lular. Aquesta es pot guardar a -80°C, si és que es desitja processar. El pèl·let restant conté la fracció nuclear.
9. Es resuspèn aquest pèl·let en 2/3 volum de tampó de lisi nuclear al qual, prèviament, se li ha afegit DTT 0.5 mM i 1:1000 de la barreja d'inhibidors de proteases.
10. Per mitjà de la utilització d'una xeringa d'insulina amb agulla incorporada, es disgreguen els nuclis tot pujant i baixant la suspensió cel·lular unes 5-6 vegades. Cal evitar que l'agulla es col·lapsi i que no es formi massa escuma. En aquest punt es pot guardar la mostra a -80°C i continuar el seu processament un altre dia.
11. Les mostres es mantenen en agitació orbital intensa a 4°C durant 45 min.
12. Es centrifuga la suspensió nuclear durant 5 min. a 9900 rpm a 4°C.
13. El sobrenedant conté la fracció nuclear. Es transfereix a un eppendorf nou i se'n determina la concentració de proteïna total mitjançant el mètode de Bradford.

3.3.3. Estudi de l'activació dels receptors de la família EGF

Per tal de conèixer el mecanisme d'acció de les formes truncades de l'EGF així com del propi EGF recombinant, s'han estudiat diverses etapes del mecanisme d'activació del receptor d'EGF (EGFR). S'ha determinat si indueixen la fosforilació de l'EGFR, mitjançant la detecció per immunotransferència d'una tirosina fosforil·lada específica d'aquest receptor, i la dimerització, per mitjà de la utilització de tècniques d'entrecreuament químic. En tots aquests estudis s'ha emprat la tècnica de transferència tipus *Western*. D'altra banda, per estudiar la internalització del receptor s'ha utilitzat una tècnica també basada en la detecció específica amb anticossos: el *Cell-Elisa*. A continuació es detallen els protocols utilitzats en totes aquestes tècniques.

3.3.3.1. Transferència tipus Western

Amb aquesta tècnica, també anomenada *electroblotting* o *western blotting* (Townin i col., 1979, Renart i col., 1979) es combina l'especificitat de la detecció d'anticossos amb la resolució obtinguda per les tècniques electroforètiques. Consisteix en una tècnica electroforètica amb la qual es transfereixen les proteïnes carregades d'un gel d'electroforesis a una membrana de material sintètic (difluorur de polivinildè o PVDF) gràcies a un camp elèctric perpendicular a les dues parts.

2.3.3.1.1. Electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-Page)

L'electroforesi discontinua en SDS (dodecil sulfat sòdic) és una metodologia que permet l'anàlisi de barreges complexes de proteïnes (Laemmli, 1970). El mètode es basa en un suport físic constituït per fibres de monòmers d'acrilamida entrecreuades amb bisacrilamida que polimeritzen en dissolució, en presència de radicals lliures, i formen una matriu reticular de consistència gelatinosa. Aquests radicals lliures són aportats pel persulfat amònic i queden estabilitzats pel Temed (N,N,N',N'-tetrametilen-diamina). Es polimeritzen dos tipus de gel: un de superior o apilador, i un d'inferior o separador. Les funcions que realitzen són diferents. El gel apilador permet que les proteïnes es concentrin en una banda estreta abans d'entrar en el gel separador i n'augmenten la resolució al provocar que tota la mostra entri en la fase separadora al mateix temps. El gel separador permet la separació de les proteïnes en funció de la seva massa molecular. Les electroforesis s'han dut a terme en un equip Mini-Protean III (Bio-Rad, EUA) i són de tipus vertical. La mida dels gels és 9 cm x 6 cm x 1.5 mm.

QUADRE 3.8. Electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-Page)

Material i dissolucions

Marcadors de pes molecular pretenyits (Invitrogen Life Technologies, EUA): 250 KDa Miosina, 98 KDa BSA, 64 KDa Glutamat deshidrogenasa, 50 KDa Alcohol deshidrogenasa, 36 KDa Anhidrasa carbònica, 30 KDa Mioglobina, 16 KDa Lisosim, 6 KDa Aprotinina, 4 KDa Insulina.

Marcadors de pes molecular de rang ampli no tenyits (Bio-Rad): 250 KDa Miosina, 116.25 KDa β -Galactosidasa, 97.4 KDa Fosforilasa b, 66.2 KDa Albúmina sèrica bovina, 45 KDa Ovoalbémina, 31 KDa Anhidrasa Carbònica, 21.5 KDa Inhibidor de Tripsina, 14.4 KDa Lisozim, 6.5 KDa Aprotinina.

Marcadors de pes molecular de rang ampli no tenyits (Invitrogen Life Technologies, EUA): 200 KDa Miosina, 116.3 KDa β -Galactosidasa, 97.4 KDa Fosforilasa b, 66.3 KDa Albúmina sèrica bovina, 55.4 KDa Glutamic deshidrogenasa, 36.5 KDa Lactat deshidrogenasa, 31 KDa Anhidrasa Carbònica, 21.5 KDa Inhibidor de Tripsina, 14.4 KDa Lisozim, 6 KDa Aprotinina, 3.5 KDa Cadena B de la Insulina, 2.5 KDa Cadena A de la Insulina.

Tampó del gel apilador (x4): Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4%.

Tampó del gel separador (x4): Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4%.

Acilamida 30%, N-N'-bismetilen acilamida 0.8%.

Persulfat amònic 15% preparat al moment (Bio-Rad, EUA)

Temed (N,N,N',N', tetrametiletildiamina) (Bio-Rad, EUA)

Tampó d'elució (x10): glicina 1.92 M, Tris 0.25 M, SDS 1%. S'ajusta a pH 8.3-8.5.

Tampó d'aplicació (x4): Tris-HCl 120 mM pH 6.8, SDS 8%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 5% (s'afegeix just abans de fer servir) i blau de bromofenol 0.02%.

Protocol

1. Es polimeritza el gel separador (amb el percentatge d'acilamida desitjat) i sobre d'aquest el gel apilador (normalment al 3%)
2. En les electroforesis en condicions desnaturalitzants les mostres s'incuben 5 minuts a 100°C en presència del tampó d'aplicació per tal de reduir els ponts disulfur de les proteïnes.
3. Les mostres es carreguen a les butxaques amb una micropipeta.
4. Les electroforesis es corren a intensitat suau i constant (30 mA per gel).

2.3.3.1.2. *Electrotransferència*

Amb aquesta tècnica és possible transferir les proteïnes, que prèviament s'han separat en un gel d'electroforesi SDS-Page, a una membrana de PVDF i per mitjà de l'aplicació d'un camp elèctric. Les transferències s'han dut a terme en un equip Mini-Trans-Blot (Bio-Rad, EUA).

QUADRE 3.9. Electrotransferència**Material i dissolucions**

Membranes de PVDF (difluorur polivinilidè) (Millipore, EUA).

Paper Whatman (Acefe, Espanya).

Tampó d'electrotransferència 192 mM Glicina, 25 mM Tris, 20% metanol. Cal preparar-lo una estona abans i conservar-lo a 4°C.

Protocol

1. Una vegada ha corregut el gel, es submergeix en tampó d'electrotransferència fred i es deixa agitant durant 10 minuts a temperatura ambient.
2. Es retalla la membrana de PVDF de la mida del gel i s'activa submergint-la 10 segons en 5-10 mL de metanol 100%. Posteriorment es renta amb aigua Milli-Q en excés durant 5 minuts i llavors s'incuba breument en tampó d'electrotransferència.
3. S'incuben en tampó d'electrotransferència durant 10 min els components del paquet de transferència, les 2 esponges i les 4 peces de paper Whatman, la membrana de PVDF i el gel de poliacrilamida.
4. Es munta el sistema de transferència amb el següent ordre a partir del pol negatiu (costat negre): Esponja – 2 papers Whatman – gel d'electroforesi – membrana de PVDF – 2 papers Whatman-Esponja
5. A mesura que es van col·locant els diferents components, es va afegint tampó d'electrotransferència entre ells i s'eliminen les bombolles.
6. Es col·loca el sistema en el Mini-Trans-Blot juntament amb el bloc refrigerant i una barra magnètica. S'omple de tampó d'electrotransferència fred i es manté en agitació durant tot el procés.
7. Es connecta l'aparell a la font d'electroforesi i es manté a voltatge constant de 100 V durant 4 hores (es realitza la transferència dins una cambra freda per evitar un augment de temperatura del tampó que sol anar acompanyada d'un increment d'amperatge).
8. Una vegada acabada la transferència se separa el gel de la membrana i es comprova l'efectivitat del procés per mitjà de l'observació de la transferència dels marcadors de pes molecular pretenyits del gel a la membrana. Cal tenir en compte que, per a la posterior incubació, la membrana s'ha de col·locar amb el cantó que ha estat en contacte amb el gel cara amunt.

2.3.3.1.3. Detecció immunològica amb anticossos específics

Les proteïnes s'han detectat mitjançant la incubació de la membrana, que prèviament s'ha incubat amb tampó de bloqueig per tal d'evitar la unió inespecífica d'anticossos, amb un anticòs que sigui específic. Posteriorment s'ha eliminat l'excés d'anticòs amb la realització de varis rentats, i s'ha incubat la membrana amb un segon anticòs que reconegui específicament la regió constant dels Fc de l'anticòs primari i que portava unida una molècula de peroxidasa a partir de la qual s'ha pogut fer el revelat per a la detecció.

QUADRE 3.10. Detecció immunològica amb anticossos específics**Material i dissolucions**

Anticòs policlonal de conill contra la regió intracel·lular de l'EGFR (de l'aa 1005 al 1016) 100 µg/mL (Sta. Cruz Biotechnology, EUA). Es conserva a 4°C

Anticòs policlonal de conill contra la regió intracel·lular de l'ErbB-2 100 µg/mL (Sta. Cruz Biotechnology, EUA). Es conserva a 4°C.

Anticòs monoclonal de ratolí contra la regió C-terminal de l'actina humana. Clon C-2, 100 µg/mL (Sta. Cruz Biotechnology, EUA). Es conserva a 4°C.

Anticòs monoclonal contra la tirosina fosforil·lada 1068 de l'EGFR (Cell Signaling, EUA). Es conserva a -20°C.

Anticòs contra la regió constant dels anticossos de conill, conjugat amb peroxidasa (GAR-Po) (Pierce, EUA) Es conserva a -20°C.

Anticòs contra la regió constant dels anticossos de ratolí, conjugat amb peroxidasa (GAM-Po) (Roche Diagnostics, Alemanya). Es conserva a -80°C.

Cassette d'exposició (Sigma, Espanya).

Dissolució reveladora Anatomix Developer (Fujifilm, Espanya). S'utilitza directament. Es conserva a 4°C i no és fotosensible.

Dissolució fixadora X-Fix (Fujifilm, Espanya). S'utilitza directament. Es conserva a 4°C.

Film autorradiografia X-ray films (Fujifilm, Espanya).

Reactiu quimioluminiscent West Pico o West Dura (Pierce, EUA). Es conserva a temperatura ambient.

Tampó de rentat: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (es prepara al moment)

Tampó de bloqueig: tampó de rentat amb 3% de llet en pols (es prepara al moment)

Protocol

1. Es renta la membrana durant 10 min amb tampó de rentat.
2. S'incuba a temperatura ambient durant 1 hora amb el tampó de bloqueig (aquest pas pot fer-se o/n)
3. S'incuba a temperatura ambient durant 1 hora amb l'anticòs contra la proteïna que es vol detectar. Aquest es prepara fent una dilució adequada de la dissolució comercial en tampó de bloqueig.
4. Es fan 3 rentats de 10 min de la membrana amb tampó de bloqueig
5. S'incuba a T^a ambient durant 1 hora amb un anticòs que reconegui el primer anticòs i que estigui conjugat amb peroxidasa. L'anticòs es prepara fent una dilució adequada de la dissolució comercial en tampó de bloqueig.
6. Es fan 3 rentats de 10 min de la membrana amb tampó de bloqueig.
7. S'elimina l'excés de tampó dels rentats i es col·loca la membrana en una safata neta.
8. S'afegeix el reactiu de revelat (West Pico o West Dura), amb una proporció 1:1 de les dues dissolucions A i B directament sobre la membrana i s'incuba durant exactament 5 minuts en agitació.
9. S'elimina l'excés de dissolució de detecció i s'embolica la membrana amb plàstic transparent (si la quantitat de proteïna és alta es veuen bandes fluorescents).
10. Es col·loca la membrana en un cassette d'exposició, amb la zona que ha estat en contacte amb el gel durant la transferència, cara amunt.
11. A la cambra fosca, es col·loca un film d'autoradiografia sobre la membrana i es deixa exposant el temps necessari des de segons fins, com a màxim, 1 hora.
12. Es revela el film amb dissolució reveladora. Primer es col·loca en aigua per treure l'emulsió o pols present al revers del film, i després es col·loca a la cubeta on hi ha la dissolució reveladora. S'atura el revelat amb aigua destil·lada quan es veuen bé les bandes.
13. Es fixa amb dissolució fixadora fins que el film s'observi totalment transparent.
14. Finalment, es renta amb aigua destil·lada i es deixa assecant a l'aire.

2.3.3.1.4. Reciclatge de la membrana per a un nou revelat

Si després de revelar la membrana amb un anticòs per detectar de forma específica una proteïna s'ha volgut revelar aquesta mateixa membrana amb un altre anticòs, ha calgut prèviament fer un procés de reciclatge. Aquest procés consisteix en l'extracció dels anticossos per mitjà de l'aplicació d'unes condicions desnaturalitzants.

QUADRE 3.11. Extracció dels anticossos de revelat d'una membra de PVDF

Material i dissolucions

Re-Blot Plus Western Blot Recycling kit (Chemicon, EUA)

Tampó de rentat: 10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (es prepara al moment)

Protocol

1. Un cop s'ha revelat la membrana se li fan diversos rentats durant 1 hora amb aigua milliQ per tal d'eliminar les restes de reactiu de revelat.
2. Es prepara la dissolució d'extracció d'anticossos segons el kit comercial: es dilueix la dissolució mare fins a una concentració x1 en aigua milliQ. En el cas d'haver carregat molta proteïna al gel és millor utilitzar la dissolució forta. En cas contrari, si s'ha carregat poca proteïna, utilitzar la dissolució dèbil. Preparar-ne un volum de 5-10 mL.
3. Es submergeix la membrana en aquesta dissolució i s'incuba a temperatura ambient durant 15 min en agitació vigorosa.
4. Es fan 3 rentats de 5 min de la membrana en tampó de rentat.
5. Es procedeix a la incubació en tampó de bloqueig i es continua amb el protocol de detecció immunològica amb anticossos.

2.3.3.1.5. Tinció dels gels d'electroforesi

En alguns casos, després de l'electroforesi SDS-Page, enlloc de procedir a la transferència tipus Western blot i posterior immunodetecció, s'ha tenyit el gel per tal de visualitzar totes les proteïnes presents a la mostra. Això s'ha dut a terme, sobretot, en el seguiment de la mostra al llarg dels processos de purificació de proteïnes recombinants.

S'han emprat dos mètodes de tinció de proteïnes en gels d'electroforesi SDS-Page, segons la sensibilitat que es volia aconseguir: tinció amb blau de Coomassie i tinció amb nitrat de plata.

El **Coomassie** és un mètode quantitatiu que té una sensibilitat al voltant d'1 µg per banda de proteïna. El **nitrat de plata** és un mètode no quantitatiu i la seva sensibilitat és fins a 100 vegades superior a la del Coomassie, ja que permet detectar entre 2 i 5 ng per banda de proteïna. A continuació s'expliquen ambdós mètodes.

QUADRE 3.12. Tinció amb blau de Coomassie**Material i dissolucions**

Dissolució Coomassie Brillant Blue R al 0.1% (p/v), dissolt en àcid acètic, metanol i aigua en proporció 1:4:4. Aquesta dissolució es pot reutilitzar.

Dissolució fixadora: 50% metanol, 7% àcid acètic

Dissolució de rentat: àcid acètic 7%

Protocol

1. Un cop acabada l'electroforesi, es col·loca el gel en una cubeta on s'hi afegeix dissolució fixadora. Es manté durant 30 min en agitació a temperatura ambient.
2. S'elimina la dissolució fixadora, i el gel es tenyeix amb Coomassie durant 15 min en agitació i a temperatura ambient.
3. Es fan diversos rentats del gel amb dissolució de rentat, per tal d'eliminar l'excés de colorant.
4. Quan el gel es vegi transparent, estarà totalment destenyit.
5. Els gels que han estat tenyits seguint aquest mètode es poden tenyir posteriorment amb nitrat de plata. Abans, però, caldrà que es submergeixin en una dissolució de metanol 50%, àcid acètic 12% perquè quedin ben destenyits.

QUADRE 3.13. Tinció amb nitrat de plata**Material i dissolucions**

Nitrat de plata

Dissolució fixadora: 50% metanol, 12% àcid acètic, formaldehid 37%

Dissolució de rentat: etanol 50%

Dissolució oxidant: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L

Dissolució d'impregnació: AgNO_3 2 g/L, formaldehid 37%

Dissolució de revelat: Na_2CO_3 60 g/L, formaldehid 37%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L

Dissolució d'aturada: 50% metanol, 12% àcid acètic

Protocol

1. Es fixen les proteïnes amb dissolució fixadora durant 1 hora en agitació suau.
2. Es fan tres rentats de 20 min cadascun amb dissolució de rentat.
3. S'aplica la dissolució oxidant durant exactament 1 min, en agitació.
4. Es fan 3 rentats de 20 s amb aigua milliQ.
5. S'aplica la dissolució d'impregnació, protegida de la llum, durant 20 min en agitació suau.
6. Es fan 2 rentats de 20 s amb aigua milliQ.
7. Es procedeix al revelat mitjançant l'aplicació de la dissolució de revelat fins que es visualitzin les bandes.
8. Es fan 2 rentats de 2 min amb aigua milliQ.
9. Per aturar la reacció, s'aplica la dissolució d'aturada durant 10 min en agitació suau.
10. Es renta el gel durant aproximadament 20 min amb 50% metanol.

3.3.3.2. Estudi de la dimerització de l'EGFR

Per tal de determinar en quin grau els diversos lligands produïts indueixen la dimerització de l'EGFR, s'han dut a terme estudis d'entrecruament químic a partir de lisats cel·lulars d'A431.

QUADRE 3.14. Inducció de la dimerització dels receptors i reacció d'entrecreuament químic

Material i dissolucions

RIPA B concentrat (tampó de lisi més concentrat en inhibidors de proteases): 20 mM tampó fosfat sòdic pH 7.4, 1% Tritó X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 7 mM PMSF, aprotinina 1.4% (v:v), leupeptina 14 µg/mL, vanadat sòdic 350 µg/mL. Es prepara com s'ha descrit anteriorment (quadre 2.6.).

Dissolució d'EGF 100 µg/mL en 10 mM acètic, 0.2% BSA (R&D, EUA)

Dissolució d'EGF recombinant i formes truncades en 10 mM acètic, 0.2% BSA

Dissolució de BSA de 2 mg/mL

Dissolució 10 mM acètic, 0.2% BSA

Dissolució de glutaraldehid 25%

Dissolució de glicina 2 M pH 9

Protocol

1. Es barregen en un eppendorf, en aquest ordre: x µl de lisat cel·lular (els necessaris per tal que hi hagi 10 µg de proteïna total) + (10.5 µl - x µl) de RIPA B concentrat + 3 µl de la dissolució d'EGF/EGFrec/formes truncades (en el cas dels controls, BSA)
2. Es barreja suaument i s'incuba durant 30 min a temperatura ambient.
3. S'afegeixen a la barreja 1.5 µl de RIPA B concentrat
4. S'afegeix 5 µl de glutaraldehid 160 mM, preparat a partir de la dissolució al 25%. Es barregen suaument i s'incuba durant exactament 1 min a temperatura ambient.
5. S'atura la reacció d'entrecreuament químic afegint 1.7 µl de glicina 2 M. Es barreja suaument. El color de la dissolució vira a groc.

A partir d'aquí s'han analitzat els monòmers i els dímers per mitjà de la tècnica de transferència tipus Western. S'han carregat les mostres en gels de poliacrilamida-SDS al 5% per tal de poder analitzar tant els monòmers (170 KDa) com els dímers (340 KDa) i s'han transferit, posteriorment, a una membrana de PVDF mitjançant una transferència a 100 V durant 4 h.

3.3.3.3. Cell-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Aquesta tècnica està basada en un assaig d'ELISA sobre cèl·lules que prèviament s'han fet créixer en una placa especialment tractada per a l'adherència. Amb el Cell-ELISA només és possible detectar proteïnes de membrana ja que les cèl·lules no es lisen sinó que simplement es fixen. En aquest cas, ha calgut utilitzar un altre anticòs perquè el que rutinàriament s'havia utilitzat en el *Western blot* reconeix la part C-terminal de l'EGFR la qual es troba a l'interior de la cèl·lula.

QUADRE 3.15. Cell-ELISA**Material i dissolucions**

Plaques de 96 pouets de fons pla (Nunc, Dinamarca)

Medi complet

Medi incomplet

PBS

PBS 2% formaldehid

PBS 1% BSA

Anticòs monoclonal de ratolí contra el domini extracel·lular de l'EGFR (EGFR Ab-5, clone H11) 200 µg/mL. Es conserva a 4°C (Lab Vision, EUA)

Anticòs contra la regió constant dels anticossos de conill, conjugat amb peroxidasa (GAM-Po). Es conserva a -80°C (Roche Diagnostics, Alemanya).

BM Blue POD Substrate (Roche Diagnostics, Alemanya)

Àcid sulfúric (H₂SO₄) 0.25 M

Protocol

1. Es sembren les cèl·lules en medi complet en una placa de 96 pouets.
2. Un cop adherides i a una confluència d'aproximadament el 60-70%, es canvia el medi complet per medi incomplet i es mantenen així durant una nit.
3. Passat aquest temps, es retira el medi incomplet i s'aplica el tractament.
4. Es retira el tractament i es fan 3 rentats amb PBS.
5. Es fixen les cèl·lules amb una dissolució de PBS 2% formaldehid durant 20 min a temperatura ambient.
6. Es fan 3 rentats amb PBS
7. Es bloqueja la superfície del pouet amb una dissolució de PBS 1% BSA durant 1 h. A partir d'aquí, totes les incubacions es fan a temperatura ambient en una cambra humida.
8. Es retira el tampó de bloqueig i s'incuben les cèl·lules amb anticòs contra l'EGFR diluït en PBS 1% BSA, durant 1 h.
9. Es fan 3 rentats amb PBS.
10. S'incuben les cèl·lules amb anticòs GAM-Po diluït en PBS 1% BSA, durant 1h.
11. Es fan 3 rentats amb PBS.
12. Es procedeix al revelat: s'afegeixen 100 µl de dissolució comercial de revelat i, quan es vol aturar la reacció, s'afegeixen 100 µl d'àcid sulfúric 0.25 M. Seguidament es llegeix l'absorbància a 450 nm.

En el cas d'un ELISA normal, és a dir en el qual la mostra és una proteïna o barreja de proteïnes que s'uneixen al pouet, hi ha una sèrie de diferències en el protocol:

- La dissolució en la qual es dissol la mostra és tampó carbonat-bicarbonat pH 9.6. Com a alternativa a aquest tampó, també es pot fer servir el tampó comercial *Coating Buffer* (Scil diagnostics, Alemanya). Aquests tampons permeten la unió de les proteïnes a la superfície del pouet.
- La dissolució de rentat és Saline, Tween 0.05%.
- La dissolució en la qual es dissolen els anticossos és tampó PBS pH 7.2 Tween 0.05%.

Quan s'han determinat els nivells d'EGFR i erbB2 per ELISA en les diferents línies cel·lulars utilitzades per a la combinatòria de fàrmacs, s'han utilitzat uns kits comercials

d'ELISA, específics per a EGFR i erbB2 , els quals van ser adquirits a la casa comercial Bayer Diagnostics (Cambridge, USA).

3.4. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.4.1. Material biològic i medis de cultiu

3.4.1.1. Soques i vectors

Les soques utilitzades al llarg d'aquest treball i les seves característiques més rellevants es detallen a continuació:

TG1. (Gibson, 1984). El seu genotip és: *thr, hsdD5, supE, Δ(lac-proAB) F'[traD36, proA⁺, proB⁺, lac^q lacZΔM15]*. Soca de clonatge i d'expressió. L'F' permet alfa complementació, superinfecció per M13 i superprodueix lac repressor (lac^q).

XL1-Blue. (Bullock i col., 1987). El seu genotip és: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB, lacIqZΔM15, Tn10 (tet^r)]*. Soca de clonatge i d'expressió. L'F' permet alfa complementació, infecció pel fag M13 i superprodueix lac repressor (lacIq).

BL21(DE3). (Studier i col., 1990). El seu genotip és: *F-, ompT, r_B⁻, m_B⁻ (DE3)*. Soca d'expressió. Superprodueix el repressor lac (lacIq). Té la T7-RNA polimerasa sota el control de l'operó lac.

MC1061. (Casadaban i Cohen, 1980). El seu genotip és: *hsd R2, hsd M⁺, hsd S⁺, ara D139, Δ(ara-leu)7697, Δ(lac)X47, gal E15, gal K16, rpsL (Str^r), McrA, McrB1*. Soca de clonatge i expressió.

S'han utilitzat dos tipus de vectors: els de clonatge i els d'expressió. Els primers s'utilitzen per a la manipulació del DNA fins arribar a obtenir les diferents construccions, i els segons s'utilitzen per a produir les proteïnes per les quals codifica el DNA que s'ha manipulat. Els vectors pUC118 i pNIII/OmpA3 van ser subministrats pel laboratori d'Enzimologia i Química de Proteïnes i pel de Biologia Molecular de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB, respectivament. A continuació es detallen els vectors utilitzats així com les seves característiques més destacades.

pUC118. (Vieira i Messing, 1988). Vector d'expressió per *E.coli*, promotor lac, resistència a ampicil·lina, lacZ, complementació, ssDNA origen de replicació.

pET21b(+). Vector d'expressió per *E.coli*, promotor T7, cua T7 a la part N-terminal i cua d'histidines opcional a la part C-terminal, resistència a l'ampicil·lina (Novagen, AMS Biotechnology, EUA).

pET22b(+). (Studier i Moffat, 1986). Vector d'expressió per *E.coli*, promotor T7, pèptid senyal de pelB, resistència a ampicil·lina (Novagen, AMS Biotechnology, EUA).

pET32b(+). Vector d'expressió per *E.coli*, promotor T7, proteïna de fusió tioredoxina i cua d'histidines a la part N-terminal, cua d'histidines opcional a la part C-terminal, resistència a l'ampicil·lina (Novagen, AMS Biotechnology, EUA).

pINIII OmpA3. Vector d'expressió per *E.coli*, promotor lpp-lacZ_{po}, seqüència OmpA a l'N-terminal que dirigeix la proteïna a l'espai periplasmàtic, resistència a l'ampicil·lina, gen del repressor lacI.

3.4.1.2. Medis de cultiu

Per al creixement i propagació de les diferents soques bacterianes, portadores o no de vectors, s'han utilitzat els medis de cultiu que es detallen a continuació.

Medi LB. Medi ric d'ús comú utilitzat generalment en forma sòlida per al cultiu d'*E.coli* en placa.

Medi 2YT. Es tracta d'un medi molt ric utilitzat en forma líquida per al culti d'*E.coli* a fi d'obtenir grans creixements bacterians.

Medi M9. És un medi mínim utilitzat pel creixement de la soca MC1061.

Medi M9CAS. Medi utilitzat pel cultiu de la soca MC1061 portadora del vector pINIII OmpA3.

QUADRE 3.16. Composició dels medis de cultiu**Medi LB**

10 g de bactotripton, 5 g d'extracte de llevat, 10 g de NaCl, 1 L d'aigua destil·lada.

Per a l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu, s'han d'afegir 15 g d'agar (1.5% final). Cal ajustar el pH a 7.5 amb NaOH i posteriorment esterilitzar amb autoclau a 120°C durant 20 minuts.

Medi 2YT

16 g de bactotripton, 10 g d'extracte de llevat, 5 g de NaCl, 1 L d'aigua destil·lada.

Per a l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu, s'han d'afegir 15 g d'agar (1.5% final). Cal ajustar el pH a 7.5 amb NaOH i posteriorment esterilitzar amb autoclau a 120°C durant 20 minuts.

Medi M9

200 mL de sals M9x5, 2 mL de MgSO₄ 1M, 1 mL de CaCl₂ 0.1M, 1 mL de tiamina 1M, glucosa 20% o glicerol 80% fins a una concentració final de 0.2-2%, aigua destil·lada fins a 1 L.

La composició de les sals M9x5 és: 32.3 g de Na₂HPO₄ x H₂O, 15 g de KH₂PO₄, 5 g de NH₄Cl, 2.5 g de NaCl, 1 L d'aigua destil·lada. Un cop s'han barrejat aquestes dissolucions, s'ajusta el pH a 7.4 i s'autoclava a 120°C durant 20 minuts.

Totes aquestes dissolucions s'esterilitzen per separat: la tiamina per filtració i la resta amb autoclau a 120°C durant 20 minuts. Si es vol preparar medi sòlid per plaques de cultiu, s'han d'afegir 15 g d'agar (1.5% final).

Medi M9CAS

La composició és idèntica al medi M9 amb l'excepció que es suplementa amb casaminoàcids a una concentració final del 0.2%. Per això cal preparar, prèviament, una dissolució de casaminoàcids al 20%, s'autoclava a 120°C durant 20 minuts, i s'afegeixen 10 mL d'aquesta dissolució per cada litre de medi M9.

3.4.1.3. Antibiótics

Quan es treballa amb soques transformades amb vectors, els medis de cultiu s'han de suplementar amb els antibiòtics pels quals el vector confereix resistència. D'aquesta manera creixen només les cèl·lules portadores del vector i la soca no perd informació genètica de la qual és portadora. Per suplementar els medis, s'ha partit sempre d'una dissolució mare d'antibiòtic preparada per separat i de manera estèril.

L'antibiòtic de selecció, en la majoria dels casos, ha estat l'ampicil·lina preparada en dissolució mare a 100 mg/mL, esterilitzada per filtració, conservada a -20°C i utilitzada en cultius a una concentració final de 50, 100 o 175 µg/mL, segons cada cas. En medi sòlid s'afegeix abans de la gelificació, un cop la temperatura ha baixat dels 70°C. Les plaques es poden mantenir en condicions òptimes durant uns dies a 4°C, però si l'emmagatzematge s'allarga massa és recomanable tornar a suplementar-les amb l'antibiòtic abans del seu ús. Quan s'ha treballat amb les cèl·lules *E.coli* BL21(DE3) pLys ha calgut suplementar els medis amb ampicil·lina i cloramfenicol; aquest últim antibiòtic s'ha aplicat a una concentració de 75 µg/mL tant en placa (medi sòlid) com en medi líquid. Les condicions de preparació i emmagatzematge han estat les mateixes que pel cas de l'ampicil·lina.

3.4.1.4. Condicions de cultiu

Per als **cultius líquids** s'han aplicat les següents normes generals:

- S'ha intentat que el volum de medi de cultiu fos, com a màxim, 1/5 part del volum total del flascó, tot i que amb volums grans la relació varia entre 1/3 i 1/5.
- Els cultius de menys de 4 mL s'han preparat sempre a partir d'una colònia única o bé d'un glicerinat. Pels cultius de volum superior sempre s'ha fet créixer abans un preinòcul de volum adequat, i després s'ha afegit al medi de cultiu en una proporció 1:100 (inòcul:medi).
- La temperatura de creixement dels cultius ha estat de 37°C (excepte en casos molt especials que ja es comenten al llarg d'aquest treball).
- Tots els cultius líquids s'han incubat en agitació, al voltant de 250 rpm
- Pel que fa el temps d'incubació, referit normalment com a o/n, ha estat sempre d'entre 12 i 15 hores. Incubacions més llargues són desaconsellables pel fet que poden aparèixer processos proteolítics i també pot veure's reduïda la població de cèl·lules portadores del vector d'interès, en favor de la població de cèl·lules sense vector.
- Els temps d'incubació de cultius encaminats a l'expressió de gens recombinants en els vectors de la família pET han oscil·lat entre les 6 i les 8 hores, les tres darreres, posteriors a la inducció. En el cas del vector pNIIIIOmpA3 el cultiu s'ha deixat créixer durant 24 hores posteriors a la inducció.

Per als **cultius en placa de Petri** les condicions han estat la simple incubació a 37°C fins l'aparició de colònies clares sense colònies satèl·lit. Les colònies satèl·lit apareixen després de períodes perllongats d'incubació i són propiciades per la degradació de l'antibiòtic al voltant de les colònies que són realment portadores del vector.

3.4.1.5. *Conservació de soques i plasmidis*

Els bacteris utilitzats han estat conservats en placa de Petri fins a 30 dies per a l'ús diari, i en medi de cultiu amb un 15% de glicerol a -80°C per a conservació durant varis anys.

Els plasmidis es conserven dissolts (en tampó TE o aigua milliQ autoclavada) a -20°C , i en glicerinatats en les soques transformades.

QUADRE 3.17. Obtenció d'un glicerinat.

1. Es fa créixer el cultiu en medi líquid.
2. Quan arriba a una fase estacionària, se'n prenen alíquotes d'1 mL.
3. Aquestes alíquotes es barregen amb glicerol 87% per tenir una concentració final del 15% (v/v).
4. Es guarden a -80°C .

En els casos en què es volia guardar un cert microorganisme un temps molt llarg (més de 3 anys) es va utilitzar medi de congelació x2 (FMx2). De la mateixa manera, es repeteixen les etapes abans esmentades i es barregen amb 2 volums iguals de FMx2 i cultiu. La composició del medi de congelació x2 és la següent:

K_2HPO_4	12.6 g
Citrat Sòdic	0.9 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.18 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.8 g
KH_2PO_4	3.6 g
Glicerol 87%	88 g
H_2O destil·lada	fins a 1 L

3.4.1.6. *Mesura de la densitat òptica d'un cultiu*

L'absorbància a 550 nm d'un cultiu d'*E.coli* és una mesura del nombre de bacteris. Malgrat que no diferencia els actius dels morts és molt útil ja que és instantània i permet accions immediates de control en fermentadors. Per qüestions de linealitat cal diluir la mostra fins que l' A_{550} sigui inferior a 0.7.

3.4.2. Mètodes de DNA recombinant

En aquest apartat es descriuen els mètodes bàsics de DNA recombinant utilitzats. En general, s'han seguit els protocols descrits al manual de laboratori de Maniatis et al.

3.4.2.1. *Obtenció de DNA dels vectors*

Les anomenades minipreparacions de DNA plasmídic permeten obtenir de manera relativament ràpida quantitats que poden oscil·lar entre 5 i 10 µg de DNA plasmídic. Durant aquest treball s'ha utilitzat el kit comercial Concert Rapid Plasmid Purification System (GIBCO, EUA) que es basa en el mètode ja tradicional de la lisi alcalina. Amb aquest sistema es poden arribar a obtenir rendiments de fins a 30 µg de DNA, depenent del nombre de còpies del plasmidi, el tipus de plasmidi, la soca bacteriana utilitzada i altres condicions de creixement com són el medi de cultiu, l'antibiòtic de selecció, la temperatura d'incubació i l'oxigenació.

El DNA obtingut mitjançant aquest procés pot ser utilitzat per a transformacions i digestions amb enzims de restricció, seguides d'electroforesi en gels d'agrosa, ja sigui analítica o bé preparativa, també per a seqüenciació automàtica de DNA, seqüenciació manual, reaccions d'amplificació, etc. A més a més, el DNA obtingut al final d'aquestes minipreparacions es manté estable durant mesos a -20°C. És molt recomanable conservar congelat el DNA plasmídic de les construccions més importants com a mesura de seguretat, per si es malmet alguna de les soques portadores dels plasmidis que es guarden en forma de glicerinat.

QUADRE 3.18. Minipreparació de DNA plasmídic**Material i dissolucions**

Medi LB, 2YT o M9CAS

Tampó TE: Tris-HCl 10 mM pH 7.5

En el kit (Concert rapid plasmid purification System, Gibco, E.E.U.U.) vénen inclosos els següents tampons: de suspensió cel·lular (G1), de lisi (G2), de neutralització (G3), de rentat opcional (GX) i de rentat (G4)

RNAasa

Tubs de 2 mL i columnes

Protocol

1. Abans de començar el protocol de minipreparació de DNA plasmídic, cal haver posat un cultiu de nit en medi de cultiu (LB, 2YT o M9 CAS segons la soca i plasmidi utilitzats), suplementat amb antibiòtic.
2. Es centrifuguen els cultius de nit, durant 10 min a 2500 rpm. Cal partir d'un pèl·let obtingut a partir de 1 a 5 mL de cultiu. Es descarta completament el sobrenedant.
3. S'afegeixen 210 µL de dissolució de lisi (G2) i s'inverteix el tub 5 vegades. No s'utilitza el vòrtex. Es manté a temperatura ambient durant 5 min.
4. S'afegeixen 280 µL de tampó de neutralització (G3) i s'inverteix immediatament el tub 5 vegades. No s'utilitza el vòrtex. Es centrifuga la barreja a 12000 xg durant 10 min.
5. Es col·loca la columna en un tub de rentat de 2 mL. S'hi carrega el sobrenedant del pas anterior. Es centrifuga la barreja a 12000 xg durant 1 min. S'elimina el líquid restant.
6. S'afegeixen 500 µL de tampó de rentat opcional (GX) a la columna. S'incuba a temperatura ambient durant 1 min. Es centrifuga a 12000 xg durant 1 min. S'elimina el líquid restant. Aquest pas és opcional tot i que molt recomanable quan es treballa amb bacteris rics en nucleases.
7. Es col·loca de nou la columna en un tub de rentat de 2 mL. S'hi afegeixen 700 µL de tampó de rentat (G4) al qual se li ha afegit, prèviament, etanol, a la columna. Es centrifuga a 12000 xg durant 1 min. S'elimina el líquid restant.
8. Es centrifuga de nou a 12000 xg durant 1 min per tal d'eliminar el tampó de rentat que pogués quedar.
9. Es col·loca la columna en un eppendorf i s'hi afegeixen 75 µl de tampó TE temperat a 65°C. S'incuba a temperatura ambient durant 1 min. Es centrifuga a 12000 xg durant 2 minuts. El líquid que es troba a l'eppendorf conté el DNA plasmídic.

3.4.2.2. Manipulació del DNA**2.4.2.2.1. Condicions generals**

El DNA purificat és molt susceptible de ser atacat per les nucleases que es troben a tot arreu, tant provinents de la pell del manipulador, com d'origen bacterià, presents a la pols de l'ambient. És per això que és necessari treballar respectant certes mesures de seguretat, per tal de no malmetre la mostra. Així, cal esterilitzar per autoclau les puntes de pipeta, els tubs eppendorf, i qualsevol cosa que hagi de tenir un contacte directe amb el DNA. D'aquesta manera, s'evita la presència massiva de nucleases actives. Així mateix, també s'han d'autoclavar totes les solucions que han d'entrar en contacte amb el DNA. En algunes ocasions es recomana, també, l'ús de quelants d'ions divalents (com l'EDTA) que

impossibilitin l'acció de les nucleases. Ara bé, l'EDTA pot no estar indicat en alguns processos posteriors com ara digestions o lligacions.

2.4.2.2.2. *Electroforesi de DNA en gels d'agarosa*

Aquesta tècnica s'ha mostrat sempre com la manera més eficient d'analitzar preparacions de DNA plasmídic, productes de digestió amb enzims de restricció i productes de PCR. A més a més, és l'etapa preliminar per a la purificació del DNA (apartat) i un molt bon mètode per a estimar-ne la seva concentració.

Per a la preparació de gels s'ha seguit el protocol que es detalla a continuació. S'han utilitzat dos tipus d'agarosa segons la concentració a la qual es volia preparar el gel i que ve determinada per la longitud dels fragments que es volen separar (percentatges elevats per a fragments petits). Per gels de 0.5 fins a 2%, s'ha utilitzat agarosa de baixa electroendòsmosi (Ecogen, FMSC o Boehringer Mannheim). Per gels de més del 2% s'ha utilitzat l'agarosa Metaphor® (FMC Bioproducts, EUA) la qual té una temperatura de fusió superior a 75°C i, a més a més, permet una elevada resolució quan es volen separar fragments inferiors a 500 pb.

QUADRE 3.19. Electroforesi en gel d'agarosa

Dissolucions

Agarosa de baixa o elevada electroendòsmosi.

Tampó TBE 5x: 54 g/L Tris pH 8.7, 27.5 g/L d'àcid bòric i 3.72 g/L EDTA.

Bromur d'etidi 5 mg/mL

Marcadors de pes molecular: Φ X174 RF DNA/HaeIII fragments i 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL Life Technologies, EUA).

Marcadors pes molecular: DNA molecular weight marker X (0.07-12.2 Kbp) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya).

Tampó de càrrega x7: 0.15 g/mL de ficoll tipus 400, 2.5 mg/mL de blau de bromofenol i 2.5 mg/mL de xilè cianol.

Protocol

1. Es pesa la quantitat necessària d'agarosa i es diposita en un matrau.
2. S'afegeix el volum de tampó TBE adequat el qual, prèviament, ha estat diluït amb aigua milliQ fins a una concentració de x1, i una gota de bromur d'etidi. Es fa bullir en un microones fins que l'agarosa està completament fosa.
3. Es deixa refredar fins a una temperatura de 50°C aproximadament, i es diposita sobre la cubeta d'electroforesi. S'hi afegeix la pinta amb les butxaques i es deixa que l'agarosa solidifiqui.
4. Es retira la pinta i s'afegeix tampó TBE 1x fins a cobrir totalment els pouets.
5. Abans de carregar les mostres de DNA, aquestes es barregen amb 1/7 de tampó de càrrega. Un cop preparades, es carreguen al gel amb una micropipeta, tenint cura de no fer bombolles.
6. Els gels es fan córrer a un voltatge de 40-80 V. Normalment es deixa córrer fins que el marcador (blau de bromofenol) surt del gel. Ara bé, això depèn de la banda que volem veure i de si hem de separar molt o no dues o més bandes.
7. Per visualitzar el gel, es col·loca en un transil·luminador de llum ultraviolada i, quan es creu oportú, es capta la imatge amb l'aparell de sistema d'anàlisi d'imatge.

2.4.2.2.3. Purificació de fragments de DNA

Aquest procés s'ha dut a terme quan s'ha volgut recuperar el DNA provinent d'una digestió amb enzims de restricció o bé quan aquest DNA s'ha hagut de seqüenciar o amplificar per PCR. En aquest treball s'ha optat pel sistema de purificació Qiaex II Gel Extraction Kits (QIAGEN, EUA) amb el qual la recuperació és molt bona, sobretot per fragments petits els quals amb altres kits no són fàcilment recuperables. Aquest mètode es basa en la solubilització de l'agarosa i l'adsorció selectiva d'àcids nucleics a les partícules sílica-gel en presència d'elevades quantitats de sal. L'elució del DNA es produeix en afegir una dissolució baixa en sal com és el cas del tampó Tris o l'aigua.

QUADRE 3.20. Purificació de fragments de DNA

Material i dissolucions

Tampó Tris-HCl 10 mM pH 8.5

En el kit (Qiaex II Gel Extraction Kits, Qiagen, EUA) vénen inclosos els següents tampons: de suspensió (QX1), de rentat (PE).

Partícules de sílica-gel (QIAEX II)

Protocol

1. Un cop localitzada la banda al gel amb el transil·luminador, es talla el fragment d'agarosa que la conté amb un ganivet net i ben afilat. Cal minimitzar el tros de gel tallat i intentar no endur-nos més agarosa del que és necessari. Es col·loca la banda en un eppendorf.
2. S'afegeixen 3 volums de tampó QX1 per cada volum de gel, en el cas de fragments d'entre 100 pb i 4 Kb (s'afegeixen 300 µL de tampó per cada 100 mg de gel). Si la banda és inferior a 100 pb se n'afegeixen 6 volums, i si és superior a 4 Kb se n'afegeixen 3 i 2 volums d'aigua.
3. Es resuspèn la dissolució que conté les partícules de sílica-gel (QIAEX II) tot vortejant 30 s. S'afegeixen 10 µL d'aquesta dissolució si la mostra conté menys de 2 µg de DNA, 30 µL si en conté de 2 a 10 µg, o bé, per sobre els 10 µg, 30 µL per cada 10 µg de DNA addicionals.
4. S'incuba la barreja durant 10 min a 50°C per tal de solubilitzar l'agarosa i perquè el DNA s'uneixi a les partícules de sílica-gel. Cal vortejar cada 2 o 3 min per tal que les partícules quedin en suspensió. Cal comprovar, també, que el color de la barreja es manté groc, ja que això és un indicador que el pH és el correcte per tal que el DNA s'uneixi a les partícules.
5. Es centrifuga la mostra durant 30 s a 14000 rpm i s'elimina el sobrenedant.
6. Es renta el pèl·let amb 500 µL de tampó QX1, es centrifuga durant 30 s a 14000 rpm i s'elimina el sobrenedant.
7. Es renta el pèl·let 2 vegades amb tampó PE, es centrifuga durant 30 s a 14000 rpm i s'elimina el sobrenedant.
8. S'asseca el pèl·let durant 10-15 min fins que es torni blanc. Millor no fer-ho en un assecador de buit ja que el rendiment final disminueix. És millor fer-ho a temperatura ambient.
9. Per eluir el DNA cal afegir 20 µL de tampó Tris-HCl 10 mM pH 8.5 i resuspendre el pèl·let amb el vòrtex. Per fragments de menys de 4 Kb cal incubar a temperatura ambient durant 5 min, per fragments d'entre 4 i 10 Kb cal incubar a 50°C durant 5 min, i per fragments més grans de 10 Kb cal incubar a 50°C durant 10 min.
10. Es centrifuga durant 30 s. Es recupera el sobrenedant i es passa a un nou eppendorf.
11. Com a pas opcional, es recomana repetir els passos 9 i 10 per tal d'incrementar la recuperació de DNA en un 10-15%.

2.4.2.2.4. Estimació de la concentració de DNA

Per a l'estimació de la concentració de DNA en dissolució, s'han fet servir dos mètodes: la determinació espectrofotomètrica i l'estimació per electroforesi en gel d'agarosa.

QUADRE 3.21. Determinació de la concentració de DNA mitjançant l'espectrofotòmetre

Aquest mètode és molt senzill i ràpid, i consisteix en mesurar l'absorbància a 260 nm de la dissolució de DNA o d'una dilució d'aquesta.

Una unitat de densitat òptica a 260 nm equival a 50 µg de DNA/mL per un DNA doble brau, 40 µg/mL per un DNA monobru i 20 µg/mL per un oligonucleòtid. Amb aquest mètode es pot conèixer la puresa de la mostra mesurant també OD₂₈₀, ja que la relació OD₂₆₀ / OD₂₈₀ ha de ser superior a 2 per a un DNA pur.

QUADRE 3.22. Determinació de la concentració de DNA mitjançant gel d'agarosa

Sovint, els volums de les dissolucions purificades de DNA són tan petits que es fa difícil estimar la seva concentració espectrofotomètricament sense perdre gran quantitat de mostra.

Per a dur a terme aquesta estimació, es realitza una electroforesi analítica en agarosa de dues alíquotes de volum conegut: una de la dissolució de DNA i l'altra dels marcadors adequats. Com que és possible calcular quant DNA hi ha en cada una de les bandes del marcador, es pot estimar la quantitat de DNA present en la banda de la dissolució problema, per comparació de la seva intensitat amb les bandes corresponents als marcadors.

Protocol

1. Es fa córrer l'electroforesi en gel d'agarosa.
2. Cal conèixer els µg de DNA marcador carregat.
3. Cal conèixer el pes molecular del marcador total. Es calculen els mols de marcador carregats que corresponen equimolarment als mols de cada banda.
4. Coneixent els pb de cada banda del marcador se sap el seu pes molecular, i a partir de la dada coneguda del nombre de mols es coneixen els µg de DNA que corresponen a la banda d'intensitat de fluorescència similar a la de la banda problema.

2.4.2.2.5. Amplificació de DNA mitjançant PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction* o PCR) és un mètode ràpid per a l'amplificació enzimàtica *in vitro* de fragments específics de DNA. En els clonatges moleculars, la PCR ha fet possibles una multitud d'experiments abans inimaginables: clonatge directe de DNA genòmic o cDNA, mutagènesi dirigida, etc.

