

Universidad de Córdoba

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina
Regenerativa (CABIMER)

ANÁLISIS DE ANTÍGENOS PRESENTES EN CÉLULAS EMBRIONARIAS HUMANAS MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Gema García Jurado

Dirigida por:

Dr. Diego Llanes Ruiz

Dr. Juan R. Tejedo Huamán



CÓRDOBA 2010

TITULO: Análisis de antígenos presentes en células embrionarias humanas
mediante anticuerpos monoclonales

AUTOR: *Gema García Jurado*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-694-1649-5



Dr. **Diego Llanes Ruiz**, catedrático de Genética de la Universidad de Córdoba, y Dr. **Juan R. Tejedo Huamán**, profesor contratado-doctor de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad Pablo de Olavide.

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por Dña. **Gema García Jurado** titulado “*Análisis de antígenos presentes en células embrionarias humanas mediante anticuerpos monoclonales*”, ha sido realizado bajo su supervisión y dirección, y reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste y a efectos oportunos, firman el presente informe.

VºBº de los directores del trabajo.

Profesor Dr. Diego Llanes Ruiz

Profesor Dr. Juan R. Tejedo Huamán

Córdoba, a 10 de diciembre de 2010

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1. ANTICUERPOS.....	7
2. ANTICUERPOS MONOCLONALES MURINOS.....	12
3. ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS. LAS BALAS MÁGICAS.....	15
4. NUESTRO INMUNÓGENO: CÉLULAS EMBRIONARIAS HUMANAS.	16
4.1 Antígenos de superficie como marcadores de células troncales embrionarias humanas.....	17
5. PROTEOMA Y ANTICUERPOS: INICIATIVAS.....	18
6. HACER DE LOS ANTICUERPOS HERRAMIENTAS ÚTILES.....	21
OBJETIVOS.....	27
1. ANIMALES	33
2. CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES	33
2.1 HS181	33
2.2 SHEF-4, SHEF6	34
2.3 H7(S6), H7(S14)	34
2.4 NTERA-2/clon D1.....	35
2.5 n2102Ep/clon 2A6.....	35
2.6 1411H (Human yolk sac carcinoma), RD (Human Caucasian embryo rhabdomyosarcoma, BEWO (Human choriocarcinoma)	36
2.7 P-19.....	36
2.8 Fibroblastos.....	37
2.9 Leucocitos mononucleares de sangre periférica y plaquetas.....	37
2.10 Células de mieloma (SP2/O-AG14)	38
2.11 Esplenocitos de ratón	39
2.12 D3.....	39

3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	39
3.1 Inmunizaciones y fusiones	39
3.2 Selección de clones positivos (ELISA)	41
3.3 Clonaje de los hibridomas.....	42
3.4 Determinación del isotipo de las inmunoglobulinas.....	43
4. PRODUCCIÓN DE SOBRENADANTE Y ASCITIS	43
5. INMUNOCITOQUÍMICA	43
6. CITOMETRÍA DE FLUJO	45
7. INMUNOHISTOQUÍMICA	46
7.1 Procesado de las muestras.....	47
7.2 Desarrollo de la técnica.....	47
8. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS ANTÍGENOS	48
8.1 Western blot.....	49
8.1.1 Fraccionamiento celular.....	49
8.1.2 Electroforesis, transferencia y revelado	50
8.1.3 Identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF MS	52
9. DIFERENCIACIÓN CELULAR (NTERA-2/D1)	54
10. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CON ESTAUROSPORINA.....	55
 RESULTADOS	 57
1. ANTICUERPOS: PRODUCCIÓN, DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN.....	59
1.1 Antígeno e inmunizaciones	59
1.2 Fusiones.....	60
1.3 Selección de hibridomas.....	60
1.4 Determinación de los isotipos de las cadenas ligeras y pesadas.	64
1.5 Clonación de los hibridomas.....	64

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE MOLÉCULAS PRESENTES EN LA LÍNEA CELULAR EMBRIONARIA HUMANA HS181 Y MOLÉCULAS PRESENTES EN TODAS LAS LÍNEAS CELULARES.....67