En aquesta part del treball s'ha utilitzat de manera molt rutinària la PCR per tal d'obtenir DNA en quantitat suficient per clonar, per mutagènesi dirigida i, tal com s'ha esmentat anteriorment, com a últim pas de la RT-PCR. La polimerasa utilitzada ha estat la *DeepVent* la qual té activitat correctora 3´-5´ fet que la fa molt adequada en processos de

clonatge ja que evita, en gran part, errors que podrien alterar la seqüència nucleotídica del gen que es vol clonar.

A continuació, a la taula 3.2., es mostren tots els encebadors i les seves característiques que s'han utilitzat en aquest apartat del treball, així com la seva finalitat.

ENCEBADOR (5'-3')	T _m	pb amplificades	Finalitat
<i>EGF53</i> ATGAAAAAGACGAATTCTATGAACAGTGA	56.9	202	Obtenció del gen de l'EGF a partir del plasmidi pTB361, per tal de clonar-lo als vectors pUC i pET.
<i>EGF35</i> TAACATTAACGGATCCTCTGCAGCTATC	61.2		
<i>FUP24</i> CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	55	268	Obtenció de l'EGF a partir dels vectors de la sèrie pET.
<i>RUP24</i> TCACACAGGAAACAGCTATGACCA	55		
<i>Truncat53</i> GATCCGAATTCTATGAACAGTGATTC	50	166	Mutació de l'EGF per tal d'eliminar-li els 6 últims aminoàcids.
<i>Truncat35</i> CCAAGCTTTCTAATCTCGGTACTGGC	54		
<i>EGF53inserció</i> ATGAAAAAGACGAATTCTGATGAACAGTGA	58.7	207	Obtenció del gen de l'EGF a partir del plasmidi pTB361, per tal de clonar-lo al vector pINIIIompA3. Cal afegir una base a 5' del gen per tal de corregir el marc de lectura.
<i>EGF35</i> TAACATTAACGGATCCTCTGCAGCTATC	61.2		

Taula 2.2. Característiques dels encebadors utilitzats en el procés de clonatge.

QUADRE 3.23. Reacció d'amplificació en cadena o PCR
<p>Reactius i dissolucions Aigua milliQ autoclavada a pH 7.5 Encebadors (5 pmol/μL) DeepVent DNA polimerasa (2 U/μL) (New England BioLabs). Juntament amb la polimerasa també es subministren el tampó x10 (1 mM) i els nucleòtids (10 mM).</p> <p>Protocol</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cal afegir els components en l'ordre exacte que es detalla: aigua milliQ, tampó 10x (concentració final 100 μM), nucleòtids (concentració final 200 μM), encebadors (20 pmols), DNA motllo (50 ng), polimerasa (1 unitat). Totes les reaccions de PCR es fan en un volum final de 100 μL. Tot el procés es fa a 4°C. 2. El programa del termociclador s'ha adaptat a cada parell d'encebadors. Ara bé, hi ha una sèrie de passos comuns en tots els programes: 2 min a 94°C / 30 cicles de: 75 s a 94°C, 90 s a la T_m, 75 s a 72°C / 2 min a 72°C / 4°C. 3. Les reaccions de PCR es guarden a 4°C per ús immediat, o bé a -20°C.

2.4.2.2.6. Tractament amb enzims de restricció

Els enzims de restricció tallen el DNA per un punt específic i, d'aquesta manera, generen extrems que poden ser o bé cohesius o roms, i de longitud i seqüència definides. Durant aquest treball s'han utilitzat aquest tipus d'enzims per tal d'obtenir fragments de DNA que posteriorment es visualitzaven en gels d'agarosa, es purificaven i s'unien per donar lloc a les diferents construccions de DNA.

L'activitat d'aquests enzims es troba directament relacionada amb el pH, la força iònica i la temperatura a la qual la reacció es duu a terme. Així, les condicions d'incubació per a cada digestió dependran dels requeriments de l'enzim en qüestió, per tal d'assolir la seva activitat màxima. Tant els enzims de restricció com els seus amortidors s'han guardat a -20°C .

Les condicions generals d'ús dels enzims de restricció es poden resumir en els següents punts:

- La quantitat de DNA utilitzada en les digestions ha oscil·lat entre 0.05 i 10 μg en un volum de 5-40 μl , depenent de si la digestió era preparativa o analítica.
- Les mescles s'han incubat a temperatura òptima (normalment 37°C) durant un temps que ha oscil·lat entre 1 i 2 h per digestions amb un sol enzim i de 3-5h per digestions dobles amb enzims de tampons compatibles, encara que no sol donar problemes deixar les digestions o/n. Per digestions dobles o múltiples amb enzims de tampons incompatibles, després de la digestió amb el primer enzim es resuspèn en el tampó adequat per la següent digestió.

Tots els enzims utilitzats en aquest treball han estat adquirits a la casa comercial Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanya) i la seqüència de tall així com el tampó o tampons de reacció en els quals l'enzim té un 100% d'activitat s'indiquen a la taula 2.3.

ENZIM	SEQÜÈNCIA DE TALL	TAMPÓ DE REACCIÓ
Aat II	GACGT/C	A
Bgl II	A/GATCT	A, B, M, H
EcoR I	G/AATTC	A, B, H
Hind III	A/AGCTT	B, M

Pst I	CTGCA/G	H
Sac I	GAGCT/C	A, L
Sca I	AGT/ACT	B, H
BamH I	G/GATCC	A, B, M
Xba I	T/CTAGA	A, H

Taula 2.3. Enzims de restricció utilitzats en aquest treball. Es mostra la seqüència de tall de cada un així com el tampó de reacció amb el qual mostren un 100% d'activitat.

2.4.2.2.7. *Reacció de lligació*

La lligació permet inserir fragments forans en vectors plasmídics o bé unir molècules de DNA per tal d'obtenir construccions per a un determinat propòsit. En el nostre cas, l'enzim utilitzat ha estat sempre la DNA lligasa de T4.

Les condicions de lligació depenen del tipus d'experiment que es dugui a terme, dels extrems que posseeixin el vector i l'insert linealitzats, i la concentració disponible del DNA a inserir. Les variables que cal tenir més en compte són les concentracions de DNA del vector i de l'insert o dels fragments a unir, i la durada i temperatura del lligació. També, de forma general, s'acostuma a sacrificar el fet que la T4 DNA lligasa treballi a la seva temperatura òptima (37°C), per guanyar en una millor complementació dels extrems. Així, s'acostuma a baixar la temperatura de lligació que sol oscil·lar entre 12 i 25°C.

QUADRE 3.24. Lligació de fragments de DNA

Reactius i dissolucions

T4 DNA lligasa (1U/μL) (Roche Diagnostics, Alemanya). Juntament amb la lligasa, també es subministra el tampó x10.

Protocol

1. Es talla el DNA (vector i insert) amb els enzims de restricció adequats. El DNA es purifica per electroforesi en gel d'agarosa. Si els extrems del vector són idèntics cal defosforil·lar-ne la posició 5'.
2. Es barregen en un eppendorf les dissolucions del vector i de l'insert. S'escalfa durant 10 min a 65°C i seguidament es refreda en gel.
3. S'afegeix 1/10 del volum final de tampó T4 DNA lligasa x10.
4. S'afegeix 1 μL de T4 DNA lligasa.
5. S'incuba a 16°C tota una nit (16 h aproximadament) o bé a 25°C durant 2-3 hores.
6. S'atura la reacció escalfant la mostra a 65°C durant 15 min (si es vol transformar, no cal aturar la reacció).

2.4.2.2.8. Seqüenciació del DNA

Un cop obtingudes les construccions plasmídiques corresponents, ha calgut confirmar si el clonatge era correcte i, també, si la seqüència del gen de l'EGF no tenia cap error. El mètode que s'ha seguit ha estat l'enzimàtic de Sanger (Sanger et al., 1977 i Sanger Coulson, 1978), també anomenat mètode del didesoxiribonucleòtid. L'electroforesi capil·lar d'elevada resolució de la reacció de seqüenciació s'ha dut a terme en els Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona.

S'ha utilitzat el kit comercial Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA), el qual utilitza l'AmpliTaQ™ DNA polimerasa FS. Aquest sistema es basa en reaccions de seqüenciació cíclica amb didesoxiribonucleòtids marcats amb un fluoròfor. L'enzim AmpliTaQ™ DNA polimerasa FS és una variant de la polimerasa de *Thermus aquaticus* que es caracteritza perquè no té activitat correctora 3'-5', d'aquesta manera s'evita l'eliminació dels ddNTP's que s'incorporen a la cadena i aturen la síntesi. La tècnica es basa en la síntesi d'una cadena complementària a la cadena motlle fins que s'incorpora un didesoxiribonucleòtid marcat fluorescentment (ddNTP) al qual li manca el grup OH en 3' de la ribosa, fet que provoca l'aturada de la síntesi de la cadena, ja que la polimerasa, en absència de l'extrem OH 3' de la ribosa, no pot seguir incorporant els dNTPs. D'aquesta manera es van generant fragments de diferents mides aleatòriament, els quals són posteriorment separats i identificats per mitjà d'un seqüenciador automàtic (ABI prism 310 genetic analyser, d'Applied Biosystems, EUA). La identificació dels fragments es pot fer gràcies a la presència de fluoròfors units a cada un dels ddNTPs. Hi ha quatre ddNTP, un per cada nucleòtid, els quals porten incorporat un fluoròfor diferent, per facilitar la seva identificació.

QUADRE 3.25. Seqüenciació de DNA**Material i dissolucions**

Encebadors específics per amplificar el fragment del gen a seqüenciar (convé tenir present que el seqüenciador permet seqüenciar unes 400-500 bases amb capil·lar curt i fins a 700 bases amb el capil·lar llarg).

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (barreja de la PCR de seqüenciació que conté l'AmpliTaTM DNA polimerasa FS, el tampó Tris-HCl pH 9, la concentració de magnesi adequada, els dNTPs i els ddNTPs marcats fluorescentment) (Applied Biosystems, EUA)

Tampó precipitació dels ddNTP: EDTA 125 mM pH 8, acetat sòdic 3 M pH 5.2, etanol 100%

Etanol 70%

Template Suppression Reagent (TSR) (Applied Biosystems, EUA)

Tubs ABI 210 (Applied Biosystems, EUA)

ProtocolReacció d'amplificació

1. Es barregen en un eppendorf de PCR: 5 µL de DNA, 3 µL de Big Dye, 1 µL d'encebador, 1 µL d'aigua milliQ.
2. Es procedeix a la reacció d'amplificació. Les condicions són les següents: 3 min a 94°C / 25 cicles de: 10 s a 96°C, 5 s a 50°C, 4 min a 60°C / es guarda a 4°C.

Precipitació dels ddNTP fluorescents

3. Es barreja la reacció anterior amb 80 µL de tampó de precipitació dels ddNTP.
4. Es vorteja breument.
5. Es manté durant 15 min a temperatura ambient.
6. Es passa a tubs eppendorf d'1.5 mL.
7. Es centrifuga durant 20 min a 12000 rpm. Cal vigilar l'orientació dels tubs, per saber on estarà el pèl·let.
8. S'aspira el sobrenedant amb una pipeta pasteur connectada a una bomba de buit.
9. S'afegeixen 250 µL d'etanol 70%.
10. Es vorteja.
11. Es centrifuga durant 5 min a 12000 rpm. Cal vigilar l'orientació dels tubs.
12. S'aspira el sobrenedant.
13. S'assequen les mostres en una estufa a 30°C, mantenint-les a temperatura ambient durant una estona, o bé en un *speed vac*.
14. Es manté el pèl·let a 4°C preservat de la llum amb paper de plata.

Resuspensió del pèl·let de DNA marcat

15. S'afegeixen 30 µL de TSR.
16. Es manté durant 20 min a temperatura ambient.
17. Es vorteja suaument i es fa un pols de centrifuga.
18. Es col·loca durant 3 min a 94°C per desnaturalitzar-lo.
19. Es refreda durant 3 min a 0°C.
20. Es vorteja suaument i es fa un pols de centrifuga.
21. Es passa la mostra a tubs ABI 210, especials per al seqüenciador.

3.4.2.3. Mètodes de clonatge

El procés d'incorporació de DNA forà present en el medi per part de les cèl·lules bacterianes s'anomena transformació. La introducció de vectors plasmídics, que poden portar o no inserts, en cèl·lules de la soca *E.coli*, es realitza per mitjà de la transformació, en cèl·lules competents, d'aquesta soca.

2.4.2.3.1. Preparació de cèl·lules competents pel mètode del CaCl_2

L'obtenció de cèl·lules competents s'ha realitzat d'acord amb el protocol que s'especifica. El mètode és una variació de Maniatis del descrit per Cohen *et al.* (1972), i ha estat aplicat per obtenir cèl·lules competents de totes les soques d'*E.coli* emprades. En aquest protocol és molt important treballar en condicions estèrils i que un cop s'han refredat les cèl·lules no es tornin a temperatura ambient fins al moment d'utilitzar-les.

QUADRE 3.26. Obtenció de cèl·lules competents

Dissolucions

Medi de cultiu LB o 2YT

CaCl_2 75 mM. Es prepara al moment, s'autoclava i es manté en fred.

Protocol

1. S'inoculen 30 mL de medi de cultiu distribuït en 2 tubs de 50 mL (cal posar poc volum per tal d'aconseguir una bona oxigenació). Es punxa, amb un escuradents estèril una mostra de cèl·lules provinents d'un glicerinat, i es col·loca dins el tub amb el medi.
2. S'incuben els tubs a 37°C fins que l'absorbància a 550 nm sigui aproximadament 6 (de 3 a 5 hores depenent de la soca). S'observa terbolesa.
3. Es centrifuguen els tubs durant 10 min a 4000 xg a 4°C.
4. Es decanta de forma asèptica el sobrenedant, i es resuspèn el pèl·let en la meitat del volum inicial de CaCl_2 75 mM estèril i fred. En aquest pas és millor no utilitzar el vòrtex ni cap mètode violent sinó pipetejant lentament i suau.
5. Es deixen els tubs en gel durant 15 min.
6. Es repeteixen els passos 3, 4 i 5, 3 vegades.
7. Es decanta de forma asèptica el sobrenedant i es resuspèn el pèl·let en 1/10 del volum inicial de CaCl_2 75 mM estèril i fred.
8. Les al·lotes sobreres de cèl·lules competents es poden aprofitar barrejant-hi glicerol a una concentració final del 15% (v/v). Es mantenen a -80°C (s'hi poden guardar durant 6 mesos, sense descongelar-les).

2.4.2.3.2. Transformació de cèl·lules competents

QUADRE 3.27. Transformació de cèl·lules competents

Material i dissolucions

Medi de cultiu (LB o 2YT)

Medi de cultiu sòlid en placa de petri, suplementades amb antibiòtic.

Ampicil·lina (100 mg/mL)

Cloramfenicol (100 mg/mL)

Protocol

1. Es descongela una al·lota de 100 μL de cèl·lules competents mantenint-les en gel durant 10 min.
2. S'afegeix màxim 50 ng del DNA en un volum inferior al 5% de cèl·lules competents. Es barreja suaument i s'incuba 30 min en gel.
3. S'incuba a 42°C exactament 1 min 45 s.
4. Es transfereix ràpidament en gel i s'hi manté durant 5 min.
5. S'afegeixen 250 μL de medi de cultiu.
6. S'incuba a 37°C durant, com a màxim, 1 h.
7. Es sembren al·lotes de 100 μL en plaques de medi que seleccioni o permeti identificar els transformants (suplementades amb ampicil·lina o, en casos especials, amb cloramfenicol).
8. Es mantenen les plaques a 37°C no més de 24 h, per evitar la formació de colònies satèl·lit.

2.4.2.3.3. Selecció de colònies transformants

Una vegada s'han obtingut colònies transformants, cal seleccionar aquelles que són portadores del vector amb l'insert, ja que hi ha la possibilitat que hi hagi hagut relligament del vector sense incorporar el fragment de DNA que es vol clonar. També pot ser que s'hagi incorporat més d'un insert al vector. Per tot això cal fer un anàlisi del DNA per tal de detectar aquestes reaccions i la millor manera és fer una extracció minipreparativa de DNA plamídic d'algunes de les colònies aparegudes a la placa després de la transformació i sotmetre, després, aquest DNA a una digestió amb un o varis enzims de restricció, per tal d'aclarir la presència de l'insert a la construcció incorporada per les cèl·lules. El producte d'aquesta digestió es carrega en un gel d'agarosa, juntament amb marcadors de pes molecular i una digestió de vector sense insert digerit amb els mateixos enzims de restricció, com a control.

3.4.3. Tècniques de detecció d'RNA missatgers

En el present treball s'han estudiat, en diverses ocasions, els canvis en els nivells d'expressió de determinats gens després de l'adició d'algun factor de creixement o fàrmac. S'han utilitzat dues tècniques per tal de detectar els canvis en l'mRNA: la RT-PCR semiquantitativa i la PCR a temps real. En un primer moment, no es disposava de la tecnologia necessària i es va dur a terme la semiquantitativa. Temps després, es va gaudir de l'oportunitat de poder treballar amb l'equip adequat i, els experiments posteriors, es van dur a terme mitjançant la PCR a temps real, que d'altra banda és una tècnica més fiable.

A continuació s'explica el procés previ a la detecció de l'RNA missatger que comprèn el tractament de les cèl·lules, l'extracció d'RNA total, la seva quantificació, i l'anàlisi del seu estat i puresa per mitjà del gel d'agarosa. Posteriorment, s'expliquen, per separat, les tècniques de RT-PCR semiquantitativa i PCR a temps real.

3.4.3.1. Tractament de les cèl·lules

S'han sembrat les cèl·lules en medi complet i quan la confluència ha estat d'aproximadament el 60-70% (indicatiu que el creixement és exponencial), s'ha procedit de diferent manera segons la finalitat de l'estudi:

Estudi de l'efecte de factors de creixement. En aquest cas es deixaren les cèl·lules durant 16 hores sense sèrum, i passat aquest temps se'ls aplicà diferents tractaments en medi incomplet.

Estudi de l'efecte de fàrmacs. No calgué deixar-les 16 h sense sèrum, sinó que immediatament es tractaren en medi complet.

Un cop finalitzat el tractament, es tripsinitzaren, i el pèllet es va rentar dues vegades amb PBS fred i tractat amb DEP. Aquest pèllet es va mantenir a -80°C fins al moment del seu processament.

3.4.3.2. Extracció d'RNA total

En el procés d'extracció d'RNA cal tenir molta cura en la manipulació per tal que la mostra no es contami ni de ribonucleases que destruïrien l'RNA. Això representa certa

dificultat ja que l'ambient que ens envolta està ple de ribonucleases (pell, microorganismes, material de laboratori, etc.). Per això cal treballar sempre amb guants nets, autoclavar tot el material de plàstic i utilitzar-lo només per l'extracció d'RNA, netejar el material de vidre amb NaOH 1 N i esbandir-lo amb aigua destil·lada estèril i tractada amb dietilpircarbonat al 0.1% (DEP). Aquest tractament amb DEP es fa durant tota una nit i, posteriorment, s'han d'autoclavar les dissolucions per tal d'eliminar el DEP que és tòxic.

L'RNA s'ha obtingut mitjançant l'extracció amb un kit comercial que es basa en el mètode de Chomczynski i Sacchi.

QUADRE 3.28. Extracció d'RNA

Material i dissolucions

High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Alemanya). Inclou: tampó de lisi i unió, tampó d'incubació (se li ha d'afegir DNAsa: 10 µL per cada 90 µL de tampó), tampó de rentat I, tampó de rentat II i tampó d'elució, tubs recol·lectors, columnes PBS tractat amb DEP

Protocol

Els volums corresponen a un pèl·let de 10^6 cèl·lules.

1. Es resuspèn el pèl·let de cèl·lules en 200 µL de PBS fred i tractat amb DEP (aquest volum correspon a un pèl·let de 10^6 cèl·lules).
2. S'afegeixen 400 µL de tampó de lisi i unió i es barreja bé.
3. Es combina la columna amb el tub de recol·lecció i es pipeteja la mostra al compartiment superior.
4. Es centrifuga durant 15 s a 10000 rpm. Es descarta el volum que queda en el tub (eluit) i es torna a combinar la columna amb el tub.
5. S'afegeixen 100 µL de tampó d'incubació amb DNAsa, prèviament afegida, a la columna i s'incuba durant 15 min a temperatura ambient.
6. S'afegeixen 500 µL de tampó de rentat I a la columna, es centrifuga durant 15 s a 10000 rpm i es descarta l'eluit. Es tornen a combinar la columna amb el tub.
7. S'afegeixen 500 µL de tampó de rentat II a la columna i es procedeix com en el pas anterior.
8. S'afegeixen 200 µL de tampó de rentat II a la columna i es centrifuga durant 2 min a màxima velocitat per tal d'eliminar les restes de tampó de rentat.
9. Es descarta el tub de recol·lecció i s'introdueix la columna en un eppendorf.
10. Per eluir l'RNA, cal afegir 50-100 µL de tampó d'elució a la columna, i centrifugar durant 1 min a 10000 rpm.

3.4.3.3. Quantificació de l'RNA total

El mètode utilitzat per quantificar l'RNA ha estat l'espectrofotòmetre.

QUADRE 3.29. Quantificació d'RNA

L'espectrofotòmetre amb el qual s'ha treballat, permet utilitzar cubetes amb les quals només calen 250 µL de mostra o de dilució d'aquesta per tal de poder mesurar l'absorbància (Genequant II, (Pharmacia Biotech, Suècia)).

La concentració d'RNA es calcula de la següent manera: es prenen 1.3 µL de mostra i es dilueixen en 260 µL d'aigua milliQ tractada amb DEP (dilució 1:200). Es llegeix l'absorbància a 260 nm en cubetes de quars tractades amb NaOH 1 N i rentades amb aigua milliQ tractada amb DEP i autoclavada. S'estimen 40 µg d'RNA total per cada unitat de densitat òptica. En una aproximació de la puresa, es considera que la relació A_{260} / A_{280} ha de ser superior a 2.

Un cop quantificat, i per determinar l'estat i puresa d'aquest RNA, es procedí a fer un gel d'agarosa. Quan s'ha utilitzat el kit comercial d'extracció d'RNA, en cap cas ha calgut fer un tractament posterior amb DNasa ja que l'RNA extret sempre s'ha obtingut lliure de DNA. Immediatament després, i si tots els passos anteriors eren correctes, s'ha procedit a fer la RT-PCR semiquantitativa o la PCR a temps real, segons procedís, d'aquest RNA. Aquestes dues tècniques s'expliquen a continuació.

3.4.3.4. *RT-PCR semiquantitativa*

Els nivells d'RNA poden ser semiquantificats amb varis mètodes, d'entre els quals cal incloure el *Northern Blot*, la hibridació "in situ" i la transcripció inversa amb amplificacions en cadena (RT-PCR). En l'anàlisi per *Northern Blot* i la hibridació "in situ" calen sondes marcades per tal d'hibridar-les amb l'mRNA i així reconèixer mRNA específics. El *Northern Blot* permet conèixer la mida dels mRNA i la hibridació "in situ" la seva distribució i, ambdós, poden ser semiquantitatius. La RT-PCR és un mètode indirecte de detecció de mRNAs i, si es compara amb aquestes dues tècniques més tradicionals, ofereix nivells més alts d'especificitat i sensibilitat i permet treballar amb quantitats més petites d'RNA.

Així doncs, en un primer moment, es van analitzar els canvis d'expressió gènica amb aquesta tècnica la qual permet estudiar, de forma indirecta, l'abundància relativa d'un determinat RNA missatger respecte l'abundància de l'mRNA d'un gen constitutiu.

2.4.3.4.1. Reacció de retrotranscripció (per a semiquantificació)

Aquesta tècnica consisteix en convertir l'mRNA a cDNA (DNA complementari) el qual és molt menys làbil i, per tant, és més senzill de manipular.

QUADRE 3.30. RT-PCR (per a semiquantificació)

Dissolucions

Encebador d'Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 0.5 µg/µL (Life Technologies, EUA): encebador que hibrida amb la cua poliA dels mRNA i que permet la síntesi de cDNA per part de la transcriptasa inversa.

10 mM dNTP (2-deoxinucleòsid 5'-trifosfat) (Life Technologies, EUA): els 4 tipus de nucleòtids dATP, dCTP, dGTP i dTTP a 10 mM cadascú.

0.1 M DTT

Superscript™ Rnase H 200 U/µL (Life Technologies, EUA): transcriptasa inversa

Tampó 5x: 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ (Life Technologies, EUA)

Aigua DEP: aigua lliure d'RNAses

Protocol

1. Es barregen en un eppendorf 2 µg d'RNA total de la mostra amb 1 µL d'oligo dT i x µL d'aigua DEP (el volum final ha de ser de 10 µL).
2. S'incuba la barreja durant 10 min a 70°C per tal de desnaturalitzar l'encebador i l'RNA.
3. Es deixa en gel.

4. S'afegeix a l'ependorf: 6 µL de tampó x5, 1 µL de dNTP, 2 µL de transcriptasa inversa i 10 µL d'aigua DEP.
5. S'incuba la barreja durant 1 h 30 min a 37°C per tal que es doni la transcripció inversa
6. S'atura la reacció col·locant la mostra durant 10 min a 70°C.
7. Es manté el cDNA a 4°C (ús immediat) o bé es conserva a -20°C.

2.4.3.4.2. Reacció d'amplificació en cadena (PCR)

L'expressió de l'EGFR s'analitzà per mitjà de reaccions d'amplificació en cadena amb la polimerasa (PCR) utilitzant el cDNA com a cadena motllo i encebadors específics pel gen que es volia analitzar, en aquest cas el de l'EGFR. Es van realitzar RT-PCR semiquantitatives on s'utilitzà l'expressió de GAPDH (gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa), proteïnes constitutives, com a control intern d'expressió. El nombre de cicles utilitzats fou 30. Els encebadors utilitzats es mostren a la Taula 2.4.

ENCEBADOR (5'-3')	T _m	pb amplificades	Finalitat
<i>EGFR dret</i> GCTGCCAAAAGTGTGATCCAAG	54	699	Expressió del receptor d'EGF (EGFR)
<i>EGFR invers</i> CATGGAGGTCCGTCCTGTTTTTC	54		
<i>GAPDH dret</i> TGTTGCTCTGGGTATTG	60	368	Expressió del, gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (gen constitutiu)
<i>GAPDH invers</i> TGATGATAAGGACAGCCA	60		

Taula 2.4. Característiques dels encebadors utilitzats en la RT-PCR semiquantitativa.

En aquest cas la PCR es realitzà a partir d'un kit comercial, la *PCR Supermix*, el qual conté la polimerasa i els dNTP. A continuació es detalla el protocol de PCR per a RT-PCR semiquantitativa.

QUADRE 3.31. Reacció d'amplificació en cadena (PCR) per a semiquantificació de l'RNA
<p>Dissolucions La concentració dels encebadors és de 50 pmol/µL en TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA) <i>PCR Supermix</i> (Life Technologies, EUA): 22 mM Tris HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dCTP, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 22 U recombinant Taq DNA Polimerasa/mL, estabilitzants.</p> <p>Protocol</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Es barregen en un eppendorf: 1.3 µL de cDNA, 0.7 µL de la barreja 1:1 dels encebadors (18 pmol d'encebador dret i invers), 18 µL de PCR Supermix. 2. Es col·loca al termociclador. El programa és: 10 min a 94°C / 30 cicles de: 60 s a 94°C, 60 s a T_m, 90 s a 72°C / 10 min a 72°C / 4°C.

Les diferents mostres es carregaren en un gel d'agarosa (apartat), es visualitzaren amb el transiluminador i es captà la imatge amb la càmera fotogràfica. Els films s'escanejaren i s'analitzà la quantitat relativa de cada banda respecte la corresponent del gen constitutiu, mitjançant el programa Quantity-One (Bio-Rad, EUA).

3.4.3.5. PCR a temps real

La PCR a temps real, també anomenada PCR quantitativa, va ser comercialitzada el 1995. Aquest mètode es basa en la relació quantitativa existent entre la quantitat de mostra inicial i la quantitat de producte de PCR a qualsevol cicle d'aquesta. Aquesta metodologia és considerada la més puntera d'entre totes les tècniques per tal de quantificar l'expressió de gens. És un mètode molt sensible i reproduïble. En el present treball s'ha utilitzat la tecnologia d'Applied Biosystems, en concret el seu sistema de detecció ABI PRISM.

La tècnica es basa en les sondes TaqMan les quals contenen un *reporter* marcat fluorescentment (el marcatge més habitual és la fluoresceïna (6-FAM)) i un *quencher* no marcat. Quan la sonda està intacta, la proximitat del *reporter* al *quencher* fa que s'apantalli la fluorescència del primer degut a la transferència d'energia del tipus Förster (Förster, 1948; Lakowicz, 1983). Durant la PCR la sonda s'uneix específicament a la seqüència complementària del gen (cDNA) entre els llocs d'unió dels encebadors. Només aquelles sondes que s'hagin unit al cDNA seran degradades per l'activitat exonucleasa 5' de la DNA polimerasa AmpliTaq. El tall fa que el *reporter* es separi del *quencher* i, per tant, la fluorescència del primer pugui ser detectada (figura 2.2). Aquesta fluorescència anirà augmentant a mesura que avancin els cicles. Aquest increment en la fluorescència només es donarà si el cDNA que es vol amplificar té una part complementària a la sonda, i si és amplificat durant la reacció de PCR. La quantitat de fluorescència és mesurada a cada cicle, per tant el que s'obté és una mesura a temps real dels canvis en l'amplificació del gen. El valor de *Ct* que s'obté serveix per comparar les diferents mostres analitzades, i es calcula mitjançant la identificació del cicle de PCR en el qual la fase exponencial de la corba és, per primer cop, detectable. Això permet una quantificació molt acurada de l'expressió de gens en una mostra determinada.

Pel que fa els encebadors, Applied Biosystems ha introduït al mercat els anomenats Assays-on-Demand els quals contenen dos encebadors i la sonda marcada. Les condicions de PCR per a tots aquests assajos són les mateixes, per tant es poden processar diferents gens alhora en una mateixa placa. A més a més, garanteixen la mateixa eficiència d'amplificació per a tots els gens.

Referent a la quantificació, aquesta pot ser absoluta o relativa. En aquest cas, s'ha utilitzat la quantificació relativa ja que no ens interessava quantificar els nivells de mRNA de cada gen sinó solament comparar-ne els nivells entre mostres tractades i mostres control.

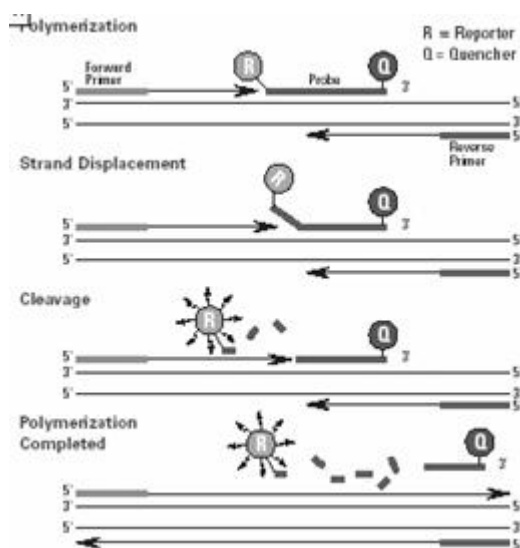


Fig 2.2. Unió de la sonda a la seqüència diana i posterior trencament d'aquesta per part de la DNA polimerasa AmpliTaq fent ús de la seva activitat exonucleasa 5'. Això permet finalment l'emissió de fluorescència.

2.4.3.5.1. Reacció de retrotranscripció (per a PCR a temps real)

La reacció de retrotranscripció s'ha dut a terme amb un kit comercial d'Applied Biosystems, ja que el que s'havia utilitzat anteriorment no permetia l'ús del cDNA obtingut per fer PCR a temps real.

QUADRE 3.32. RT-PCR (per a PCR a temps real)

Material i dissolucions

High-Capacity cDNA Archive Kit que conté: tampó RT x10, barreja de dNTP x25, encebadors aleatoris x10, retrotranscriptasa MustiScribe RT 50 U/ μ L.
Aigua DEP

Protocol

1. Es barregen els diferents components del kit per tal que la concentració de cada un quedi reduïda

- a la meitat: tampó RT x5, barreja de dNTP x12.5, encebadors aleatoris x5, retrotranscriptasa 125 U/mostra, aigua DEP fins a un volum final de 25 µL. Així la barreja quedarà a una concentració final x2.
2. Es barreja la mescla anterior amb el mateix volum, 25 µL, de mostra. La concentració final de tots els components és x1.
 3. S'inicia la reacció de retrotranscripció. El programa és el següent: 10 min a 25°C / 2 h a 37°C. La mostra es conserva a -20°C fins al moment de la seva utilització.

2.4.3.5.2. *PCR a temps real*

Quan es disposa del cDNA, aquest es sotmet a un procés de PCR a temps real.

QUADRE 3.33. PCR a temps real

Material i dissolucions

TaqMan Gene Expression Assays: betacel·lulina (Hs00156140), EGF (Hs00153181), TGF α (Hs00608187), epiregulina (Hs00154995), amfiregulina (Hs00155832), neuregulina 1 (Hs00247620), TATA box binding protein (Hs99999910).

TaqMan x2 Universal PCR Mastermix

Aigua DEP

Plaques de 96 pouets amb tires de taps (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Flat Optical caps)

Protocol

1. Es barregen en un pou de la placa: 1 µL de TaqMan Gene Expression Assay x20, 10 µL de TaqMan x2 Universal PCR Mastermix, 7 µL (ajustar volums de mostra i, si cal, d'aigua).
2. Es tapa la placa amb les tires de taps.
3. Es col·loquen les plaques a l'aparell ABI PRISM i s'inicia la PCR. El programa és el següent: 10 min a 95°C / 40 cicles de: 15 s 95°C, 60 s 60°C.
4. S'analitzen els resultats de *C_t* obtinguts.

3.5. TÈCNIQUES DE TREBALL AMB PROTEÏNES

Un dels objectius d'aquest treball ha estat la posada a punt d'un mètode d'obtenció d'una proteïna recombinant, l'EGF, així com de variants d'aquesta. Això ha comportat la utilització de diverses tècniques d'expressió, purificació, modificació per mitjà de digestió proteolítica i caracterització. En primer lloc, s'explica la tècnica d'expressió de proteïnes, i a continuació les tècniques de purificació utilitzades. Aquest apartat es subdivideix segons les diferents construccions plasmídiques a partir de les quals s'ha obtingut la proteïna recombinant, ja que la localització d'aquesta ha depès d'aquest fet. A continuació, es detalla la metodologia d'obtenció de variants de l'EGF mitjançant digestió proteolítica. Per últim, es parla dels diferents tipus de caracterització que s'han dut a terme de les mostres proteiques

3.5.1. Expressió de proteïnes recombinants

En aquest treball s'ha treballat amb dos mètodes generals d'expressió de proteïnes recombinants: la derivada dels vectors d'expressió de la família pET i la derivada del vector d'expressió pNIII/OmpA3. En cada una de les etapes, les condicions han estat lleugerament diferents segons s'hagi treballat amb un sistema o altre. Això és degut a la diferent localització de la proteïna recombinant produïda en cada una de les construccions plasmídiques: en el cas dels vectors de la família pET ha estat bàsicament intracel·lular, i utilitzant el vector pNIII/OmpA3 l'expressió ha estat extracel·lular. A continuació es detallen, per separat, les condicions generals d'inoculació i inducció del cultiu, així com el fraccionament cel·lular.

3.5.1.1. *Inoculació i creixement del cultiu*

El que normalment s'ha fet ha estat fer créixer un precultiu de nit a partir d'una única colònia de la soca desitjada per tal d'utilitzar-lo com a inòcul per al cultiu d'expressió. Per a aquests cultius s'ha utilitzat una concentració de 200 µg/mL d'ampicil·lina en medi LB o 2YT, i 50 µg/mL d'ampicil·lina en medi M9CAS. Aquest precultiu s'ha fet créixer tota una nit a 37°C i 250 rpm.

El matí següent es procedeix a la inoculació:

- Per a un cultiu de medi LB o 2YT suplementat amb ampicil·lina fins a 150 µg/mL (i 75 µg/mL de cloramfenicol, si cal), s'inocula 1/100 del volum total de cultiu provinent del cultiu de nit (inòcul). S'incuba a 37°C en agitació (250 rpm).
- En el cas de medi M9CAS, aquest es suplementa amb ampicil·lina fins a 50 µg/mL i s'inocula 1/100 de cultiu de nit. S'incuba a 37°C en agitació intensa (300 rpm)

3.5.1.2. Inducció del cultiu

Es deixa créixer el cultiu a 37°C en agitació durant 2-3 hores, fins que assoleix una densitat òptica (550 nm) d'entre 0.6 i 1. En aquest moment s'afegeix IPTG (inductor) a una concentració final de 2 mM. La dissolució mare d'IPTG (200 mM) s'ha d'esterilitzar per filtració i es guarda a -20°C.

- En el cas de treballar amb vectors de la família pET, després de 3-4 hores de creixement, posteriors a la inducció, el cultiu es centrifuga a 15000 rpm durant 20 minuts aproximadament, i el pèllet amb les cèl·lules es pot guardar congelat a -20°C fins al moment de començar el procés de purificació.
- Quan s'ha treballat amb el vector pNIII/OmpA3, el cultiu s'ha deixat créixer durant 24 hores, posteriors a la inducció. Seguidament, s'ha centrifugat el cultiu 2 vegades a 10000 xg durant 20 min en una centrífuga refrigerada. El sobrenedant s'ha guardat a 4°C fins al moment del seu processament. També es pot congelar però degut a la gran quantitat de volum es recomana processar-lo quant abans millor.

3.5.1.3. Fraccionament cel·lular

Degut al fet que la localització cel·lular de la proteïna recombinant ha estat diferent en cada cas, el protocol de fraccionament cel·lular així com la purificació posterior també han variat. Així doncs, a partir d'ara, els processos per a cada construcció plasmídica s'expliquen per separat.

2.5.1.3.1. Obtenció de fraccions cel·lulars en pET21b-EGF i pET22b-EGF

En aquest cas la proteïna es trobava completament localitzada a la fracció intracel·lular insoluble del cultiu. El protocol seguit per a l'obtenció de la fracció esmentada ha estat el que es detalla al Quadre 3.24.

QUADRE 3.34. Obtenció de fraccions cel·lulars per a pET21b-EGF i pET22b-EGF
<p>Dissolucions Dissolució I: TrisHCl 20mM, EDTA 2.5mM, pH 8.5 Dissolució II: TrisHCl 20mM, EDTA 2.5 mM, Tritó X-100 2%, pH 8.5</p> <p>Protocol Els volums són referits a 1 L de cultiu.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Es centrifuga el cultiu a 15000 xg durant 10 min a 4°C. 2. Es resuspèn el pèl·let en 100 mL de Dissolució I. 3. Es manté durant 10 min en gel i es sonica 10 min a 50w de potència amb polsos entremitjos de 0.5 s. 4. Es centrifuga a 22000 xg durant 30 min a 4°C. El sobrenedant correspon a la part intracel·lular soluble. 5. Es resuspèn el pèl·let en 100 mL de Dissolució II. 6. Es centrifuga a 22000 xg durant 30 min a 4°C. 7. El pèl·let correspon a la fracció intracel·lular insoluble del cultiu (cossos d'inclusió).

2.5.1.3.2. Obtenció de fraccions cel·lulars en pET32b-EGF

En aquest cas la proteïna es trobava localitzada tant a la fracció intracel·lular soluble com insoluble, per tant va caldre recuperar-les totes dues. També cal tenir en compte que com que el pròxim pas de purificació ha estat una cromatografia d'afinitat per níquel (la proteïna de fusió té una cua d'histidines) el tampó de resuspensió també ha hagut de ser diferent.

QUADRE 3.35. Obtenció de fraccions cel·lulars per a pET32b-EGF
<p>Dissolucions Tampó d'unió a la reina x8: Imidazol 40mM, NaCl 4M, Tris-HCl 160mM pH 7.9</p> <p>Protocol Els volums són referits a 1 L de cultiu.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Es centrifuga el cultiu a 5000 xg durant 10 min a 4°C. 2. Es resuspèn el pèl·let en 320 mL de tampó d'unió x1. 3. Es sonica durant 10 min a 50w de potència amb polsos entremitjos de 0.5 s. 4. Es centrifuga a 20000 xg durant 15 min a 4°C. Es guarda el sobrenedant ja que correspon a part de la fracció intracel·lular soluble del cultiu. 5. Es resuspèn el pèl·let en 160 mL de tampó d'unió x1. 6. Es sonica durant 5 min a 50w de potència amb polsos entremitjos de 0.5 s. 7. Es centrifuga a 20000 xg durant 15 min a 4°C. Juntament amb el sobrenedant del pas representen la part intracel·lular soluble del cultiu.

2.5.1.3.3. Solubilització de cossos d'inclusió

En tots els casos en què s'ha treballat amb vectors de la família pET, sempre hi ha hagut expressió intracel·lular insoluble de la proteïna recombinant. En el cas de pET21b(+) aquesta expressió ha representat la totalitat, mentre que en el cas de pET32b(+) la fracció insoluble només ha representat una part de la totalitat de proteïna expressada. Sigui com sigui, per tal de solubilitzar la proteïna ha calgut aplicar agents desnaturalitzants, que en aquest cas han estat la urea i el clorur de guanidini. La urea s'ha utilitzat per a la proteïna expressada a partir de la construcció pET32b-EGF ja que, anteriorment en el nostre grup, s'havia vist que el tampó amb urea era més adequat que no pas l'equivalent amb clorur de guanidini per, en un següent pas, passar la mostra per la columna d'afinitat. Per a l'EGF obtingut a partir de la construcció pET21b-EGF s'ha utilitzat clorur de guanidini com agent desnaturalitzant.

Les fraccions intracel·lulars insolubles es varen resuspendre en 1/50 del volum inicial de dissolució de solubilització que fou en cada cas:

- EGF (pET21b-EGF): Clorur de guanidini 5M, DTT 30mM, pH 8.5
- Thrx-EGF (pET32b-EGF): Tampó d'unió a la reïna x1 amb Urea 6M

Es mantingué durant unes 5-6 hores a temperatura ambient, el primer cas, i a 4°C el segon. Per a Thrx-EGF, després d'aquest temps, la mostra es va centrifugar a 39000 xg durant 20 min a 4°C; el sobrenedant corresponia a la fracció insoluble solubilitzada. Per a l'EGF obtingut a partir de la construcció pET21b-EGF, després d'aquest temps, la mostra es dialitzà enfront TrisHCl 0.1 M pH 8.5 durant 24 hores; la mostra dialitzada corresponia a la fracció insoluble solubilitzada.

2.5.1.3.4. Obtenció de fraccions cel·lulars de pINIII OmpA3-EGF

En aquest cas la proteïna es trobava localitzada al medi de cultiu. Tot i que, un cop posada a punt la tècnica de purificació no calgué, en cada ocasió, analitzar si hi havia proteïna recombinant a l'espai periplasmàtic, sí que s'hagué de testar els primers cops. És per això que a continuació es detalla el protocol sencer amb el qual es poden separar les parts extracel·lular, intracel·lular i espai periplasmàtic del cultiu d'*E.coli*. En aquest cas, i com que el vector pINIII OmpA3 no comporta l'expressió de la proteïna a l'espai intracel·lular, el pèllet no ha estat processat. Si, per contra, es volgués processar, un cop

obtingut s'hauria de seguir el protocol que ja ha estat descrit d'aïllament i solubilització de cossos d'inclusió.

QUADRE 3.36. Obtenció de fraccions cel·lulars de pINIIIompA3-EGF

Dissolucions

Tampó de rentat: NaCl 0.9%

Tampó de resuspensió: Sacarosa 25%, EDTA 1 mM

Aigua milliQ

Protocol

Els volums són referits a 1 L de cultiu.

1. Es centrifuga el cultiu a 10000 xg durant 20 min a 4°C.
2. El sobrenedant correspon a l'espai extracel·lular del cultiu. Es manté a 4°C fins a ser processat (es recomana processar-lo tan aviat com sigui possible, i evitar congelar-lo). El pèl·let conté les cèl·lules.
3. Es renta el pèl·let amb 100 mL de tampó de rentat.
4. Es centrifuga el cultiu a 10000 xg durant 20 min a 4°C.
5. Es resuspèn el pèl·let en 100 mL de tampó de resuspensió.
6. Es manté en agitació durant 10 min a temperatura ambient.
7. Es centrifuga a 10000 xg durant 10 min a 4°C.
8. Es resuspèn el pèl·let en 100 mL d'aigua freda. Es manté en agitació durant 10 min a 4°C.
9. Es centrifuga a 10000 xg durant 10 min a 4°C.
10. El sobrenedant correspon a l'espai periplasmàtic. Es conserva a 4°C fins a ser processat (es recomana processar-lo tan aviat com sigui possible, i evitar congelar-lo). El pèl·let correspon a la fracció intracel·lular.

El medi extracel·lular, abans de ser processat, es centrifuga a 10000 xg durant 20 min a 4°C, dues vegades. Les restes de pèl·let que puguin quedar es descarten.

3.5.2. Purificació de proteïnes recombinants

Un cop es va haver fraccionat el cultiu, es procedí a la purificació de l'EGF. El protocol de purificació ha variat segons la localització de la proteïna que depèn de la construcció plasmídica utilitzada.

3.5.2.1. Purificació de l'EGF a partir de la fracció intracel·lular soluble

L'avantatge d'aquest tipus d'expressió és que, en principi, la proteïna ja està ben plegada. Això és força teòric ja que en realitat el fet que es trobi a la fracció soluble no garanteix un correcte plegament, i menys en el cas de proteïnes que tenen ponts disulfur, ja que necessiten una sèrie de proteïnes anomenades xaperones per formar-los i que no es troben presents en la sòcia utilitzada. És per això que caldrà un pas final de plegament

de la proteïna. A diferència, però, de la fracció insoluble, aquesta no cal que sigui desnaturalitzada.

Aquest tipus d'expressió s'ha donat en el vector pET32b(+) en el qual l'EGF està unit a una altra proteïna, la tioredoxina, i a més a més duu una cua d'histidines a la part N-terminal, entre ambdues proteïnes. És per això que el sistema de purificació utilitzat ha estat la cromatografia d'afinitat per níquel. En un següent pas, el que s'ha fet és plegar la proteïna.

2.5.2.1.1. Cromatografia atmosfèrica d'afinitat

Les columnes utilitzades han estat les HiTrap™ Chelating Sepharose®, (Amersham Pharmacia Biotech, Suècia), les quals s'han d'activar amb níquel. La cua d'histidines és capaç de quelar metalls divalents i per tant té elevada afinitat pel níquel. Aquesta afinitat es deu a l'accessibilitat dels anells imidazol de la cadena lateral de la histidina. Els tampons utilitzats contenen una concentració creixent d'imidazol. A poc a poc es van eluint, per competència amb l'imidazol, les proteïnes que tenen afinitat creixent pel níquel. Finalment, només es manté unit a la columna l'EGF que conté la cua d'histidines. Aquest s'elueix mitjançant l'augment de la concentració d'imidazol. S'ha utilitzat una bomba peristàltica per fer les elucions pertinents. El flux ha estat de 0.5 mL/min. S'han recollit fraccions de 5 mL..

QUADRE 3.37. Cromatografia d'afinitat per níquel**Material i dissolucions**

HiTrap™ Chelating Sepharose® (Amersham Pharmacia Biotech, Suècia)
 Tampó d'unió a la reïna x8: Imidazol 40mM, NaCl 4M, Tris-HCl 160mM pH 7.9
 Tampó de rentat x8: Imidazol 480mM, NaCl 4M, Tris-HCl 160mM pH 7.9
 Tampó d'elució x8: Imidazol 4M, NaCl 2M, Tris-HCl 80mM pH 7.9
 Tampó de regeneració x8: EDTA 400mM, NaCl 2M, Tris-HCl 80mM pH 7.9
 Tampó d'activació de la reïna: NiSO₄ 400mM
 Etanol 20%
 BSA (albúmina bovina sèrica) 0.1 mg/mL, en tampó d'unió x1

Protocol

1. Es renta la columna amb 5 volums d'aigua. Les columnes utilitzades han estat d'1 mL.
2. Es passen 7 volums de tampó d'activació x1.
3. Es passen 7 volums de tampó d'unió x1.
4. Quan la quantitat de proteïna sigui baixa, es passen 3 volums de BSA 0.1 mg/mL.
5. Es carrega la mostra corresponent a la fracció soluble del cultiu.
6. Es fa un primer rentat amb 10 volums de tampó d'unió x1. S'eluiran les proteïnes que no tinguin afinitat pel níquel.
7. Es fa un segon rentat amb 6 mL de tampó de rentat x2/3. S'eluiran les proteïnes que tinguin poca afinitat pel níquel.
8. S'elueix la proteïna (EGF unit a la tioredoxina amb cua d'histidines) amb 10 mL de tampó d'elució x1/4.
9. Es regenera la columna amb 5 volums de tampó de regeneració x1.
10. Es passen uns 30 volums d'aigua.
11. Es passen 20 mL d'etanol 20% per tal de protegir la columna de possibles contaminacions.

Les diferents fraccions han estat analitzades per mitjà d'un gel SDS-Page tenyit amb Coomassie o bé amb nitrat de plata. Les fraccions en les qual s'hi trobava EGF es van reunir i dialitzar.

2.5.2.1.2. Diàlisi

La diàlisi es realitza per eliminar les sals que s'han afegit durant la cromatografia i permetre així que no es concentrin de manera que podria resultar perjudicial per a les proteïnes durant altres processos. També s'ha utilitzat per fer un canvi de tampó abans o després d'una cromatografia o d'un procés de plegament.

S'han utilitzat sacs de diàlisi Spectra-Por (Spectrum Medical Industries, EUA), de límit de porus de 3500 Da, que permeten que, en posar-se en un medi fortament hipotònic respecte el medi de la mostra, les sals i partícules de pes molecular inferior a 3500 Da surtin de l'interior del sac, però que això no puguin fer-ho molècules amb un pes molecular superior, com és el cas de l'EGF.

En les diàlisis es van introduir els sacs en 3 o 5 litres d'aigua milliQ, i el procés es va repetir 3 vegades en períodes d'aproximadament 8 hores.

2.5.2.1.3. Plegament de la proteïna

Per plegar la proteïna purificada s'ha utilitzat glutatió oxidat i glutatió reduït. Després de la purificació, les mostres que contenien EGF s'han liofilitzat i resuspès en un tampó de plegament (TrisHCl 0.1M, GSSG 2mM, GSH 4mM, pH 8.5). S'ha mantingut durant 24 hores a 22°C.

Posteriorment s'ha dialitzat enfront Acètic 10mM i quantificat espectrofotomètricament. Finalment, s'ha tornat a liofilitzar i s'ha mantingut liofilitzat a -20°C o dissolt en Acètic 10mM BSA 0.2% a -80°C (en alíquotes de volums petits).

3.5.2.2. Purificació de l'EGF a partir de la fracció intracel·lular insoluble

L'expressió intracel·lular normalment ha cursat en una insolubilitat de la proteïna en forma d'agregats anomenats cossos d'inclusió. Aquests, tot i ser fàcils d'aïllar, representen un problema i és que cal una posterior solubilització i replegament de la proteïna i com a conseqüència disminueix bastant el rendiment final de proteïna recombinant.

El protocol utilitzat ha variat segons el sistema d'expressió de partida. Així doncs, si la construcció utilitzada ha estat la pET21b-EGF s'ha fet una primera cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic, una segona cromatografia de gel filtració en sistema FPLC, i per últim el plegament de la mostra en presència d'agents reductors i oxidants. Quan s'ha treballat amb la construcció pET32b-EGF s'ha passat la mostra per una columna d'afinitat per níquel seguint el protocol descrit al quadre 2.37., amb la única diferència que en aquest cas, i com que es treballava en condicions desnaturalitzants, els tampons contenien urea 6M; tots els altres passos han estat els mateixos que quan s'ha partit de la fracció intracel·lular soluble del cultiu.

A continuació es detalla el protocol utilitzat per a purificar l'EGF recombinant a partir de la fracció insoluble del cultiu de pET21b-EGF.

2.5.2.2.1. Cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic

La cromatografia de bescanvi iònic s'utilitza per separar molècules que difereixen en la seva càrrega. Els bescanviadors iònics solen ser resines amb grups carregats, units de forma covalent, els quals poden interaccionar amb molècules de càrrega oposada

mitjançant forces electrostàtiques. El fonament es basa en què les molècules carregades queden adsorbides, de forma reversible, a la reïna bescanviadora, i poden ser eluïdes per mitjà de la modificació d'aquest entorn iònic (amb amortidors de pH, força iònica o composició diferent a la utilitzada en el primer estadi de manera que, els components de l'amortidor competeixin amb les substàncies unides al bescanviador). Com que la unió al bescanviador és diferent per a cada substància, s'aconsegueix separar, en gran part, les diferents substàncies presents a la mostra inicial.

L'EGF és una proteïna que té un punt isoelèctric de 4.62, per tant cal triar un bescanviador aniònic, que en aquest cas ha estat el DEAE (dietilaminoetil). El pH de treball ha estat 6.5 al qual l'EGF es troba carregat negativament i pot unir-se al bescanviador que està carregat positivament. L'elució s'ha realitzat mitjançant l'augment de la força iònica, amb la qual cosa s'ha aconseguit que les interaccions electrostàtiques entre proteïna i reïna siguin més febles.

El protocol es detalla a continuació.

QUADRE 3.38. Cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic

Material i dissolucions

Reïna de bescanvi aniònic DEAE-Sepharose (Sigma, Espanya)

Tampó A: fosfat 0.1 M pH 6.5, NaCl 25 mM

Tampó B: fosfat 50 mM pH 6.5 NaCl 25 mM

Tampó C: fosfat 50 mM pH 6.5 NaCl 0.9 M

Tampó D: fosfat 50 mM pH 6.5 NaCl 1 M

Tampó de conservació: etanol 20%

Protocol

Preparació i empaquetament de la reïna

1. Es renta amb 2 L d'aigua milliQ.
2. Es renta amb 300 mL de tampó A.
3. Es renta amb 300 mL de tampó B.
4. S'empaqueta la columna.
5. S'equilibra durant tota la nit, a un flux de 0.1 mL/min, amb tampó B.

Mètode cromatogràfic

6. Es resuspèn la mostra en tampó B. Si la mostra no s'ha liofilitzat el que s'ha de fer, prèviament, és una diàlisi enfront tampó B.
7. Es fa passar la mostra. A partir d'aquí el flux passa a ser d'1 mL/min.
8. Es fan passar 100 mL de tampó B.
9. S'aplica el gradient: 100 mL de tampó B + 100 mL de tampó C.
10. Es fan passar 100 mL de tampó D, per acabar d'eluir les proteïnes que encara estan unides a la reïna.
11. Es desmunta la columna.
12. Es renta amb 2 L d'aigua milliQ.
13. Es renta amb 200 mL de tampó de conservació, amb el qual es manté la reïna.

A continuació, es mesura l'absorbància a 280 nm de les diferents fraccions, s'elabora el cromatograma, i es realitza un ELISA per tal de determinar en quines fraccions es troba present l'EGF. El mètode d'ELISA utilitzat es basa en el descrit en l'apartat 2.3.3.3. Pel que fa als anticossos, com a primari se n'ha utilitzat un de policlonal que reconeix l'EGF (Santa Cruz Biotechnology, EUA), i com a secundari el GAR-Po (Pierce, EUA).

Les fraccions que contenen EGF es van agrupar, dialitzar enfront aigua milliQ i liofilitzar.

2.5.2.2.2. Cromatografia de gel filtració en sistema FPLC

La cromatografia de gel filtració permet separar proteïnes segons la seva massa molecular. El mètode es basa en la utilització d'un material porós, o gel, amb una estructura de porus definida. Les molècules amb una grandària superior al porus del gel només es mouren en l'espai que queda entre les partícules del gel, mentre que les que són més petites podran difondre, també, cap a l'interior de les partícules amb una probabilitat que augmenta a mesura que disminueix la grandària molecular. Per tant, el moviment de descens a través de la columna varia en funció de la mida molecular i les molècules són eluïdes per ordre de grandària decreixent.

La columna utilitzada, Superdex 75 HR 10/30 permet obtenir una elevada resolució en la separació de proteïnes i pèptids entre 3 i 70 KDa. El volum de columna és de 24 mL, aproximadament, la pressió màxima 1.8 MPa i el flux de treball recomanat és de 0.5 mL/min. És molt important que la mostra tingui un volum d'entre 25 i 250 µL per tal que la separació sigui òptima. El sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) automatitzat permet controlar el gradient aplicat així com l'absorbància a 280 nm.

QUADRE 3.39. Cromatografia de gel filtració en sistema FPLC**Material i dissolucions**

Tampó: Tris HCl 50 mM, NaCl 200 mM pH 7.5 (cal desgasificar-lo)

Aigua milliQ desgasificada

Etanol 20% desgasificat

Protocol

1. En primer lloc, es fa un rentat de les bombes amb aigua milliQ.
2. Es renta el sistema FPLC amb aigua milliQ durant 10 min a un flux 1 mL/min
3. Es munta la columna a l'equip. A partir d'aquest moment, cal anar molt amb compte de no sobrepassar la pressió màxima que pot suportar la columna. Per això cal controlar molt bé el flux.
4. Es renta amb 2 volums de columna d'aigua milliQ.
5. S'equilibra amb 2 volums de columna de tampó.
6. Es prepara la mostra: es resuspèn el liofilitzat amb tampó, es centrifuga durant 10 min a 13000 xg i es descarta el pèl·let. Cada punxada que s'ha fet ha estat de 100 µL per tal que la resolució de separació fos bona.
7. Programa cromatogràfic: 0.5 volums de columna de tampó / injecció de la mostra / 1 volum de columna de tampó.
8. Es renta amb 2 volums de columna de tampó.
9. Es renta amb 2 volums de columna d'aigua milliQ.
10. Es fa passar 1 volum de columna d'etanol 20%.
11. Es desconnecta la columna del sistema.
12. Es renta el sistema amb aigua milliQ.
13. Es renta el sistema, per a la seva conservació, amb etanol 20%.

Les fraccions recollides s'analitzaren en un ELISA per a la detecció de l'EGF. D'altra banda, la puresa s'ha determinat per mitjà d'un gel SDS-Page tenyit amb nitrat de plata i Western blot. Les fraccions que contenien EGF es van reunir, dialitzar enfront aigua milliQ, quantificar espectrofotomètricament i liofilitzar.

3.5.2.3. Purificació de l'EGF a partir de la fracció extracel·lular

Aquest tipus d'expressió té l'avantatge que, teòricament, la proteïna ha d'estar ben plegada ja que a l'espai periplasmàtic hi ha les proteïnes i l'ambient adequats per tal que l'EGF pugui formar correctament els tres ponts disulfur que conté. Com ja s'ha comentat, amb la utilització del vector pNIIIompA3, en principi, l'expressió de la proteïna hauria de ser periplasmàtica, però s'ha vist que no és així sinó que és extracel·lular. Això n'ha facilitat més la seva recuperació, però ha obligat a treballar, inicialment, amb volums més grans. Com a conseqüència, abans de procedir a la purificació ha calgut un pas previ de concentració de la mostra mitjançant la filtració tangencial. Els passos cromatogràfics posteriors han estat els mateixos que ja s'han descrit en l'apartat anterior: bescanvi aniònic i gel filtració. En aquest cas, no ha calgut plegar la proteïna.

2.5.2.3.1. *Filtració tangencial*

Aquesta tècnica ha permès concentrar 25 vegades el volum inicial de medi de cultiu. Això ha fet més senzilla i factible una posterior etapa cromatogràfica. S'ha treballat amb l'aparell Minitan (Millipore®, EUA) i amb una membrana de cel·lulosa que permet el pas de molècules de menys de 5 KDa. Així, al medi concentrat s'hi trobaran totes aquelles molècules de més de 5 KDa, entre elles l'EGF el qual té una massa molecular de 6 KDa. El procés de muntatge de l'aparell i de concentració de la mostra es detallen a continuació.

QUADRE 3.40. Filtració tangencial

Material i dissolucions

Minitan (Millipore®, EUA)

Membrana de cel·lulosa: Prep/Scale®-TFF cartridge (Millipore®, EUA)

NaOH 1 M

Aigua destil·lada

Formaldehid 1%

Protocol

Muntatge de l'aparell

1. Es connecten el tub de desgast i de recirculació a la membrana.
2. El tub de desgast s'aboca a un vas de precipitats; el de recirculació s'aboca al vas que conté la mostra i s'hi col·loca una pinça per regular-ne la pressió.
3. Es connecta el tercer tub, el que prendrà la mostra. S'aboca al vas que conté la mostra i la conduirà fins a la membrana, per tant també es connecta a la membrana tot passant, abans, per l'aparell de filtració tangencial el qual regularà la velocitat de captació.
4. El vas de precipitats que conté la mostra es manté en gel, igual que el vas que contindrà el volum descartat.
5. Quan no es vol que hi hagi recirculació (en rentats): el tub de recirculació no es pinça, i s'aboca el seu contingut al vas de descartat.
6. Quan es vol que hi hagi recirculació (durant la concentració): el tub de recirculació es pinça i s'aboca el seu contingut al vas que conté la mostra.
7. La pressió màxima quan hi ha recirculació no pot superar els 12 psi.

Procés de concentració

8. Es passen 2 L d'aigua destil·lada sense recirculació.
9. Es passen 3 L d'aigua destil·lada amb recirculació durant 30 min.
10. Es passa la mostra (uns 2 L de mostra tarden, aproximadament 2 hores i mitja a concentrar-se). Quan el procés de concentració està cap al final, cal anar molt amb compte. S'ha d'intentar deixar el mínim volum al vas de la mostra i, quan es creu que el tub que pren la mostra ja no en podrà prendre més, cal parar el sistema i invertir el flux. Al cap d'uns segons es torna a invertir el flux i seguidament es recull la mostra que està dins el tub de recol·lecció. Quan comenci a sortir molta escuma, es para el sistema.
11. Es passen 2 L d'aigua destil·lada sense recirculació
12. Es passen 3 L d'aigua destil·lada amb recirculació durant 30 min.
13. Es passa 1 L de NaOH 1 M sense recirculació. Es van fent passar de 250 mL en 250 mL i, entremig, es deixa actuar durant 10 min.
14. Es passen 2 L d'aigua destil·lada sense recirculació.
15. Es passen 3 L d'aigua destil·lada amb recirculació durant 30 min.
16. Es renta la membrana durant 5 min amb formaldehid 1%, per a la seva conservació.

La mostra concentrada es dialitza enfront tampó fosfat 50 mM pH 6.5 NaCl 25 mM, per tal de preparar-la per a la cromatografia d'intercanvi aniònic. A continuació, es sotmeté

a una cromatografia de gel filtració en sistema FPLC i, finalment, la mostra es dialitza enfront aigua milliQ, es quantifica espectrofotomètricament i es liofilitza. Es conserva liofilitzada o dissolta en tampó Acètic 10 mM 0.2% BSA, a -80°C.

3.5.3. Obtenció de variants proteiques mitjançant digestió proteolítica

S'ha utilitzat aquesta metodologia per tal d'obtenir variants de l'EGF a les quals se'ls volia eliminar certs aminoàcids de la seva part C-terminal. A continuació, s'ha procedit a la purificació de les diferents formes amb una cromatografia de fase reversa en sistema FPLC.

3.5.3.1. Digestió proteolítica amb tripsina

La tripsina és un enzim serin-endopeptidasa que talla selectivament enllaços peptídics de lisina i arginina. El tractament amb TPCK al qual s'ha sotmès aquesta tripsina permet inactivar l'activitat quimiotrípica i d'autodegradació.

QUADRE 3.41. Digestió amb tripsina

Material i dissolucions

EGF (R&D, Anglaterra)
Modified Trypsin TPCK-treated (New England Biolabs, EUA)

Protocol

Després de testar moltes condicions i combinacions d'aquestes, les que han permès obtenir una més bona digestió són les següents:

EGF

Es prepara una dissolució mare 0.5 µg/µL
Es dissol en PBS pH 7.5, CaCl₂ 20 mM

Tripsina

Es reconstitueix en HCl 1.13 mM, CaCl₂ 1 mM pH 2-3
Es prepara una dissolució mare 0.5 µg/µl
La proporció tripsina vs. EGF en la reacció és de 1:20

Condicions d'incubació

Temps: 26 hores
Temperatura: 42°C

Per aturar la reacció s'afegeix TFA fins a 0.1%, i es congela a -20°C. Per a l'anàlisi de la digestió, es pren una alíquota de la reacció de digestió (amb uns 2 o 3 µl n'hi ha suficient) i s'analitza per MALDI-TOF. Aquesta metodologia no s'ha utilitzat personalment, sinó que les

mostres han estat processades al Servei de Proteòmica i Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.5.3.2. Cromatografia de fase reversa Vydac C4 en sistema FPLC

A continuació, i per tal de separar les diferents formes digerides d'EGF, s'ha dut a terme una cromatografia de fase reversa, Vydac C4 (Waters, EUA), en sistema FPLC. Aquest tipus de cromatografia es basa en el caràcter hidrofòbic que tenen les proteïnes. En introduir la mostra, es desnaturalitza i exposa els seus radicals hidrofòbics i interacciona amb les cadenes alifàtiques de la reïna. Per tal d'eluir les proteïnes de la columna, es crea un gradient amb aigua milliQ i solvent no polar (acetonitril), i es va augmentant la proporció d'aquest últim. D'aquesta manera, les proteïnes eluiran segons el seu caràcter hidrofòbic (de menys a més hidrofobicitat).

La columna Vydac C4 té un volum de 2.5 mL, una capacitat d'unió de 0.5 mg de proteïna, aguanta una pressió màxima de 12 MPa i el flux òptim de treball és de 0.5 mL/min.

QUADRE 3.42. Cromatografia de fase reversa en sistema FPLC

Material i dissolucions

Tampó A: aigua amb 0.1% TFA (desgasificat)
 Tampó B: acetonitril amb 0.1% TFA (desgasificat)
 Aigua milliQ (desgasificada)
 Acetonitril 50% (desgasificat)

Protocol

1. En primer lloc, es fa un rentat de les bombes amb aigua milliQ.
2. Es renta el sistema FPLC amb aigua milliQ durant 10 min a un flux 1 mL/min
3. Es munta la columna a l'equip. A partir d'aquest moment, cal anar molt amb compte de no sobrepassar la pressió màxima que pot suportar la columna. Per això cal controlar molt bé el flux.
4. Es renta amb 2 volums de columna d'aigua milliQ.
5. S'equilibra amb 2 volums de columna de tampó A.
6. Es prepara la mostra: es centrifuga durant 10 min a 13000 xg i es descarta el pèl·let. El volum de punxada ha estat de 500 µl.
7. Programa cromatogràfic: 15% tampó B en 2 volums de columna, de 15 a 35% de tampó B en 25 volums de columna, del 35 al 100% de tampó B en 2 volums de columna, 100% de tampó B en 2 volums de columna.
8. Es renta amb 2 volums de columna de tampó A.
9. Es renta amb 2 volums de columna d'aigua milliQ.
10. Es fa passar 1 volum de columna d'acetonitril 50%, per a la seva conservació.
11. Es desconnecta la columna del sistema.
12. Es renta el sistema amb aigua milliQ.
13. Es renta el sistema, per a la seva conservació, amb etanol 20%.

Les fraccions recollides foren altre cop analitzades per MALDI-TOF. Posteriorment, van ser liofilitzades, per tal d'eliminar les restes de solvents orgànics, redissoltes i quantificades espectrofotomètricament.

4A. CAPÍTOL I

4A.1. INTRODUCCIÓ GENERAL

4A.1.1. EL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGF)

4A.1.1.1. Estructura

El factor de creixement epidèrmic (EGF) és un polipèptid de 53 aminoàcids (6215 KDa) que inclou 6 cisteïnes que formen 3 ponts disulfur (figura 4A.1).

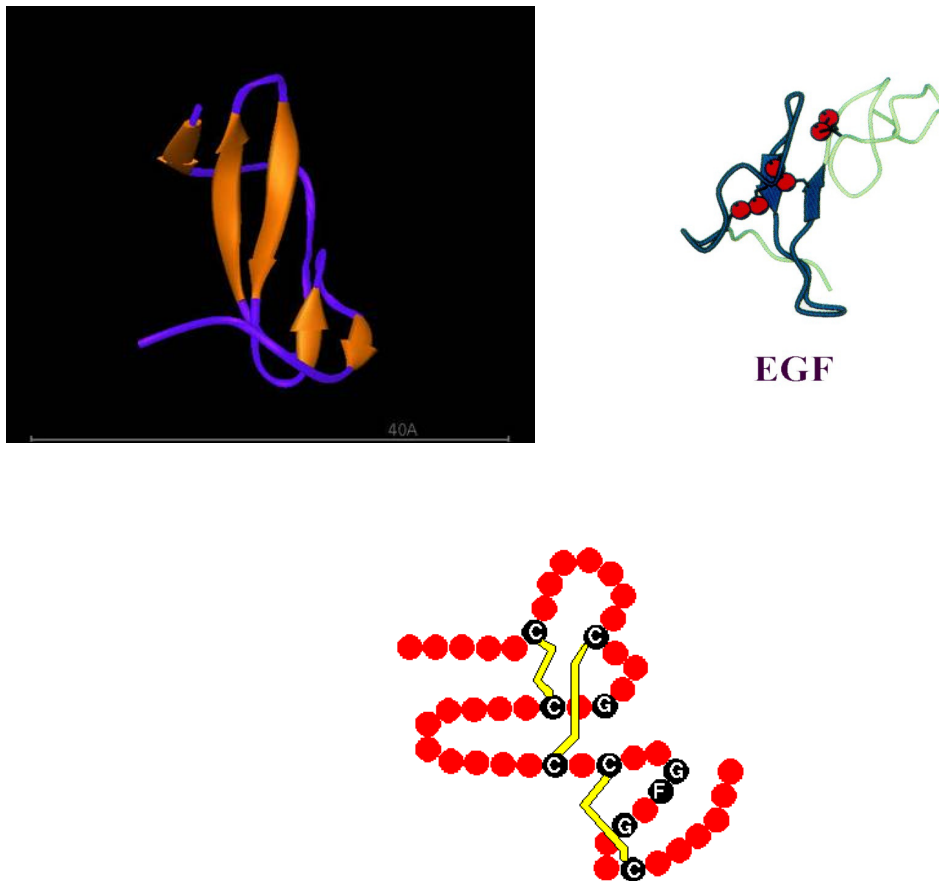


Fig 4A.1. Imatges on es mostra l'estructura tridimensional del factor de creixement epidèrmic amb el domini EGF ("T-Knot") constituït per les 6 cisteïnes que determinen els 3 ponts disulfur. (Extret de www-nmr.cabm.rutgers.edu, Lin i Nussinov 1995, i www.cryst.bbk.ac.uk, respectivament,).

L'EGF humà (hEGF) es sintetitza a partir d'una gran molècula precursora (Scott i col.,

1983; Shields i col., 1978) la qual s'obté per traducció d'un mRNA de 4800 bases que codifica per un polipèptid d'aproximadament 1207 aminoàcids. El domini extracel·lular consta de 8 regions de seqüència parcialment homòlogues a l'EGF madur. Cada un té aproximadament 40 aminoàcids. L'EGF madur només representa el 5% de la molècula precursora i està situat en el domini extracel·lular. El domini transmembrana està format per 25 aminoàcids, la majoria hidrofòbica, disposats en hèlix- α (fig 4A.2).



Fig. 4A.2. Representació esquemàtica del precursor del factor de creixement epidèrmic (EGF). Les 2 regions hidrofòbiques, a l'extrem N-terminal i prop del C-terminal, corresponen al pèptid senyal (PS) i al domini transmembrana (TM). Les 8 repeticions similars "EGF-like", riques en Cys, i l'EGF madur es troben al domini extracel·lular del precursor.

En el ratolí, l'EGF (mEGF) es sintetitza igual que en els éssers humans, és a dir, mitjançant un precursor de 1217 aminoàcids, i presenta una estructura molt semblant a la de l'hEGF. L'EGF de cavall presenta un 60-70% d'homologia amb el de les dues espècies descrites.

4A.1.1.2. Distribució

L'EGF es troba present en gairebé tots els fluids i secrecions corporals (Carpenter i col., 1990): orina, secrecions mamàries, fluids prostàtics i seminals, saliva, llàgrimes, líquid amniòtic, suor de la mama, suor de l'axila i suc gàstric. En tots ells, excepte en el suc gàstric i en la suor de l'axila, en els quals només s'hi detectava EGF de 6.2 KDa, s'hi ha trobat altres molècules d'EGF immunoreactives de més de 300, 170, 150, 70 i 20 KDa. Els fluids que presenten una heterogeneïtat més gran són l'orina, la llet i el plasma seminal.

A la sang, els nivells d'EGF madur són baixos, tot i que també s'hi troben presents formes d'elevat i baix pes molecular. Les formes d'elevat pes molecular constitueixen el 40% del total d'EGF en sang i sembla ser que s'uneixen al receptor amb una constant d'afinitat més baixa que la de l'EGF madur.

Al ronyó i a la glàndula mamària, el que s'acumula és el precursor de l'EGF i no la forma madura. Això fa pensar que el precursor per sí mateix té funcions fisiològiques addicionals (Parriers i col., 1995). Aquest precursor pot unir-se al receptor i activar la seva activitat tirosin quinasa, per tant sembla ser que no cal un processament per tal que el precursor pugui dur a terme la seva funció biològica.

4A.1.1.3. Funcions

Tot i que sembla car que l'EGF té un paper mitogènic, el seu paper fisiològic no s'ha pogut determinar del cert fins al moment. Hi ha estudis que han posat de manifest que pot induir multitud de processos tant en cèl·lules com en teixits, com poden ser la síntesi de proteïnes i DNA, i la proliferació cel·lular (Carpenter i col., 1979). També s'ha determinat que estimula la proliferació del tracte gastrointestinal i la síntesi d'enzims intestinals (James i col., 1987; Jaeger i col., 1990; Zijlstra i col., 1994). S'ha observat que també intervé en diverses activitats metabòliques i fisiològiques que inclouen l'estimulació del transport iònic, l'augment de la fosforil·lació proteica endògena i alteracions en la morfologia cel·lular (Pimental 1994; Lee i col., 1995).

4A.1.2. L'INHIBIDOR DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI)

4A.1.2.1. Característiques generals

El PCI és una proteïna petita de 39 aminoàcids rica en ponts disulfur i que no presenta ni metionina ni leucina en la seva seqüència. A la natura, es troba present en 5 isoformes de les quals la més abundant, i utilitzada en aquest treball, és la PCI-IIa. Aquesta isoforma té 39 aminoàcids, que representen un pes molecular de 4333 Da, i un punt isoelèctric de

5.8. (taula 4A.1).

Propietat	Isoforma				
	PCI-Ia	PCI-Ib	PCI-IIa	PCI-IIb	PCI-III
Pes Molecular	4219	4089	4333	4204	4075
Nº residus	39	38	39	38	37
Punt isoelèctric	4.6	4.6	5.8	5.8	6.5
K_i app. (CPA)	1.9-3.5 nM	1.9-3.5 nM	1.5-2.7 nM	1.5-2.7 nM	1.6-3.3 nM
K_i app. (CPB)	3.2-6 nM	3.2-6 nM	1.1-5.5 nM	1.1-5.5 nM	1.3-3.3 nM

Taula 4A.1. Característiques de les isoformes del PCI dels tubercles de patata.

La seqüència d'aminoàcids de les cinc isoformes és la següent:

	5	10	15	20	25	30	35
PCI-Ia	<EQHADPI	CNKP	CKTHDD	CSGAWF	CQA	CWNAAGT	CGPIVG
PCI-IIb	<EHADPI	CNKP	CKTHDD	CSGAWF	CQA	CWNAAGT	CGPIVG
PCI-IIa	<EQHADPI	CNKP	CKTHDD	CSGAWF	CQA	CWNSART	CGPIVG
PCI-IIb	<EHADPI	CNKP	CKTHDD	CSGAWF	CQA	CWNSART	CGPIVG
PCI-III	HADPI	CHKP	CKTHDD	CSGAWF	CQA	CWNSART	CGPIVG

El PCI es troba de forma natural a la patata (*Solanum tuberosum*). L'acumulació es dona en diversos òrgans d'entre els quals el tubercle és el que en presenta una major acumulació. La tija i les fulles n'acumulen en menor grau (Hass, 1979). Pel que fa la seva localització intracel·lular, el PCI s'acumula en els vacúols de les cèl·lules del mesòfil de les fulles (Hollander i Czytko, 1985). Ara bé, ja que aquesta molècula no és molt abundant a la patata, s'ha obtingut de forma recombinant en *Escherichia coli*. El gen utilitzat ha estat un gen sintètic el qual s'ha clonat en *E.coli* per tal de produir-lo en gran quantitat mitjançant un fermentador (Molina i col., 1992; Molina i col., 1994; Marino i col., 1994).

La funció o funcions fisiològiques del PCI no estan massa clares. S'ha suggerit que podria regular proteases endògenes de la patata, o bé tenir com a missió protegir-la contra proteases de plagues (insectes, fitòfags, fongs, etc.) (Ryan i col., 1974). S'ha descrit que el PCI inhibeix una carboxipeptidasa produïda pel fong entomopatogen de la cutícula de *Metarhizium amisopliae* (Leger i col., 1994), així com també la de certs bacteris. El fet que el PCI es trobi present en poca quantitat en els òrgans aeris en situació normal, i en canvi augmenti de dues a tres vegades en produir-se una ferida a la planta, fa pensar que una possible funció podria ser com a molècula defensiva contra els herbívors (Graham i Ryan, 1981). A més a més, s'ha comprovat que el PCI inhibeix el creixement del cuc *Diatrotica larval* que es troba en una espècie de blat de moro (Orr i col., 1994).

4A.1.2.2. Estructura tridimensional del PCI

El PCI és un clar exemple de proteïna mínima ja que tot i ser petita té una conformació globular que li confereix una estructura tridimensional estable i funcional. La proteïna té un nucli globular del qual en sobresurten l'extrem N-terminal (7 aminoàcids) i l'extrem C-terminal (5 aminoàcids) (figura 4A.3). Aquest nucli conté 3 ponts disulfur i forma, d'aquesta manera, un T-knot o nus de cisteïnes (Lin i col., 1995). També presenta una hèlix 3_{10} entre els residus 14 i 18 que és la única estructura secundària que té la molècula. Així doncs, la seva estructura tridimensional es basa en els tres ponts disulfur que es formen entre les cisteïnes 8 i 24, 12 i 27 i la 18 i 34, els quals formen un nucli al voltant del qual es plega la molècula. L'extrem C-terminal constitueix el centre d'unió primari del PCI a la carboxipeptidasa i s'introdueix en el centre actiu d'aquesta última durant la formació del complex PCI-CPA. Les simulacions per dinàmica molecular del PCI lliure, tant en absència com en presència de dissolvent (Oliva i col., 1991 a, b; 1992), revelen que aquest extrem presenta una conformació amb un alt grau d'estabilitat que manté una direccionalitat respecte al nucli central de l'inhibidor, molt semblant a la que posseeix en el complex PCI-CPA. En el manteniment d'aquesta direccionalitat, semblen tenir un paper important diversos ponts d'hidrogen que s'estableixen entre àtoms de la cadena principal dels residus de la cua i del nucli globular d'entre els quals cal destacar: Ala26-Gly35, Trp28-Pro36, Trp22-Tyr37 i Asp16-Tyr37.

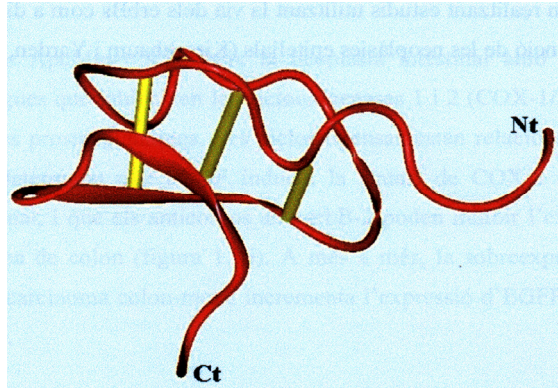


Figura 4A.3. Estructura de l'esquelet de carboni α del PCI representat en forma de cinta (els ponts disofre es mostren en groc; Nt: extrem N terminal; Ct: extrem C terminal)

4A.1.2.3. Aplicacions del PCI

El PCI pot tenir aplicacions clíniques, en el futur, en tres àmbits diferents:

S'ha trobat que el PCI, a baixes concentracions (5 $\mu\text{g/ml}$) i *in vitro*, inhibeix la transformació tumoral de cèl·lules embrionàries de ratolí, induïda per radiació (Billings i col., 1989). El PCI s'uneix primer a la membrana plasmàtica de les cèl·lules i s'internalitza ràpidament. També s'ha comprovat que d'inhibidor II de patata (un inhibidor serín-proteases) inhibeix la transformació tumoral induïda per radiació, i a més a més que ambdós inhibidors tenen un efecte sinèrgic, és a dir, el seu efecte supressor de la transformació tumoral s'incrementa si s'administren conjuntament. També s'ha demostrat àmpliament que els inhibidors de serín-proteases són supressors efectius de la carcinogènesi induïda químicament i per radiació, no només *in vitro* sinó també *in vivo* (Hocman, 1992). Això ha portat a suposar que existeix una serín-proteasa implicada en la transformació maligna de les cèl·lules. Els resultats obtinguts per Billings i col., suggereixen que hi ha, almenys, dues activitats proteases diferents involucrades en la transformació maligna de les cèl·lules: una serín-proteasa i una metal·loproteasa la qual pot ésser inhibida pel PCI.

Existeixen diverses carboxipeptidases reguladores implicades en el control de processos fisiològics en el cos humà com el processament d'hormones peptídiques i neurotransmissors (Gee i col., 1993; Wang i col., 1994). La majoria d'elles es troben a la membrana plasmàtica de les cèl·lules, amb el centre actiu que sobresurt a l'exterior.

Algunes d'aquestes carboxipeptidases són inhibides pel PCI, com passa amb la de mastòcits o la de placenta. Per això no és descartable que quan es conegui la funció fisiològica exacta d'aquestes carboxipeptidases i el seu possible paper en disfuncions i malalties, el PCI trobi aplicació com inhibidor d'aquestes en casos en què una excessiva activitat carboxipeptidàsica estigui implicada en la malaltia.

S'ha determinat que el PCI inhibeix el creixement de les línies cel·lulars tumorals de càncer de pàncreas humà, de càncer de vulva humà i d'insulinoma de ratolí. Aquest efecte apareix a llarg termini i es manté fins i tot en absència de l'inhibidor. Mitjançant diferents models animals s'ha pogut comprovar que el PCI inhibeix el creixement de tumors de cèl·lules pancreàtiques humanes inoculades en ratolins atòmics i també l'aparició de metàstasis en ratolins inoculats amb cèl·lules singèniques. A més a més, s'ha comprovat que el PCI allarga la supervivència de ratolins transgènics que desenvolupen insulinomes i tumors de plexus coroides (Blanco-Aparicio i col., 1998; Blanco, 1998; Sitjà-Arnau, 2001).

4A.1.3. EL PCI COM AGENT ANTITUMORAL. ANTECEDENTS DEL GRUP DE RECERCA.

El grup de recerca en el qual es troba emmarcat aquest treball fa anys que estudia el PCI i el paper d'aquest com antagonista del factor de creixement epidèrmic (EGF), així com el seu possible ús en teràpies anticancerígenes.

Fins el moment s'ha determinat que el PCI és un antagonista de l'EGF i que com a tal s'uneix al seu receptor (EGFR) i competeix amb el lligand natural, l'EGF, però amb una afinitat (IC_{50}) unes 160 vegades inferior. Tot i unir-se al receptor no n'indueix la dimerització però sí que induceix un lleuger augment de la fosforil·lació en tirosines, fenomen que es creu que permet que el receptor sigui internalitzat. El PCI, doncs, és internalitzat i com a conseqüència es produeix una *downregulation*. Un cop dins la cèl·lula s'ha observat que la seva localització és perinuclear. Passat un temps s'observa que induceix nova síntesi de receptor d'EGF. Aquest fenomen s'ha vist reflectit en un increment dels nivells proteics de receptor i del seu mRNA en cèl·lules de carcinoma mamari i pancreàtic. També s'ha vist que aquests canvis són específics del tipus cel·lular amb el qual es treballa (Blanco-Aparicio i col., 1998; Blanco-Aparicio 1998; Sitjà-Arnau i col., 2005;

Sitjà-Arnau 2001).

A nivell proliferatiu s'ha estudiat l'efecte del PCI tant en cèl·lules de carcinoma pancreàtic com mamari. S'ha observat que el PCI, en la majoria de línies cel·lulars, inhibeix l'efecte induït per l'EGF en la proliferació *in vitro*. Així mateix s'ha establert que el PCI actua com a agent citostàtic (tot i que no se sap molt bé de quina manera. Assaigs *in vivo* amb ratolins atímics han posat de manifest que el PCI inhibeix el creixement de les cèl·lules humanes de carcinoma pancreàtic injectades en aquests animals, i que allarga la supervivència de ratolins transgènics amb càncer de plexus coroide i insulinoma (Blanco-Aparicio i col., 1998; Blanco-Aparicio 1998; Sitjà-Arnau i col., 2005; Sitjà-Arnau 2001).

Per últim, s'han dut a terme estudis computacionals de comparació d'estructures tridimensionals de diferents molècules a través de la superposició de ponts disulfur, en col·laboració amb el grup de Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB), els quals han posat de manifest que el PCI presenta una estructura molt semblant a la que presenten tots els lligands de la família de l'erB. En concret, el PCI té, en la mateixa posició espacial, aminoàcids de característiques físico-químiques similars als aminoàcids de la superfície d'interacció del TGF- α al seu receptor (Sitjà-Arnau i col., 2005) (figura 4A.4) No obstant això, no presenta aminoàcids equivalents a l'extrem C-terminal del factor de creixement.

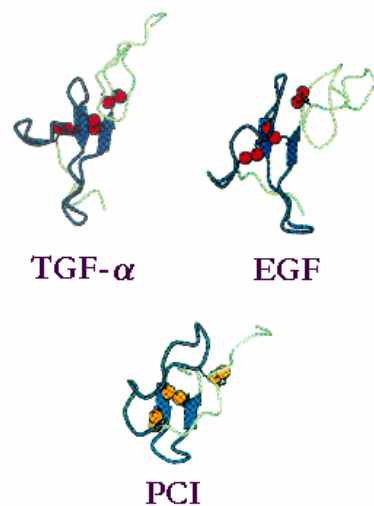


Figura 4A.4. Similituds estructurals entre l'EGF, el TGF- α i el PCI (extret de Lin i Nussinov, 1995)

Tots aquests resultats feren pensar que aquesta seria una bona via d'estudi per tal de, en el futur, poder trobar un agent que bloquegés de forma efectiva la via de transducció del senyal iniciada per l'EGFR. Ara bé, el possible ús terapèutic del PCI queda restringit degut, bàsicament, a tres problemes:

L'afinitat per l'EGFR és molt més baixa en comparació amb la del lligand natural, l'EGF.

Això fa que a l'hora de competir amb aquest, el PCI sempre estigui en desavantatge. En conseqüència, quan es fan tractaments amb PCI cal treballar amb quantitats 1.000 o 10.000 vegades superiors en relació amb la quantitat d'EGF.

Tot i unir-se a l'EGFR, sense aparentment activar-lo, el PCI no pot fer front a les altres vies d'activació de les quals disposa la cèl·lula: activació per altres receptors de membrana, xoc a l'atzar entre receptors, homodimerització erbB-2-erbB-2, l'activació del receptor d'EGFR mitjançant altres vies independents del lligand (Hackel i col., 1999), i per últim el *loop autocrí*. En resum, el sistema és molt complex.

El PCI actua com a agent citostàtic, per tant el seu efecte queda restringit a un retard en l'avenç del tumor o a una aturada del seu creixement, però mai a una regressió. Es creu que malgrat es millori la seva capacitat com antagonista no es millorarà la seva capacitat antitumoral.

Els dos últims problemes podrien ser solventats si, en una teràpia antitumoral, es combinés el PCI (agent citostàtic) amb un de citotòxic. Aquesta combinació s'ha vist que millora molt l'eficàcia del tractament i fa disminuir els efectes secundaris i la resistència desenvolupada pel tumor. En concret, s'ha observat que el tractament conjunt de cèl·lules de carcinoma de mama amb PCI i tamoxifén té un efecte sinèrgic: la presència de PCI permet reduir la concentració de tamoxifén necessària per obtenir la inhibició total del creixement *in vitro* induït per estrògens (Sitjà-Arnau i col., 2005). Ara bé, el problema de l'afinitat cal solventar-lo de manera diferent. El que cal fer és incidir sobre l'estructura del PCI i determinar què fa que aquest sigui menys afí que l'EGF per l'EGFR.

4A.1.4. PCI versus EGF

Com ja s'ha comentat anteriorment els estudis computacionals han posat de manifest que el PCI té una estructura molt semblant a la regió globular tant de l'EGF com del TGF- α , fet que li permetria unir-se al mateix receptor. Per altra banda, li manca la part

corresponent a la regió C-terminal d'ambdós lligands (McInnes i col., 2000; Sitjà-Arnau i col., 2005) (figura 4A.5).

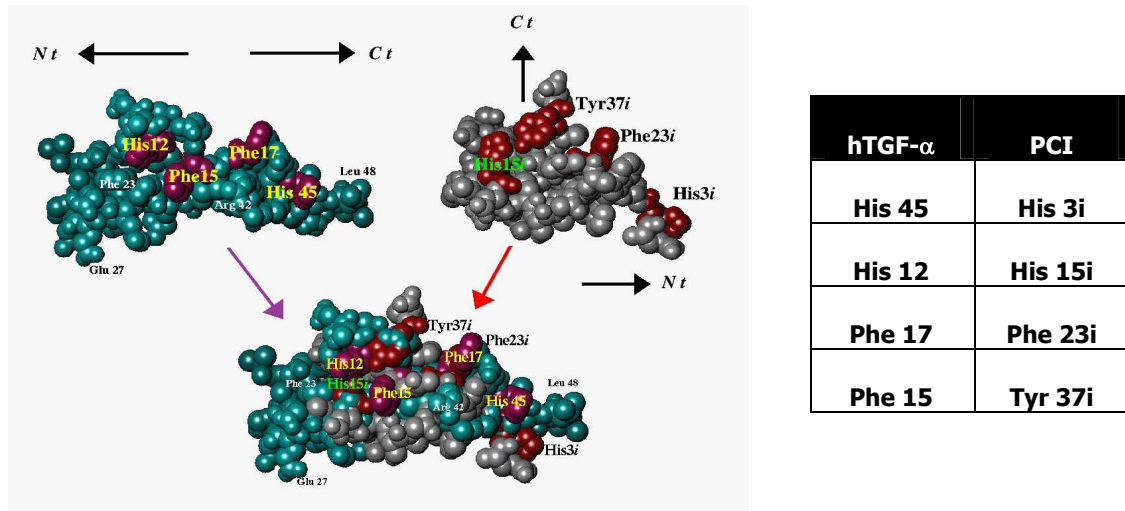


Figura 4A.5. Superposició de les estructures tridimensionals del PCI (en gris) i del TGF- α (en verd) d'acord amb la topologia dels seus tres ponts disulfur. S'indica l'orientació amb fletxes. Les cadenes laterals d'alguns aminoàcids claus per la unió del TGF- α a l'EGFR, com són els que s'indiquen a la taula s'han marcat en fúcsia, i les cadenes laterals dels aminoàcids importants del PCI s'han marcat en vermell. A la taula es mostren les coincidències espacials entre els aminoàcids del PCI i els aminoàcids importants per la unió del TGF- α humà a l'EGFR.

S'han fet moltes variants de l'EGF i també s'han dut a terme estudis de cristallització del lligand unit al receptor per tal de determinar quin paper juguen cada un dels aminoàcids en la unió i posterior dimerització i activació de l'EGFR. S'ha arribat a una sèrie de conclusions referents al paper jugat per certs aminoàcids de l'EGF en la unió a l'EGFR (Groenen i col., 1994; Campion i col., 1994; Van Zoelen i col., 1996; Lenferink i col., 1998; Garrett i col., 2002; Ogiso i col., 2002).

Els ponts disulfur són vitals per a l'estructura i estabilitat de l'EGF.

L'estructura de l'EGF es divideix en tres regions: A (Cys6-Cys20), B (Cys14-Cys31) i C (Cys33-Cys42).

Sembla que l'Asn32, ubicada entre dos cisteïnes, funciona com a nexa entre les zones B i C.

La regió B de l'EGF interacciona amb el lloc 1 del domini I de l'EGFR, la regió A i l'Arg41 interaccionen amb el lloc 2 del domini II de l'EGFR, i la part C-terminal vora l'Arg45 interacciona amb el lloc 3 del domini III de l'EGFR.

Ile23 de l'EGF és indispensable per a la unió forta amb el receptor.

Mutacions a la Met21 i Leu26 de l'EGF van mostrar una reducció significativa en la capacitat d'unio de l'EGF al seu receptor.

L'Asn32 de l'EGF forma ponts d'hidrogen amb Gln16 de l'EGFR.

Leu15 i Tyr13 de l'EGF estableixen interaccions hidrofòbiques amb residus del receptor.

L'Arg41 de l'EGF forma un pont salí amb l'Asp355 de l'EGFR. De fet, aquest aminoàcid (Arg41) és clau en la unió d'elevada afinitat al receptor ja que estableix forces de van der Waals amb la Tyr13 del mateix EGF i amb Phe357 de l'EGFR.

La Leu47 de l'EGF estableix interaccions hidrofòbiques amb certs aminoàcids del lloc 3 de l'EGFR, i també és clau en la unió d'elevada afinitat a l'EGFR.

Gln43 i Arg45 estableixen ponts d'hidrogen amb aminoàcids del lloc III de l'EGFR.

Burgess i col., van veure que un mutant de l'EGF al qual li mancaven als aminoàcids del 47 al 53 (tenia, per tant, 46 aminoàcids) tenia disminuïda de forma molt significativa la seva activitat mitogènica, així com també una mica l'afinitat pel receptor. Veieren també que quan a aquest mutant se li afegia la leucina 47 es recuperava parcialment l'activitat mitogènica.

Agrupant tots aquests resultats, i mantenint com a objectiu el disseny d'una molècula amb les característiques del PCI però amb una afinitat pel receptor més elevada que aquest, es va decidir construir un mutant de l'EGF sense els 7 últims aminoàcids, és a dir l'EGF 1-47 al qual se l'ha anomenat EGF Truncat. La raó per la qual es trià aquest mutant en concret és perquè es creu que aquesta part de la molècula, la corresponent a la cua C-terminal, juga un paper decisiu en la inducció i estabilització del dímer de receptors. Es va creure que si s'eliminava aquesta part de la molècula es podria aconseguir un EGF capaç d'unir-se al seu receptor amb una afinitat força semblant al natiu (es mantenen tant l'arginina 41 com la leucina 47), però sense la capacitat d'induir la dimerització de receptors i conseqüent activació de la cascada de senyalització.

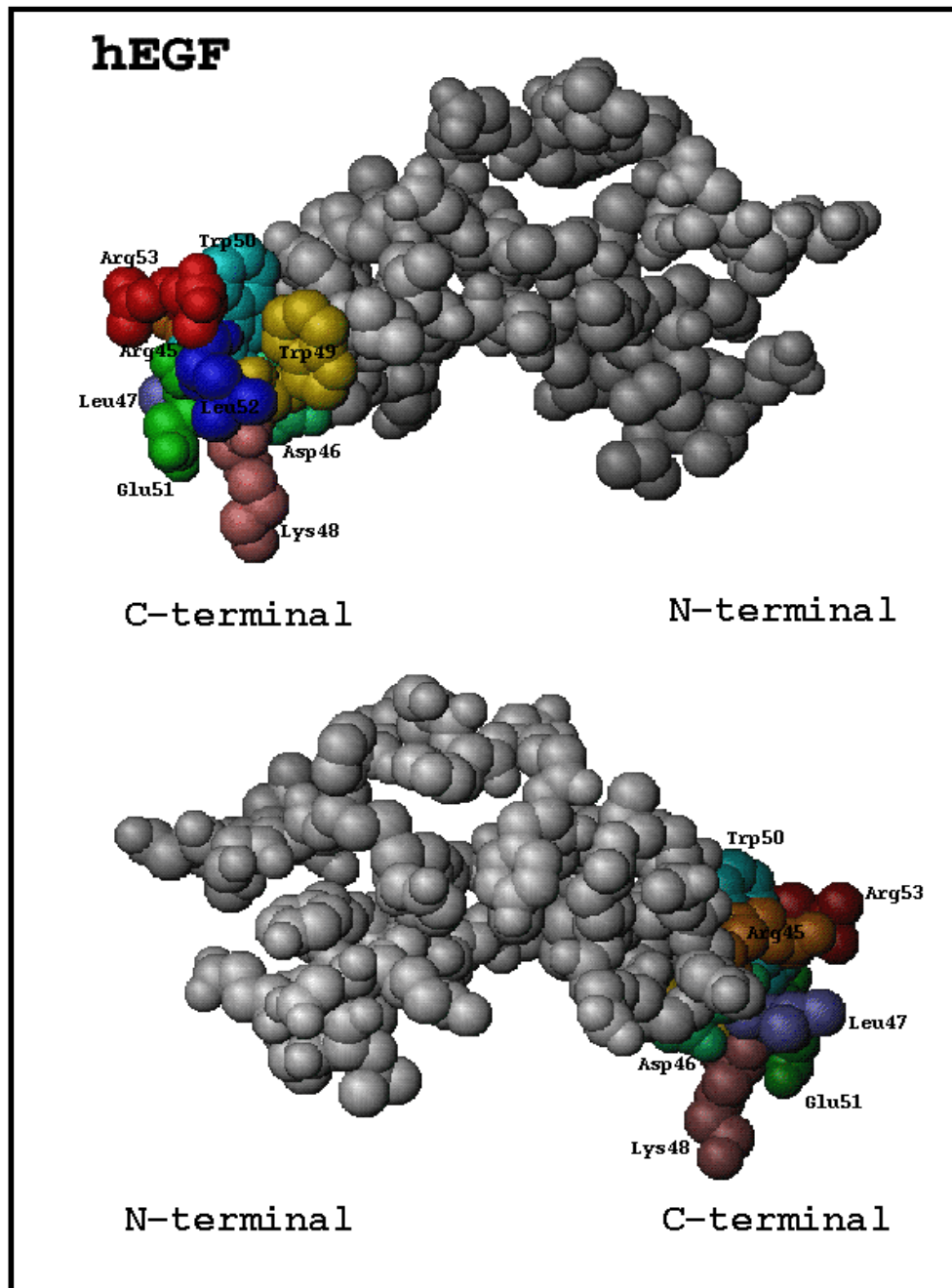


Figura 4A.6. Estructura tridimensional de l'EGF vista des de dos angles diferents. Es senyalen els extrems N i C-terminal. En colors estan marcats els aminoàcids de la cua C-terminal.

4A.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4A.2.1. Clonatge, expressió i purificació de l'EGF en un sistema d'expressió intracel·lular bacterià.

El primer pas per tal d'obtenir una forma truncada de l'EGF va ser el clonatge de l'EGF sencer en un sistema d'expressió bacterià. Són diversos els autors que han posat a punt diferents sistemes d'obtenció d'EGF recombinant que van des de l'expressió extracel·lular a la intracel·lular. La majoria obtenen rendiments acceptables de proteïna pura i activa al final del procés (Oka i col., 1985; Engler i col., 1988; George-Nascimento i col., 1988; Yagamata i col., 1989; Dudgeon i col., 1990, Lee i col., 2003; Lee i col., 2006). En el primer moment en què es decidí clonar l'EGF, es va optar per la família de vectors pET ja que permetien diferents estratègies per tal d'obtenir la proteïna recombinant i a més a més se'n tenien bons antecedents dins el grup de recerca. Els tres vectors que inicialment es varen escollir foren els següents:

pET21b: permet una expressió intracel·lular de la proteïna, normalment en nivells molt elevats.

pET22b: permet una expressió periplasmàtica de la proteïna ja que es fusiona el gen amb un pèptid senyal que direcciona la proteïna a l'espai periplasmàtic. A vegades, però, si l'expressió és molt elevada la proteïna s'acumula a l'interior cel·lular en forma de cossos d'inclusió.

pET32b: amb aquest sistema es fusiona el gen desitjat a una proteïna de fusió que en aquest cas és la tioredoxina. L'expressió sol ser citoplasmàtica i els nivells també solen ser elevats. La fusió amb la tioredoxina està pensada per afavorir el plegament i solubilització de la proteïna recombinant.

De cada un d'aquests tres vectors n'existeixen tres variants (a, b i c) segons el marc de lectura en el qual es troba el gen que es vol clonar. En aquest treball sempre s'ha utilitzat el vector amb la variant "b" ja que és el que està en la fase adequada per tal de poder expressar l'EGF.

4A.2.1.1. Obtenció del gen de l'EGF

El gen del factor de creixement epidèrmic humà (EGF) fou subministrat pel Dr. Seno el qual ens el féu arribar clonat en el vector pTB361 (figures 4A.7 i 4A.8). Tot i que segons el protocol que se'ns adjuntà, l'EGF podia obtenir-se per digestió, diferents assaigs que es van dur a terme van posar de manifest que el vector era de molt baix nombre de còpies i, com a conseqüència, en fer la digestió s'obtenien quantitats molt petites de DNA corresponent al gen. És per això que es va decidir extreure'l mitjançant PCR. Es van dissenyar encebadors que continguessin les seqüència tant de la diana per EcoRI a l'extrem 5' del gen, com de les dianes PstI i BamHI a l'extrem 3' (figura 4A.9).

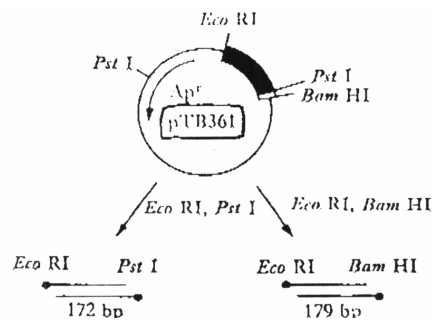


Fig 4A.7. Vector pTB361. Conté el gen del factor de creixement epidèrmic clonat entre les dianes EcoRI i PstI. També es mostra el producte i la longitud del fragment corresponent al gen de l'EGF, en ser digerit el vector amb els enzims EcoRI i PstI o bé EcoRI i BamHI.

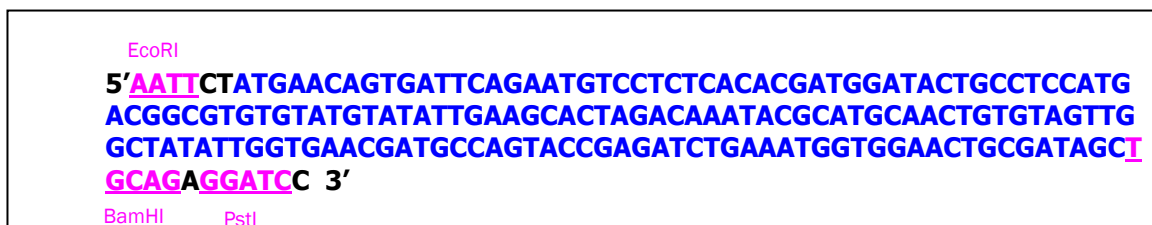


Fig 4A.8. Seqüència del gen del factor de creixement epidèrmic clonat al vector pTB361. En blau es mostra la seqüència pertanyent al gen de l'EGF, en negre les bases corresponents al vector, i en lila les dianes de restricció.

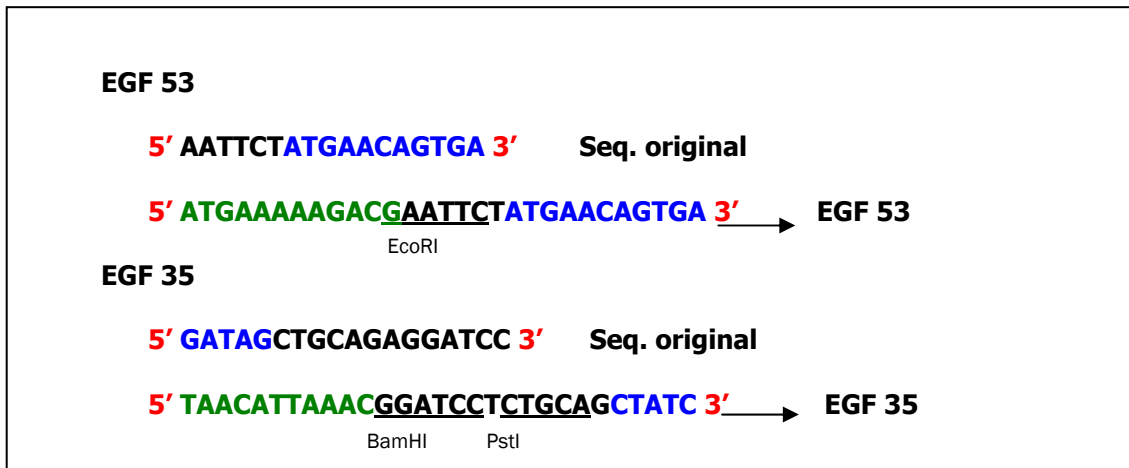


Fig 4A.9. Disseny dels encebadors per extreure, per PCR, el gen de l'EGF, clonat al vector pTB361. Es mostren les seqüències originals dels dos extrems (5' i 3') extretes de la figura 4.11. En negre es mostren les seqüències pertanyents al vector, i en blau les pertanyents al gen de l'EGF. En verd s'indiquen les bases que s'han introduït en els encebadors per tal que les dianes de restricció no quedin just als extrems dels mateixos.

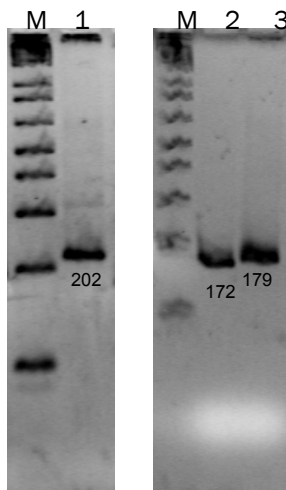


Fig 4A.10. Electroforesi en gel d'agarosa al 4% del producte de PCR i la posterior digestió per tal d'obtenir l'EGF el qual serà clonat en altres vectors. (M) Marcadors de pes molecular (1 Kb Plus DNA Ladder); (1) producte de PCR sobre el vector pTB361 amb els encebadors hEGF35 i hEGF53; (2) producte de PCR digerit amb *EcoRI* i *PstI*; (3) producte de PCR digerit amb *EcoRI* i *BamHI*. De cada banda se n'indica el nombre de parell de bases.

Com es pot observar a la figura 4A.10, els fragments obtinguts en la PCR i les posteriors digestions són els que cal esperar segons el disseny que es va fer inicialment i la informació que ens va proporcionar el Dr. Seno. La digestió amb *EcoRI* i *BamHI* es féu com a control però el producte no s'utilitzà per a tasques posteriors.

Arribat a aquest punt, ja es disposava del gen de l'EGF en suficient quantitat i es podia procedir al seu clonatge en vectors d'expressió. Abans, però, es decidí incloure un pas entremig com és el de la inserció en un vector de clonatge per tal d'obtenir-lo en quantitats elevades sempre que fés falta.

4A.2.1.2. Clonatge de l'EGF al vector pUC118

El vector pUC118 és un bon vector de clonatge ja que és multicòpia, és a dir, presenta una mutació en el gen que controla el nombre de còpies. Té un promotor lac i presenta resistència a l'ampicil·lina. Tot i que aquest plasmidi també s'hagués pogut utilitzar per expressar l'EGF, el fet que rendeixi quantitats de proteïna menors que els vectors de la família pET, ha fet que només s'hagi utilitzat com a pas entremig. A més a més, el fet de tenir clonat l'EGF a pUC118 va permetre tenir el gen en un plasmidi del qual se'n coneixien tant la seqüència com la regulació (en detriment de pTB361), i a més va permetre introduir la diana de restricció HindIII a 3' del gen la qual possibilitava la inserció de l'EGF als vectors pET.

Es va digerir el vector pUC118 amb els enzims de restricció *EcoRI* i *PstI* i es van lligar els productes amb el gen de l'EGF digerit, prèviament, amb els mateixos enzims. A continuació, es va transformar la reacció de lligació en cèl·lules *Escherichia coli* XL1-Blue i es van obtenir transformants els quals van ser posteriorment analitzats i seqüenciats. A la figura es mostra l'anàlisi d'un d'aquests clons que resultà ser positiu pel clonatge de l'EGF.

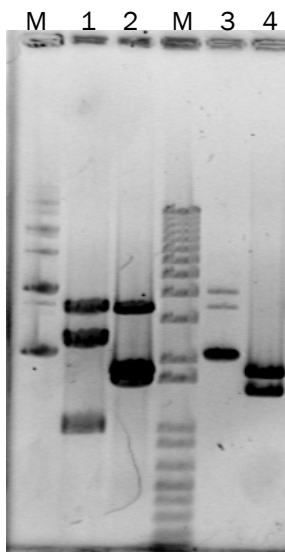


Fig 4A.11. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1.5% de les diferents digestions del clon positiu per EGF obtingut en la transformació, així com del vector pUC118. (M) Marcadors de pes molecular (1 Kb Plus DNA Ladder); (1) transformant digerit amb *Bgl II* i *Aat I* (2188 i 1146 pb); (2) transformant digerit amb *EcoR I* i *Sca I* (1727 i 1607 pb); (3) vector pUC118; (4) vector pUC118 digerit amb *Bgl II* i *Aat I* (3162 pb i vector linealitzat).

Es disposava, doncs, d'una construcció plasmídica que incloïa l'EGF (pUC118-EGF) i que era coneguda tant pel que fa la seqüència com la regulació. El pas més immediat fou el clonatge d'aquest gen de l'EGF, a partir d'aquesta construcció, als diferents vectors d'expressió de la família pET.

4A.2.1.3. Clonatge de l'EGF als vectors pET (pET21, pET22 i pET32)

Aquests vectors d'expressió són de moderat nombre de còpies, tenen un promotor T7lac que permet controlar l'expressió basal de la proteïna recombinant fins a nivells que solen ser molt baixos, i són resistents a l'ampicil·lina. Com que no contenen la diana de restricció PstI al MCS ("Multicloning Site") s'optà per clonar el gen de l'EGF per les dianes de restricció EcoRI i HindIII (figura).

Pel clonatge es va partir de la construcció pUC118-EGF i, mitjançant PCR amb els encebadors universals RUP i FUP que reconeixen zones situades a l'extrem del MCS, es va obtenir el gen de l'EGF. El fet d'anteriorment haver aconseguit bons resultats amb la PCR va fer que s'optés per aquesta tècnica en detriment de la digestió. El producte de PCR i els tres vectors foren digerits amb els enzims de restricció *EcoRI* i *HindIII*, i posteriorment lligats i transformats en cèl·lules *Escherichia coli* XL1-Blue. Es van obtenir transformants i es van analitzar mitjançant digestió amb enzims *ApaI* (amb una única diana al plasmidi i cap al gen) i *BglII* (amb una única diana al plasmidi i una única diana al gen). D'aquesta manera es van poder distingir els clons que contenen l'EGF ja que donarien una restricció de 3 fragments, dels falsos transformants els quals donarien dos fragments (figura 4A.12).

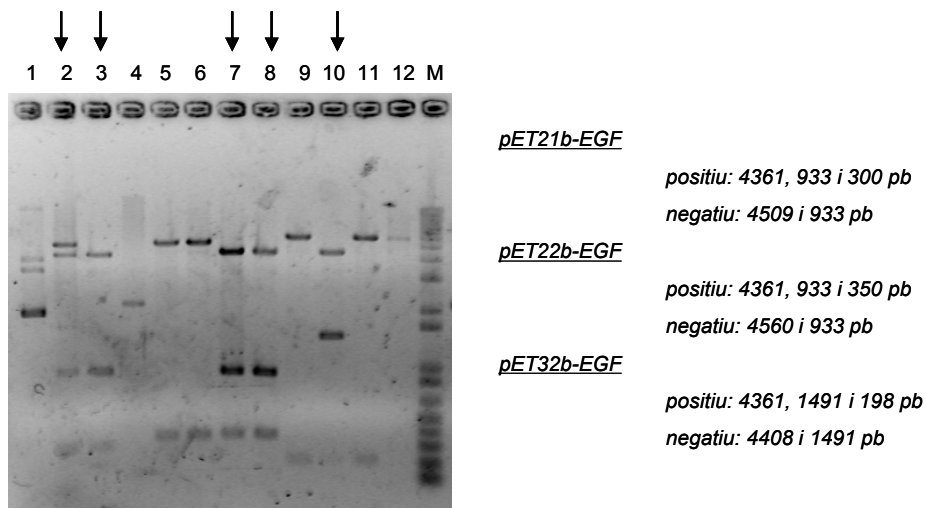


Fig 4A.12. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1.5% de les digestions dels transformants obtinguts després de la lligació entre el gen de l'EGF i els diferents vectors de la família pET. En cursiva es mostren els fragments esperats després de la digestió dels transformants, tant en el cas que siguin clons positius com negatius. Les fletxes indiquen els clons que varen resultar ser positius (M) Marcadors de pes molecular (1 Kb Plus DNA Ladder); (1, 2, 3, 4) transformants pET21b-EGF digerits amb *ApaI* i *BglII*; (4, 5, 6, 7) transformants pET22b-EGF digerits amb *ApaI* i *BglII*; (8, 9, 10, 11) transformants pET32b-EGF digerits amb *ApaI* i *BglII*

Es van obtenir dos clons positius per a pET21-EGF, dos per pET22-EGF i un per pET32-EGF, per tant ja es disposava de les tres construccions plasmídiques d'expressió. El següent pas que calia fer era analitzar l'expressió de proteïna recombinant utilitzant cada un d'aquests sistemes.

4A.2.1.4. Anàlisi de l'expressió d'EGF recombinant

Per tal d'analitzar l'expressió es va procedir de la següent manera: es féu créixer el cultiu, prèviament induït, i se separaren les parts intracel·lular soluble i insoluble segons el protocol descrit al Material i Mètodes. Les diferents fraccions obtingudes es van carregar en un gel d'electroforesi SDS-Page i els resultats són els que es mostren a la figura 4A.13.

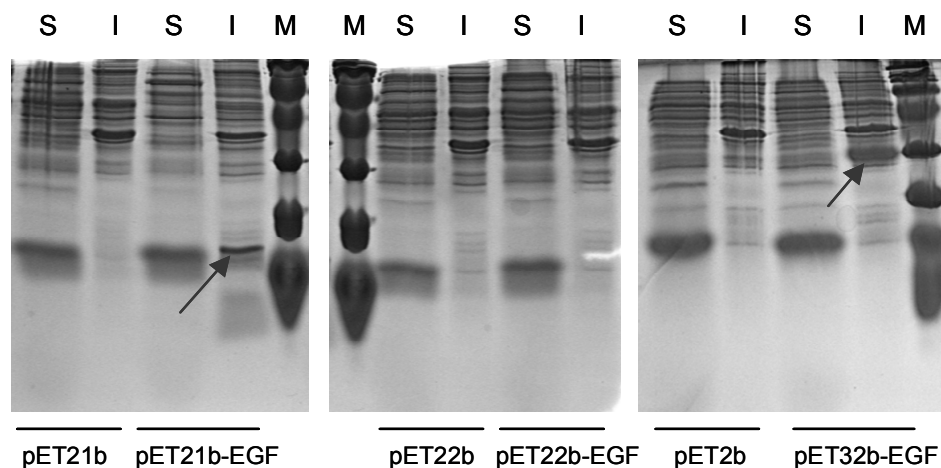


Fig 4A.13. Electroforesi en gel SDS-Page 16% tenyit amb Coomassie de les fraccions intracel·lulars solubles (S) i insolubles (I) dels cultius d'*E.coli* BL21(DE3) de les diferents construccions plasmídiques i els respectius controls sense l'insert. Les fletxes indiquen la proteïna recombinant expressada. (M) Marcadors de pes molecular de rang ampli no pretenyits (Bio-Rad).

De les tres construccions plasmídiques només dues expressen EGF: pET21-EGF i pET32-EGF (figura 4A.13). En el primer cas s'observen dues bandes que no apareixen en el control i que corresponen al monòmer d'EGF (7.9 KDa aproximadament) i al dímer (15-16 KDa aproximadament). En la construcció pET32-EGF també s'observa expressió de la proteïna recombinant que en aquest cas té una massa molecular superior (28 KDa aproximadament) pel fet que està unida a la tioredoxina. Pel que fa la localització, en

ambdós casos (pET21-EGF i pET32-EGF) la proteïna es troba exclusivament a la fracció intracel·lular insoluble. Quan es va utilitzar la construcció pET22-EGF no es va detectar expressió d'EGF recombinant. Les causes poden ser diverses. En primer lloc, podria ser que hi hagués expressió proteica, i fins i tot podria ser en nivells elevats, però que a l'hora que aquesta proteïna es dirigís a l'espai periplasmàtic taponés els forats de pas ("Bayer Junctions") i la part que quedés al citoplasma fos degradada per proteases. Aquest cas correspondria a una translocació incorrecta seguida d'una degradació de la proteïna. En segon lloc, i la raó que es creu més versemblant, podria ser que no s'arribés a aconseguir suficient expressió per tal de ser detectada mitjançant les tècniques utilitzades. Se sap que pET22 normalment no permet obtenir grans quantitats d'expressió, però que això sempre depèn de la proteïna amb la qual es treballi (Maniatis i col., 1989).

El fet que a partir dels dos sistemes, pET21-EGF i pET32-EGF, s'obtingués proteïna en forma insoluble dificulta la purificació ja que caldria un pas previ de solubilització mitjançant l'ús d'agents desnaturalitzants. L'expressió de l'EGF de forma soluble tampoc garanteix el bon plegament de la proteïna pel fet que l'ambient intracel·lular no és el més idoni per tal que es formin els tres ponts disulfur, ja que és molt oxidant. A més, la soca utilitzada no conté enzims que afavoreixin aquest plegament. Ara bé, tot i que la solubilització no millora aquest aspecte, sí que permet una purificació més senzilla i sense tantes pèrdues. Per tant, en aquest punt, i abans de continuar endavant i procedir a la purificació, es va decidir intentar millorar la solubilitat de l'EGF recombinant.

Es van proposar 3 alternatives per millorar la solubilitat:

Temperatura de creixement. Un dels factors que més afecten la solubilitat de les proteïnes és la temperatura del cultiu. S'ha vist que disminuint la temperatura fins a 28-25°C la quantitat de proteïna soluble que s'obté, respecte a l'obtinguda a 37°C, augmenta significativament. Tot i així, en aquest cas no s'observaren canvis significatius.

Soca bacteriana. Els vectors pET tenen un promotor T7lac, és a dir, el gen està clonat sota el control d'un promotor que necessita, per tal d'iniciar la transcripció del gen, la T7 RNA polimerasa. El gen que codifica per aquest enzim es troba a la regió anomenada DE3 del genoma d'*Escherichia coli* BL21(DE3) i està sota el control d'un promotor lacUV5. Tant al plasmidi com al genoma d'*E.coli* hi ha el gen lacI el qual codifica per un repressor que s'uneix al promotor lac i no permet que la RNA polimerasa s'hi uneixi i es transcriu el gen de la T7 RNA polimerasa. Per tant, en absència de T7 RNA

polimerasa, tampoc es pot transcriure el gen clonat. El repressor també s'uneix al promotor T7lac i evita que, tot i que hi hagi nivells basals de T7 RNA polimerasa, aquesta no es pugui unir al seu promotor i transcriure el gen clonat. Ara bé, quan el cultiu és induït amb IPTG, aquest s'uneix al repressor i el desplaça del promotor lac i del T7lac al qual estava unit i permet, d'aquesta manera, que la RNA polimerasa d'*E.coli* s'uneixi al promotor lac, es transcriu el gen de la T7 RNA polimerasa i s'uneixi al promotor T7lac i, per tant, que es pugui transcriure el gen clonat. Tot i que aquest sistema sembla força estricte pel que fa referència a la transcripció basal del gen clonat, no ho és del tot. En el mateix manual del pET s'informa que els nivells basals d'expressió del gen clonat són força més elevats del que caldria esperar. El fet que la proteïna s'expressi en elevades quantitats sol tenir com a conseqüència la insolubilitat. És per això que es decidí provar d'utilitzar com a soca *Escherichia coli* BL21(DE3) pLys. Aquest tipus de cèl·lules duen clonat en el seu genoma el gen que codifica pel lisozim. Aquest, a part de digerir el peptidglicà de la paret cel·lular bacteriana, pot inhibir l'activitat de la T7 RNA polimerasa. Així doncs, l'expressió de lisozim retarda l'acció de la T7 RNA polimerasa i, de retruc, disminueix la quantitat de proteïna recombinant expressada. El lisozim, tot i la seva funció, no sol tenir temps d'arribar a la paret cel·lular ja que abans troba la polimerasa a la qual ha d'inactivar. Aquest tipus de cèl·lules poden ser lisades fàcilment, tot i que la utilització de medis isotònics minimitza aquests problemes de lisi.

Els resultats que es van obtenir van ser esperançador per a pET32b-EGF ja que, en aquest cas, part de la proteïna es va expressar de forma soluble; no es van observar canvis significatius per pET21b-EGF.

Inducció amb IPTG. S'ha comprovat que la quantitat d'IPTG amb la qual s'indueix un cultiu és crítica per a l'obtenció de proteïna en suficients quantitats i, com a conseqüència, per la solubilitat d'aquesta. Tot i que l'expressió basal de proteïna recombinant hauria de ser mínima, la realitat que s'observa és que aquesta expressió és força important. És per això que es va plantejar no induir el cultiu per tal de disminuir la quantitat total de proteïna expressada. Els resultats obtinguts, però, no mostraven una millora en termes de solubilitat per cap de les dues construccions. El que sí que és curiós és que els nivells de proteïna no diferien massa entre el cultiu induït i el no induït. Això va permetre economitzar la quantitat d'IPTG utilitzada.

Resumint, la única modificació que es va introduir en el protocol d'expressió va ser la soca bacteriana utilitzada, que en el cas de pET32-EGF va passar a ser, a partir d'aquest moment, *Escherichia coli* BL21(DE3) pLys. En el cas de pET21-EGF la purificació d'EGF s'hauria de fer partint de la fracció insoluble i, mitjançant un pas previ de solubilització; en el cas de pET32-EGF la purificació tant es faria a partir de la fracció insoluble com de la soluble.

4A.2.1.5. Purificació de l'EGF

L'expressió intracel·lular insoluble sol derivar en la formació dels anomenats cossos d'inclusió que estan formats per agregats de proteïna, RNA i altres molècules. Solen sorgir per un mal plegament total o parcial i per la sobreexpressió de la proteïna. La solubilització es fa mitjançant l'exposició dels cossos d'inclusió a agents caotròpics com la urea, el clorur de guanidini, detergents (SDS), pH no fisiològics, etc. Ara bé, els cossos d'inclusió presenten una sèrie d'avantatges com per exemple que són molt fàcilment aïllables (simplement per centrifugació) i que en ells la proteïna queda resguardada de l'atac de proteases i per tant de la degradació (Maniatis i col., 1989).

Un cop s'han aïllat els cossos d'inclusió, cal solubilitzar-los i, seguidament, es pot procedir a la purificació de la proteïna recombinant. Finalment, cal plegar la proteïna mitjançant l'exposició a agents com el glutatió reduït (GSH) i oxidat (GSSG) que afavoriran la formació dels ponts disulfur.

4A.2.1.5.1. Purificació de l'EGF a partir de la construcció pET21-EGF

En aquest cas, la purificació ha consistit en l'aïllament dels cossos d'inclusió per solubilització amb clorur de guanidini, seguit de dos passos cromatogràfics (cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic i cromatografia en sistema FPLC de gel filtració), i per últim plegament, quantificació i liofilització. Els resultats obtinguts al llarg del procés de purificació es mostren a la figura 4A.14.

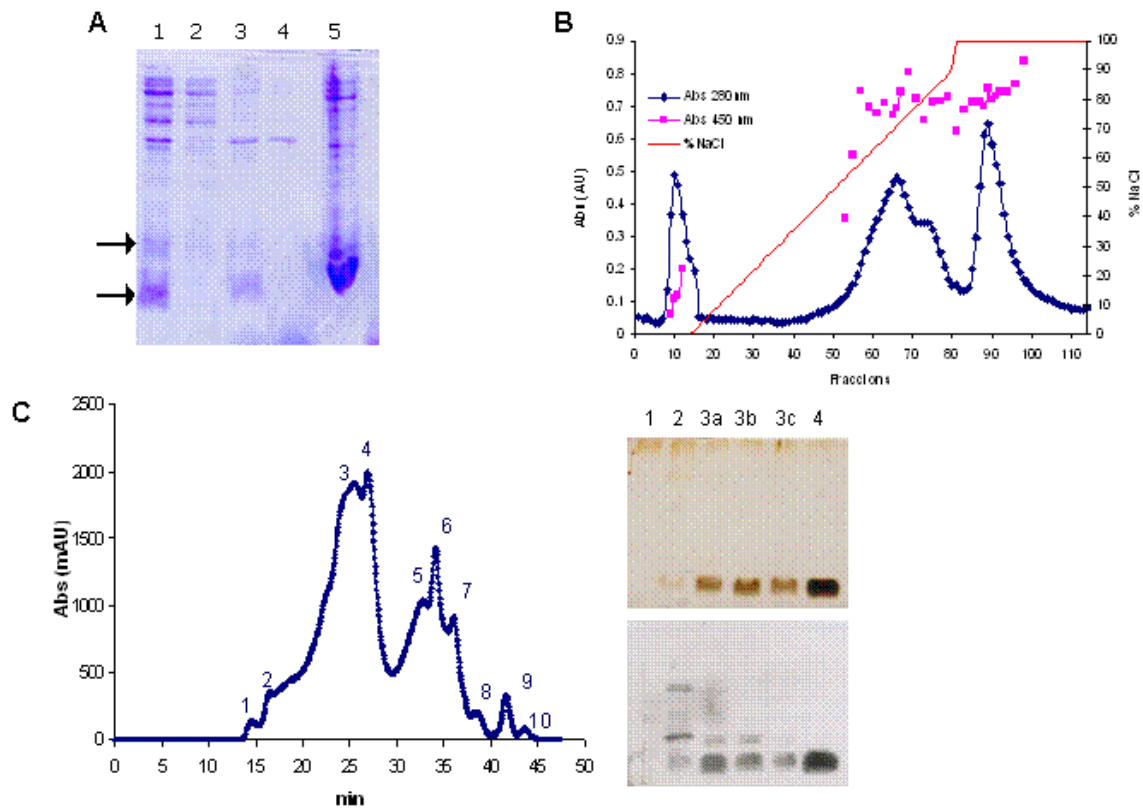


Fig 4A.14. Purificació de l'EGF a partir de la fracció insoluble del cultiu de pET21b-EGF. **A.** Electroforesi en gel SDS-Page 16% tenyit amb Coomassie de les fraccions obtingudes en la primera part de la purificació, la corresponent a les centrifugacions. (1) Després de sonicar; (2) sobrenedant d'abans de la segona centrifugació; (3) pèl·let d'abans de la segona centrifugació; (4) sobrenedant de després de la segona centrifugació; (5) mostra solubilitzada. **B.** Cromatografia de bescanvi aniònic. Es mostra l'absorbància a 280 nm (◆) i l'absorbància a 450 nm (■) corresponent a l'anàlisi per ELISA de diverses fraccions recollides durant la cromatografia. **C.** Cromatografia de gel filtració en sistema FPLC. Es mostra el cromatograma així com l'anàlisi d'algunes fraccions per electroforesi en gel SDS-Page 16% tenyit amb nitrat de plata (imatge superior) i per immunodetecció per mitjà de transferència tipus Western blot (imatge inferior).

Al llarg de les diferents centrifugacions no es va perdre EGF i, a més, l'EGF representava gran part del total de proteïna present a l'extracte (figura 4A.14 A). La primera cromatografia per bescanvi aniònic ha permès separar l'EGF de forma parcial. Els dos pics majoritaris contenen EGF, per tant es van agrupar les dues fraccions (figura 4A.14 B). Finalment, la cromatografia en sistema FPLC de gel filtració permet recuperar l'EGF de forma pura (figura 4A.14 C). Aquesta mostra pura va ser sotmesa, en una següent etapa, a plegament.

4A.2.1.5.2. Purificació de l'EGF a partir de la construcció pET32-EGF

Quan s'ha partit de la construcció pET32-EGF s'ha purificat l'EGF mitjançant una columna d'afinitat que uneix histidines ja que l'EGF recombinant es troba unit a una proteïna, la tioredoxina, per mitjà d'una cua d'histidines. S'ha seguit un protocol lleugerament diferent en els dos casos (fracció soluble i fracció insoluble).

Fracció insoluble

En aquest cas la purificació ha consistit en l'aïllament dels cossos d'inclusió i solubilització amb urea, seguit d'un pas cromatogràfic (cromatografia atmosfèrica d'afinitat), i per últim plegament, quantificació i liofilització. Els resultats obtinguts al llarg del procés de purificació es mostren a la figura 4A.15.

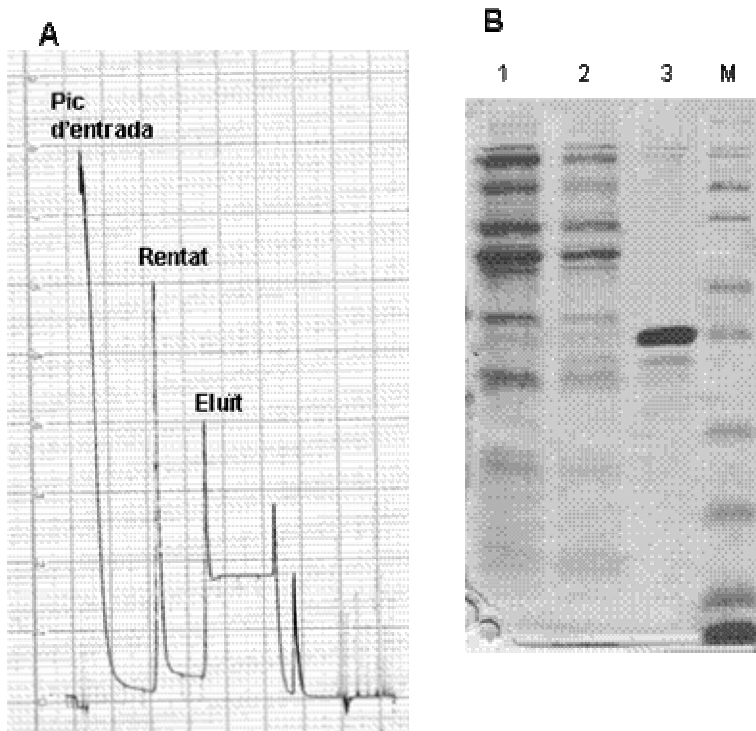


Fig 4A.15. Purificació de l'EGF unit a tioredoxina a partir de la fracció intracel·lular insoluble del cultiu de pET32b-EGF. **A.** Cromatografia d'afinitat. En el cromatograma s'indica el pic d'entrada, el rentat i l'eluit. **B.** Electroforesi en gel SDS-Page 16% de les fraccions corresponents al rentat (1 i 2) i l'eluit (3). (M) Marcadors de pes molecular de rang ampli no pretenyits (Novex).

El perfil d'elució obtingut amb la cromatografia d'afinitat per níquel presenta tres pics importants. Tal i com es pot comprovar en el gel, l'EGF unit a tioredoxina es troba ubicat completament, a la fracció de l'eluit (figura 4A.15 B). Aquesta mostra es va sotmetre posteriorment al procés de plegament.

Fracció soluble

La única diferència respecte el protocol utilitzat per la fracció insoluble ha estat el fet que quan es parteix de la fracció soluble, aquesta s'aplica directament a la columna d'afinitat ja que no cal un pas previ de solubilització. Els resultats obtinguts al llarg del procés de purificació es mostren a la figura 4A.16.

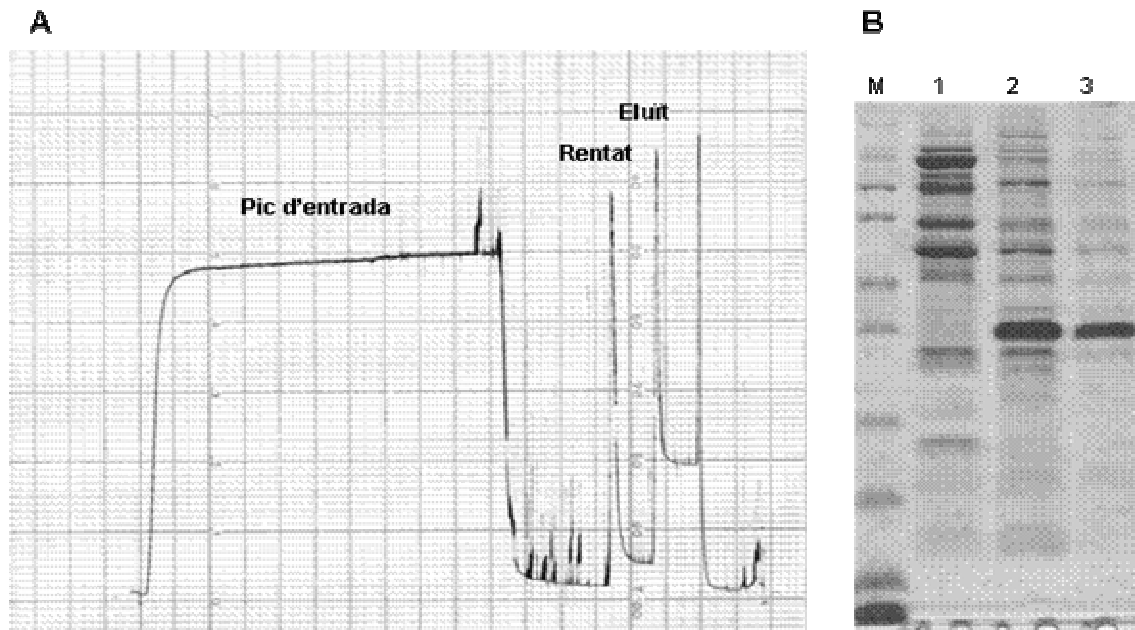


Fig 4A.16. Purificació de l'EGF unit a tioredoxina a partir de la fracció intracel·lular soluble del cultiu de pET32b-EGF. **A.** Cromatografia d'afinitat. En el cromatograma s'indica el pic d'entrada, el rentat i l'el·luït. **B.** Electroforesi en gel SDS-Page 16% de les fraccions corresponents al rentat (1 i 2) i l'el·luït (3). (M) Marcadors de pes molecular de rang ampli no pretenyits (Novex).

En aquest cas la purificació de la proteïna recombinant no va ser tan bona com quan es partia de la fracció insoluble. Així es pot comprovar que, part de l'EGF unit a tioredoxina es perd durant el rentat i, a més a més, la fracció de l'el·luït no és completament pura sinó que hi ha altres proteïnes que s'elueixen en aquestes condicions (figura 4A.16 B). Tot i així, es partí de la mostra de l'el·luït per al posterior plegament, sempre tenint en compte que la puresa era molt inferior al 100%. Si en un futur es volgués fer servir aquesta tècnica per a la purificació de l'EGF caldria posar a punt les condicions per tal de millorar l'obtenció de proteïna pura. Si es fessin servir columnes de més capacitat d'unió o bé es modifiqués la composició en imidazol dels tampons, es podrien aconseguir millors resultats.

4A.2.2. Anàlisi de l'activitat biològica dels EGF recombinants obtinguts

Un cop els 3 EGF obtinguts a partir de les dues construccions plasmídiques (pET21-EGF i pET32-EGf soluble i insoluble) s'hagueren sotmès a un procés de plegament, s'analitzà l'activitat biològica en cèl·lules tumorals tant pel que fa fosforil·lació com dimerització de l'EGFR. La línia cel·lular utilitzada fou A431 que sobreexpressa el receptor d'EGF (EGFR) al qual s'uneix l'EGF.

4A.2.2.1. Fosforil·lació

Es va analitzar la capacitat d'inducció de la fosforil·lació de l'EGFR dels 3 EGF obtinguts. Com a control positiu es va utilitzar l'EGF comercial. Els resultats es mostren a la figura 4A.17.

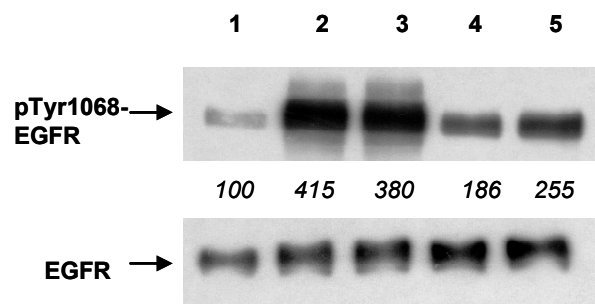


Fig 4A.17. Anàlisi per transferència tipus Western de la fosforil·lació de l'EGFR induïda per l'EGF comercial (2), l'EGF recombinant obtingut a partir de pET21b (3) i l'EGF recombinant obtingut a partir de pET32b fracció soluble (4) i insoluble (5). La dosi sempre ha estat de 50 ng/mL. S'ha fet un control (1) que no ha estat tractat. La intensitat de les bandes indica el grau de fosforil·lació d'una tirosina específica de l'EGFR (panell superior) i la quantitat d'EGFR present a cada una de les mostres (panell inferior). Aquesta intensitat va ser calculada per densitometria i els valors relatius al control s'expressen en tant per cent, i es mostren en cursiva.

S'observa que l'EGF de pET21-EGF té una activitat força semblant a l'EGF comercial. Els dos EGF units a tioredoxina (pET32-EGF soluble i insoluble) tenen una activitat bastant inferior a la de l'EGF comercial. En concret, la corresponent a la fracció soluble és una mica inferior a la de la insoluble, possiblement pel fet que la primera no era del tot pura i això pot haver afectat el plegament. Per tant, sembla que l'estratègia d'expressar l'EGF unit a una proteïna de fusió no és massa exitosa tenint en compte que els nivells d'activitat es veuen reduïts a la meitat aproximadament. Aquesta davallada en l'activitat pot ser deguda a la tioredoxina que, en estar fusionada a l'extrem N-terminal de l'EGF fos suficientment gran com per impedir que aquest s'unís a l'EGFR amb una elevada afinitat.

4A.2.2.2. Dimerització

S'analitzà la dimerització del receptor induïda per l'EGF de pET21-EGF i s'observà que, igual que en el cas de la fosforil·lació, els nivells obtinguts tant per l'EGF comercial com pel recombinant eren força semblants (figura 4A.18).

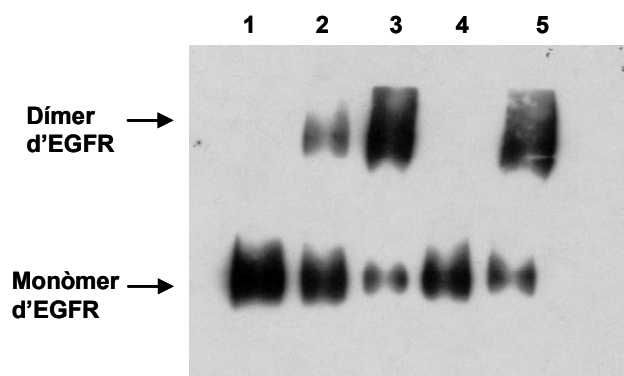


Fig 4A.18. Anàlisi per transferència tipus Western de la dimerització de l'EGFR induïda per l'EGF comercial 1 i 10 µg/mL (2 i 3 respectivament) i per l'EGF recombinant 1 i 10 µg/mL (4 i 5 respectivament) obtingut a partir de pET21b. Així mateix, s'ha fet un control (1) el qual no ha estat tractat. La intensitat de les bandes indica la quantitat de dímer d'EGFR (340 kDa) o monòmer d'EGFR (170 kDa) que presenten cada una de les mostres.

Finalment, a la taula 4A.2 es mostren els rendiments finals d'EGF recombinant tant pel que fa quantitat com activitat en cada un dels sistemes utilitzats.

CONSTRUCCIÓ	TIPUS D'EGF	mg proteïna / L cultiu	% ACTIVITAT
pET21-EGF	EGF (8 KDa approx.)	Entre 5 i 10	92
pET32-EGF	Thrx-EGF (28 KDa approx.) / fracció soluble	3	45
pET32-EGF	Thrx-EGF (28 KDa approx.) / fracció insoluble	Entre 3 i 5	61

Taula 4A.2. Rendiment i activitat dels diferents tipus d'EGF recombinant obtinguts. L'activitat es refereix a la inducció de la fosforil·lació de l'EGFR per part dels diferents EGF obtinguts i s'ha calculat en base a un control (cèl·lules no tractades)

Agrupant els resultats referents a rendiment i activitat, sembla que el millor sistema a partir del qual obtenir EGF i construir l'EGF Truncat és el pET21-EGF. Tot i que la

construcció pET32-EGF permet recuperar quantitats relativament acceptables de proteïna, el fet que sigui poc activa fa que es descarti aquesta opció.

4A.2.3. Disseny d'un mutant de l'EGF (EGF Truncat), expressió i purificació

El clonatge de l'EGF ha tingut dos grans objectius. Per una part, el fet de poder disposar d'un sistema d'obtenció d'EGF en quantitats acceptables, i per l'altra el disseny d'un mutant sense la part C-terminal (7 últims aminoàcids). Aquesta part de la molècula es creu que participa activament en la formació i estabilització del dímer de receptors. Per tant es creu que si s'elimina es pot aconseguir un EGF incapaç d'induir la dimerització però amb una afinitat semblant al natiu, ja que conserva aminoàcids essencials com és l' Arg41. A aquest mutant se l'ha anomenat EGF Truncat.

Per tal de dissenyar l'EGF Truncat s'ha partit de la construcció plasmídica amb la qual s'han obtingut millors resultats: pET21-EGF.

4A.2.3.1. Obtenció del gen de l'EGF Truncat per mutagènesi dirigida

En primer lloc es van dissenyar uns encebadors que permetessin l'amplificació del gen de l'EGF, clonat al vector pET21, tenint en compte que només es volia amplificar fins a la seqüència nucleotídica corresponent a l'aminoàcid 46. Calgué tenir present que calia mantenir les mateixes dianes de restricció als dos extrems del gen (*EcoRI* a 5' i *HindIII* a 3'), i que calia introduir un codó de finalització (figures 4A.19 i 4A.20).



Figura 4A.19. Seqüència del gen del factor de creixement epidèrmic clonat al vector d'expressió pET21b(+). En blau es mostra la seqüència pertanyent a l'EGF, en negre les bases corresponents al vector, i en lila les dianes de restricció. En cursiva s'indiquen les bases que cal eliminar per tal de tenir un EGF amb només els 46 primers aminoàcids.

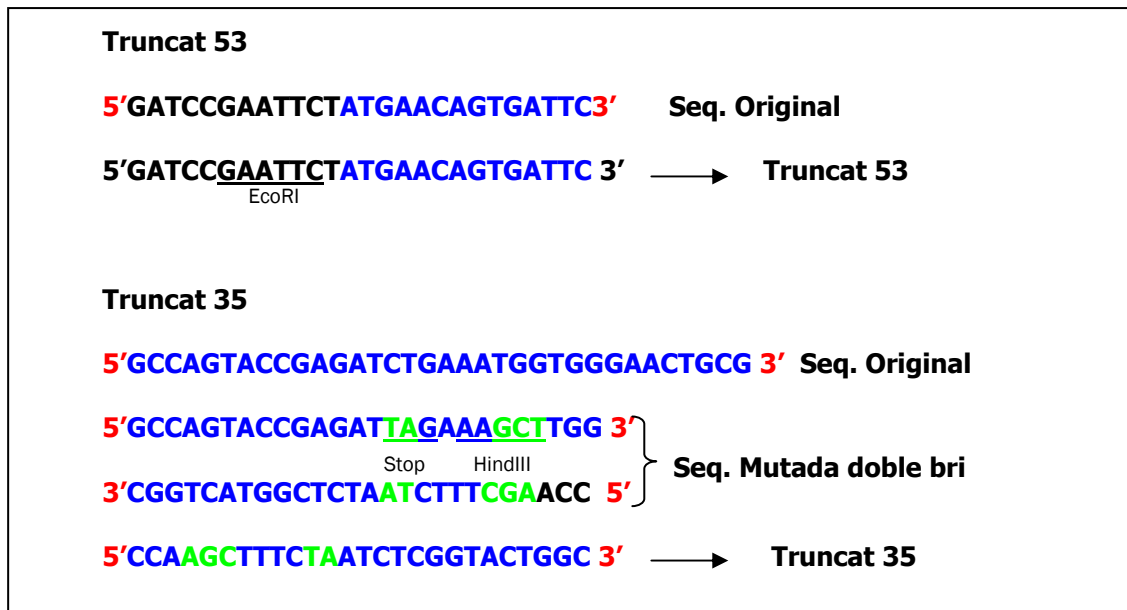


Figura 4A.20. Disseny dels encebadors per construir l'EGF Truncat. Es mostren les seqüències originals dels dos extrems (5' i 3') extrems de la figura 4.24. En negre es mostren les seqüències pertanyents al vector, i en blau les pertanyents al gen de l'EGF. En verd s'indiquen les bases que ha calgut modificar per introduir o bé una diana de restricció o bé un codó de finalització.

Una vegada dissenyats i sintetitzats els encebadors es va procedir a fer la PCR utilitzant com a motllo la construcció plasmídica pET21-EGF. Els resultats d'aquesta PCR i la posterior digestió amb enzims de digestió es mostren a la figura 4A.21.

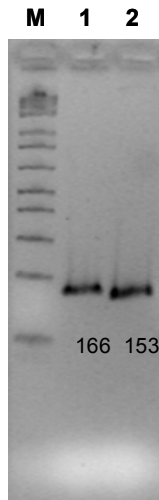


Fig 4A.21. Electroforesi en gel d'agarosa al 4% del producte de PCR i la posterior digestió per tal d'obtenir l'EGF Truncat el qual seria, posteriorment, clonat al vector pET21b. (M) Marcadors de pes molecular (1 Kb Plus DNA Ladder); (1) producte de PCR sobre el vector pET21b-EGF amb els encebadors Truncat 53 i Truncat 35; (2) producte de PCR digerit amb *EcoR I* i *Hind III*. De cada banda se n'indica el nombre de parell de bases.

4A.2.3.2. Clonatge de l'EGF Truncat al vector pET21

Pel clonatge es partí del fragment de 153 pb, obtingut a partir de la digestió del producte de PCR, així com del vector pET21 digerit amb els mateixos enzims de restricció (*EcoRI* i *HindIII*). Es van lligar aquests dos components i es transformaren en cèl·lules *Escherichia coli* XL1-Blue. Es van obtenir transformants els quals van ser analitzats mitjançant digestió amb els enzims *EcoRI* i *PstI*. Aquesta digestió permet diferenciar els clons positius dels negatius, ja que el patró de digestió obtingut és diferent. A la figura 4A.22 es mostren els diferents clons assajats i es marquen quins d'aquests són positius. D'aquests clons positius es féu una segona confirmació mitjançant digestió amb *EcoRI* i *HindIII* per obtenir el gen de l'EGF Truncat. Per últim, es van seqüenciar i es va confirmar que s'havien eliminat els nucleòtids que codificaven pels 7 últims aminoàcids de l'EGF. En aquest punt, doncs, ja es disposava de la construcció pET21-Truncat.

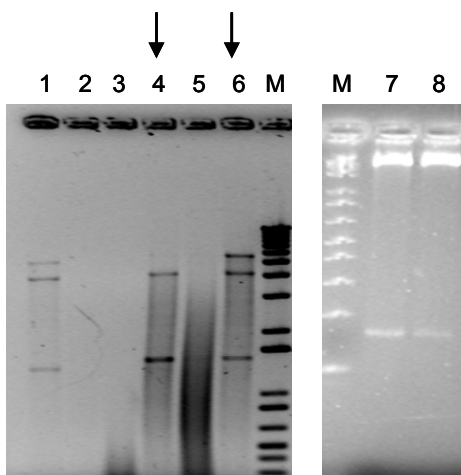


Fig 4A.22. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1.5% de les digestions dels transformants obtinguts després de la lligació entre el gen de l'EGF Truncat i els vector pET21b. Les fletxes indiquen els clons que varen resultar ser positius (M) Marcadors de pes molecular (1 Kb Plus DNA Ladder); (1) pET21b digerit amb *EcoR I* i *Pst I*; (2, 3, 4, 5, 6) transformants digerits amb *EcoR I* i *Pst I*; (7, 8) transformants 4 i 6, respectivament, digerits amb *EcoR I* i *Hind III*.

4A.2.3.3. Expressió i purificació de l'EGF Truncat.

El procés d'expressió i purificació de l'EGF Truncat ha estat el mateix que per l'EGF obtingut a partir de la construcció pET21-EGF. La soca bacteriana utilitzada ha estat *Escherichia coli* BL21(DE3), la temperatura de creixement ha estat de 37°C i s'ha induït amb IPTG. Un cop el cultiu ha estat crescut, i per mitjà de centrifugacions, s'han aïllat els cossos d'inclusió, s'han solubilitzat i s'han purificat mitjançant cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic i cromatografia en sistema FPLC de gel filtració. Finalment, s'ha plegat la proteïna i quantificat.

Els perfils cromatogràfics obtinguts en la purificació de l'EGF Truncat han estat idèntics als obtinguts, prèviament, per l'EGF (resultats no inclosos). Ara bé, el rendiment aconseguït d'EGF Truncat ha estat lleugerament inferior al d'EGF: 3-5 mg enfront els 5-10 mg de l'EGF. Per gel SDS-Page es comprovà que la massa molecular de l'EGF Truncat era, com era d'esperar, inferior a la de l'EGF recombinant i l'EGF comercial (figura 4A.23). En concret, les masses moleculars de cada proteïna són: EGF comercial 6 KDa, EGF recombinant 7.8 KDa i EGF Truncat 6.7 KDa. Tots tres EGF van ser dissolts en Acètic-BSA, per tant apareixen altres bandes al gel.

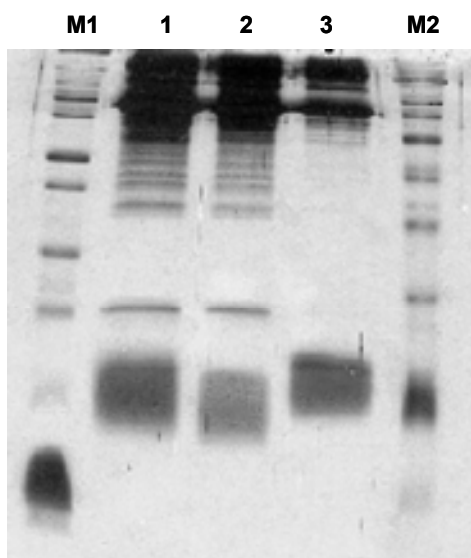


Fig 4A.23. Electroforesi en gel SDS-Page 18% tenyit amb nitrat de plata de l'EGF Truncat (1), EGF comercial (2) i EGF recombinant (3). De tots tres, se'n carregà la mateixa quantitat, és a dir, 0.5 µg. (M1) Marcadors de pes molecular de rang ampli no pretenyits (Novex); (M2) marcadors de pes molecular de rang ampli pretenyits (Novex)

4A.2.4. Confirmació de l'estructura tridimensional de l'EGF i l'EGF Truncat

Tot i que en aquest punt ja s'havia utilitzat l'EGF recombinant per tal de dur a terme proves bioquímiques, les quals havien posat de manifest que aquest EGF era biològicament actiu, i s'havia partit de la construcció plasmídica per dissenyar l'EGF Truncat i, posteriorment, s'havia produït de forma satisfactòria, quedava un aspecte per comprovar: l'estructura tridimensional de les dues proteïnes. En principi, i segons els antecedents que es tenien, semblava obvi que si l'activitat era correcta el plegament també ho havia de ser. Però sorprenentment no ha estat així.

S'ha avaluat l'estructura tridimensional de l'EGF recombinant i l'EGF Truncat per mitjà d'una tècnica, el dícroïsme circular, que permet deduir si la proteïna adopta una conformació correcta. Aquests assajos es van dur a terme en col·laboració estreta amb la Dra. Virtudes Villegas, al servei de Química Inorgànica de la Universitat Autònoma de Barcelona. En ambdós casos l'espectre que es va obtenir va ser igual, és per això que només se'n presenta un (4A.24).

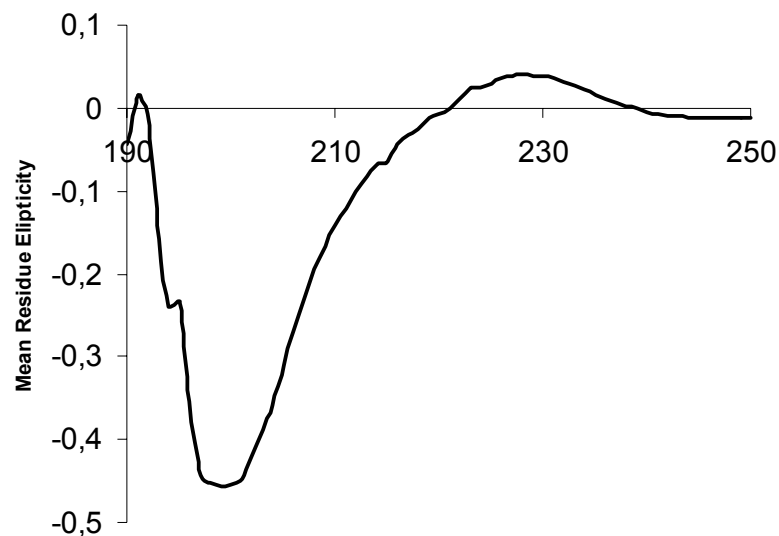


Fig 4A.24. Espectre obtingut en l'anàlisi per dícroïsme circular de les mostres d'EGF recombinant i EGF Truncat (tampó Acètic 10 mM pH 2.5) A l'eix de les abscisses es representen les absorbàncies (nm) i a l'eix d'ordenades l'elipticitat molar mitjana per residu ($\text{deg cm}^{-2} \text{ d mol}^{-1}$)

Com es pot observar a la figura 4A.24, l'espectre que s'obté és l'anomenat "random coil" que indica que la proteïna no adopta la conformació nativa sinó que es troba desplegada. Un fet curiós és el màxim obtingut a 230 nm, que reflexa la presència de residus aromàtics, probablement exposats al solvent. Aquesta interpretació dels

espectres ha estat confirmada per deconvolució amb el programa K2d (Andrade i col., 1993; Merelo i col., 1994), que va donar un resultat de 100% d'estructura random coil. S'ha de ressaltar que les mostres es trobaven en acètic 10 mM pH 2.5

Com s'ha comentat, aquest resultat va ser sorprenent, sobretot pel que fa l'EGF recombinant. És a dir, semblava que no calia un plegament correcte de la proteïna per tal d'induir l'activitat biològica pròpia d'aquest factor de creixement. L'explicació més plausible d'aquest fet es que encara que l'estructura en acètic 10 mM no sigui la correcta, en afegir la mostra al cultiu la proteïna es troba amb un pH i una força iònica adients per adoptar el seu plegament natiu i replegar, adoptant una estructura suficient per tal d'induir l'activitat biològica corresponent.

4A.2.5. Anàlisi de l'activitat biològica de l'EGF Truncat

Tot i que es va confirmar que tant l'EGF com l'EGF Truncat no estaven ben plegats, i abans de pensar en una alternativa per solventar aquest problema, es va decidir assajar l'activitat biològica d'aquestes dues proteïnes. De fet, tot i estar mal plegat, els antecedents que es tenien de l'EGF recombinant en quant a activitat biològica eren prou bons com per animar-nos a continuar per aquesta via.

S'estudià la fosforil·lació i dimerització de l'EGFR, i la proliferació cel·lular induïda tant per l'EGF Truncat, en comparació amb l'induïda per l'EGF recombinant, en la línia cel·lular A431.

4A.2.5.1. Fosforil·lació

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4A.25.

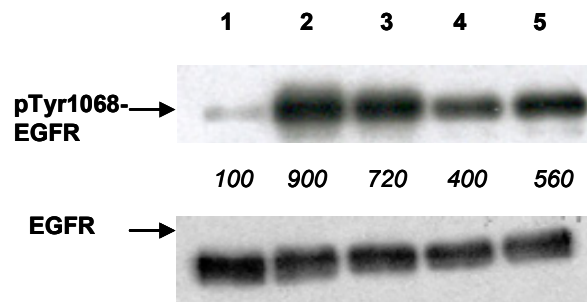


Fig. 4A.25. Anàlisi per transferència tipus Western de la fosforil·lació de l'EGFR induïda per l'EGF recombinant 10 i 50 ng/mL (2 i 3, respectivament) i per l'EGF Truncat 10 i 50 ng/mL (4 i 5, respectivament). Així mateix, s'ha fet un control (1) el qual no ha estat tractat. La intensitat de les bandes indica el grau de fosforil·lació d'una tirosina específica de l'EGFR (panell superior) i la quantitat d'EGFR present a cada una de les mostres (panell inferior). Aquesta intensitat va ser calculada per densitometria i els valors obtinguts en tant per cent es mostren en cursiva.

La fosforil·lació de l'EGFR induïda per l'EGF Truncat és inferior a la induïda per l'EGF recombinant, aproximadament un 50% menys. Mentre que amb 10 ng/mL d'EGF recombinant ja s'arriba a una saturació de fosforil·lació i per més lligand que s'administri la fosforil·lació no augmenta, amb l'EGF Truncat sembla que a 50 ng/mL encara no s'ha arribat a aquesta saturació. Tot i així, cal destacar que la fosforil·lació, tenint en compte que a l'EGF Truncat li manca la part de la cua C-terminal, és prou important si es compara amb la fosforil·lació induïda pel PCI (Sitjà-Arnau i col., 2005). Per tant sembla que el fet d'eliminar la cua de l'EGF no evita que aquest sigui capaç de promoure la fosforil·lació de l'EGFR.

4A.2.5.2. Dimerització

En aquest cas es va analitzar tant la dimerització de l'EGFR induïda per l'EGF recombinant i l'EGF Truncat sols (figura 4A.26), com per la combinació (primer tractant les cèl·lules amb EGF Truncat i després amb EGF recombinant) (figura 4A.27).

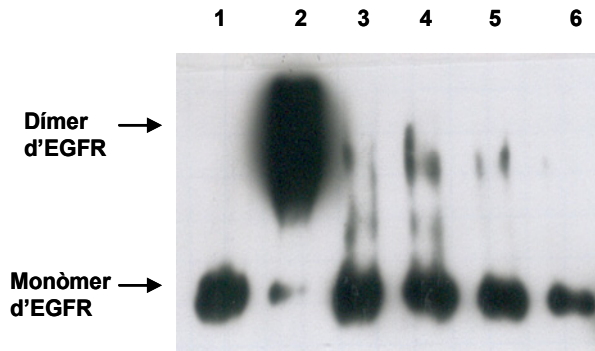


Fig 4A.26. Anàlisi per transferència tipus Western de la dimerització de l'EGFR induïda per l'EGF recombinant 10 µg/mL (2) i per l'EGF Truncat 10, 100 i 200 µg/mL (3, 4 i 5, respectivament). Així mateix, s'ha fet un control (1) el qual no ha estat tractat i un en el qual s'ha tractat amb BSA (6). La intensitat de les bandes indica la quantitat de dímer d'EGFR (340 kDa) o monòmer d'EGFR (170 kDa) que presenten cada una de les mostres.

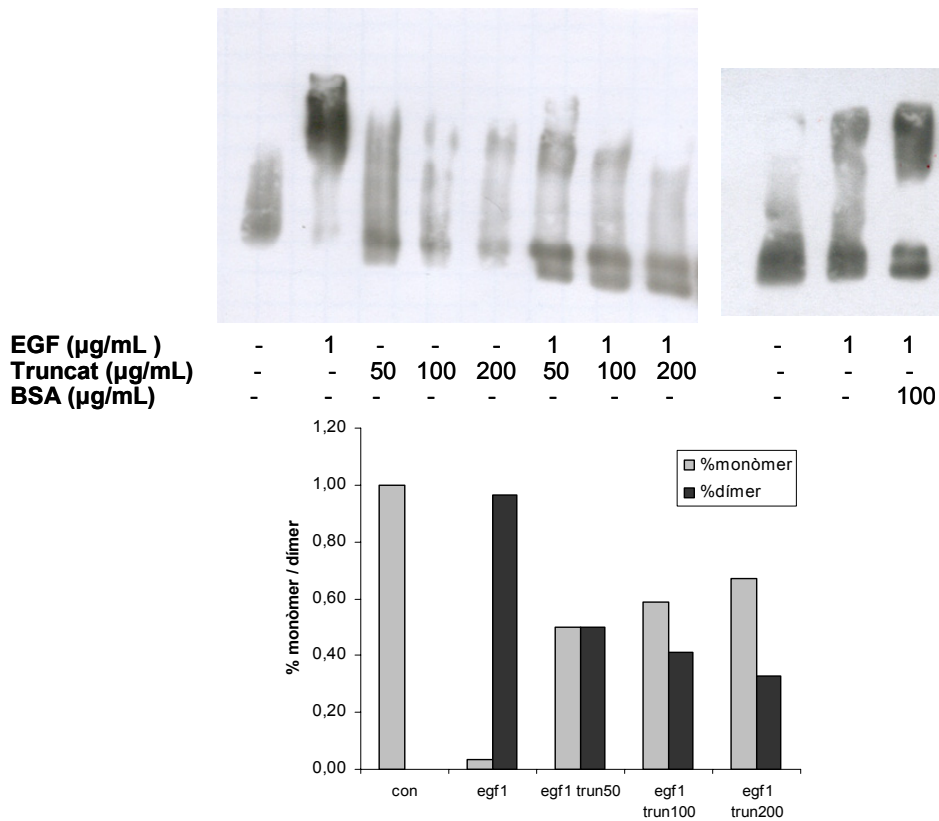


Fig 4A.27. Anàlisi per transferència tipus Western de la dimerització de l'EGFR induïda per l'EGF recombinant i l'EGF Truncat sols i combinats. S'inclouen, també, el control no tractat, i el corresponent al tractament amb BSA sola o combinada amb EGF recombinant. La intensitat de les bandes indica la quantitat de dímer d'EGFR (340 kDa) o monòmer d'EGFR (170 kDa) que presenten cada una de les mostres. Aquesta intensitat va ser calculada per densitometria i els resultats obtinguts es mostren en el gràfic.

Pel que fa la dimerització els resultats són força contundents. L'EGF Truncat no induïx dimerització de l'EGFR, almenys a les concentracions que s'han aplicat. Ni afegint 20 vegades més EGF Truncat que EGF recombinant s'aprecia dímer d'EGFR.

Quan es combinen ambdues molècules s'observa que l'EGF Truncat està bloquejant la dimerització induïda per l'EGF recombinant, i es comporta, almenys en aquest procés, com a antagonista o bloquejador.

És evident, doncs, que el fet d'eliminar els 7 últims aminoàcids de la cua de l'EGF afecta de forma molt significativa la dimerització del receptor. Això fa pensar en la possibilitat ja suggerida per alguns autors del paper fonamental que té aquesta part de la molècula en la formació i estabilització del dímer de receptors. (Nice i col., 2002).

4A.2.5.3. Proliferació cel·lular

S'ha estudiat la proliferació cel·lular de la línia cel·lular A431 induïda per l'EGF recombinant i l'EGF Truncat. A431 es considera un model negatiu pel que fa la proliferació, ja que l'EGF n'indueix l'apoptosi. Es creu que el fet de sobreexpressar en grans quantitats l'EGFR fa que quan se'ls administra el lligand, la internalització massiva de receptors provoca el col·lapse de la cèl·lula i la consegüent inducció de l'apoptosi. Els resultats es mostren a la figura 4A.27.

S'observa que l'efecte provocat per l'EGF Truncat és molt menor que el provocat per l'EGF recombinant, tot i seguir una mateixa tendència. Tot i així, té certa activitat a nivell proliferatiu tot i no induir dimerització. Es creu que el fet d'induir certa fosforil·lació del receptor seria suficient per desencadenar resposta cel·lular.

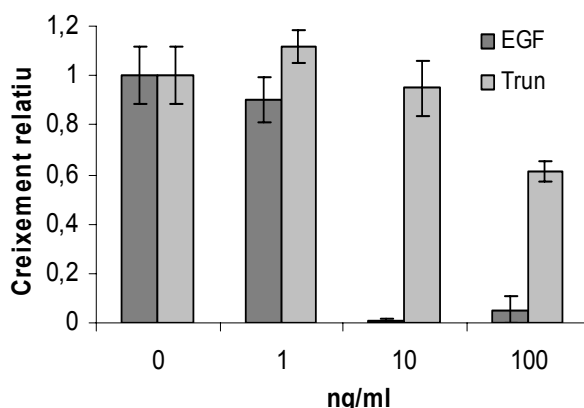


Fig 4A.27. Efecte de l'EGF recombinant i l'EGF Truncat en la proliferació de la línia cel·lular A431. Les cèl·lules van créixer en medi 0.5% de sèrum, amb diferents concentracions d'EGF i EGF Truncat durant 72 hores. Les barres d'error indiquen l'error estàndard relatiu calculat a partir de 3 experiments independents.

4A.2.6. Clonatge, expressió i purificació de l'EGF en un sistema d'expressió extracel·lular bacterià.

Un dels objectius d'aquest treball ha estat l'obtenció d'un EGF biològicament actiu el qual pogués ser utilitzat per assajos bioquímics "in vitro" així com per ser modificat i obtenir, així, variants que posteriorment serien estudiades en termes d'activitat biològica. Com s'ha vist, mitjançant el sistema d'expressió pET21-EGF s'han obtingut quantitats considerables d'EGF que en principi semblava actiu. Ara bé, les proves de dicroïsm circular han posat de manifest que l'estructura de la proteïna no era la correcta, sinó que es tractava d'una mostra que presentava diferents formes de plegament com a conseqüència de l'aparellament aleatori i moltes vegades incorrecte de les cisteïnes per formar els tres ponts disulfur.

És per això, que vistos aquests resultats s'optà per canviar d'estratègia i clonar l'EGF en un sistema d'expressió bacterià el qual es basa en la secreció de proteïnes fora del citoplasma. El vector escollit ha estat el pNIII OmpA3. Quan el gen es clona en aquest vector dóna lloc a una proteïna recombinant que es troba fusionada pel seu extrem N-terminal al pèptid senyal OmpA. Aquest guia la proteïna a l'espai periplasmàtic on el pèptid senyal és tallat per una proteasa de la membrana plasmàtica d'*E.coli* i la proteïna recombinant, en principi, queda en aquest espai emmagatzemada. La utilització de vectors de secreció és una alternativa àmpliament utilitzada per tal de produir proteïnes recombinants en *E.coli* de forma soluble i activa (Schein, 1991), especialment en el cas de proteïnes que ja són de secreció en els seus organismes originals. Diverses proteïnes petites i riques en ponts disulfur ja han estat expressades amb força èxit de forma activa en *E.coli* mitjançant la fusió a pèptids de secreció (Becker i Hsuing, 1986; Marks i col., 1986; Auerswald i col., 1991). Entre aquestes proteïnes cal destacar el PSTI (inhibidor pancreàtic secretori de tripsina) (Maywald i col., 1988) de 56 aminoàcids i tres ponts disulfur i per tant molt semblant a l'EGF i el PCI. De fet, el mateix PCI també va ser clonat (Molina i col., 1992) i es van obtenir nivells força acceptables de proteïna recombinant que, posteriorment, va ser analitzada i es va veure que estava ben plegada i era activa.

En aquest sistema, les proteïnes arriben al periplasma en un estat inicialment no plegat (Wickner i col., 1991). Ara bé, aquest ambient periplasmàtic és més favorable que l'intracel·lular i permet el plegament per mitjà de la formació correcta dels ponts disulfur. No totes les proteïnes, però, poden ser expressades i abocades al periplasma sinó que han

de tenir una sèrie de característiques que són condicions necessàries tot i que no suficients (MacIntyre i Henning, 1990). Les principals són que a l'extrem N-terminal de la proteïna no hi hagi una càrrega positiva important, i que la proteïna madura no contingui seqüències llargues de residus hidrofòbics. L'EGF compleix ambdues característiques.

Per tot això, s'ha optat per aquest sistema d'expressió per tal d'obtenir l'EGF de forma soluble, ben plegat i actiu.

4A.2.6.1. *Obtenció del gen de l'EGF*

En aquest cas, i igual que es va fer quan es va clonar l'EGF als vectors de la família pET, el punt de partida va ser el vector pTB361. Els encebadors utilitzats per tal d'extreure el gen d'aquest vector, en principi, podien ser els mateixos que en l'anterior cas. Ara bé, per tal que aquest gen quedés en fase (és a dir, que el marc de lectura de la seqüència gènica fos correcte) s'ha hagut d'introduir un nucleòtid a l'extrem 5' del gen, en concret a la regió no codificant. És per això que s'ha hagut de dissenyar un nou encebador "forward" però s'ha pogut mantenir el "reverse" (EGF35). El disseny d'aquest encebador es mostra a la figura 4A.28:

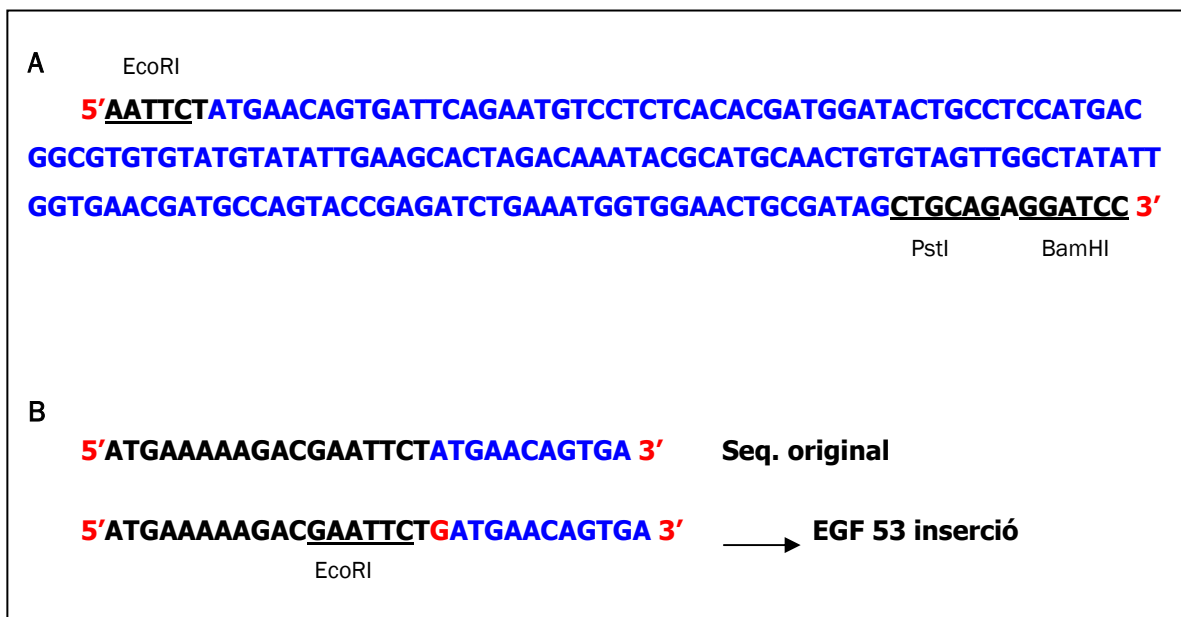


Fig 4A.28. (A) Seqüència del gen del factor de creixement epidèrmic clonat al vector pTB361. En blau es mostra la seqüència pertanyent al gen de l'EGF, en negre les bases corresponents al vector, i en lila les dianes de restricció. (B) Disseny de l'encebador "forward" per extreure, per PCR, el gen de l'EGF, clonat al vector pTB361. En negre es mostren les seqüències no codificants, en blau les codificants corresponents al gen de l'EGF, i en vermell el nucleòtid que s'ha introduït per tal de corregir el marc de lectura.

Mitjançant els encebadors EGF53 inserció i EGF35 es va extreure del vector pTB361, per PCR, el gen de l'EGF. Com que el lloc de clonatge de pINIIIompA3 només té tres punts de restricció (*EcoRI*, *HindIII* i *BamHI*) es van haver d'incloure aquestes dianes a la seqüència nucleotídica. En concret *EcoRI* està situat a l'extrem 5' del gen i *BamHI* al 3'. Després de la PCR es va digerir el producte i es va obtenir un fragment de massa molecular menor que corresponia al fragment que posteriorment s'utilitzaria pel clonatge (figura 4A.29).

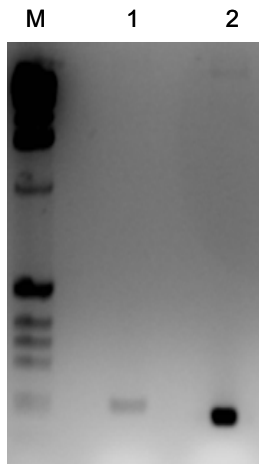


Fig 4A.29. Electroforesi en gel d'agarosa al 2% del producte de PCR i la posterior digestió per tal d'obtenir l'EGF el qual serà clonat al vector pINIIIompA3. (M) Marcadors de pes molecular (DNA Molecular Weight Marker X (0.07-12.2 Kbp); (1) producte de PCR sobre el vector pTB361 amb els encebadors hEGF53inserció i hEGF35; (2) producte de PCR digerit amb *EcoRI* i *BamHI*.

4A.2.6.2. Clonatge de l'EGF al vector pINIIIompA3

Un cop es va disposar de l'EGF digerit amb els enzims de restricció corresponents, es va procedir igual pel plasmidi pINIIIompA3. Vector i insert digerits es van lligar i el producte es va transformar en cèl·lules *E.coli* XL1 Blue. Es van obtenir una sèrie de transformants que van ser analitzats mitjançant digestió amb enzims de restricció (figura 4A.30). Tots van resultar ser positius i per tant ja es disposava de la construcció plasmídica pINIII-EGF. Es va comprovar per seqüenciació que efectivament el nucleòtid guanina havia estat incorporat i que la seqüència del gen era la correcta.

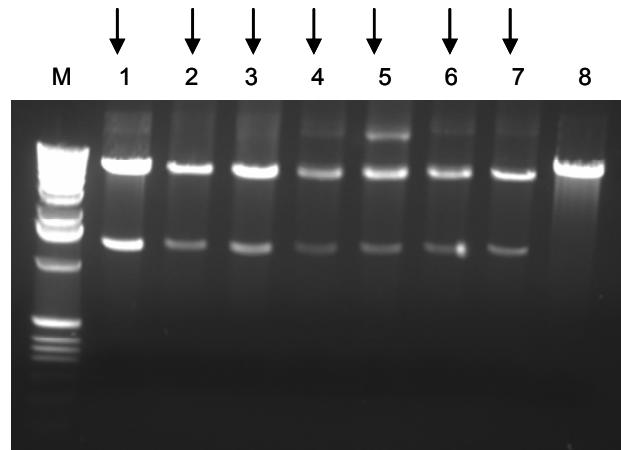


Fig 4A.30. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1.5% de les digestions dels transformants obtinguts després de la lligació entre el gen de l'EGF(amb la base insertada) i el vector pINIIIompA3. Com es pot comprovar, en digerir amb Pst I, si s'ha donat la lligació apareixen dues bandes (1350 i 5850 pb), mentre que sinó el vector només linealitzà. Les fletxes indiquen els clons que van resultar ser positius. (M) Marcadors de pes molecular (DNA Molecular Weight Marker X (0.07-12.2 Kbp)); (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) transformants pINIIIompA3-EGF digerits amb Pst I; (8) pINIIIompA3 digerit amb Pst I.

4A.2.6.3. Expressió i purificació de l'EGF a partir de la construcció pINIII-EGF

Com ja s'ha comentat, el vector pINIII permet una expressió periplasmàtica de la proteïna recombinant. És per això, que el primer que es féu va ser analitzar si efectivament l'EGF es trobava localitzat en aquesta fracció cel·lular. Les primeres proves que es feren tenien com a objectiu determinar la localització exacta de l'EGF. Els resultats han indicat que es troba de forma exclusiva al medi de cultiu (almenys amb les tècniques utilitzades no se n'ha pogut detectar ni al citoplasma ni a l'espai periplasmàtic del bacteri). Aquest fet també s'ha observat pel PCI (Molina i col., 1992) i pel PSTI (Maywald i col., 1988), entre d'altres proteïnes. El mecanisme per mitjà del qual pot passar de l'espai periplasmàtic a l'exterior cel·lular no està massa clar. S'ha suggerit que podria ser per la seva baixa massa molecular (Maywald i col., 1988), però aquesta teoria no és acceptada per molts altres autors. S'han assenyalat una sèrie de factors que podrien afavorir aquest pas de la proteïna al medi extracel·lular:

- Cal que al citoplasma no tingui una estructura terciària estable. Evidentment, l'EGF no té aquest problema ja que l'ambient citoplasmàtic no és el més idoni pel seu plegament.

- La mida mínima que ha de tenir ha de ser de 70 aminoàcids, tot i que s'han trobat polipèptids més petits secretats per la cèl·lula bacteriana (MacIntyre i Henning, 1990). Aquest és, probablement, el cas de l'EGF.

L'expressió extracel·lular afavoreix molt la purificació de la proteïna i encara més si s'utilitza un medi relativament pobre pel creixement de la soca bacteriana. En aquest cas s'ha utilitzat el medi mínim M9 Cas que és el mateix que s'havia fet servir en el cas del PCI (Molina i col., 1992). El protocol de purificació ha estat força semblant a l'utilitzat per l'EGF intracel·lular amb algunes diferències. Com que la mostra tenia un volum molt gran, el primer pas ha consistit en la concentració mitjançant filtració tangencial. S'ha aconseguit concentrar la mostra aproximadament 25 vegades respecte el volum de partida. Els passos cromatogràfics posteriors han estat els mateixos que pel cas de la purificació de l'EGF a partir del sistema d'expressió pET21-EGF, és a dir, una primera cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic i una segona cromatografia en sistema FPLC de gel filtració (figura 4A.31). En el cas de la filtració tangencial no s'han apreciat pèrdues d'EGF en la fracció descartada. Pel que fa les dues cromatografies, els perfils d'elució segueixen un patró força similar als obtinguts per la mostra de pET21-EGF, és a dir, l'elució de l'EGF es dona dins el mateix rang de gradient d'elució. Aquest protocol ha permès recuperar EGF de forma pura amb un rendiment final d'1.5 mg per cada litre de cultiu.

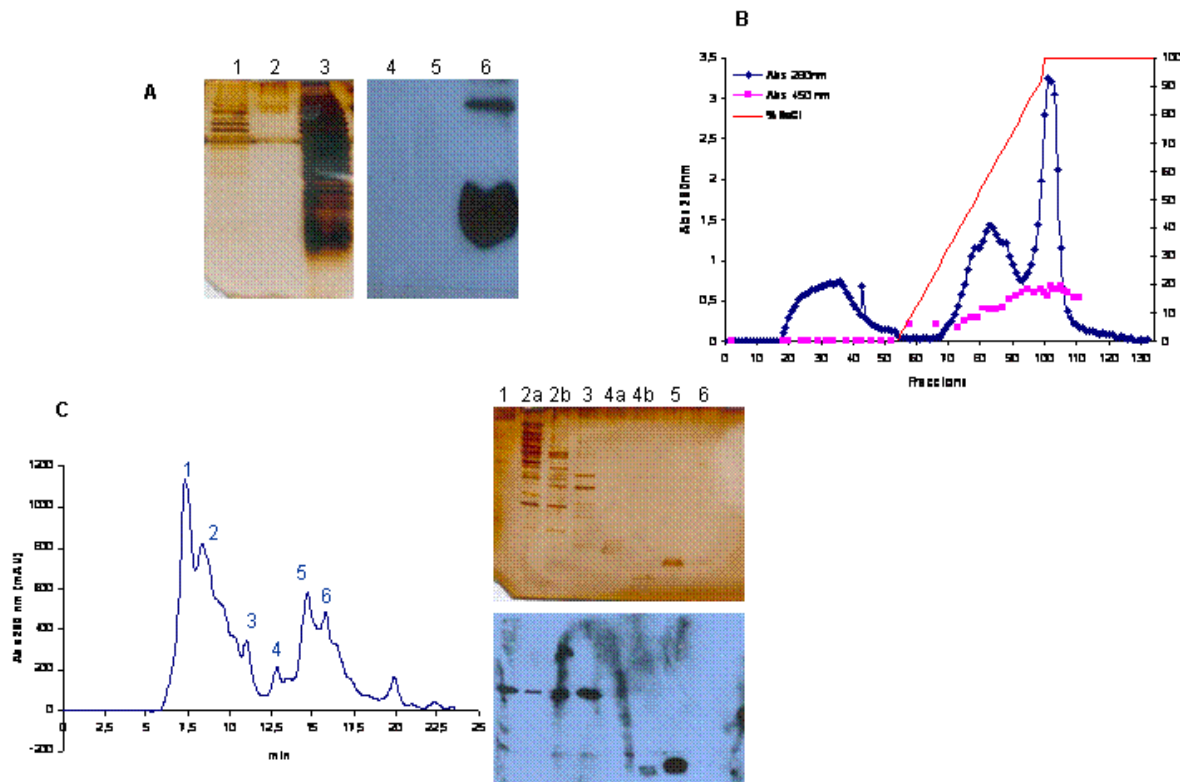


Fig 4A.31. Purificació de l'EGF a partir del sobrenedant del cultiu de pNIIIIOmpA3-EGF. **A.** Electroforesi en gel SDS-Page 16% tenyit amb nitrat de plata (esquerra) i per immunodetecció per mitjà de transferència tipus Western blot (dreta). (1 i 4) Medi extracel·lular abans de concentrar; (2 i 5) medi exclòs en la concentració; (3 i 6) medi concentrat. **B.** Cromatografia de bescanvi aniònic. Es mostra l'absorbància a 280 nm (♦) i l'absorbància a 450 nm (■) corresponent a l'anàlisi per ELISA de diverses fraccions recollides durant la cromatografia. **C.** Cromatografia de gel filtració en sistema FPLC. Es mostra el cromatograma així com l'anàlisi d'algunes fraccions per electroforesi en gel SDS-Page 16% tenyit amb nitrat de plata (imatge superior) i per immunodetecció per mitjà de transferència tipus Western blot (imatge inferior).

4A.2.7. Anàlisi de la puresa i el plegament de l'EGF recombinant

Per tal de determinar si l'EGF recuperat presentava una puresa acceptable i si, a més a més, tenia una conformació estructural correcta es va analitzar la mostra per mitjà de cromatografia en sistema FPLC de fase reversa i Maldi Tof (figura 4A.32), per saber exactament la puresa i la massa molecular de la proteïna respectivament, així com Dicroïsme Circular (figura 4A.33) per tal de determinar el plegament.

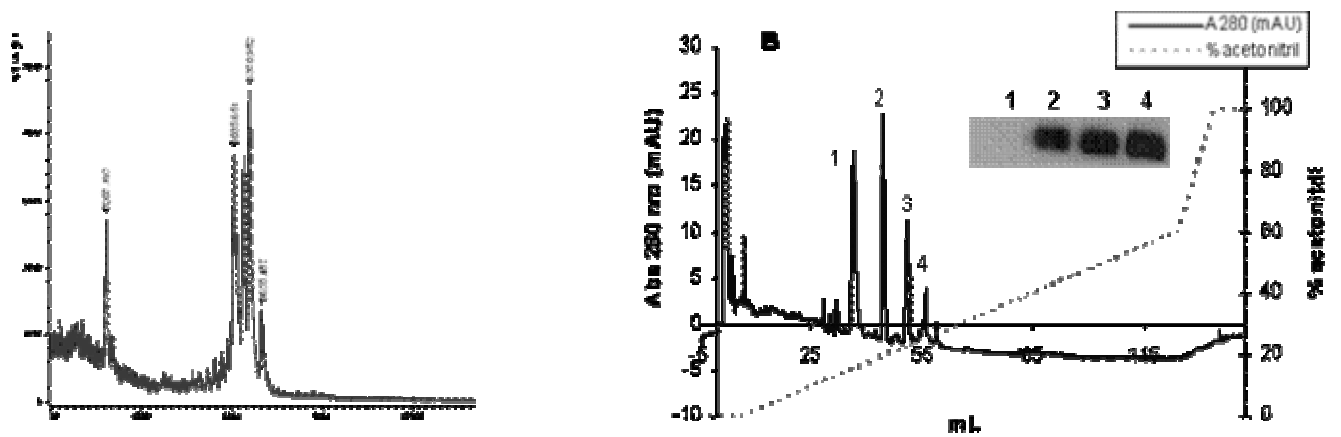


Fig. 4A.32. Anàlisi per MALDI-ToF de la mostra purificada d'EGF recombinant (pINIII). **B.** Cromatografia de fase reversa (Vydac C4) en sistema FPLC de la mostra purificada d'EGF recombinant (pINIII). Els diferents pics obtinguts van ser analitzats per immunodetecció mitjançant transferència tipus Western blot: (1) 3207 Da, (2) 6053 Da, (3) 6370 Da, (4) 6655 Da.

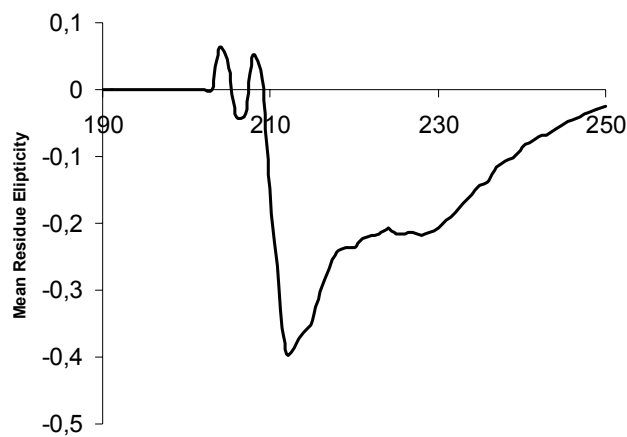


Fig 4A.33. Espectre obtingut en l'anàlisi per diroïsmes circular de la mostra d'EGF recombinant (pINIII) en tampó PBS pH 7.6. A l'eix de les abscisses es representen les absorbàncies (nm) i a l'eix d'ordenades l'elipticitat molar mitjana per residu ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$)

Mitjançant aquest sistema d'expressió s'han obtingut més d'una forma d'EGF ja que tant en el cromatograma de MALDI ToF com en el de cromatografia de fase reversa s'observen diferents pics. Inicialment es va pensar que la purificació no havia estat prou bona i que la mostra que es creia pura en realitat no ho era (figura 4A.32 A). És per això que els pics recuperats en la cromatografia de fase reversa es van analitzar per transferència tipus western blot i detecció específica amb anticossos anti EGF. El resultat ha estat que dels 4 pics obtinguts 3 corresponen a l'EGF, mentre que un, el primer que

elueix i que correspon a una massa molecular de 3207 Da (figura 4A.32 B) no ho és. Aquesta heterogeneïtat en la mostra d'EGF recombinant pot obeir a un tall diferencial de proteases de membrana a l'hora d'excretar l'EGF fora la cèl·lula bacteriana. Com ja s'ha comentat, hi ha una proteïna a la membrana interna d'*E.coli* que és l'encarregada de tallar per un punt del pèptid senyal i permetre, així, el pas a l'espai periplasmàtic. Però en aquest cas, la proteïna, a més a més, ha hagut de passar per la membrana externa del bacteri per tal de ser excretada i és en aquest punt en el qual pot haver-se donat aquest tall diferencial per part d'altres proteases de membrana (Grodberg i col., 1988; Matsuo i col., 1999; McCarter, 1994). De fet, hi ha multitud de proteïnes a la membrana d'*E.coli* que actuen com a proteases, i les diferents formes d'EGF recuperades poden obeir al tall d'aquesta proteïna recombinant per part de diferents proteases de membrana. Si s'hagués pogut detectar EGF a l'espai periplasmàtic s'hagués pogut analitzar aquest i comparar-lo amb el recuperat al sobrenedant del cultiu. Però com ja s'ha comentat, per mitjà dels mètodes d'anàlisi utilitzats no ha estat possible detectar la presència d'EGF en aquest espai periplasmàtic. En realitat, i com es veurà posteriorment, les formes que més comunament s'han detectat han estat les que tenen una massa molecular de 6630 i 6350 Da aproximadament, que corresponen a EGF de 57 i 54 aminoàcids (amb 4 i 1 aminoàcids de més a l'extrem N-terminal).

Pel que fa el plegament, en aquest cas sí que s'ha obtingut un EGF amb el plegament correcte, és a dir amb el nucli central T-knot (el format pels tres ponts disulfur entre les sis cisteïnes) correcte (figura 4A.33). Si es compara amb l'obtingut per l'EGF recombinant (pET21-EGF) i per l'EGF Truncat (figura 4A.24), es pot dir que la proteïna es troba en la seva conformació nativa en PBS pH 7,6, mentre que és incapaç d'adoptar una conformació correcta a pH àcid i baixa força iònica. En aquest últim espectre sí que hi ha un mínim vora els 228 nm i un altre mínim vora els 212 nm. El mínim a 228 nm simbolitza l'estructura en hèlix- α , encara que desplaçat cap al vermell degut a l'efecte dels residus aromàtics esmentats a l'apartat anterior. El mínim a 212 nm es correspon a la conformació en full β , encara que també hi ha un desplaçament del mínim, en aquest cas cap al blau, degut igualment a l'efecte dels residus aromàtics. La deconvolució amb el programa K2d (Andrade i col., 1993; Merelo i col., 1994), dona un 42% d'estructura en hèlix α , un 23% d'estructura en fulla- β , i un 36% de "random coil".

Es confirma que el fet d'expressar l'EGF de forma extracel·lular n'afavoreix el

plegament ja que aquest ambient presenta una sèrie de característiques que el fan més òptim per a la formació dels ponts disulfur.

4A.2.8. Anàlisi de l'activitat biològica de l'EGF recombinant

Igual que s'ha fet per l'altre EGF recombinant obtingut (pET21-EGF) i per l'EGF Truncat, en aquest cas també s'ha analitzat quina activitat biològica presenta aquesta proteïna. S'han analitzat la fosforil·lació i dimerització de l'EGFR i la proliferació cel·lular en les línies cel·lulars A431 i MCF-7, induïda per aquest EGF recombinant.

4A.2.8.1. Fosforil·lació

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4A.34.

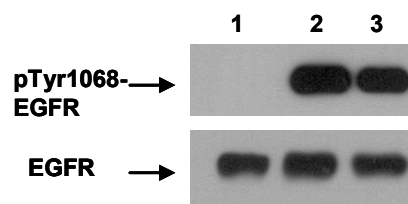


Fig 4A.34. Anàlisi per transferència tipus Western de la fosforil·lació de l'EGFR induïda per l'EGF comercial 50 ng/mL (1) i per l'EGF recombinant (pNIII) 50 ng/mL (2). Així mateix, s'ha fet un control (1) el qual no ha estat tractat. La intensitat de les bandes indica el grau de fosforil·lació d'una tirosina específica de l'EGFR (panell superior) i la quantitat d'EGFR present a cada una de les mostres (panell inferior).

La fosforil·lació de l'EGFR induïda per l'EGF recombinant (pNIII-EGF), igual que ja passava amb l'EGF recombinant (pET21-EGF), és gairebé la mateixa que la induïda per l'EGF comercial, i a la mateixa concentració de treball.

4A.2.8.2. Dimerització

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4A.35.

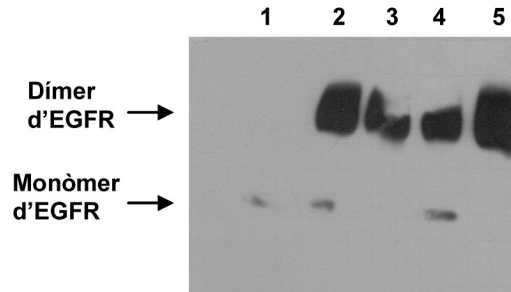


Fig 4A.35. Anàlisi per transferència tipus Western de la dimerització de l'EGFR induïda per l'EGF comercial 1 i 10 µg/mL (2 i 3, respectivament) i per l'EGF recombinant (pINIII) 1 i 10 µg/mL (3 i 4, respectivament). Així mateix, s'ha fet un control (1) el qual no ha estat tractat. La intensitat de les bandes indica la quantitat de dímer d'EGFR (340 kDa) o monòmer d'EGFR (170 kDa) que presenten cada una de les mostres.

En aquest cas també es confirma que l'activitat biològica en termes d'inducció de la dimerització de l'EGFR per part de l'EGF recombinant (pINIII-EGF) és igual que l'obtinguda per l'EGF comercial, i a més a les mateixes dosis de tractament.

4A.2.8.3. Proliferació

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4A.36.

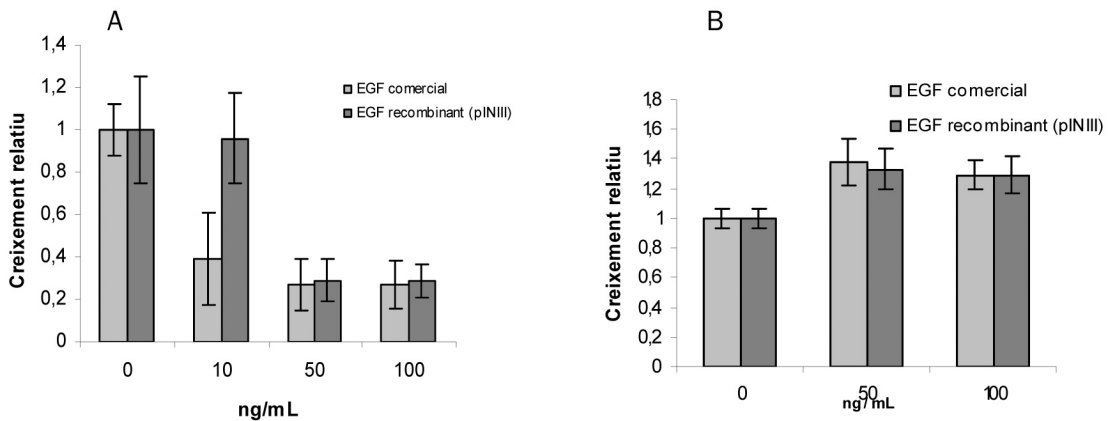


Fig 4A.36. Efecte de l'EGF comercial i l'EGF recombinant obtingut a partir de la construcció pINIII-EGF, en la proliferació de la línia cel·lular A431 (A) i MCF-7 (B). Les cèl·lules van créixer en medi 0.5% de sèrum, amb diferents concentracions d'EGF, variants truncades per digestió i EGF Truncat durant 72 hores. Les barres d'error indiquen l'error estàndard relatiu de tres experiments independents.

En aquest cas, i amb l'expectativa d'utilitzar aquest EGF recombinant com a punt de partida pels posteriors assajos biològics i pel disseny de variants, s'ha inclòs la línia cel·lular MCF-7 en l'estudi de la inducció de la proliferació, a més a més d'A431. La raó

és que tot i que A431 és un bon model d'estudi, la resposta enfront l'EGF és d'inhibició del creixement, per tant es considera un model negatiu. Es va decidir buscar una línia cel·lular que respongués bé i de forma positiva al tractament amb EGF. Després de moltes proves amb diverses línies cel·lulars, es va optar per escollir MCF-7. S'observa que els nivells de proliferació obtinguts per l'EGF recombinant i pel comercial són, en general, molt semblants.

Un cop analitzades la puresa, estructura i activitat biològica d'aquest EGF recombinant obtingut a partir del sistema d'expressió pINIII-EGF, i tenint en compte que el rendiment obtingut en la producció és acceptable, s'ha decidit partir d'aquest sistema a l'hora d'obtenir EGF recombinant per tal de construir variants que posteriorment seran estudiades en termes d'activitat biològica. A més a més, es planteja, en un futur, posar a punt un sistema de fermentador per tal d'optimitzar la producció d'EGF recombinant mitjançant aquest sistema d'expressió.

4A.2.9. Obtenció de variants de l'EGF

Un dels problemes que s'han observat en l'EGF Truncat és el plegament. L'ambient intracel·lular no és l'adequat per plegar una proteïna com l'EGF, però tot i que ho fos, el fet d'eliminar una part important de la proteïna com és la cua C-terminal, es creu que pot afectar el plegament ja que sembla ser que aquesta part és la responsable de la iniciació d'aquest procés. Per tant, doncs, tot i tenir un sistema com el de pINIII-EGF que permet recuperar un EGF ben plegat, no sembla massa viable obtenir-ne variants truncades mitjançant mutagènesi dirigida. Així doncs, es va optar per l'obtenció d'aquestes variants a partir de l'EGF natiu ben plegat i per mitjà de digestió proteolítica amb un enzim, la tripsina.

La tripsina és una endopeptidasa que talla selectivament enllaços peptídics de lisina i arginina. Anteriorment ja s'havia utilitzat aquest sistema per obtenir variants de l'EGF (Nice i col., 2002) tot i que el procés que seguien posteriorment no ha estat factible dur-lo a terme en el laboratori del qual disposa el grup de recerca, ja que requeria una infraestructura de laboratori de química inorgànica important. Aquests autors, un cop havien tallat l'EGF pels punts concrets, duien a terme reaccions químiques per tal d'enganxar diferent nombre d'aminoàcids a la part C-terminal i així tenir un ampli espectre de formes truncades de l'EGF als quals, gradualment, els aniria mancant un aminoàcid. Partint de la base d'aquests resultats, que ja han estat comentats a la introducció d'aquest

capítol de resultats, es va decidir obtenir dos EGF: l'1-48 (tall per la lisina 48) i l'1-45 (tall per l'arginina 45). Tot i que l'EGF té altres residus d'arginina (41) i lisina (28), sembla ser que queden protegides per la mateixa estructura de l'EGF i s'evita, així, que la tripsina pugui tallar per aquests punts, fins i tot a temps d'incubació amb l'enzim de més de 24 hores (Nice i col., 2002).

4A.2.9.1. Digestió de l'EGF recombinant amb tripsina i purificació de les variants obtingudes

En primer lloc va caldre posar a punt el protocol de digestió i trobar les condicions òptimes de temperatura, concentració de tripsina i EGF, i de temps de digestió. Després de diverses proves, les condicions de digestió que van mostrar major rendiment de producte obtingut han estat les següents:

- Concentració d'EGF: solució mare de 0.5 µg/mL dissolta en PBS pH 7.5-8 i CaCl₂ 20 mM.
- Concentració de tripsina: solució mare de 0.5 µg/µL dissolta en HCl 1.13 mM CaCl₂ 1 mM pH 2-3.
- Relació tripsina-EGF: 1:20
- Temps d'incubació: 26 hores
- Temperatura d'incubació: 42°C

Els resultats obtinguts per la digestió de l'EGF amb tripsina després d'aplicar aquestes condicions es mostren a la figura 4A.37.

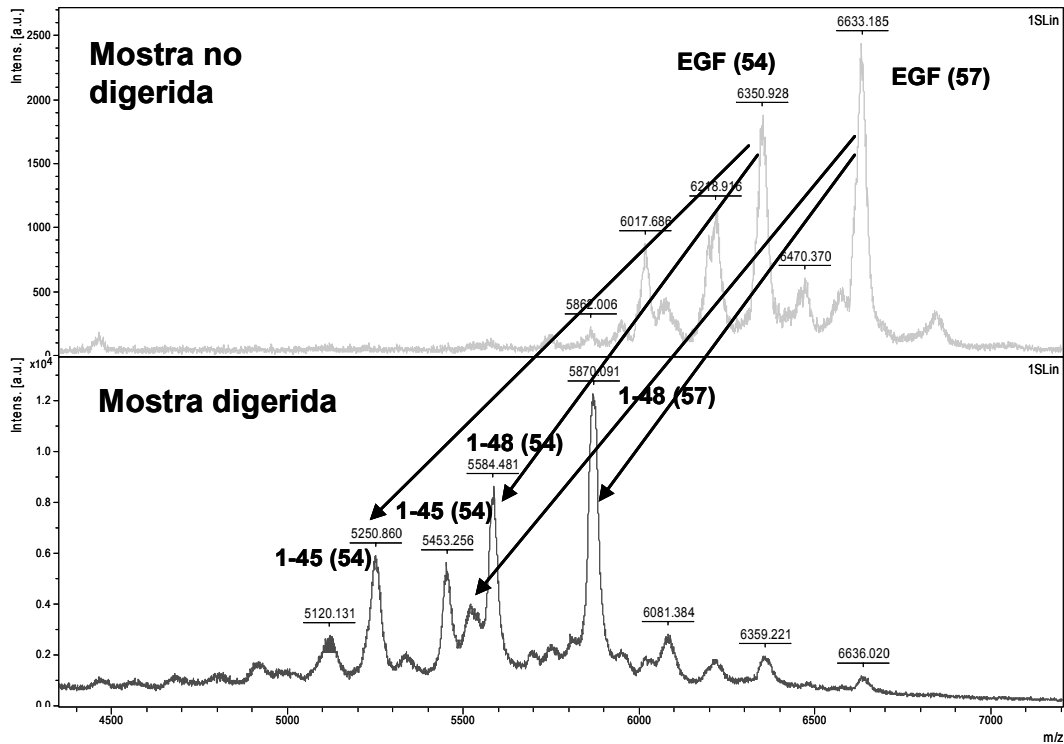


Fig 4A.37. Anàlisi per EM-MALDI TOF de la mostra d'EGF recombinant abans i després de la digestió amb tripsina. S'indiquen les formes EGF recombinant de 54 i 57 aminoàcids, i en què es converteixen després de la digestió.

La mostra d'EGF abans de digerir presenta, com a formes predominants, les variants de 54 i 57 aminoàcids que, per digestió amb tripsina, donen lloc a unes variants de 45 i 48 aminoàcids amb diferent massa molecular segons provenguin d'una o altra forma d'EGF. Aquesta mostra digerida va ser, posteriorment, sotmesa a una cromatografia en sistema FLPC de fase reversa per tal de separar les diferents variants truncades de l'EGF producte de la digestió amb tripsina (figura 4A.38).

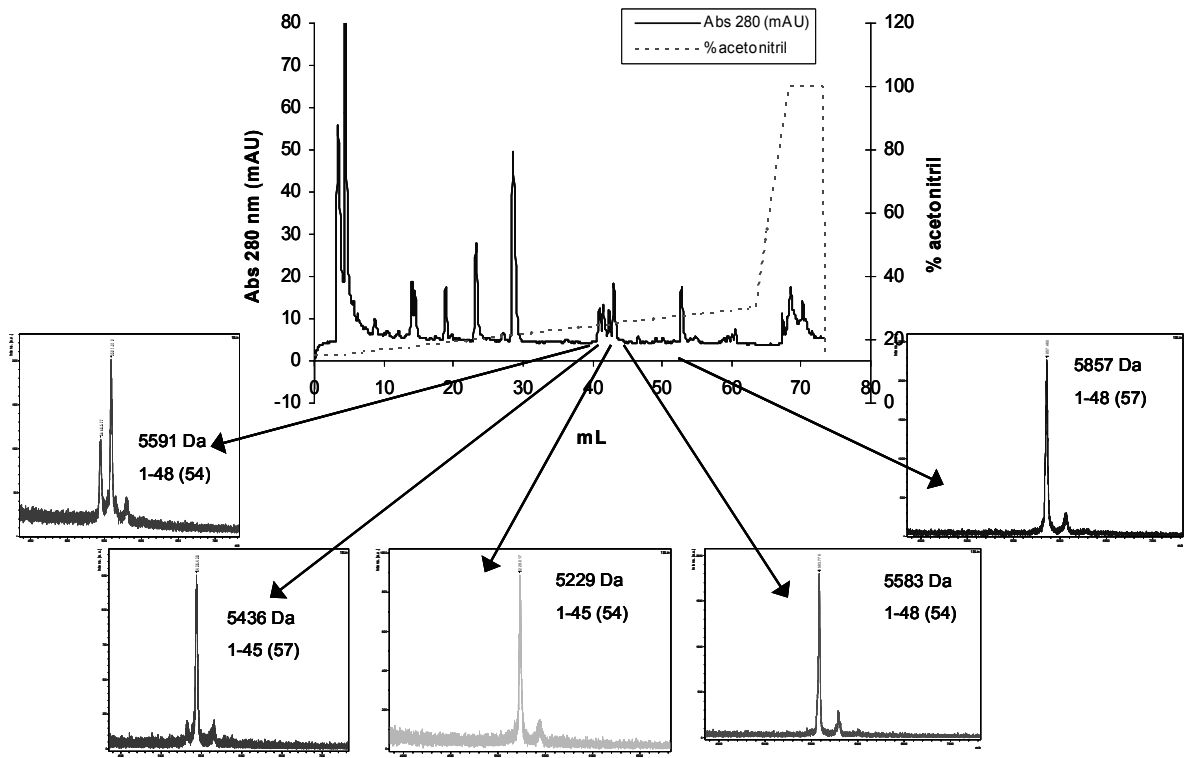


Fig 4A.38. Separació per cromatografia de fase reversa (Vydac C4) en sistema FPLC de les diferents formes producte de la digestió de l'EGF recombinant amb tripsina. Es senyalen els cromatogrames de Maldi-Tof de les formes 1-45 i 1-48, tant de l'EGF de 54 aminoàcids com del de 57.

El perfil d'elució mostra la presència de molts pics. Tots ells van ser analitzats per Maldi Tof, però només es va obtenir senyal pels que s'indiquen. Els altres poden correspondre a restes de sals o a pèptids petits el quals no entren dins el rang d'anàlisi del Maldi Tof. Es van poder recollir i quantificar, per separat, aquests cinc pics corresponents a les formes truncades de l'EGF. És curiós que, mentre que totes les variants s'elueixen en un sol pic, l'1-48 provinent de la digestió de l'EGF de 54 aminoàcids (1-48(54)) s'elueix en dos pics relativament separats. Tot i ser un sistema prou bo per obtenir variants de l'EGF, el rendiment final és força baix (de l'ordre de micrògrams) ja que el pas cromatogràfic que implica la columna de fase reversa representa pèrdues de fins al 50% de proteïna. En concret, quan s'ha partit de 100 μg d'EGF per a ser digerit, se n'han recuperat per terme mig uns 45-50 μg . Aquest és l'únic sistema vàlid del qual es disposa per tal de separar proteïnes amb tan poca diferència de massa molecular. Tot i així, les quantitats recuperades han permès dur a terme els assajos que s'havien plantejat inicialment en aquest treball.

4A.2.10. Anàlisi de l'activitat biològica de les variants truncades de l'EGF obtingudes per digestió amb tripsina

Un cop més, s'analitzà l'activitat biològica d'aquestes variants obtingudes pel que fa la inducció de la fosforil·lació, dimerització i també internalització de l'EGFR, així com de la proliferació cel·lular. En total s'han utilitzat 4 variants: 1-45 i 1-48 provinents de l'EGF de 54 aminoàcids, i 1-45 i 1-48 provinents de l'EGF de 57 aminoàcids. En realitat són dues variants, però provinents de dos EGF que, en principi, tenen la mateixa activitat biològica tal i com s'ha comprovat anteriorment.

4A.2.10.1. Fosforil·lació

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4A.39.

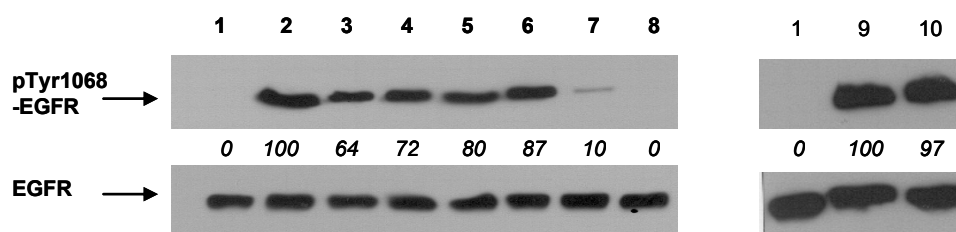


Fig 4A.39. Anàlisi per transferència tipus Western de la fosforil·lació de l'EGFR induïda per l'EGF recombinant (pINIII) (2 i 10, respectivament), i les variants truncades 1-45(54) (3), 1-48(54) (4), 1-45(57) (5), 1-48(57) (6), l'EGF truncat (7) i l'EGF comercial (9). La dosi sempre ha estat de 50 ng/mL. Així mateix, s'ha fet un control (1) el qual no ha estat tractat i un altre en el qual s'ha aplicat BSA (8). La intensitat de les bandes indica el grau de fosforil·lació d'una tirosina específica de l'EGFR (panell superior) i la quantitat d'EGFR present a cada una de les mostres (panell inferior). Aquesta intensitat va ser calculada per densitometria i els valors obtinguts es mostren en cursiva.

La fosforil·lació induïda per les formes truncades, és lleugerament menor en comparació a la induïda per l'EGF recombinant. A més a més, no s'observen diferències entre les variants 1-45 i 1-48. Tampoc s'observen diferències de comportament entre les mateixes variants provinents d'EGF amb diferent nombre d'aminoàcids. Si es comparen aquests resultats als que s'obtenen per l'EGF Truncat es pot veure que, a la mateixa dosi de treball, 50 ng/mL, la fosforil·lació induïda per l'EGF Truncat és 10 vegades inferior a l'obtinguda per l'EGF recombinant. Aquest valor, a diferència dels altres, sí que es considera molt significatiu.

4A.2.10.2. *Dimerització*

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 3.40.

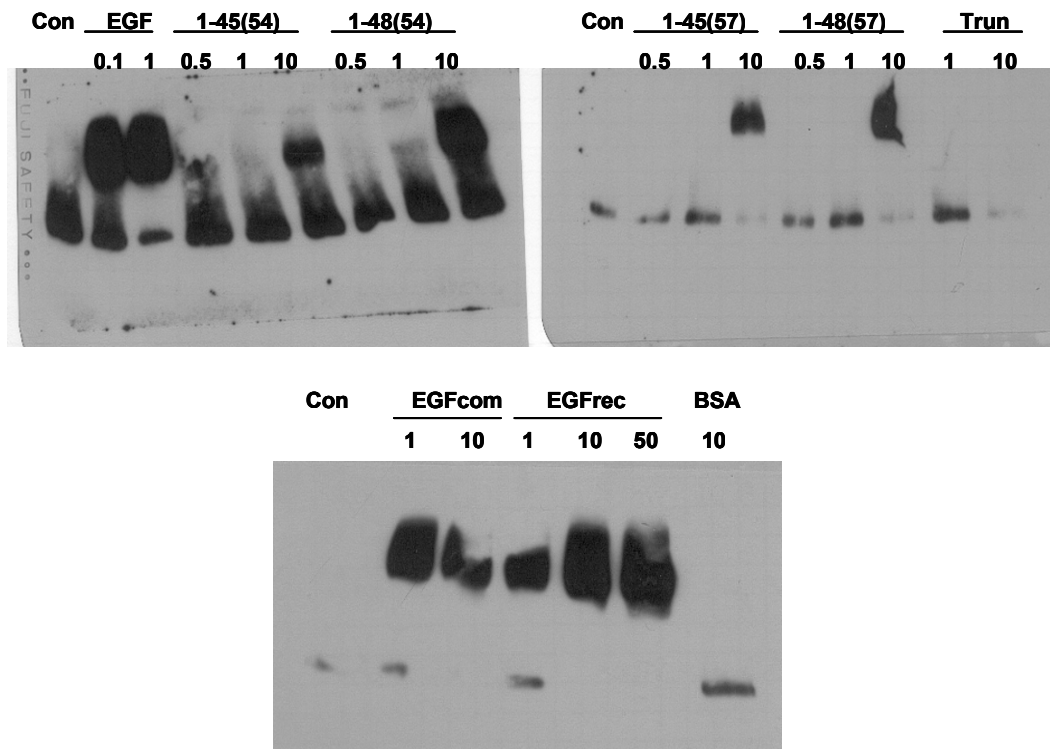


Fig 4A.40. Anàlisi per transferència tipus Western de la dimerització de l'EGFR induïda per l'EGF comercial, l'EGF recombinant (pINIII) i les formes truncades per digestió d'aquest, i l'EGF truncat. Així mateix, s'ha fet un control el qual no ha estat tractat i un en el qual s'ha tractat amb BSA. La intensitat de les bandes indica la quantitat de dímer d'EGFR (340 kDa) o monòmer d'EGFR (170 kDa) que presenten cada una de les mostres.

Tal i com ja passava en el cas de l'EGF Truncat, i que aquí es reafirma, la dimerització és el procés més afectat quan es modifica l'estructura de l'EGF. En aquest cas per les variants truncades per digestió s'observa que cal augmentar la dosi unes 10 vegades aproximadament per tal d'obtenir una resposta similar a l'obtinguda per l'EGF recombinant. Aquí sí que s'observen lleugeres diferències entre les variants 1-45 i 1-48. En concret, sembla que la 1-45 indueix menys dimerització que la 1-48. No s'observen diferències de comportament entre les mateixes variants provinents d'EGF amb diferent nombre d'aminoàcids.

4A.2.10.3. Internalització

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4A.41.

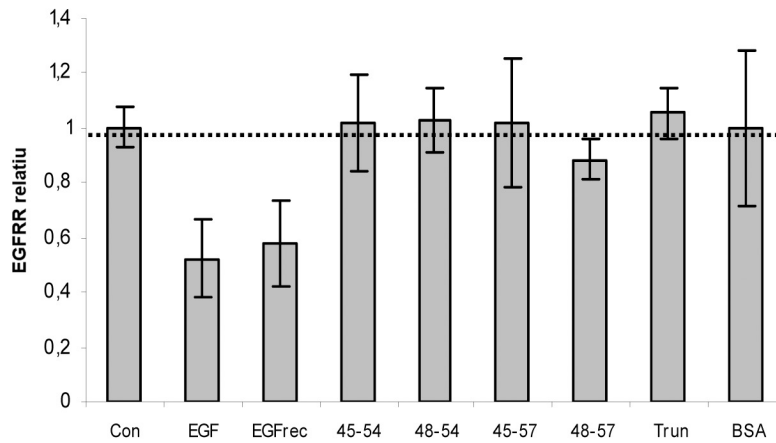


Fig 4A.41. Anàlisi per Cell-Elisa de la internalització de l'EGFR, en la línia cel·lular MCF-7, induïda per l'EGF comercial, l'EGF recombinant (pNIII) i les formes truncades per digestió d'aquest, i l'EGFtruncat. Així mateix, s'ha fet un control el qual no ha estat tractat i un en el qual s'ha tractat amb BSA. La dosi de tractament ha estat, en tots els casos, de 50 ng/mL. Aquest gràfic és el resultat de tres experiments independents. Les barres d'error indiquen l'error estàndard relatiu.

S'ha estudiat com l'EGF i les respectives variants induïen la internalització de l'EGFR en la línia cel·lular MCF-7. Aquest pas és la conseqüència immediata de l'activació del receptor i de vital importància ja que suposa una disminució de receptors a membrana susceptibles de ser activats per més lligand. S'ha utilitzat la línia cel·lular MCF-7 perquè presenta nivells moderats d'EGFR fet que permet veure diferències més clares que no pas en línies cel·lulars que sobreexpressen molt el receptor i en les quals les variacions són més difícils de detectar.

Segons els resultats obtinguts, l'EGF recombinant indueix la mateixa internalització del receptor que l'EGF comercial (aproximadament un 40% a la dosi assajada). D'altra banda, a la concentració de 50 ng/mL no s'ha detectat internalització de l'EGFR induïda per cap de les variants truncades de l'EGF. Se suposa que augmentant la dosi de treball, tal i com passa amb la dimerització i la fosforil·lació, s'observaria internalització. A més a més, veient

els resultats que es presenten a continuació hi ha una evidència molt clara que la internalització induïda per les variants ocorre.

4A.2.10.4. Proliferació cel·lular

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4A.42.

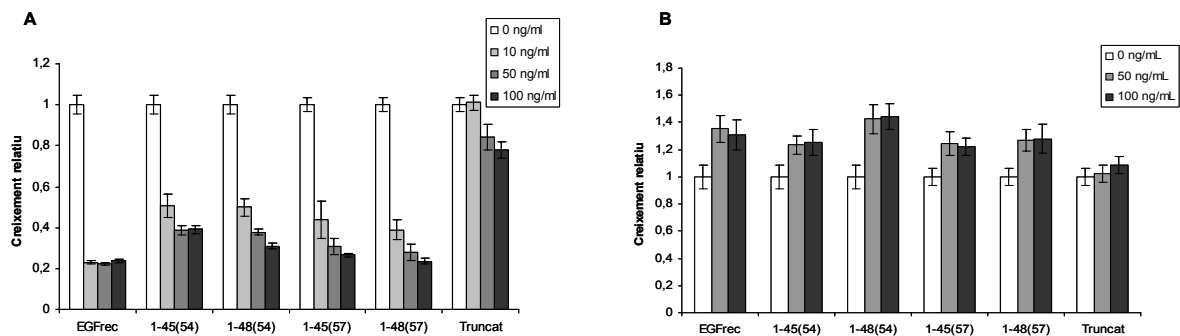


Fig 4A.42. Efecte de l'EGF recombinant (pNIII), les formes truncades per digestió i l'EGF Truncat en la proliferació de la línia cel·lular A431 (A) i MCF-7 (B). Les cèl·lules van créixer en medi 0.5% de sèrum, amb diferents concentracions d'EGF, variants truncades per digestió i EGF Truncat durant 72 hores. Les barres d'error indiquen l'error estàndard relatiu, de tres experiments independents.

En aquest cas, i com ja s'ha comentat, s'ha treballat amb dues línies cel·lulars: A431 que sobreexpressa EGFR i és considerada un model negatiu perquè l'EGF l'inhibeix, i MCF-7 considerada un model positiu perquè l'EGF l'estimula tot i tenir molt poca quantitat d'EGFR.

Les variants truncades per digestió es comporten de forma bastant semblant a l'EGF tot i que en alguns casos, sobretot en la línia cel·lular A431, costa més aconseguir els nivells assolits per l'EGF recombinant en quant a resposta. Ara bé, l'EGF Truncat continua mostrant-se com una excepció ja que en ambdós casos es comporta de forma diferent a la resta de variants. A les dosis assajades, en A431 inhibeix la proliferació cel·lular però molt menys que les altres variants. En canvia en MCF-7 ni tan sols s'observa una resposta clara enfront l'EGF Truncat; cal pensar que l'EGF recombinant, que és la molècula que s'espera que provoqui una resposta cel·lular més clara, només estimula en un 30% la proliferació cel·lular, per tant no és sorprenent que molècules amb força menys afinitat pel receptor no estimulin aquestes cèl·lules a les dosis assajades. En general no s'observen diferències gaire significatives ni entre les formes 1-45 i 1-48, ni entre les dues formes 1-45 i 1-48

producte de la digestió dels dos EGF de 54 i 57 aminoàcids.

El fet que quan es tracten les cèl·lules amb tot aquest banc de variants de l'EGF s'observi resposta i que aquesta segueixi el mateix patró que en el cas del tractament amb EGF recombinant, fa pensar que en el fons aquestes proteïnes també estan activant el sistema. És a dir, la proliferació cel·lular, o inhibició de la proliferació en el cas de les A431, és la resposta final a un procés d'activació d'una via de transducció del senyal. Per tant, si s'està observant divisió o apoptosi vol dir que fenòmens com la fosforil·lació, dimerització i internalització han hagut d'ocórrer prèviament. També és significatiu el fet que es correspon molt bé el grau d'activació del sistema amb la resposta final que s'aconsegueix. Mentre que les variants truncades per digestió provoquen més fosforil·lació, dimerització i internalització, l'EGF Truncat ho fa menys, i això es veu reflectit en la resposta final de la cèl·lula.

4A.2.11. Resum de l'activitat bioquímica de totes les variants de l'EGF que s'han obtingut

La primera taula-resum que es presenta (taula 4A.3) mostra l'activitat bioquímica de l'EGF comercial, el recombinant, les variants truncades per digestió, l'EGF Truncat i el PCI a la mateixa dosi de treball, que ha estat per cada procés:

- Fosforil·lació: 50 ng/mL
- Dimerització: 1 µg/mL
- Internalització: 50 ng/mL
- Fosforil·lació: 50 ng/mL

	Control	EGF comercial	EGF rec. (pINIII)	1-45 ₅₄	1-48 ₅₄	1-45 ₅₇	1-48 ₅₇	EGF Truncat	PCI
Fosforil·lació	0	100	100	64	72	80	87	10	5
Dimerització	100	15	18	100	82	100	100	100	100
D**	100	620	606	95	211	93	89	87	100
Internalització	100	50	60	100	100	100	100	100	100
Proliferació A431♦	100	20	20	35	35	30	30	80	100
Proliferació MCF-7♦	100	135	135	120	137	120	120	100	100

Taula 4A.3. Taula comparativa que mostra l'activitat relativa de cada una de les variants d'EGF obtingudes per digestió, de l'EGF Truncat, del PCI, així com dels dos EGF sencers (comercial i recombinant obtingut per mitjà de la construcció pINII-EGF), a la mateixa concentració de treball. Les dades han estat obtingudes mitjançant la relativització dels resultats obtinguts respecte el control positiu que s'ha considerat que és l'EGF comercial. Per fosforil·lació i dimerització s'han pres els valors de densitometria obtinguts mitjançant l'anàlisi dels films de western blot amb el programa Quantity-One (Bio-Rad), i per la internalització i proliferació s'han pres els valors de creixement relatiu obtinguts en els ELISA i assaig de proliferació respectivament. (M: monòmer d'EGFR; D: dímer d'EGFR).

* Monòmer d'EGFR: 100 en el control significa que, sense afegir lligand, gairebé tot el receptor es troba en forma de monòmer.

** Dímer d'EGFR: 100 en el control indica la quantitat de receptor que, espontàniament, es troba formant dímer. Aquest representa una fracció molt petita del total.

♦ El 100 del control indica la proliferació de les cèl·lules en medi DMEM 0.5% FBS, sense afegir cap tractament.

Segons les dades que es presenten a la taula s'ha arribat a les següents conclusions:

FOSFORIL·LACIÓ: hi ha davallada de la fosforil·lació (entre un 20 i 30%) quan es tracta amb les formes truncades per digestió. Pel que fa l'EGF Truncat, indueix molta menys fosforil·lació (aproximadament un 90% menys) i aquest comportament és molt semblant al que s'observa pel PCI.

DIMERITZACIÓ: procés en el qual s'observen diferències més importants entre les formes natives de l'EGF (comercial i recombinant) i les truncades. Les variants truncades per digestió provoquen unes 6 vegades menys dimerització de l'EGFR en comparació amb la forma nativa. L'EGF Truncat i el PCI es comporten de forma semblant. Ara bé, si es comparen amb les formes truncades per digestió, cal més quantitat d'EGF Truncat i PCI respecte aquestes per tal d'assolir el nivell de dimerització aconseguït amb les formes natives d'EGF (EGF comercial i recombinant).

INTERNALITZACIÓ: a les dosis assajades, cap de les formes truncades induïx internalització de l'EGFR de forma significativa.

PROLIFERACIÓ: en ambdues línies cel·lulars, A431 i MCF-7, les formes truncades per digestió es comporten com la forma nativa però amb una intensitat lleugerament inferior (10-20% aproximadament). L'EGF Truncat i PCI no induïxen resposta significativa.

A la segona taula-resum que es presenta (taula 4A.4) es mostra a quina concentració de cada una de les variants truncades per digestió, EGF Truncat i PCI, s'aconsegueix el mateix efecte que l'EGF comercial i el recombinant. D'aquests dos últims, es mostra a quina concentració s'observa un efecte màxim en cada una de les etapes d'activació de l'EGFR.

	Control	EGF comercial	EGF rec.(pINIII)	1-45 ₅₄	1-48 ₅₄	1-45 ₅₇	1-48 ₅₇	EGF Truncat	PCI
Fosforil·lació	-	50 ng/mL	50 ng/mL	75 ng/mL	70 ng/mL	60 ng/mL	60 ng/mL	>500 ng/mL *	>>1 µg/mL *
Dimerització	-	1 µg/mL	1 µg/mL	20-30 µg/mL	10 µg/mL	20-30 µg/mL	10 µg/mL	>>500 µg/mL *	>>5 mg/mL *
Internalització	-	50 ng/mL	50 ng/mL	>50 ng/mL	>50 ng/mL	>50 ng/mL	>50 ng/mL	>50 ng/mL	>50 ng/mL
Proliferació A431	-	10 ng/mL	50 ng/mL	100-125 ng/mL	100 ng/mL	100 ng/mL	100 ng/mL	>>200 ng/mL *	♣
Proliferació MCF-7	-	50 ng/mL	50 ng/mL	50 ng/mL	50 ng/mL	50 ng/mL	50 ng/mL	>100 ng/mL	♣

Taula 4A.4. Taula comparativa que mostra a quina concentració aproximada de cada una de les variants d'EGF obtingudes per digestió, de l'EGF Truncat, del PCI, així com dels dos EGF sencers (comercial i recombinant obtingut per mitjà de la construcció pINIII-EGF), s'assoleix l'efecte màxim en cada un dels processos estudiats. (*) no s'ha pogut assolir l'activitat màxima a la màxima dosi de treball.

♣ No s'ha dut a terme.

Segons les dades que es presenten a la taula s'ha arribat a les següents conclusions:

FOSFORIL·LACIÓ: no es necessita gaire més quantitat de formes truncades per digestió per aconseguir el mateix efecte que indueixen EGF comercial i recombinant. Quan es treballa amb EGF Truncat i PCI no s'ha pogut detectar efecte igual a l'EGF comercial i recombinant.

DIMERITZACIÓ: únic procés en el qual s'observen diferències entre les variants truncades 1-45 i 1-48. En concret es necessita molt més variant 1-45 per induir la mateixa dimerització que EGF comercial i recombinant, en comparació amb la variant 1-48. No hi ha diferències entre les provinents d'EGF de 54 i 57 aminoàcids. Pel que fa EGF Truncat i PCI no s'ha pogut detectar efecte igual a l'EGF comercial i recombinant.

INTERNALITZACIÓ: No s'ha pogut determinar a quina concentració de cada una de les variants i també del PCI s'aconsegueix un efecte semblant a l'indut per l'EGF comercial i recombinant, si és que s'arriba a aconseguir.

PROLIFERACIÓ: Per la línia cel·lular A431 calen unes 2 vegades més de formes truncades en comparació amb EGF recombinant i 10 respecte EGF comercial, per aconseguir el mateix efecte que aquests. Per l'EGF Truncat no s'ha aconseguit observar el mateix efecte a les concentracions amb les quals s'ha treballat. Per la línia cel·lular MCF-7 no hi ha diferències en les concentracions de variants obtingudes per digestió per tal d'aconseguir el mateix efecte que EGF comercial i recombinant. D'EGF Truncat en cal més del doble.

4A.3. DISCUSSIÓ GENERAL

El factor de creixement epidèrmic (EGF) va ser identificat per primer cop a la orina humana (Angeletti, 1964). El primer protocol de purificació a partir de mostres humanes consistia en 5 passos, i va permetre obtenir EGF per tal de ser caracteritzat (Carpenter i Cohen, 1979). Aquest protocol no partia de mostra d'orina sinó d'un concentrat de proteïnes de l'orina. El mateix any, uns altres autors (Gregory i Willshire, 1975) van presentar un protocol d'aïllament d'urogastrona (idèntica a l'EGF) a partir, també, de l'orina humana. Tot i així, aquest protocol es basava en el processament de més de 3000 litres d'orina, la utilització de 12 passos de purificació, i com a conseqüència el rendiment final era molt baix (vora el 3-5%). Un altre protocol de purificació el van descriure Savage i Harper (1981) i aquest consistia en 6 passos per aïllar EGF a partir de 20 litres d'orina, i incorporava només dos cromatografies. Tot i així, la millora no va ser gaire important i el rendiment final continuava essent baix (16% aproximadament).

Tot i que, inicialment, aquestes estratègies van servir per poder obtenir suficient proteïna per fer-ne una primera caracterització, les necessitats d'obtenció d'EGF que es tenien van fer pensar que el millor sistema per disposar d'EGF de forma ràpida, senzilla i eficaç seria obtenir-lo de forma recombinant. Han estat moltes les estratègies que s'han utilitzat fins ara per tal d'obtenir l'EGF de forma recombinant. I és que l'interès que es té, tant des l'àmbit farmacèutic com científic i de desenvolupament, per tal de disposar d'EGF per aplicacions clíniques o bé per dur a terme estudis estructurals i de disseny de nous fàrmacs, ha evidenciat la manca d'un sistema prou bo i que complís les expectatives desitjades pel que fa a rendiment i activitat d'aquesta proteïna. Com s'ha demostrat en aquest treball, el fet d'expressar una molècula tant petita i amb una estructura tan particular governada pels tres ponts disulfur com és el cas de l'EGF, en un sistema bacterià d'expressió intracel·lular (pET21-EF) comporta una sèrie de problemes. Tot i que aquesta estratègia permet obtenir quantitats molt elevades de proteïna recombinant, presenta el gran inconvenient de la incapacitat d'aquesta de plegar-se correctament en un ambient tan reductor com és el citoplasma d'*Escherichia coli*. Ni tan sols en presència de proteïnes que afavoreixen la solubilització, i fins i tot el plegament, com és el cas de la tioredoxina, aquest objectiu s'ha pogut aconseguir. En aquests casos el més indicat és, tal i com s'ha fet en aquest treball, plegar la proteïna un cop ha estat purificada i mitjançant l'exposició a agents que afavoreixen el plegament com són el glutatió oxidat i reduït (Chang i col., 1995; Chang i col., 2000). Tot i així, s'ha pogut comprovar que aquesta estratègia no permet obtenir EGF ben plegat sinó una barreja de formes amb diferents combinacions d'unió

entre cisteïnes. De fet, alguns autors (Nice i col., 2002) ja indicaven que la probabilitat d'obtenir una mostra homogènia pel que fa plegament (correcte formació dels ponts disulfur entre les cisteïnes adequades), era molt baixa per no dir gairebé impossible. D'altra banda, altres autors (Chang i col., 1995; Chang i col., 2000) han proposat que el plegament correcte és possible i, de fet, les condicions utilitzades en aquest treball van ser suggerides després d'analitzar els resultats obtinguts en molècules semblants com són el PCI i l'LCl. Tot i així, no ha estat possible obtenir EGF ben plegat per mitjà d'aquesta estratègia.

En aquest moment, es va decidir optar per una altra via que inicialment no s'havia prioritzat a causa de la diferència en rendiment final entre aquesta estratègia i l'anterior, que consistia en expressar l'EGF de forma soluble al periplasma o al medi extracel·lular (pINIII-EGF), i es basava en els resultats obtinguts per Molina i col., (1992) amb el PCI. Mitjançant aquest procediment ha estat possible obtenir EGF, el qual s'ha recuperat del medi extracel·lular, i ben plegat. I és que aquest ambient, l'extracel·lular, permet un correcte plegament de la proteïna ja que és més oxidant que el citoplasma bacterià. Igual que ja havia passat amb el PCI, l'EGF ha estat secretat fora la cèl·lula i no s'ha mantingut al periplasma. Cal tenir en compte que l'EGF i el PCI són dues proteïnes molt semblants tant pel que fa la mida com l'estructura, per tant és fàcil pensar que es comportin de la mateixa manera a l'hora de ser produïdes i transportades pel bacteri. Tot i que el rendiment final no és tan elevat com quan es treballa amb sistemes d'expressió intracel·lulars, és de lluny suficient per tal de disposar de proteïna pura per dur a terme assaigs bioquímics. Igual que ja es va fer amb el PCI, es planteja com a objectiu futur posar a punt un protocol a partir del qual es puguin obtenir quantitats més elevades d'EGF i que, molt probablement, estarà basat en un sistema de fermentador. Cal destacar el fet que un cop recuperat i purificat, s'ha observat que aquest EGF es troba present en forma de dues variants amb diferent nombre d'aminoàcids, 54 i 57, producte del tall diferencial dut a terme, molt probablement, per una proteasa de la membrana d'*E.coli*, a l'hora d'alliberar l'EGF al medi extracel·lular (Grodberg i col., 1988; Matsuo i col., 1999; McCarter, 1994). Tot i així, ambdues formes s'ha comprovat que tenen la mateixa activitat biològica, per tant no s'han tractat per separat.

Ara bé, si pel tema estructural sembla clar que l'expressió intracel·lular no permet acomplir aquest objectiu, sí que la mostra d'EGF pura que s'obté al final del procés s'ha comprovat que és biològicament activa, igual que ho és l'EGF obtingut a partir de l'expressió extracel·lular. És a dir, ambdós EGF són capaços d'induir la fosforil·lació, dimerització i internalització de l'EGFR, així com la proliferació cel·lular en nivells semblants als aconseguits per l'EGF comercial. No deixa de ser sorprenent que una mostra d'EGF que conté diferents formes de plegament i que, globalment, es considera mal plegada sigui capaç de ser activa. Això fa pensar que l'estructura, tot i ser important, no és vital per l'activitat, i que és en major proporció la seqüència polipeptídica de l'EGF la que determina l'afinitat per l'EGFR i la capacitat d'induir-ne la seva activació. Tot i així, i en termes estrictament científics, no es considera aquest un bon EGF, i l'opció extracel·lular és la que s'accepta com a correcte per tal de produir-lo.

L'objectiu final del treball ha estat utilitzar aquest EGF recombinant per obtenir variants i estudiar quina és la importància de la cua C-terminal en l'activació del receptor. S'ha pogut comprovar que, altre cop, i a partir del sistema d'expressió intracel·lular (pET21-EGF) s'obtenia una variant, l'EGF Truncat, mal plegat. En aquest cas, es creu que a més de la impossibilitat de formar els ponts disulfur, aquesta variant no ha pogut iniciar els moviments pertinents, que sembla que vindrien dirigits per la part C-terminal de la molècula, i que permetrien iniciar l'apropament de les cisteïnes apropiades i, en conseqüència, la formació dels ponts disulfur. Prèviament s'havia observat que la part N-terminal no era indispensable per la formació dels tres ponts disulfur, i que tot semblava indicar que el correcte posicionament de les 6 cisteïnes per tal de formar els tres ponts disulfur era dirigit per la regió C-terminal de l'EGF (Shin i col., 1995). Tot i així, s'ha tingut en compte a l'hora de dur a terme proves bioquímiques d'activitat biològica.

L'estratègia que s'ha seguit per tal d'obtenir mutants a partir de la forma ben plegada de l'EGF (l'obtinguda mitjançant la construcció pNIII-EGF) ha estat la digestió enzimàtica amb tripsina. Aquesta tècnica té l'avantatge d'actuar sobre la proteïna ben plegada, i sense sotmetre-la a condicions desnaturalitzants. S'havia vist que si, sobre la seqüència gènica s'eliminaven certs nucleòtids per mutagènesi dirigida, la proteïna resultant, un cop expressada, seria molt difícil que es pogués plegar pel fet de no tenir una part essencial de la molècula involucrada en la iniciació del plegament. Com a desavantatge principal hi ha el fet que els rendiments finals no són gaire elevats, i que aquesta digestió només permet tallar en punts concrets de la seqüència polipeptídica. Per mitjà d'aquesta estratègia s'han obtingut dues variants de l'EGF: una amb 45 aminoàcids (tall per l'arginina 45) i una amb

48 aminoàcids (tall per la lisina 48). En realitat, han estat 4 variants ja que de cada una de les formes d'EGF (54 i 57 aminoàcids) se n'han obtingut les dues formes truncades. S'ha pogut comprovar que el procés més significativament afectat per la manca de la part C-terminal és la dimerització del receptor, mentre que la fosforil·lació i internalització així com la proliferació cel·lular, tot i disminuir respecte la induïda per l'EGF sencer, continua essent prou important. Exceptuant en el procés de dimerització, en general no s'observen massa diferències entre les formes digerides fins l'aminoàcid 45 o fins el 48. Pel que fa la dimerització, sembla que la forma truncada fins a l'aminoàcid 45 induïx menys dimerització que la truncada fins a l'aminoàcid 48, fet que dóna un protagonisme important als aminoàcids compresos entre el 45 i 48 en la formació i estabilització del dímer d'EGFR. En termes de proliferació cel·lular, els resultats obtinguts en aquest treball es contradiuen amb els resultats obtinguts per Burgess i col., (1988) els quals observaren que el fet d'eliminar la Leu47 feia disminuir molt l'activitat mitogènica. Cal dir que en aquests estudis (Burgess i col., 1988; van Zoelen i col., 1996) s'analitzava de forma diferent l'activitat biològica de les variants de l'EGF (en concret es feia mitjançant isòtops radioactius) i aconseguien uns nivells de sensibilitat molt més elevats que no pas els aconseguits en aquest treball. Per tant, es creu que si es pogués disposar d'aquestes tècniques potser els resultats obtinguts permetrien veure diferències més importants entre aquestes dues variants de l'EGF. Pel que fa l'EGF Truncat, que cal recordar que es troba mal plegat, és el que es comporta de forma més semblant al PCI en tots els aspectes. Tot i així, no arriba als nivells d'antagonisme mostrats pel PCI, però en contrapartida sí que sembla que manté més afinitat pel receptor.

Alguns autors (Wang i col., 2005) apunten que per tal que es doni la internalització del receptor d'EGF cal que, prèviament, hagi ocorregut la dimerització. I és que sembla que aquest procés és clau per tal que, posteriorment, es doni l'activació per mitjà de la fosforil·lació dels dos EGFR. La internalització és un tema més delicat i sembla ser que no totes les parelles de receptors internalitzen i si ho fan, ho fan en diferent grau. Els resultats obtinguts en aquest treball semblen donar força a aquesta hipòtesi ja que s'observa que el fet de modificar l'EGF provoca canvis bàsicament en la dimerització. Aquest procés és el que es veu més afectat, i de retruc també la internalització. La fosforil·lació no es veu tan modificada i per aquesta raó sembla que no pot ser que aquesta controli tots els altres processos que sí que es veuen afectats (dimerització i internalització). En termes generals, però, tot i que puntualment sí que es denoten canvis en el comportament bioquímic de l'EGFR, la proliferació cel·lular no es veu ni molt menys inhibida sinó més aviat retardada.

És a dir, no s'aconsegueix parar la via de transducció del senyal iniciada per les variants truncades de l'EGF, però sí que s'aconsegueix desfasar-la en el temps respecta a la iniciada per l'EGF.

En resum, doncs, sembla que tot i que sempre s'havia partit de la base del plegament, la variant mal plegada, l'EGF Truncat, sembla ser el que mostra més semblança al PCI, fet que no deixa de ser sorprenent. Això indica que és molt difícil eliminar la capacitat d'inducció de l'activació de l'EGFR que té l'EGF només eliminant una part de la molècula, tot i que aquesta part sigui prou important estructuralment. Només tocant el receptor amb certa afinitat (afinitat que sembla venir governada per la seqüència polipeptídica) seria suficient per tal d'induir una reorganització en els diferents dominis extracel·lulars i activar en cert grau el receptor. Això, de fet, és el que sembla que també fan els anticossos monoclonals com el C225 (erbitux). Tot i que molts aminoàcids clau per l'activació de l'EGF hagin estat eliminats, altres encara presents poden induir un canvi conformacional d'aquest que, tot i que no igual, sí suficient per tal de generar una resposta. Tot sembla indicar que aquest lleuger canvi estructural de l'EGFR induït per les variants de l'EGF li permet al receptor esdevenir fosforilat i, per tant, activat i capaç de generar una resposta. Seria interessant poder analitzar quines tirosines es fosforilen en cada cas, és a dir quan s'utilitza EGF sencer o cada una de les variants que s'han fet. D'aquesta manera es podria saber quines vies d'activació depenen de la presència de determinats aminoàcids a la part C-terminal de l'EGF.

4A.4. CONCLUSIONS

1. S'han provat diverses estratègies de clonatge del gen de l'EGF humà: pET21 (expressió intracel·lular), pET22 (expressió periplasmàtica), pET32 (expressió mitjançant proteïna de fusió), i pNIII-OmpA3 (expressió extracel·lular). De totes aquestes estratègies, pET21 i pNIII-OmpA3 són les que s'han escollit a l'hora de produir EGF recombinant i les posteriors variants, ja que són les que han donat millors rendiments.
2. S'ha posat a punt un sistema d'expressió i purificació de l'EGF recombinant a partir dels dos sistemes d'expressió (pET21-EGF i pNIII-EGF). En el primer cas, pET21-EGF, la proteïna s'ha expressat en forma de cossos d'inclusió, per tant de forma insoluble, i en el segon cas, pNIII-EGF, l'expressió ha estat extracel·lular, per tant de forma soluble.
3. S'ha confirmat el plegament i activitat de l'EGF recombinant obtingut mitjançant les dues estratègies. En ambdós casos l'activitat ha estat pràcticament del 100%, en comparació amb l'EGF comercial. D'altra banda, els estudis de dicromisme circular per confirmar l'estructura secundària de la proteïna han posat de manifest que només l'EGF expressat de forma soluble (pNIII-EGF) estava ben plegat, mentre que el que s'ha obtingut a partir de pET21-EGF consistia en una barreja de formes mal plegades.
4. Això ha permès concloure que l'ambient intracel·lular no és el més propici per tal que una proteïna, rica en ponts disulfur, es pugui plegar. Les millors condicions es donen a l'ambient extracel·lular on sí s'ha demostrat que l'EGF es pot plegar bé. Tot i això, l'activitat no es veu significativament afectada per aquest fet. Això semblaria confirmar que l'afinitat pel receptor la determina més la seqüència aminoacídica que no pas l'estructura de l'EGF.
5. A partir de la construcció plasmídica pET21-EGF s'ha dissenyat un mutant al qual se li ha eliminat la part de la cua C-terminal: EGF Truncat (47 aminoàcids, 1-47). Aquest mutant s'ha expressat i purificat satisfactòriament. Els rendiments de producció han estat lleugerament inferiors als obtinguts per l'EGF.
6. A partir de l'EGF obtingut extracel·lularment utilitzant la construcció plasmídica pNIII-EGF s'han dut a terme digestions enzimàtiques amb tripsina per tal d'eliminar part de la cua C-terminal de l'EGF: EGF1-45 i EGF1-48. En purificar aquestes variants, en realitat se n'han obtingut dues de cada forma degut a què l'EGF recombinant del qual s'ha

partit és una barreja de dues formes amb diferent nombre d'aminoàcids (54 i 57) per tall diferencial d'una proteasa de membrana en ser translocat a l'espai extracel•lular.

7. S'han dut a terme assajos bioquímics per determinar l'activitat de cada una de les variants de l'EGF obtingudes. En general, s'ha comprovat que les variants 1-45 i 1-48 i que estan ben plegades, presenten certa activitat tant pel que fa fosforil•lació, dimerització, internalització i proliferació cel•lular. Aquesta activitat, però, és significativament més baixa que l'observada per l'EGF recombinant.
8. Pel què fa l'EGF Truncat, té un comportament força similar al PCI ja que tot i induir certa fosforil•lació, té molt reduïda la capacitat d'inducció de la dimerització, internalització i proliferació cel•lular.

4B. CAPÍTOL II

4B.1. INTRODUCCIÓ GENERAL

4B.1.1. ELS INHIBIDORS DE TIROSIN QUINASES

Deguda la gran importància que té la via EGFR en la majoria de carcinomes, s'han destinat molts esforços per tal d'intentar frenar-la i aturar, d'aquesta manera, el progrés del tumor. A la Introducció general ja s'han enumerat algunes de les estratègies desenvolupades en aquest sentit, com són els anticossos monoclonals. En aquest apartat, es tractaran de forma més àmplia els inhibidors de tirosin quinases, ja que un d'ells ha estat objecte d'estudi en aquest treball.

Els receptors ErbB solen trobar-se activats de forma aberrant en molts tipus de neoplàsies. La sobreexpressió d'EGFR es correlaciona amb un mal pronòstic i desenllaç en un gran nombre de carcinomes inclosos els de pulmó, bufeta, mama i còlon. Un increment en la quantitat de receptor sol estar associada a un increment en la producció de lligands, com el TGF α , per part de la pròpia cèl·lula. Això fa que el receptor estigui permanentment activat mitjançant un "loop" autocrí. És per tot això que la diana que representa l'EGFR i els altres membres de la família ErbB els fan uns bons candidats a l'hora de dissenyar teràpies antitumorals específiques. D'entre totes aquestes teràpies, els inhibidors de tirosin-quinasa i els anticossos monoclonals són les que es troben en un estat més avançat pel que fa el seu possible ús com a fàrmacs antineoplàsics.

El tractament de les cèl·lules tumorals amb aquests agents s'ha vist que modifica la regulació de proteïnes importants en la via de transducció del senyal iniciada per aquesta família de receptors. També s'ha comprovat que, com a conseqüència d'això, el creixement en línies cel·lulars tumorals i en xenògrafts es veu alentit o fins i tot aturat (Hynes i Lane, 2005).

Les proteïnes amb activitat tirosin-quinasa, d'entre les quals l'EGFR n'és un exemple, catalitzen la transferència del grup fosfat de l'ATP als residus de tirosina d'altres proteïnes cel·lulars diana. Regulen transduccions del senyal intracel·lulars les quals deriven en proliferació cel·lular, migració, metabolisme, supervivència i comunicació cel·lular. La fosforil·lació de les proteïnes és rara i està molt finament regulada en cèl·lules quiescents, però és abundant i ràpida en cèl·lules que estan proliferant o bé en cèl·lules transformades. Les vies regulades per aquestes proteïnes tirosin-quinasa són habitualment dianes de

mutacions somàtiques les quals provoquen alguns càncers. Per tal de seleccionar una tirosin-quinasa com a diana terapèutica cal que no tingui un paper vital en el desenvolupament postnatal o en la fisiologia de l'adult.

Les drogues dissenyades per tal de bloquejar aquestes proteïnes són generalment menys tòxiques i més ben tolerades que la quimioteràpia convencional i poden ser aplicades durant un període més llarg de temps. Normalment, aquests tractaments s'utilitzen en combinació amb la quimioteràpia citotòxica convencional o bé amb la teràpia de radiació. Hi ha dos grans raons per aquest fet. En primer lloc, com a agents citostàtics aplicats en monoteràpia, sembla que tenen efectes molt limitats en pacients amb un grau avançat de la malaltia, i només en comptades ocasions provoquen una regressió del tumor (fenomen conegut com a "resposta objectiva"). En segon lloc, sembla que en ocasions potencien l'efecte de la quimioteràpia convencional i de la radiació, i per això s'utilitzen com a quimio i radiosensibilitzadors. Aquests compostos, sensibilitzadors, s'utilitzen, en part, per alentir o revertir la resistència a la quimioteràpia, a la radiació o bé a la teràpia hormonal (Schmidt i Lichtner, 2002; Dowsett, 2001).

Durant els anys 90, van veure la llum una àmplia varietat de compostos, especialment derivats de quinolones, que inhibien la via iniciada per l'EGFR (Levitzki i Gazit, 1995; Klohs i col., 1997). Aquests inhibidors difereixen pel que fa la seva potència, especificitat enfront l'EGFR, reversibilitat de l'acció i biodisponibilitat (taula). Els que es poden administrar de forma oral, en general són més ben acceptats en clínica. De la mateixa manera, el fet que siguin irreversibles fa que l'efecte pugui ser més perllongat i per tant calguin menys administracions. Aquests inhibidors bloquegen l'activitat tirosin quinasa per mitjà de la unió al lloc del receptor on normalment s'uneix l'ATP, i provoquen el bloqueig de la via de transducció del senyal corresponent.

COMPOST	IRREVERSIBLE	DIANA	TIPUS DE TUMOR	ESTADI
Gefitinib	No	HER-1	NSCLC	Aprovat des de jul de 2003
Tarceva	No	HER-1	NSCLC	Aprovat des de nov 2004
Erlotinib	No	HER-1	NSCLC, pàncreas	Aprovat
Lapatinib (GlaxoSmithKline)	No	HER-1/2	Mama	Fase III
EKB-569	Sí	HER-1	Còlon	Fase II
AAE788	No	HER-1/2 - Anti-VEGFR	-	Fase I

Taula 4B.1. Alguns exemples d'inhibidors tirosin quinasa dissenyats per tal de combatre la via EGFR (extret de Baselga i Arteaga, 2005).

Els resultats obtinguts en fases inicials de desenvolupament van ser molt esperançadors. Malgrat això, quan s'ha passat a la fase III d'estudi la realitat ha estat una altra i, en general, les expectatives que s'havien creat no han arribat a complir-se. I és que, de forma general, aquests compostos no confereixen un efecte significativament millor que l'observat per la quimioteràpia convencional quan aquesta s'aplica com a monoteràpia (Giaccone i col., 2004; Herbst i col., 2004).

4B.1.1.1. Gefitinib

Gefitinib, també anomenat ZD1839 o Iressa, és una molècula de baix pes molecular, en concret una anilinoquinazolina sintètica (4-(3-cloro-4-fluoroanilina)-7-metoxi-6(3-morfolinoproxi)quinazolina) (figura 4B.1). És molt hidrofòbic i, per tant, penetra a la cèl·lula travessant la membrana plasmàtica de forma passiva. D'aquesta manera pot penetrar en qualsevol tipus de cèl·lula fet que explicaria la seva toxicitat. S'administra de forma oral i en quantitats que van dels 100 als 500 mg per dia. És molt selectiu per l'EGFR i té una baixa activitat sobre altres quinases que no siguin la d'aquest receptor (taula 4B.2). És actiu en NSCLC i càncers de cap i coll, bufeta, pròstata, mama, ovari i còlon (Ranson, 2002). Sorprenentment, l'eficàcia de l'Iressa com a agent antitumoral no sembla tenir una correlació amb els nivells d'EGFR (Salomon i col., 1995; Olayioye i col., 2000).

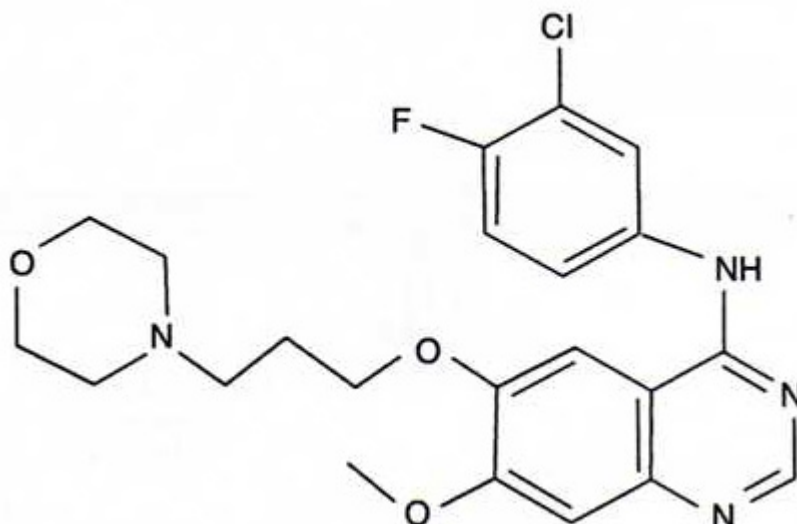


Figura 4B.1. Estructura química del ZD1839 (Iressa o Gefitinib) (AstraZeneca)

ENZIM	TIPUS DE QUINASA	IC ₅₀ (μM)
EGFR (preparació a partir de membranes d'A431)	TK	0.033
EGFR (llisat de baculovirus)	TK	0.027
erbB2	TK	3.7-10
KDR	TK	3.7-10
Flt-1	TK	>100
Raf	STK	>10
MEK-1	STK	>10
ERK-2 (MAPK)	STK	>100

Taula 4B.2. Selectivitat de Gefitinib per la tirosin quinasa (TK) de l'EGFR enfront d'altres quinases presents a la cèl·lula.

L'Iressa ha estat el primer inhibidor específic de la tirosin quinasa de l'EGFR que ha estat aprovat per a la seva administració al Japó, Austràlia i EE.UU en tercera línia de quimioteràpia després de tractaments previs que han fallat. En concret, el maig de 2003 la "Australian Therapeutic Goods Administration" i la "US Food and Drug

Administration” (FDS) van aprovar l’Iressa com a monotractament per pacients amb NSCLC els quals havien estat tractats prèviament amb quimioteràpia. Aquesta aprovació es va veure inicialment limitada a NSCLC prèviament tractat amb irinotecan o bé la combinació de platí i docetaxel (Kris i Tonato, 2002; Yamada i col., 2002; Masuda i Fukuoka, 2001).

Tot i els bons resultats obtinguts en les fases inicials de desenvolupament del producte, en els quals s’havia demostrat que l’Iressa provocava un efecte citostàtic per mitjà de la inhibició de la proliferació cel·lular i també fins i tot de l’angiogènesi (Thomas i Grandis, 2004), alguns estudis duts a terme durant la fase III no han mostrat beneficis significatius de l’Iressa quan aquest s’ha aplicat en combinació amb la quimioteràpia convencional (Van Doorn i col, 2002; Raben i col., 2002). En concret, el tractament combinat no conferia avantatge enfront les monoteràpies de cisplatí, gemcitabina, paclitaxel i carboplatí en pacients amb NSCLC; en la única combinació en la qual s’observava un lleuger benefici era amb els taxans (Sirotnak i col., 2000). Les raons que podrien explicar el poc èxit obtingut en els estudis de combinatòria poden ser diverses: dosi incorrecta, antagonisme entre el Gefitinib i la quimioteràpia convencional, mala selecció dels pacients, etc. Pel que fa la selecció dels pacients, seria de gran ajuda el fet de poder disposar d’un test de selecció que permetés detectar aquells tumors que expressessin EGFR i, sembla ser important, de forma activa. A més, sembla clau poder determinar quins són els mecanismes de resistència que desenvolupa el tumor al tractament amb quimioteràpia, per tal de poder incidir-hi i trobar possibles alternatives i/o solucions. Concretament, en aquest treball s’ha treballat aquest punt i s’han arribat a conclusions força interessants en relació amb la resistència associada als “loops” autocrins.

Els efectes secundaris principals, tot i que són molestos, poden ser tractables. La pell és especialment susceptible als efectes de l’Iressa perquè l’EGFR sol estar sobreexpressat en els queratinocits i en les glàndules sebàcies (Albanell i col., 2002). Causa, principalment, un tipus d’erupció cutània semblant a la urticària que pot tractar-se i remetre un cop cessa el tractament. També provoca vòmits, diarrees i nàusees.

Tal com s’ha comentat, els nivells d’EGFR no semblen tenir massa correlació amb la resposta del tumor al tractament amb Iressa. Ara bé, el fet que alguns pacients tractats amb aquesta droga experimentin regressió del tumor i/o alleujament de la simptomatologia clínica durant un període més o menys llarg de temps, fa pensar que l’EGFR té una funció biològica important en el NSCLC tot i que no sempre estigui sobreexpressat. Algunes d’aquestes respostes realment són molt immediates i es poden

observar al cap de pocs dies d'haver iniciat el tractament amb Iressa. Això implica que l'EGFR és d'alguna manera essencial per a la supervivència de les cèl·lules tumorals de NSCLC i que, en bloquejar-lo, es veuen abocades a l'apoptosi. Tot i així, la fracció de pacients que responen positivament a aquest tractament continua essent molt baixa. En comparació amb d'altres inhibidors de tirosin quinasa, com l'imatinib, l'eficàcia del gefitinib és molt menor. En concret, l'Imatinib permet obtenir molt bones respostes en pacients que pateixen leucèmia mielogènica crònica perquè en aquestes cèl·lules el bloqueig de la via BCR-ABL és fatídic per la cèl·lula la qual no pot arribar a compensar-ho. En el cas de NSCLC semblaria que la cèl·lula pot trobar alternatives a la via EGFR i per això l'efecte observat és molt menor.

Recentment van veure la llum alguns estudis que posaven de manifest que un subgrup de pacients que patien NSCLC tenien determinades mutacions al gen de l'EGFR i que aquest fet es correlacionava amb una millor resposta al tractament amb Iressa. Aquestes mutacions s'ha vist que provoquen un augment en l'activació de l'EGFR i, alhora, el fan més susceptible a l'inhibidor. En concret, aquestes mutacions estan localitzades al domini intracel·lular quinasa de l'EGFR i són zones de mutació sense sentit (en anglès "missense") o bé delecions (Lynch i col., 2004; Dowell i col., 2004; Paez i col., 2004). Aquests resultats han obert una escletxa pel que fa la selecció de pacients susceptibles a ser tractats amb Iressa. Tot i així, aquestes mutacions en l'EGFR, de moment, no s'han detectat en altres tipus de carcinomes i a més a més representen una fracció molt petita dels pacients amb NSCLC (Bhargava i col., 2005; Normanno i col., 2006).

La via dels estrògens i la de l'EGFR estan molt relacionades pel que fa la resistència de les cèl·lules a la teràpia anti-hormonal (Harris i col., 1992; Nicholson i col., 2001). El tamoxifè, droga anti-hormonal que s'administra per evitar la recurrència del càncer de mama, està relacionat amb la senyalització per mitjà de la via EGFR i amb la sensibilitat als inhibidors d'aquesta via. L'Iressa podria ser un bon tractament per tumors hormono-independents o bé resistents a la teràpia anti-hormonal. S'ha observat que pot restaurar la resistència al tamoxifè en cèl·lules tumorals de càncer de mama que sobreexpressen HER2 i que són hormono-independents (Shou i col., 2004). També sembla que quan Iressa i tamoxifè s'administren de forma conjunta, s'evita el desenvolupament de la resistència al tamoxifè.

L'Iressa inhibeix la proliferació de cèl·lules tumorals de càncer de mama, d'una forma

dosi i temps dependent, independentment dels nivells d'EGFR (Anderson i col., 2001; Ciardiello i col., 2001).

Per totes les característiques antitumorals que s'han descrit sobre l'Iressa, i en concret perquè té com a diana l'EGFR, en aquest treball s'ha utilitzat en combinació amb la molècula que el grup de treball fa anys que investiga, el PCI.

4B.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4B.2.1. Caracterització de les línies cel·lulars

El grup de recerca amb el qual es va col·laborar en aquests estudis, l'ICO de Girona, té una àmplia experiència en el treball amb càncer de mama. És per aquesta raó que es va decidir dur a terme aquests estudis en línies cel·lulars de carcinoma mamari.

En concret, es van escollir 5 línies cel·lulars de càncer de mama amb característiques molt diferents pel que fa a la dependència de la via EGFR i els estrògens. A l'apartat 2.2.2 de material i mètodes es fa referència a aquestes línies i es detallen les seves característiques. Tot i així, i sabent que moltes cèl·lules quan es posen en cultiu i se'ls apliquen diferents passos de tripsinització tendeixen a perdre les seves característiques, es va decidir, en primer lloc, caracteritzar les línies cel·lulars de les quals es disposava per començar a treballar, pel que fa nivells de receptors EGFR i erbB2. Es van dur a terme dos assaigs ELISA comercials que permeten detectar específicament els nivells d'ambdós receptors. Els resultats es mostren a la figura 4B.2.

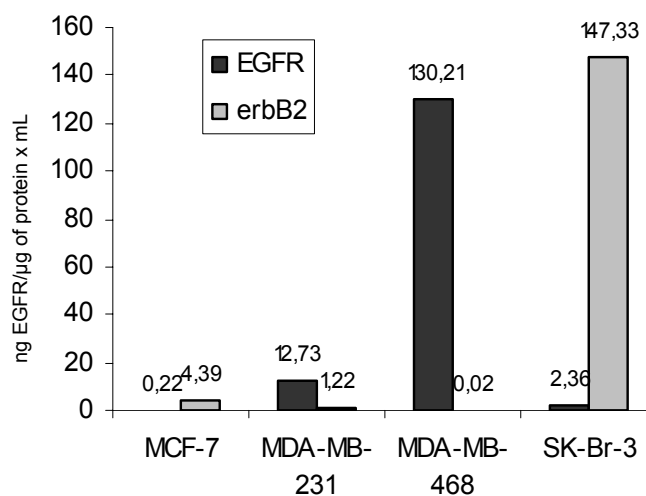


Fig 4B.2. Caracterització per ELISA de les diferents línies cel·lulars utilitzades en l'estudi combinatori, pel que fa els nivells d'EGFR i erbB2.

El fet d'escollir aquestes 5 línies cel·lulars permetia tenir un ventall força significatiu pel que fa les diferents tipologies de càncer de mama. Aquest fet és interessant a l'hora de veure quin és l'efecte dels tractaments aplicats en diferents situacions en les quals les

necessitats cel·lulars són diferents.

Pel que fa el tractament escollit, tot i que inicialment es pensà en aplicar el PCI i l'Iressa de forma conjunta (combinatòria), les proves inicials van fer que es descartés aquesta opció. Com es va poder comprovar, quan ambdues molècules s'aplicaven conjuntament només es veia efecte de l'Iressa (resultats no inclosos). I és que en els estudis que s'han dut a terme fins ara amb el PCI, sempre ha calgut perllongar els tractaments a varis dies per tal de veure efecte a nivell proliferatiu. És per això, que es va decidir aplicar-los per separat de la següent manera (figura 4B.3):

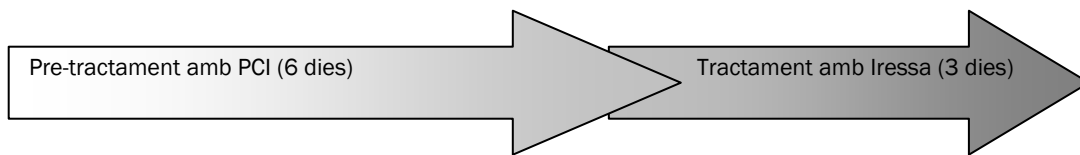


Fig 4B.3. Tractament seqüencial aplicat a les línies cel·lulars de carcinoma mamari.

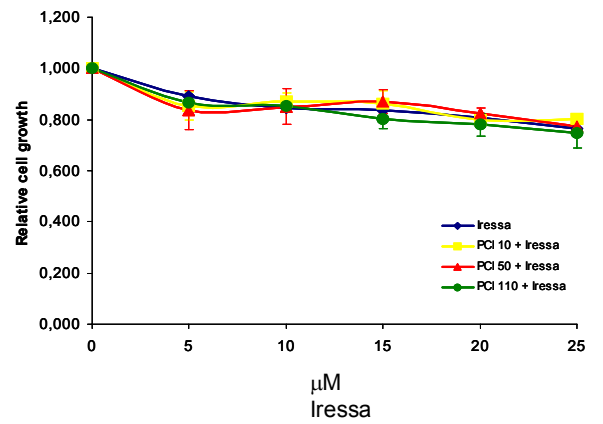
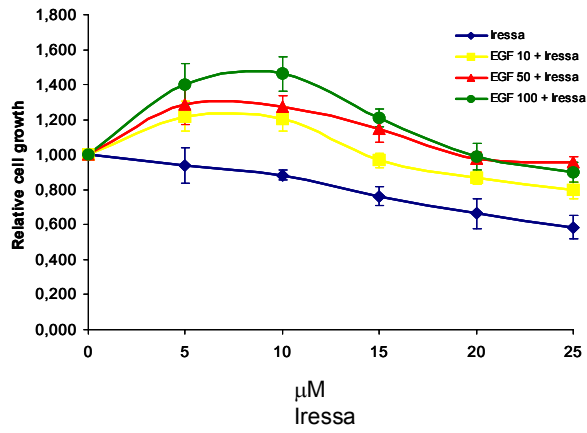
Durant els 6 dies de tractament amb PCI, el medi es va canviar una vegada, el dia 3, i es va aplicar tractament de nou. Mitjançant aquest esquema d'aplicació, es pretenia que, per una banda el pre-tractament amb PCI provoqués una davallada del nombre de receptors EGFR a membrana com a conseqüència de la internalització, i per l'altra que el tractament amb Iressa acabés d'inactivar aquests receptors que encara quedaven a membrana. Per tant, doncs, l'esperança inicial era que ambdós tractaments fossin additius o sinèrgics.

Per tal de comparar l'efecte del PCI amb la del lligand natural de l'EGFR, el mateix esquema es va aplicar però enlloc de PCI es féu amb un pre-tractament d'EGF.

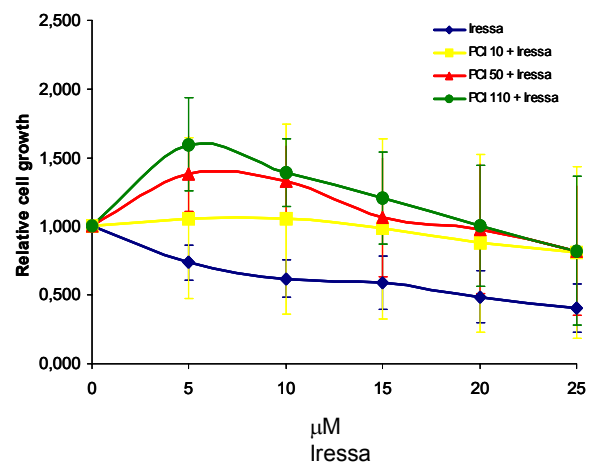
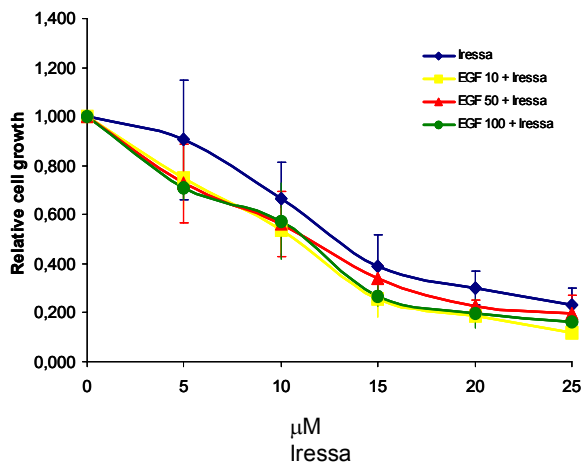
4B.2.2. Assaigs de proliferació

A continuació es mostren els resultats obtinguts, pel que fa proliferació cel·lular, en aplicar els pre-tractaments d'EGF o PCI seguits del tractament amb Iressa (figura 4B.4).

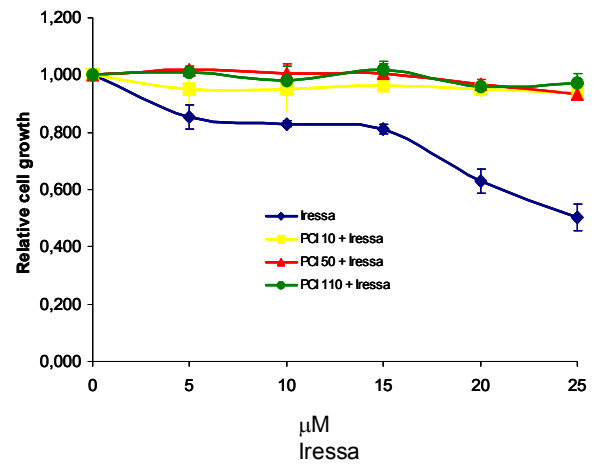
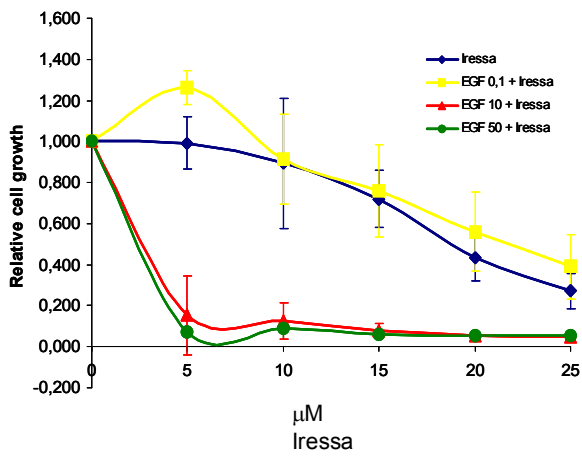
MCF7: EGF I PCI vs IRESSA



MDA MB 231: EGF I PCI vs IRESSA



MDA MB 468: EGF I PCI vs IRESSA



SKBr3: EGF I PCI vs IRESSA

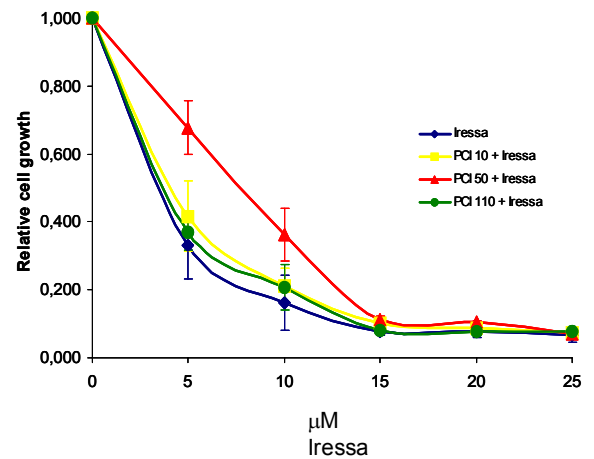
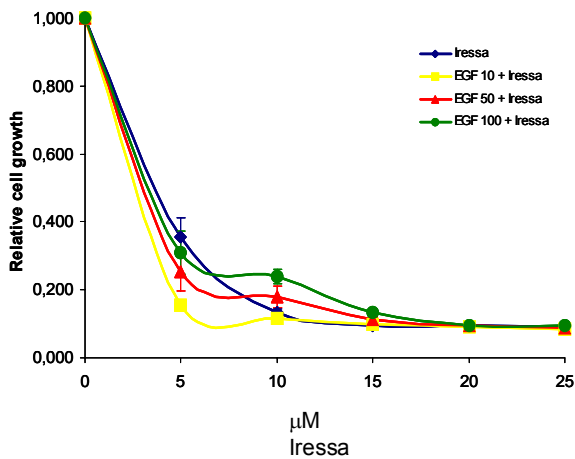


Fig 4B.4. Efecte de la combinació d'EGF o PCI amb Iressa. Les diferents línies cel·lulars (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 i SKBr-3) es van pre-tractar durant 6 dies amb EGF o PCI, amb un canvi de medi als tres dies, i seguidament es van tractar durant 3 dies amb Iressa. Cada gràfic és el resultat de tres rèpliques del mateix experiment. Les barres d'error indiquen l'error estàndard relatiu.

	Resposta EGF	Resposta PCI	Resposta Iressa	EGF + Iressa	PCI + Iressa
MCF-7	± 50% estimulació	no afecta	± 30% inhibició	Protegeix de l'efecte de l'Iressa a totes les concentracions i estimula el creixement	No modifica l'efecte de l'Iressa
MDA-MB-231	no afecta	± 40-50% estimulació	± 60-80% inhibició	No modifica l'efecte de l'Iressa	Reverteix l'efecte de l'Iressa a la màxima concentració assajada (110 µg/ml) i a més estimula el creixement
MDA-MB-468	100% inhibició	no afecta	± 60-80% inhibició	L'efecte observat és el mateix que en el cas de l'EGF (100% inhibició)	Salva de l'efecte de l'Iressa.
SKBr3	no afecta	no afecta	± 90% inhibició	Efecte inhibitori potenciat a dosis baixes d'ambdós (5 nM d'Iressa i 10 ng/ml d'EGF)	Efecte protector a dosis baixes d'ambdós (5 i 10 nM d'Iressa i 50 µg/ml de PCI)

Taula 4B.3. Resum de l'efecte del tractament aplicat (pre-tractament d'EGF o PCI amb tractament d'Iressa) sobre la proliferació cel·lular de les línies tumorals de carcinoma mamari.

Dels resultats obtinguts se'n desprenen una sèrie de conclusions que s'han agrupat en blocs per tal de fer-ne més senzilla la seva interpretació. En els següents apartats (4B.2.2.1, 4B.2.2.2 i 4B.2.2.3) els comentaris es referiran tant a la figura 4B.4 com a la taula 4B.3.

4B.2.2.1. Resposta a l'Iressa

Totes les línies cel·lulars assajades responen a l'Iressa de forma més o menys important o evident. La línia cel·lular que es veu més inhibida per aquest compost és SKBr-3 (90% d'inhibició del creixement, aproximadament) que té nivells molt baixos d'EGFR. Com ja s'ha comentat a la introducció d'aquest capítol la correspondència entre els nivells d'EGFR i resposta a l'Iressa no semblen massa clars (Salomon i col., 1995; Moasser i col.,

2001; Campiglio i col., 2004). En aquest cas, les línies que tenen més quantitat d'EGFR (MDA-MB-231 i MDA-MB-468) es veuen menys inhibides en comparació amb SKBr-3. MCF-7, tot i tenir nivells d'EGFR força similars a SKBr-3, no es veu tan inhibida per l'EGFR. Això podria ser degut a què MCF-7 és una línia cel·lular dependent d'hormones i el fet d'estar-li inhibint la via de l'EGFR no li representaria un problema tan vital com en el cas de SKBr-3 la qual no depèn de la via dels estrògens. Per tant, sembla que el fet de tenir una altra via de supervivència diferent a la via iniciada per l'EGFR, conferiria un avantatge enfront el tractament amb Iressa ja que permetria a la cèl·lula tenir alternatives de supervivència.

Cal tenir en compte, que una diferència important entre les tres línies cel·lulars més inhibides per l'Iressa és que SKBr-3 presenta sobreexpressió d'erbB-2, mentre que les altres dues no. El fet de co-expressar erbB-2 sembla vital per SKBr-3 ja que amb poca quantitat d'EGFR li permetria tenir molta activitat mitogènica per mitjà de l'heterodimerització de l'EGFR i l'erbB-2 (aquest últim, com ja s'ha comentat a la introducció general, no té lligand conegut i per tant necessita un altre receptor per esdevenir activat) (Moulder i col., 2001; Normanno i col., 2002). Una possible explicació a la forta inhibició del creixement experimentada per SKBr-3 en comparació amb les altres dues línies, podria ser el fet que la concentració d'Iressa amb la qual s'ha treballat fos suficient per inhibir la major part dels EGFR que té una cèl·lula d'aquest tipus a membrana, i per tant els erbB-2 que quedessin només poguessin ser activats per mitjà del xoc espontani entre dos receptors d'aquest tipus. Per altra banda, MDA-MB-231 i MDA-MB-468 pel fet de tenir molta més quantitat d'EGFR, és molt probable que sempre quedin receptors a membrana que no hagin estat activats. Com que s'ha demostrat que una cèl·lula pot sobreviure amb poca quantitat d'EGFR, això li seria suficient per seguir persistent.

4B.2.2.2. Resposta a PCI i Iressa

El pretractament de PCI, en la majoria de línies cel·lulars, no provoca un efecte significatiu en la proliferació, excepte en MDA-MB-231 en la qual provoca una estimulació al voltant del 50%. En estudis anteriors (Blanco-Aparicio i col., 1998) s'havia observat que 6 dies no eren suficients per tal de veure una davallada important en la proliferació de les cèl·lules tumorals. En concret, els assajos s'havien allargat varies setmanes més. En principi, i com ja s'ha comentat, el que es pretenia en aquest estudi no era veure un efecte inhibitori de la proliferació cel·lular induït pel PCI, sinó que el fet de treballar amb aquesta molècula tenia com a objectiu "preparar" les cèl·lules pel posterior tractament amb Iressa,

per mitjà de la disminució del nombre de receptors EGFR a membrana. Tot i així, no deixa de ser curiós que en MDA-MB-231 estimuli la proliferació cel·lular.

Pel que fa el tractament combinat, s'observa que tant en MDA-MB-468 com MDA-MB-231, el pretractament amb PCI salva o protegeix les cèl·lules de l'efecte de l'Iressa, comportament completament contradictori amb el que s'esperava que passés. Aquest comportament també es dona, tot i que en menor grau, en SKBr-3. En concret, en MDA-MB-231, el PCI a més de rescatar de l'efecte de l'Iressa, també estimula molt significativament el creixement cel·lular, tal i com ja s'ha s'havia observat en tractar només amb PCI.

Pel que fa MCF-7 que depèn de la via hormonal i que s'havia vist que responia poc a l'Iressa, el fet de pre-tractar-la amb PCI no modifica l'efecte de l'Iressa. Aquest resultat confirma que el fet de disposar d'una via alternativa a la supervivència és clau per poder escapar al tractament inhibitori induït per l'Iressa.

4B.2.2.3. Comparació de l'efecte induït per EGF i PCI

Quan s'apliquen individualment, tant EGF com PCI no indueixen la proliferació de les línies que sobreexpressen erbB-2, com és el cas de SKBr-3, almenys a les concentracions assajades. D'altra banda en MCF-7 i MDA-MB-231 tenen comportaments diferents ja que mentre que l'EGF estimula la proliferació de MCF-7, el PCI no hi té un efecte significatiu, i al revés amb MDA-MB-231. Pel que fa MDA-MB-468, tal i com passa amb la línia cel·lular d'adenocarcinoma de vulva, A431, el fet de sobreexpressar en nivells tan elevats l'EGFR fa que el tractament amb el lligand natural, l'EGF, provoqui una entrada massiva de receptors dins la cèl·lula i per tant el col·lapse i posterior inducció de l'apoptosi. El PCI segurament no provoca aquest efecte per la menor afinitat que té per l'EGFR i per tant per la capacitat reduïda respecte l'EGF d'induir la internalització del receptor.

Pel que fa el tractament combinat, la resposta d'ambdues molècules quan s'han aplicat com a pretractament abans del tractament amb Iressa és força diferent. En aquest treball s'ha centrat l'interès en intentar explicar o comprendre el mecanisme d'acció del PCI, i per tant no es tenen prou dades per poder explicar el comportament de l'EGF.

4B.2.3. Estudi de l'estimulació autocrina

El comportament observat en tractar les cèl·lules amb PCI i seguidament amb Iressa, com s'ha comentat, no fou l'esperat en plantejar el disseny de l'estudi. Partint de la base d'estudis anteriors, duts a terme dins el mateix grup de recerca, s'esperava una sinèrgia o addició entre els dos tractaments ja que ambdós incideixen sobre la mateixa via de transducció del senyal afavorint-ne la seva atenuació.

Però la realitat que observàrem era molt diferent, i el que succeïa era que el PCI rescatava d'alguna manera de l'efecte antitumoral de l'Iressa. Amb les dades que es tenien es feia força difícil trobar una explicació a aquest fenomen, és per això que es va decidir estudiar com el tractament independent amb ambdues molècules afectava l'expressió dels factors de creixement de la família ErbB. Aquest fenomen es coneix com a "loop" autocrí i ha estat descrit a l'apartat 1.1 de la Introducció general. Se sap que molts tumors es nodreixen d'aquesta estimulació autocrina per tal d'esdevenir més independents a l'entorn i poder, així, proliferar en tot tipus de situacions.

La tècnica utilitzada ha estat la PCR a temps real la qual permet, de forma molt fiable i robusta, comparar l'expressió de diferents gens en base a l'expressió d'un gen constitutiu. En aquest cas, no s'ha fet de forma quantitativa sinó solament qualitativa ja que el que interessava era veure diferències més que quantificar-les. El primer que es féu fou caracteritzar les diferents línies cel·lulars amb les que s'ha treballat pel que fa expressió de lligands de la família ErbB. Els resultats són els que es mostren a la taula 4B.4.

	EGF	TGF- α	BTC	AR	EPR	NEUR	TBP
MCF-7	++	+++	+	+++	++	+++	++
MDA-MB-231	++	+++	++	++	++	+/-	++
MDA-MB-468	++	+++	+	++	++	+/-	++
SKBr-3	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++

Taula 4B.4. Anàlisi per PCR a temps real de l'expressió de lligands de la família ErbB en les diferents línies cel·lulars de càncer de mama amb les quals s'ha treballat. Els signes + i - fan referència als valors qualitatius de cada un dels lligands en comparació en les 4 línies cel·lulars. EGF (factor de creixement epidèrmic), TGF α (factor transformant α), BTC (betacefalina), AR (amfipiregulina), EPI (epiregulina), NEUR (neuregulina), TBP (proteïna d'unió a la seqüència TATA; gen constitutiu).

El patró d'expressió de lligands en cada una de les línies cel·lulars utilitzades és força variable. Com a trets generals es pot dir que els factors de creixement més expressats en totes 4 línies cel·lulars són l'EGF, el TGF α (especialment), l'amfiregulina i l'epiregulina. La betacel·lulina, tot i que es troba expressada en totes les línies cel·lulars, els nivells varien força. La neuregulina només es troba significativament expressada en les línies cel·lulars MDA MB 231 i SKBr-3. MDA-MB-231 i SKBr-3 presenten expressió de tots els lligands i, en concret SKBr-3, en nivells força elevats en comparació amb les altres.

A continuació es presentaran els resultats obtinguts en tractar, separatament, les cèl·lules amb Iressa o PCI i pel que fa expressió dels lligands de la família ErbB que s'han esmentat.

4B.2.3.1. Resposta a l'Iressa

Els resultats obtinguts en tractar les cèl·lules durant 3 dies amb Iressa són els que es mostren a la taula 4B.5.

Canvis en el patró d'expressió de lligands induït per l'Iressa

	Nivells de Her				Lligands de Her-1						Lligands de Her-1 i Her-4			Lligand de Her-3 i Her-4
	IRESSA IC ₅₀	Her-1	Her-2	Her-3	Her-4	EGF	AR	TGF- α	BTC	EPR	NRG			
MCF-7	21 \pm 2 μ M	-/+	+	+++	+++	+12	n.d.	+7	n.d.	+600	+18			
MDA-MB-231	18 \pm 2 μ M	+++	-/+	-/+	-/+	n.d.	-2	-3	+6	n.d.	-2			
MDA-MB-468	15 \pm 1 μ M	+++	-/+	++	-/+	+21	+9	n.d.	+12	n.d.	+8			
SKBr-3	1 \pm 0.2 μ M	++	+++	++	-/+	n.d.	n.d.	-10 ⁴	n.d.	n.d.	-10 ⁶			

Taula 4B.5. Anàlisi per PCR a temps real de la modulació de l'expressió de lligands de la família erbB en les diferents línies cel·lulars de càncer de mama, com a conseqüència del tractament amb Iressa durant 3 dies. Es mostren, també, els nivells proteïcs d'EGFR i erbB2, així com la IC₅₀ de l'Iressa a 3 dies de tractament.. La concentració de treball d'Iressa ha estat, en tots els casos, 10 μ M. (-/+ : negatiu, feble ++ : moderat +++ : fort n.d.: no detectat).

El tractament amb Iressa provoca un augment significatiu de l'expressió de diversos lligands de la família ErbB en línies que sobreexpressen l'EGFR com són MDA-MB-231 i MDA-MB-468, i també en línies amb nivells més discrets d'EGFR i hormono dependents, com és el cas de MCF-7. Així mateix, és curiós observar que una línia cel·lular que presenta nivells molt baixos d'EGFR, SKBr-3, és veu molt afectada per l'Iressa. En concret, i com a conseqüència del tractament es produeix una regulació negativa molt forta de l'expressió de lligands. De fet, a nivell proliferatiu, aquesta línia cel·lular, és la que es veu més fortament inhibida per l'Iressa, resultat que podria estar d'acord amb allò observat a nivell d'expressió gènica i que podria ser una explicació força coherent a aquest fenomen. En el cas de MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468, el tractament amb Iressa modifica el patró d'expressió gènica dels lligands ErbB, en alguns cas augmentant-ne els nivells i en d'altres disminuint-los, però de forma molt menys important, qualitativament parlant, que en el cas de SKBr-3.

En general es pot resumir que:

- **MCF-7:** es pot considerar que respon poc a l'Iressa i que quan rep aquest tractament estimula la sobreexpressió de lligands específics de Her-3 i Her-4, receptors que d'altra banda sobreexpressa.
- **MDA-MB-231:** respon lleugerament a l'Iressa i quan es tracta amb Iressa sobreexpressa la betacel·lulina, que és un potent factor de supervivència fins i tot en absència del receptor al qual s'uneix, l'EGFR (Kramarski-Pinkas, 1998).
- **MDA-MB-468:** respon a l'Iressa i en ser tractada sobreexpressa EGF, amfiregulina, betacel·lulina i neuregulina propis dels receptors que presenta, EGFR i HER-3.
- **SKBr-3:** molt sensibles a l'Iressa. Estudis anteriors (Anido i col., 2003) han posat de manifest que l'Iressa exerceix el seu efecte antitumoral en aquesta línia cel·lular per mitjà del segrest del HER-3 en l'heterodímer 1-3. En situació normal, l'heterodímer HER-2/HER-3 és la parella preferida per la cèl·lula ja que és la que li dóna un potencial mitogènic més elevat. Quan es tracten aquestes cèl·lules amb Iressa, aquest promou la formació d'heterodímers inactius 1-2 i 1-3. Pel que fa l'expressió de lligands, els resultats obtinguts mostren que dos lligands propis dels receptors EGFR i HER-3, el TGF- α i la neuregulina, estan molt regulats negativament.

En resum, s'observa que el fet de tractar les cèl·lules tumorals amb Iressa,

provoca un efecte inhibitori a nivell proliferatiu, com és d'esperar, i a més a més una modificació en el patró d'expressió de gens de lligands de la família ErbB. Aquesta modificació és més o menys important segons la línia cel·lular i el gen, però en qualsevol cas respon a una adaptació de la cèl·lula a la nova situació en la qual es troba després del tractament amb l'agent quimioterapèutic. I és així, perquè s'observa que en la majoria dels casos la modificació respon a les necessitats que té la cèl·lula enfront la nova situació provocada després del tractament amb l'ressa (inhibició d'EGFR i presència d'altres receptors de la família ErbB a la membrana cel·lular). En general, es pot dir que les línies cel·lulars resistents a l'ressa generalment regulen positivament l'expressió de lligands, mentre que les sensibles a l'ressa ho regulen de forma negativa.

Aquesta és la primera vegada que s'observa que un inhibidor de tirosin quinases, en aquest cas l'ressa, modifica l'expressió autocrina de lligands naturals del receptor al qual bloqueja. Aquest mecanisme de resistència podria determinar la resistència-sensibilitat dels diferents carcinomes mamaris al tractament amb l'ressa, i també l'efecte rebot que s'observa quan els tumors deixen de ser tractats amb quimioteràpia i al cap de poc temps esdevenen, fins i tot, més agressius.

4B.2.3.2. Resposta al PCI

Els resultats obtinguts en tractar les cèl·lules durant 3 dies amb l'ressa són els que es mostren a la taula 4B.6.

Canvis en el patró d'expressió de lligands induït per l'Iressa

Lligands de Her-1
Lligands de Her-1 i Her-4
Lligand de Her-3 i Her-4

	Nivells de Her					Canvis en el patró d'expressió de lligands induït per l'Iressa					
	Resposta al PCI	Her-1	Her-2	Her-3	Her-4	EGF	AR	TGF- α	BTC	EPR	NRG
MCF-7	no afecta	-/+	+	+++	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-10 ²	+23
MDA-MB-231	± 40-50% estimulació	+++	-/+	-/+	-/+	+7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MDA-MB-468	no afecta	+++	-/+	++	-/+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SKBr-3	no afecta	++	+++	++	-/+	n.d.	n.d.	-10 ⁴	n.d.	n.d.	-10 ⁴

Taula 4B.6. Anàlisi per PCR a temps real de la modulació de l'expressió de lligands de la família erbB en les diferents línies cel·lulars de càncer de mama, com a conseqüència del tractament amb PCI durant 6 dies. Es mostren, també, els nivells proteics d'EGFR i erbB2, així com l'efecte sobre la proliferació cel·lular induït pel PCI a 6 dies de tractament. La concentració de treball de PCI ha estat, en tots els casos, 110 µg/ml. (-/+ : negatiu, feble ++ : moderat +++ : fort n.d.: no detectat).

En el cas del tractament de 6 dies amb PCI, el comportament és força semblant al que s'ha observat per l'Iressa. És a dir, el fet d'aplicar aquest tractament modifica el patró d'expressió dels lligands de la família ErbB. Aquesta modificació és més important quant menys EGFR té la línia cel·lular (és el cas de MCF-7 i SKBr-3) i sembla que seguint una tendència de regulació negativa de l'expressió de certs lligands. En el cas de les dues línies cel·lulars que sobreexpressen l'EGFR, MDA-MB-231 i MDS-MB-468, l'afectació no és tan important. En concret, MDA-MB-231 que és la que es veu més afectada pel PCI a nivell proliferatiu, és la que menys canvi experimenta en el patró d'expressió de lligands, fet que podria estar indicant que quan a la cèl·lula se l'estimula positivament no li cal adaptar-se a aquesta situació perquè, d'altra banda, ja li és favorable. D'altra banda, es interessant observar que tot i que no hi hagi efectes visibles a nivell de proliferació cel·lular, el PCI sí que indueix canvis a nivell molecular com es pot veure en el cas de les altres tres línies cel·lulars en les quals, tot i no provocar efectes sobre el creixement, el PCI sí que modifica l'expressió gènica dels factors de creixement de la família ErbB.

En general es pot resumir que:

- **MCF-7:** no respon a l'adició de PCI pel que fa proliferació cel·lular, però sí que en ser tractada amb aquest compost sobreexpressa lligands dels receptors que té en més quantitat, és a dir epiregulina i neuregulina.
- **MDA-MB-231:** és la única línia cel·lular estudiada la qual en afegir-li PCI aquest estimula la proliferació cel·lular. Aquest, però, no modifica molt significativament el patró d'expressió de lligands ja que solament hi ha un lleuger increment en l'expressió d'EGF el qual s'uneix a l'únic receptor, pràcticament, que té la cèl·lula, l'EGFR.
- **MDA-MB-468:** el PCI no li provoca cap efecte ni a nivell de proliferació cel·lular ni a nivell d'expressió de lligands.
- **SKBr-3:** no respon a l'adició de PCI en termes de proliferació cel·lular però sí que regula negativament l'expressió de dos lligands, TGF- α i neuregulina, els quals s'uneixen als receptors, en general, presents en menys quantitat en aquesta línia cel·lular que es caracteritza per la sobreexpressió de Her-2

4B.3. DISCUSSIÓ GENERAL

Una de les vies mitjançant les quals es pretén obrir noves perspectives en el camp de la lluita contra el càncer és la combinatòria de fàrmacs per tal d'obtenir respostes additives o sinèrgiques respecte les respostes obtingudes per cada un per separat. "A priori" s'esperaria que dues molècules que actuen de forma eficaç pel que fa inhibició del creixement de les cèl·lules tumorals, en combinar-les s'obtingués una resposta més eficaç que la suma d'ambdues (fenomen conegut amb el nom de sinèrgia) o, com a mínim, que fos additiva. Però la realitat no sempre és així, i hi ha molts casos on no es produeix cap resposta o, fins i tot, la resposta és antagònica (Normanno i col., 2002; Normanno i col., 2006).

Els estudis en fase II referents a l'Iressa han posat de manifest que aquest compost no és massa efectiu per tal de tractar el càncer de mama metastàtic, especialment després de la quimioteràpia convencional (Agrawal i col., 2005). En general, aquests estudis mostren resultats poc esperançadors amb taxes de control de la malaltia com a conseqüència del tractament, d'aproximadament el 10% i un cert allargament en el temps de supervivència dels pacients (Agrawal i col., 2005; Normanno i col., 2005).

A diferència d'altres tipus de carcinomes, com és el cas de NSCLC, en el càncer de mama no hi ha una metodologia que permeti seleccionar aquells pacients susceptibles a ser tractats eficientment amb Iressa. Això és degut al fet que les mutacions de l'EGFR observades en el NSCLC no s'han detectat en la neoplàsia mamària (Bhargava i col., 2005).

En aquest treball s'ha plantejat la combinació de dos productes, l'Iressa i el PCI que, tot i que diferents en quant a mode d'actuació i en fase d'experimentació, tenen com a diana el mateix receptor cel·lular i via de transducció del senyal. En aquest cas, no s'ha pogut dur a terme una combinatòria com a tal (aplicació simultània dels dos tractaments) pel fet que no s'ha pogut determinar la IC₅₀ del PCI als temps de tractament necessaris per l'Iressa. Per això s'ha optat per fer un pretractament amb PCI de 6 dies seguit d'un tractament de 3 dies amb Iressa. Les suposicions inicials eren que el PCI preparés la cèl·lula per a ser més susceptible al tractament posterior amb Iressa ja que s'havia observat que provocava una regulació negativa de receptors a membrana al cap d'uns dies de tractament. Tot i així el que s'ha observat és que l'efecte és totalment contrari i el PCI,

en la majoria dels casos, té un efecte protector enfront el tractament amb l'irressa o fins i tot, en el cas de la línia cel·lular MDA-MB-231, promotor de la proliferació cel·lular. També ha estat interessant observar que la línia cel·lular més afectada per l'irressa hagi estat SKBr-3 que té la peculiaritat de tenir nivells molt baixos d'EGFR i molt elevats d'ErbB2. Aquest fet evidencia la importància de l'activació de l'ErbB2 per mitjà de l'EGFR i com, amb poca quantitat d'aquest segon, la cèl·lula pot sobreviure mitjançant l'amplificació i diversificació del senyal en homo o heterodímers d'EGFR. De fet està descrit que una cèl·lula, tot i presentar nivells baixos d'EGFR, pot activar de forma significativa altres receptors de la família ErbB mitjançant l'heterodimerització (Salomon i col., 1995; Olayioye i col., 2000). En concret aquelles línies cel·lulars com SKBr-3 que presenten nivells baixos d'EGFR són extremadament sensibles a l'irressa si, alhora, coexpressen HER-2 en nivells elevats (Moulder i col., 2001; Moasser i col., 2001). En canvi, en cèl·lules que sobreexpressen l'EGFR, el fet de tractar-les amb l'irressa a les dosis que s'han aplicat, pot no ser suficient per inhibir l'activitat de tots els EGFR presents a la membrana cel·lular. En el cas de la línia cel·lular MCF-7 sembla que l'alternativa que es té a la via EGFR és la via hormonal i, en conseqüència, no es veuen tan afectades per aquest tractament. Quan ambdues molècules, PCI i l'irressa, s'han aplicat de forma seqüencial mitjançant un pre-tractament de 6 dies amb PCI seguit d'un tractament de 3 dies amb l'irressa, s'ha observat que en línies cel·lulars dependents de la via EGFR (MDA-MB-231 i MDA-MB-468) el PCI salva de l'efecte inhibitori de l'irressa i fins i tot, en el primer cas, estimula significativament la proliferació. En canvi, en línies cel·lulars dependents de la via hormonal (MCF-7 i SKBr-3) el PCI no modifica l'efecte de l'irressa. Aquest fet evidencia que quan la cèl·lula viu de més d'una via de transducció, el fet de bloquejar-ne una no és tan dramàtic com en el cas d'aquelles cèl·lules que depenen exclusivament d'aquesta via de senyalització.

Per tal de donar una possible explicació al per què d'aquest comportament de les cèl·lules en ser tractades amb PCI primer i després amb l'irressa, es va creure interessant estudiar com es veia modificada l'expressió gènica dels lligands en resposta a un i altre tractament. En general, s'ha pogut observar que tant el PCI com l'irressa (especialment aquest últim) modifiquen el patró d'expressió dels lligands de la família ErbB, tant de forma positiva com negativa. Aquesta redistribució en l'expressió dels lligands que duu a terme la cèl·lula manté un estret paral·lisme amb la situació de cada línia cel·lular pel que fa la presència de determinats tipus de receptors ErbB actius a membrana, després del tractament amb l'irressa. De fet, alguns autors han demostrat que els efectes inhibitoris

sobre el creixement, exercits per anticossos monoclonals i inhibidors de tirosin-quinasa (els quals estan dirigits contra els receptors EGFR i HER-2), es veuen significativament atenuats en presència de lligands exògens (Motoyama i col., 2002). El mecanisme per mitjà del qual aquest fenomen tindria lloc no està del tot clar, però es creu que podria ser el mateix receptor el que, després de ser internalitzat, arribés a nucli i actués com a factor de transcripció (o com ajudant d'un factor de transcripció) d'una bateria de gens d'entre els quals molt probablement hi hauria els d'alguns factors de creixement i fins i tot també el del propi receptor (Lin i col., 2001; Lo and col., 2005) (figura 4B.5). D'aquest procés ja se n'ha fet esment a la Introducció general d'aquest treball.

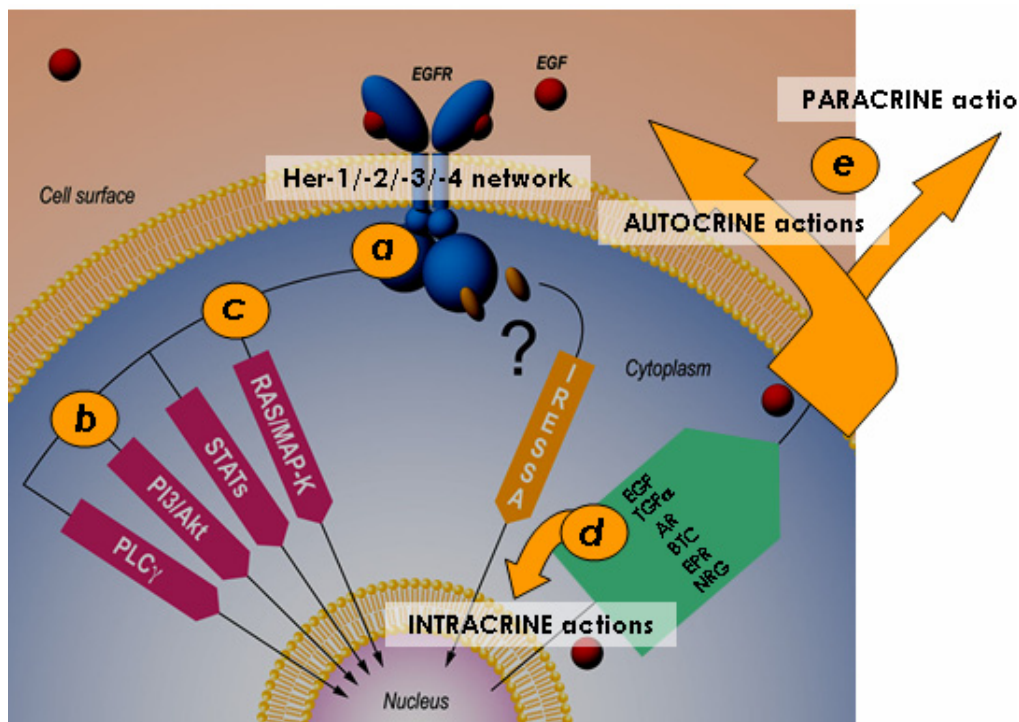


Figura 4B.5. Mecanisme proposat mitjançant el qual la cèl·lula activa la producció autocrina i paracrina de lligands de la família ErbB en resposta al tractament amb molècules que s'uneixen a l'EGFR (EGF, PCI o bé lressa). El receptor d'EGF, un cop activat, i mitjançant la internalització i arribada a nucli, induïx la síntesi de factors de creixement que poden actuar de forma autocrina unint-se als receptors que queden a membrana, de forma paracrina unint-se a receptors de cèl·lules veïnes, o bé de forma intracrina retroalimentant la transcripció gènica de més lligands. (Imatge dissenyada pel Dr. Albert Canals)

Aquesta és la primera vegada que es demostra que un inhibidor de tirosin quinasa provoca efectes a nivell d'expressió gènica i podria donar resposta al per què de la fallida de molts tractaments quimioterapèutics. És a dir, semblaria que la cèl·lula tumoral, en bloquejar-li les vies de supervivència desencadena un seguit de respostes per adaptar-se a

la nova situació. En el cas del tractament amb lressa o PCI, el fet d'incidir sobre el receptor i bloquejar-ne d'alguna manera la seva activitat provoca que la cèl·lula modifiqui el patró d'expressió de lligands del receptor per adaptar-se a aquest estrés i continuar sobrevivint.

En resum, doncs, d'aquests resultats es pot extreure que la simple mesura dels nivells de HER-1 (tant a nivell d'expressió com de proteïna) no són suficients per predir la resposta d'aquelles cèl·lules tumorals al tractament amb lressa. A més a més, està descrit que altres processos involucrats en la via de transducció del senyal sobre la qual interfereix l'EGFR poden determinar la resistència de la cèl·lula a aquest fàrmac (Siegel-Lakhai i col., 2005). Per tant, doncs, i com a perspectives futures, seria interessant pensar en la combinatòria d'agents que no només bloquegin els receptors de membrana que inicien la via d'activació del senyal, sinó també molècules que participin al llarg de la cascada.

4B.4. CONCLUSIONS

1. S'han caracteritzat 4 línies cel·lulars de càncer de mama pel que fa els nivells de dos receptors de la família ErbB: EGFR i erbB2.
2. Per tal d'augmentar l'efecte antitumoral de l'Iressa en aquestes línies cel·lulars, s'ha decidit aplicar un pre-tractament de 6 dies amb PCI, seguit d'un tractament de 3 dies amb Iressa. El fet que els dos compostos tinguin uns valors de IC50 tan diferents pel que fa el temps, ha fet que no es pogués aplicar un estudi combinatori dels dos fàrmacs.
3. Totes les línies cel·lulars assajades s'han mostrat sensibles a l'Iressa. En concret, SKBR-3 és la línia cel·lular que ha presentat una inhibició de la proliferació més significativa, tot i ésser la que té nivells més baixos d'EGFR i nivells més elevats d'erbB2. Això posa de manifest la importància de l'erbB2 en l'activació de la via ErbB mitjançant l'heterodimerització, i el fet que la sobreexpressió d'EGFR no és per sí mateixa un marcador de la resposta al tractament amb Iressa.
4. Quan s'ha estudiat l'efecte del tractament combinat de PCI i Iressa, s'ha observat que el pre-tractament amb PCI en cèl·lules depenents de la via EGFR, a diferència del que s'havia suposat inicialment, les protegeix de l'efecte inhibitori del creixement de l'Iressa. Per altra banda, en línies hormono-depenents, el pre-tractament amb PCI no modifica l'efecte de l'Iressa i posa de manifest que la via hormonal serveix d'escapatòria per contrarestar els bloqueig efectuat pel PCI sobre la via EGFR.
5. S'ha determinat que tant PCI com Iressa modifiquen el patró d'expressió de la majoria de lligands de la família ErbB, tant de forma positiva com negativa i de tal manera que suposa una adaptació de la cèl·lula al tractament de bloqueig de la via ErbB. Aquesta és la primera vegada que es demostra que un inhibidor de tirosin quinasa és capaç de modificar el patró d'expressió gènica d'una cèl·lula.
6. Tenint en compte els anteriors punts, es pot concloure que els nivells d'EGFR no són suficients per predir la resposta a bloquejadors d'aquesta via.

5. BIBLIOGRAFIA

A

Aaronson SA. *Influences of growth factors and their signaling pathways in malignancy.* Harvey Lect. 1991-92;87:17-34.

Agrawal A, Gutteridge E, Gee JM, Nicholson RI, Robertson JF. *Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer.* Endocr Relat Cancer. 2005 Jul;12 Suppl 1:S135-44.

Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, Lofgren JA, Tindell C, Evans DP, Maiese K, Scher HI, Sliwkowski MX. *Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth.* Cancer Cell. 2002 Aug;2(2):127-37.

Albanell J, Rojo F, Averbuch S, Feyereislova A, Mascaro JM, Herbst R, LoRusso P, Rischin D, Sauleda S, Gee J, Nicholson RI, Baselga J. *Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition.* J Clin Oncol. 2002 Jan 1;20(1):110-24.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología molecular de la célula (3ª Edición).* Ediciones Omega 1996.

Alroy I, Yarden Y. *The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions.* FEBS Lett. 1997 Jun 23;410(1):83-6.

Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R, Bundred NJ. *ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression.* Int J Cancer. 2001 Dec 15;94(6):774-82.

Angeletti PU, Salvi ML, Chesanow RL, Cohen S. *Action of the "epidermal growth factor" on nucleic acid and protein synthesis in cutaneous epithelium.* Experientia. 1964 Mar 15;20(3):146-8.

Arteaga CL. *Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?* Oncologist. 2002;7 Suppl 4:31-9.

Auerswald EA, Genenger G, Mentele R, Lenzen S, Assfalg-Machleidt I, Mitschang L, Oschkinat H, Fritz H. *Purification and characterization of a chicken egg white cystatin variant expressed in an Escherichia coli pIN-III-ompA system.* Eur J Biochem. 1991 Aug 15;200(1):131-8.

B

Baselga J, Arteaga CL. *Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer.* J Clin Oncol. 2005 Apr 10;23(11):2445-59.

Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired.* J Biol Chem. 1996 Mar 1;271(9):5251-7.

Bazley LA, Gullick WJ. *The epidermal growth factor receptor family.* Endocr Relat Cancer. 2005 Jul;12 Suppl 1:S17-27.

Becker GW, Hsiung HM. *Expression, secretion and folding of human growth hormone in Escherichia coli. Purification and characterization.* FEBS Lett. 1986 Aug 11;204(1):145-50.

Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B. *EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and*

HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. Mod Pathol. 2005 Aug;18(8):1027-33.

Billings PC, Morrow AR, Ryan CA, Kennedy AR. *Inhibition of radiation-induced transformation of C3H/10T1/2 cells by carboxypeptidase inhibitor 1 and inhibitor II from potatoes.* Carcinogenesis. 1989 Apr;10(4):687-91.

Bishayee A, Beguinot L, Bishayee S. *Conformational analysis of the phosphorylated epidermal growth factor receptor.* Biosci Rep. 1999 Oct;19(5):397-402.

Bishayee A, Beguinot L, Bishayee S. *Phosphorylation of tyrosine 992, 1068, and 1086 is required for conformational change of the human epidermal growth factor receptor c-terminal tail.* Mol Biol Cell. 1999 Mar;10(3):525-36.

Blanco-Aparicio C, Molina MA, Fernandez-Salas E, Frazier ML, Mas JM, Querol E, Aviles FX, de Llorens R. *Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth.* J Biol Chem. 1998 May 15;273(20):12370-7.

Blanco-Aparicio C. *El inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI): un antagonista del EGF con actividad antitumoral.* Tesi Doctoral. Universitat de Girona. 1998.

Bradford JM. *The use of a bioimpedance analyzer in the measurement of sexual arousal in male sexual deviants.* Can J Psychiatry. 1986 Feb;31(1):44-7.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokohama S. *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors.* Mol Cell. 2003 Sep;12(3):541-52.

Burgess AW, Lloyd CJ, Smith S, Stanley E, Walker F, Fabri L, Simpson RJ, Nice EC. *Murine epidermal growth factor: structure and function.* Biochemistry. 1988 Jul 12;27(14):4977-85.

C

Campion SR, Niyogi SK. *Interaction of epidermal growth factor with its receptor.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1994;49:353-83. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1995;50:339.

Carpenter G, Cohen S. *Biological and molecular studies of the mitogenic effects of human epidermal growth factor.* Symp Soc Dev Biol. 1978;(35):13-31.

Carpenter G, Cohen S. *Epidermal growth factor.* Annu Rev Biochem. 1979;48:193-216.

Carpenter G, Cohen S. *Epidermal growth factor.* J Biol Chem. 1990 May 15;265(14):7709-12.

Carpenter G, Cohen S. *Human epidermal growth factor: binding of the polypeptide to human fibroblasts and stimulation of cell proliferation.* Natl Cancer Inst Monogr. 1978 May;(48):149-56.

Carpenter G. *Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens.* Annu Rev Biochem. 1987;56:881-914.

Carpenter G. *Regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor activity during the modulation of protein synthesis.* J Cell Physiol. 1979 Apr;99(1):101-6.

Carpenter G. *The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling.* Bioessays. 2000 Aug;22(8):697-707.

Carraway KL 3rd, Cantley LC. *A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for*

receptor heterodimerization in growth signaling. Cell. 1994 Jul 15;78(1):5-8.

Ceresa BP, Schmid SL. *Regulation of signal transduction by endocytosis.* Curr Opin Cell Biol. 2000 Apr;12(2):204-10.

Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, Leahy DJ. *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab.* Nature. 2003 Feb 13;421(6924):756-60.

Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. *Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor.* Clin Cancer Res. 2001 May;7(5):1459-65.

Cohen S. *Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1960 Mar;46(3):302-11.

Cross & Dexter. *Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis.* Cell. 1991 Jan 25;64(2):271-80.

D

Dancey JE, Freidlin B. *Targeting epidermal growth factor receptor—are we missing the mark?* Lancet. 2003 Jul 5;362(9377):62-4.

Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Cell-to-cell signalling: hormones and receptors.* Molecular Cell Biology (2nd Edition). New York: Scientific american books. 709-762.

Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD. *Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family.* Nat Rev Cancer. 2004 Sep;4(9):718-27.

Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, Jorissen RN, Fabri L, Geleick D, Lax I, Schlessinger J, Sawyer W, Howlett GJ, Burgess AW, Nice EC. *Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor.* Growth Factors. 2000;18(1):11-29.

Dowell JE, Minna JD. *The impact of epidermal-growth-factor-receptor mutations in response to lung-cancer therapy.* Nat Clin Pract Oncol. 2004 Nov;1(1):2-3.

Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD. *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences.* Nature. 1984 Feb 9-15;307(5951):521-7.

Dowsett M. *Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer.* Endocr Relat Cancer. 2001 Sep;8(3):191-5.

Dudgeon TJ, Cooke RM, Baron M, Campbell ID, Edwards RM, Fallon A. *Structure-function analysis of epidermal growth factor: site directed mutagenesis and nuclear magnetic resonance.* FEBS Lett. 1990 Feb 26;261(2):392-6.

E

Engler DA, Matsunami RK, Campion SR, Stringer CD, Stevens A, Niyogi SK. *Cloning of authentic human epidermal growth factor as a bacterial secretory protein and its initial structure-function analysis by site-directed mutagenesis.* J Biol Chem. 1988 Sep 5;263.

Ennis BW, Lippman ME, Dickson RB. *The EGF receptor system as a target for antitumor therapy.* Cancer Invest. 1991;9(5):553-62.

F

Falls DL. *Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions.* J Neurocytol. 2003 Jun-Sep;32(5-8):619-47.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. *EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization.* Mol Cell. 2003 Feb;11(2):507-17.

Ferguson KM. *Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor.* Biochem Soc Trans. 2004 Nov;32(Pt 5):742-5.

G

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha.* Cell. 2002 Sep 20;110(6):763-73.

Gee P, Rhodes CH, Fricker LD, Angeletti RH. *Expression of neuropeptide processing enzymes and neurosecretory proteins in ependyma and choroid plexus epithelium.* Brain Res. 1993 Jul 23;617(2):238-48.

George-Nascimento C, Gyenes A, Halloran SM, Merryweather J, Valenzuela P, Steimer KS, Masiarz FR, Randolph A. *Characterization of recombinant human epidermal growth factor produced in yeast.* Biochemistry. 1988 Jan 26;27(2):797-802.

Giaccone G, Gonzalez-Larriba JL, van Oosterom AT, Alfonso R, Smit EF, Martens M, Peters GJ, van der Vijgh WJ, Smith R, Averbuch S, Fandi A. *Combination therapy with gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gemcitabine and cisplatin in patients with advanced solid tumors.* Ann Oncol. 2004 May;15(5):831-8.

Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johnson DH. *Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial—INTACT 2. 1.* J Clin Oncol. 2004 Mar 1;22(5):785-94.

Goodsell DS. *The molecular perspective: epidermal growth factor.* Stem cells 2003;21(6):702-3.

Gotoh N, Tojo A, Hino M, Yazaki Y, Shibuya M. *A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor.* Biochem Biophys Res Commun. 1992 Jul 31;186(2):768-74.

Graham JS, Ryan CA. *Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants.* Biochem Biophys Res Commun. 1981 Aug 31;101(4):1164-70.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.* EMBO J. 1997 Apr 1;16(7):1647-55.

Gregory H, Willshire IR. *The isolation of the urogastrones - inhibitors of gastric acid secretion - from human urine.* Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1975 Nov;356(11):1765-74.

Grodberg J, Dunn JJ. *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol.* 1988 Mar;170(3):1245-53.

Grodberg J, Lundrigan MD, Toledo DL, Mangel WF, Dunn JJ. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *ompT* gene of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1209.

Groenen LC, Nice EC, Burgess AW. Structure-function relationships for the EGF/TGF- α family of mitogens. *Growth Factors.* 1994;11(4):235-57.

Gullick WJ. A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two. *Eur J Cancer.* 1994;30A(14):2186.

Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor and the *c-erbB-2* protein in breast cancer. *Int J Cancer Suppl.* 1990;5:55-61.

Gullick WJ. The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer.* 2001 Jun;8(2):75-82.

H

Harris AL, Nicholson S, Sainsbury R, Wright C, Farndon J. Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1992;(11):181-7.

Hass GM. Purification and partial characterization of a carboxypeptidase from the limpet (*Patella vulgata*). *Arch Biochem Biophys.* 1979 Nov;198(1):247-54.

Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-6.

Herbst RS, Bunn PA Jr. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Dec 1;9(16 Pt 1):5813-24.

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johnson DH. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. *J Clin Oncol.* 2004 Mar 1;22(5):785-94.

Hocman G. Chemoprevention of cancer: protease inhibitors. *Int J Biochem.* 1992 Sep;24(9):1365-75.

Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:373-98.

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Dwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jun;87(11):4207-11.

Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 2002 May 3;109(3):275-82.

Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer.* 2001 Sep;8(3):151-9.

Hynes NE, Lane HA. *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors.* Nat Rev Cancer. 2005 May;5(5):341-54. Review. Erratum in: Nat Rev Cancer. 2005 Jul;5(7):580.

J

Jaeger LA, Lamar CH, Cline TR, Cardona CJ. *Effect of orally administered epidermal growth factor on the jejunal mucosa of weaned pigs.* Am J Vet Res. 1990 Mar;51(3):471-4.

Jin MH, Sawamoto K, Ito M, Okano H. *The interaction between the Drosophila secreted protein argos and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted spitz to the receptor.* Mol Cell Biol. 2000 Mar;20(6):2098-107.

Johnson HM, Subramaniam PS, Olsnes S, Jans DA. *Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors.* Bioessays. 2004 Sep;26(9):993-1004.

Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ, Ritter G, Cohen L, Scanlan MJ, Cavenee WK, Old LJ. *A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21;100(2):639-44.

K

Klohs WD, Fry DW, Kraker AJ. *Inhibitors of tyrosine kinase.* Curr Opin Oncol. 1997 Nov;9(6):562-8.

Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. *Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells.* Int J Cancer. 1997 Mar 17;70(6):722-6.

Kris MG, Tonato M. *New approaches in the treatment of non-small cell lung cancer: taxanes in the treatment of NSCLC: pathways to progress.* Lung Cancer. 2002 Dec;38 Suppl 4:1-3.

Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. *EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy.* Endocr Relat Cancer. 2001 Jun;8(2):83-96.

Kurokawa H, Arteaga CL. *Inhibition of erbB receptor (HER) tyrosine kinases as a strategy to abrogate antiestrogen resistance in human breast cancer.* Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12 Suppl):4436s-4442s

L

Lee DN, Kuo TY, Chen MC, Tang TY, Liu FH, Weng CF. *Expression of porcine epidermal growth factor in Pichia pastoris and its biology activity in early-weaned piglets.* Life Sci. 2006 Jan 2;78(6):649-54.

Lee YJ, Shin SJ, Lin SR, Tan MS, Tsai JH. *Increased expression of heparin binding epidermal growth-factor-like growth factor mRNA in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats.* Biochem Biophys Res Commun. 1995 Feb 6;207(1):216-22.

Lee YS, Suh CW, Park SK, Lee EK. *Purification of soluble human epidermal growth factor (hEGF) from recombinant Escherichia coli culture broth by using expanded-bed adsorption chromatography.* Biotechnol Appl Biochem. 2003 Aug;38(Pt 1):9-13.

Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J. *Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer.* EMBO J. 1997 Jan

15;16(2):281-94.

Lenferink AE, de Roos AD, van Vugt MJ, van de Poll ML, van Zoelen EJ. *The linear C-terminal regions of epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor-alpha bind to different epitopes on the human EGF receptor.* *Biochem J.* 1998 Nov 15;336 (Pt 1):147-51.

Levitzki A, Gazit A. *Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development.* *Science.* 1995 Mar 24;267(5205):1782-8.

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab.* *Cancer Cell.* 2005 Apr;7(4):301-11.

Lin SL, Nussinov R. *A disulphide-reinforced structural scaffold shared by small proteins with diverse functions.* *Nat Struct Biol.* 1995 Oct;2(10):835-7.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. *Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor.* *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):802-8.

Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC. *Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway.* *Cancer Cell.* 2005 Jun;7(6):575-89.

Lynch TJ. *The evolving story of the epidermal growth factor receptor as a target for non-small-cell lung cancer.* *Clin Adv Hematol Oncol.* 2004 Dec;2(12):786-7.

M

MacIntyre S, Henning U. *The role of the mature part of secretory proteins in translocation across the plasma membrane and in regulation of their synthesis in Escherichia coli.* *Biochimie.* 1990 Feb-Mar;72(2-3):157-67.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, Nova York. 1989.

Marks CB, Vasser M, Ng P, Henzel W, Anderson S. *Production of native, correctly folded bovine pancreatic trypsin inhibitor by Escherichia coli.* *J Biol Chem.* 1986 Jun 5;261(16):7115-8.

Masuda N, Fukuoka M. *Irinotecan in the treatment of small cell lung cancer.* *Expert Rev Anticancer Ther.* 2001 Aug;1(2):187-95.

Matsuo E, Sampei G, Mizobuchi K, Ito K. *The plasmid F OmpP protease, a homologue of OmpT, as a potential obstacle to E. coli-based protein production.* *FEBS Lett.* 1999 Nov 12;461(1-2):6-8.

Maywald F, Boldicke T, Gross G, Frank R, Blocker H, Meyerhans A, Schwellnus K, Ebbers J, Bruns W, Reinhard G. *Human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) produced in active form and secreted from Escherichia coli.* *Gene.* 1988 Sep 7;68(2):357-69.

Molina MA, Aviles FX, Querol E. *Expression of a synthetic gene encoding potato carboxypeptidase inhibitor using a bacterial secretion vector.* *Gene.* 1992 Jul 15;116(2):129-38.

McInnes C, Grothe S, O'Connor-McCourt M, Sykes BD. *NMR study of the differential contributions of residues of transforming growth factor alpha to association with its receptor.* *Protein Eng.* 2000 Mar;13(3):143-7.

Mendelsohn J. *The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy.* Endocr Relat Cancer. 2001 Mar;8(1):3-9.

Merlos-Suarez A, Ruiz-Paz S, Baselga J, Arribas J. *Metalloprotease-dependent protransforming growth factor- α ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor- α -converting enzyme.* J Biol Chem. 2001 Dec 21;276(51):48510-7.

Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N. *The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells.* Cancer Res. 2001 Oct 1;61(19):7184-8.

Mohammadi M, Honegger A, Sorokin A, Ullrich A, Schlessinger J, Hurwitz DR. *Aggregation-induced activation of the epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase.* Biochemistry. 1993 Aug 31;32(34):8742-8.

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. *Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells.* Cancer Res. 2001 Jun 15;61(12):4744-9.

Molina MA, Marino C, Oliva B, Aviles FX, Querol E. *C-tail valine is a key residue for stabilization of complex between potato inhibitor and carboxypeptidase A.* J Biol Chem. 1994 Aug 26;269(34):21467-72.

Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. *The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides.* Cancer Res. 2002 Jun 1;62(11):3151-8.

Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. *Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo.* Cancer Res. 2001 Dec 15;61(24):8887-95.

N

Nice EC, Domagala T, Fabri L, Nerriea M, Walker F, Jorissen RN, Burgess AW, Cui DF, Zhang YS. *Rapid microscale enzymic semisynthesis of epidermal growth factor (EGF) analogues.* Growth Factors. 2002 Jun;20(2):71-80.

Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, Knowlden JM, Barrow D, McClelland RA, Jones HE, Wakeling AE, Gee JM. *Related Articles, Links Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, oestrogen receptor-positive breast cancer.* Endocr Relat Cancer. 2001 Sep;8(3):175-82.

Normanno N, Biando C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS. *Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment.* Endocr Relat Cancer. 2003 Mar;10(1):1-21.

Normanno N, Campiglio M, De LA, Somenzi G, Maiello M, Ciardiello F, Gianni L, Salomon DS, Menard S. *Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth.* Ann Oncol. 2002 Jan;13(1):65-72.

Normanno N, Campiglio M, Perrone F, De Luca A, Menard S. *Is the gefitinib plus trastuzumab combination feasible in breast cancer patients?* Ann Oncol. 2005 Oct;16(10):1709.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer.* Gene. 2006

Jan 17;366(1):2-16.

O

Odaka M, Kohda D, Lax I, Schlessinger J, Inagaki F. *Ligand-binding enhances the affinity of dimerization of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor.* J Biochem (Tokyo). 1997 Jul;122(1):116-21.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains.* Cell. 2002 Sep 20;110(6):775-87.

Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. *ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner.* Mol Cell Biol. 1998 Sep;18(9):5042-51.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.* EMBO J. 2000 Jul 3;19(13):3159-67.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.* EMBO J. 2000 Jul 3;19(13):3159-67.

Oliva B, Wastlund M, Nilsson O, Cardenas R, Querol E, Aviles FX, Tapia O. *Stability and fluctuations of the potato carboxypeptidase A protein inhibitor fold: a molecular dynamics study.* Biochem Biophys Res Commun. 1991 Apr 30;176(2):616-21.

Oka T, Sakamoto S, Miyoshi K, Fuwa T, Yoda K, Yamasaki M, Tamura G, Miyake T. *Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by Escherichia coli.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Nov;82(21):7212-6.

P

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy.* Science. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500. Epub 2004 Apr 29.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 7;101(36):13306-11.

Parries G, Chen K, Misono KS, Cohen S. *The human urinary epidermal growth factor (EGF) precursor. Isolation of a biologically active 160-kilodalton heparin-binding pro-EGF with a truncated carboxyl terminus.* J Biol Chem. 1995 Nov 17;270(46):27954-60.

Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. *The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy.* Ann Oncol. 2001 Jun;12(6):745-60.

Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. *Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification.* Breast Cancer Res. 2000;2(3):184-90. Epub 2000 Mar 25.

R

Raben D, Helfrich BA, Chan D, Johnson G, Bunn PA Jr. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with radiation and chemotherapy as a new therapeutic strategy in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol.* 2002 Feb;29(1 Suppl 4):37-46.

Ranson M. ZD1839 (Iressa): for more than just non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 2002;7

Raydin PM, Chamness GC. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers. *Gene.* 1995 Jun 14;159(1):19-27.

Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 18;319(1):1-11.

Ryan CA, Hass GM, Kuhn RW. Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *J Biol Chem.* 1974 Sep 10;249(17):5495-9.

S

Salomon DS, Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Shoyab M, Todaro GJ. The role of amphiregulin in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;33(2):103-14.

Savage CR Jr, Harper R. Human epidermal growth factor/urogastrone: rapid purification procedure and partial characterization. *Anal Biochem.* 1981 Feb;111(1):195-202.

Schmidt M, Lichtner RB. EGF receptor targeting in therapy-resistant human tumors. *Drug Resist Updat.* 2002 Feb;5(1):11-8.

Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ, Bell GI. Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science.* 1983 Jul 15;221(4607):236-40.

Sherrill JM. Insufficiency of self-phosphorylation for the activation of epidermal growth factor receptor. *Biochemistry.* 1997 May 13;36(19):5677-84.

Shields R. Growth factors for tumours. *Nature.* 1978 Apr 20;272(5655):670-1.

Shin SY, Shimizu M, Ohtaki T, Munekata E. Synthesis and biological activity of N-terminal-truncated derivatives of human epidermal growth factor (h-EGF). *Peptides.* 1995;16(2):205-10.

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jun 16;96(12):926-35.

Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JH. Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa). *Oncologist.* 2005 Sep;10(8):579-89.

Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.*

2005 Oct;17(10):1183-93.

Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI, Kris MG. *Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase.* Clin Cancer Res. 2000 Dec;6(12):4885-92.

Sitjà-Arnau M, Molina MA, Blanco-Aparicio C, Ferrer-Soler L, Lorenzo J, Aviles FX, Querol E, de Llorens R. *Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker.* Cancer Lett. 2005 Aug 26;226(2):169-84.

Sitjà-Arnau M. *Efecte de l'inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) en la via de senyalització dels receptors de la família ErbB. Aplicacions antitumorals.* Tesi Doctoral. Universitat de Girona. 2001.

Sizeland AM, Burgess AW. *Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line.* Mol Biol Cell. 1992 Nov;3(11):1235-43.

Sorkin A. *Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling.* Biochem Soc Trans. 2001 Aug;29(Pt 4):480-4.

Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. *Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor.* J Biol Chem. 2002 Nov 29;277(48):46265-72. Epub 2002 Aug 23.

Stein RA, Staros JV. *Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families.* J Mol Evol. 2000 May;50(5):397-412.

T

Thomas SM, Grandis JR. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation.* Cancer Treat Rev. 2004 May;30(3):255-68.

Todaro GJ, De Larco JE. *Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells.* Cancer Res. 1978 Nov;38(11 Pt 2):4147-54.

Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y. *Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network.* EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):4938-50.

Tzahar E, Yarden Y. *The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands.* Biochim Biophys Acta. 1998 Feb 20;1377(1):M25-37.

U

Ushiro H, Cohen S. *Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes.* J Biol Chem. 1980 Sep 25;255(18):8363-5.

V

van Doorn R, Kirtschig G, Scheffer E, Stoof TJ, Giaccone G. *Follicular and epidermal alterations in patients treated with ZD1839 (Iressa), an inhibitor of the epidermal growth factor receptor.* Br J Dermatol. 2002 Sep;147(3):598-601.

van Zoelen EJ, Lenferink AE, Kramer RH, van de Poll ML. *Rational design for the development of*

epidermal growth factor receptor antagonists. *Pathol Res Pract*.1996 Jul;192(7):761-7.

W

Wakeling AE, Nicholson RI, Gee JM. *Prospects for combining hormonal and nonhormonal growth factor inhibition*. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12 Suppl):4350s-4355s;

Wang Q, Villeneuve G, Wang Z. *Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation*. *EMBO Rep*. 2005 Oct;6(10):942-8.

Wang W, Hendriks DF, Scharpe SS. *Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen*. *J Biol Chem*. 1994 Jun 3;269(22):15937-44.

Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y. *Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency*. *J Biol Chem*. 1998 May 29;273(22):13819-27.

Waugh MG, Hsuan JJ. *EGF receptors as transcription factors: ridiculous or sublime?* *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9).

Wickner S, Hoskins J, McKenney K. *Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 15;88(18):7903-7.

Wiley HS, Burke PM. *Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking*. *Traffic*. 2001 Jan;2(1):12-8.

Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. *ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors*. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):8865-74.

Y

Yamada M, Kudoh S, Fukuda H, Nakagawa K, Yamamoto N, Nishimura Y, Negoro S, Takeda K, Tanaka M, Fukuoka M. *Dose-escalation study of weekly irinotecan and daily carboplatin with concurrent thoracic radiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer*. *Br J Cancer*. 2002 Jul.

Yamagata H, Nakahama K, Suzuki Y, Kakinuma A, Tsukagoshi N, Udaka S. *Use of Bacillus brevis for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(10):3589-93.

Yarden Y, Sliwkowski MX. *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):127-37.

Z

Zijlstra RT, Odle J, Hall WF, Petschow BW, Gelberg HB, Litoy RE. *Effect of orally administered epidermal growth factor on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994 Nov;19(4):382-90.

ANNEX

ARTICLE 1

L. Ferrer Soler, J. Cedano, E. Quero, R. de Llorens. " Cloning, expression and purification of human epidermal growth factor using different expression systems". *Journal of chromatography B*. Vol. 788 (2003) : p. 113-123

Received 2 July 2002; received in revised form 6 December 2002; accepted 17 December 2002

[doi:10.1016/S1570-0232\(02\)01035-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)01035-8)

Abstract

Epidermal growth factor (EGF) is a protein that belongs to the family of growth factors that bind the ErbB receptors, which play a prominent role in the development of carcinomas. We had demonstrated that potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) acts as an EGF antagonist. Because of the low affinity of PCI for the epidermal growth factor receptor, it was decided to design EGF mutants with PCI abilities. In order to achieve this we have first cloned, expressed and purified the native protein, EGF. Different expression systems with different locations of the recombinant protein were designed and a purification protocol was designed with those which allowed expression of EGF. Finally, the sample needed folding. Differences in the amount of EGF obtained and its activity were observed depending on the expression system used.

Author Keywords: Epidermal growth factor

Subject-index terms: Cloning; Expression; Purification

ARTICLE 2

Marina Gay, Ángel M. Montaña, Virtudes Moreno, María-José Prieto, Rafael Llorens, Laura Ferrer. " Studies of interaction of dichloro[η^2 -dimethyl-2-methyldene-cyclohexylmethyl)-amino]platinum(II) with DNA: effects on secondary and tertiary structures of DNA-Cytotoxic assays on human cancer cell lines Capan 1 and A431". *Journal of inorganic biochemistry*. Vol. 99, issue 12 (2005) : p. 2387-2394

Received 30 May 2005; received in revised form 7september 2005; Accepted 15 September 2005

Available online 26 Octobre 2005

[doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.09.006)

Abstract

The interaction with DNA and the cytotoxic activity of a new organometallic platinum(II) compound were studied. Different techniques were used to evaluate changes in secondary and tertiary DNA structures, and to obtain images of DNA morphological changes. The ability of platinum complex to modify secondary DNA structure was explored by circular dichroism (CD). Electrophoretic mobility showed changes in tertiary DNA structure. Finally, Atomic Force Microscopy (AFM) revealed morphological changes of plasmid DNA (pBR322). This compound breaks the traditional structure–activity rules for *cis*-platinum compounds, but it could be of interest because of its different kinetics. An organometallic bond normally shows a higher *trans*-effect than an amine ligand, and that fact, a priori, could contribute to a higher DNA binding rate. Human A431 and Capan-1 cells (vulvae carcinoma and pancreatic carcinoma, respectively) were exposed to increasing concentrations of cisplatin and complex **6** for 24 h, after which time the cell number/viability was determined by the colorimetric MTT assay. A low cytotoxicity of organometallic compound **6** against A431 and Capan-1 cancer cell lines was observed and this result is consistent with the low interaction with DNA observed in previous studies.

Keywords: Platinum(II); π -complex; Circular dichroism; Electrophoresis; Atomic force microscopy; Cytotoxicity; Cancer cell lines; A431; Capan-1

ARTICLE 3

Marta Sitjà-Arnau, Miguel A. Molina, carmen Blanco-Aparicio, Laura Ferrer-Soler, Julia Lorenzo, Francesc X. Avilés, Enrique Querol, Rafael de Llorens. " Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker". *Cancer letters*. Vol. 226, issue 2 (2005) : p. 169-184

Received 9 June 2004; received in revised form 29 November 2004; accepted 7 January 2005

Shortcut URL to this

page: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03043835>
[doi:10.1016/j.canlet.2005.01.025](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.025)

Abstract

The epidermal growth factor receptor (EGFR) signal transduction pathway plays a prominent role in the development of carcinomas, and is an interesting target for antitumoral therapy. We have previously described how potato carboxypeptidase inhibitor (PCI), a 39-amino acid protease inhibitor with a T-Knot motif, binds to EGFR receptor and inhibits the activation of receptor protein tyrosine kinase. In this paper it is shown that PCI interferes with EGFR activation through inhibition of receptor dimerization and receptor transphosphorylation induced by epidermal growth factor (EGF) and by transforming growth factor alpha (TGF- α). Moreover, PCI blocks the formation and activation of ErbB1/ErbB-2 heterodimers that have a prominent role in carcinoma development. As a result of these effects, PCI interferes in the EGFR signal transduction pathway by reversing the effects of EGF on the growth of two tumoral cell lines, A431 and MDA-MB-453, and promotes EGFR down-regulation. These results show that PCI acts as an EGF/TGF- α antagonist, which suggests its therapeutic potential in the treatment of carcinomas.

Keywords: EGF; EGF antagonist; EGFR; ErbB-2; PCI; Signal transduction; TGF- α

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; EGF, epidermal growth factor; DMEM, Dulbeccos modified Eagle's medium; dNTP, deoxynucleotides; EGFR, epidermal growth factor receptor; FITC, fluorescein isotiocyanate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PCI, potato carboxypeptidase inhibitor; PCR, polymerase chain reaction; PVDF, polyvinylidene difluoride; RITC, rodhamine isotiocyanate; RMSD, root mean square deviation; RT-PCR, retrotranscriptase and polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium disulfate polyacrilamide gel; TGF- α , transforming growth factor alpha

**Updating of the mechanisms of resistance to
EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in breast cancer:
Gefitinib (Iressa™)-induced changes in the expression
and nucleo-cytoplasmic trafficking of *HER*-ligands**

Laura Ferrer-Soler^{1,2}
Alejandro Vazquez-Martin^{1,3}
Javier A. Menendez^{1,3*}
Rafael de Llorens^{1,2*}
Ramon Colomer^{1,3*}

¹ Fundació d' Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Tueta (IdIBGi);
Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, Girona, Catalonia, Spain.

² Biochemistry and Molecular Biology of Cancer;
Faculty of Sciences, University of Girona, Girona, Catalonia, Spain.

³ Medical Oncology, Institut Català d'Oncologia de Girona (ICO Girona);
Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, Girona, Catalonia, Spain.

Running title: Gefitinib resistance in breast cancer

Key words: Gefitinib; Iressa; Tyrosine Kinase Inhibitors; EGFR; breast cancer

* To whom correspondence should be addressed:

Javier A. Menendez; E-mail: jmenendez@ico.scs.es

Rafael de Llorens; E-mail: rafael.llorens@udg.es

Ramon Colomer; E-mail: rcolomer@ico.scs.es

Fundació de l' Institut de Recerca Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IdIBGi)
Institut Català d' Oncologia de Girona (ICO Girona)

Medical Oncology, Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta
Avenida de Francia s/n; 17007 Girona, Catalonia (Spain)

Phone: + 34 (972) 225 834 Ext. 2579

Fax: + 34 (972) 217 344

Abstract

Intrinsic resistance to the EGFR (HER1) TKI gefitinib, and more generally to EGFR TKIs, is a common phenomenon in breast cancer. The availability of molecular criteria for predicting sensitivity to EGFR-TKIs is, therefore, the most relevant issue for their correct use and for planning future research. Though it appears that in non-small-cell lung cancer (NSCLC) response to gefitinib is directly related to the occurrence of specific mutations in the EGFR TK domain, breast cancer patients cannot be selected for treatment with gefitinib on the same basis as such EGFR mutations have been reported neither in primary breast carcinomas nor in several breast cancer cell lines. Alternatively, there is a general agreement on the hypothesis that the occurrence of molecular alterations that activate transduction pathways downstream of EGFR (*i.e.*, MEK1/MEK2 → ERK1/2 MAPK and PI-3'K → AKT growth/survival signaling cascades) significantly affect the response to EGFR TKIs in breast carcinomas. However, there are no studies so far addressing a role of EGF-related ligands as *intrinsic* breast cancer cell modulators of EGFR TKIs efficacy. We recently monitored gene expression profiles and sub-cellular localization of HER-1/-2/-3/-4 related ligands (*i.e.*, EGF, amphiregulin, transforming growth factor-alpha, betacellulin, epiregulin and neuregulins) prior and after gefitinib treatment in a panel of human breast cancer cell lines. First, gefitinib-induced changes in the endogenous levels of EGF-related ligands correlated with the natural degree of breast cancer cell sensitivity to gefitinib. While breast cancer cells intrinsically resistant to gefitinib ($IC_{50} \geq 15 \mu M$) markedly up-regulated (up to 600 times) the expression of genes codifying for HER-specific ligands, a significant down-regulation (up to 10^6 times) of HER-ligand gene transcription was found in breast cancer cells intrinsically sensitive to gefitinib ($IC_{50} \leq 1 \mu M$). Second, loss of HER1 function differentially regulated the nuclear trafficking of HER-related ligands. While gefitinib treatment induced an active import and nuclear accumulation of the HER-ligand NRG in intrinsically "gefitinib-resistant" breast cancer cells, an active export and nuclear loss of NRG was observed in intrinsically "gefitinib-sensitive" breast cancer cells. In summary, through *in vitro* and pharmacodynamic studies we have learned that, besides mutations in the HER1 gene, oncogenic changes downstream of HER1 are the key players regulating gefitinib efficacy in breast cancer cells. It now appears that pharmacological inhibition of HER1 function also leads to striking changes in both the gene expression and the nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-specific ligands, and that this response correlates with the intrinsic degree of breast cancer sensitivity to the EGFR TKI gefitinib. The relevance of this previously unrecognized intracrine feedback to gefitinib warrants further studies as cancer cells could bypass the antiproliferative effects of HER1-targeted therapeutics without a need for the overexpression and/or activation of other HER family members and/or the activation of HER-driven downstream signaling cascades.