1. INTRODUCCIÓN69

1.1 Anticuerpos frente a moléculas específicas de líneas celulares estudiadas
69

1.2 Anticuerpos frente a moléculas presentes en prácticamente todas las líneas celulares estudiadas..... 70

2. RESULTADOS72

2.1 Anticuerpos que reconocen moléculas que podrían tener una expresión específica en las líneas estudiadas.....77

2.2.1 GRUPO I: GG5B6.1F9 y GG13B5.1B3 reconocen sólo HS18177

2.2.2 GRUPO II: GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 reconocen HS181 y células sanguíneas.....78

2.2.3 GRUPO III: GG1B6.1E2, GG1C6.1F5 y GG4E4.1D3: Reconocen débilmente sólo a HS181 81

2.2 Anticuerpos que reconocen moléculas presentes en varias o todas las líneas celulares.....82

2.2.1 GRUPO IV: GG3B2.2F7, GG3E7.1F2, GG8H3.1C9 y GG14B3.1E9: Reconocen todas las líneas testadas82

2.2.2 GRUPO V: GG1H2.1B3, GG3H5.1C4, GG4B3.1B6, GG4C10.1C3, GG6E10.1D7, GG6E7.1E9, GG8F3.1A2, GG8H11.1B2, GG9E2.1E5 y GG11D8.1D6: Reconocen todas las líneas testadas pero no células sanguíneas.....94

3. DISCUSIÓN 103

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL GG6H9.1C3 QUE RECONOCE UN EPÍTOPO PRESENTE EN hnRNP K (Heterogeneous Nuclear RiboNucleoProtein K) Y PSF (Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor) 111

1. INTRODUCCIÓN 113

2. RESULTADOS 117

2.1 Selección y determinación del isotipo 117

2.2 Distribución celular del antígeno 117

2.2.1 Citometría de flujo 117

2.2.2 Inmunocitoquímica.....120

2.3 Estados de diferenciación celular 121

2.4 Peso molecular del antígeno123

2.5 Identificación del antígeno: Espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF MS)124

3. DISCUSIÓN129

CAPÍTULO 3

DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS UTILIZANDO EL ANTICUERPO MONOCLONAL GG15H5.1D2 131

1. INTRODUCCIÓN133

1.1 Apoptosis y vías básicas de señalización133

1.2 Inducción de apoptosis137

1.3 Estaurosporina138

1.4 Anticuerpos y apoptosis139

2. RESULTADOS140

2.1 Selección y determinación del isotipo.140

2.2 Distribución celular del antígeno 141

2.2.1 Citometría de flujo 141

2.2.2 Inmunocitoquímica..... 141

2.3 Inducción de apoptosis con estaurosporina.....	143
3. DISCUSIÓN.....	151
CAPÍTULO 4	
DETECCIÓN DE LA ENZIMA CATALASA POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL GG3G5.1E5.....	155
1. INTRODUCCIÓN.....	157
1.1 ROS y enzimas antioxidantes.....	157
1.2 Catalasa y apoptosis.....	158
2. RESULTADOS.....	159
2.1 Selección y determinación del isotipo.....	159
2.2 Distribución celular del antígeno.....	160
2.2.1 Citometría de flujo.....	160
2.2.2 Inmunocitoquímica.....	163
2.3 Peso molecular del antígeno.....	164
2.4 Identificación del antígeno: espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF MS).....	166
3. DISCUSIÓN.....	169
DISCUSIÓN GENERAL.....	171
1. LOS ANTICUERPOS.....	173
2. LOS ANTÍGENOS.....	177
3. LAS APLICACIONES.....	180
CONCLUSIONES FINALES.....	183
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	187

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Esquema de la teoría de las cadenas laterales tomado del artículo de P. Ehrlich.....	8
Figura 2: Modelo de selección clonal de la formación de anticuerpos.	9
Figura 3: Diferentes clases de anticuerpos.....	10
Figura 4: Estructura básica de una inmunoglobulina.	11
Figura 5: Esquema representativo de las etapas para producir anticuerpos monoclonales murinos.	13
Figura 6: El ámbito de aplicación de MIAPAR.).....	20
Figura 7: Diferentes tipos de epítomos.....	23
Figura 8: Expresión de SSEA-3, SSEA-1 y TRA-1-60 en células NTERA-2/D1 después de ser inducidas a diferenciación con ácido retinoico.....	54
Figura 9: Expresión de los hibridomas en dos estadios de diferenciación de la línea HS181 por ELISA.....	62
Figura 10: Análisis funcional mediante el programa de análisis Ingenuity. Red de interacción molecular asociada a hnRNP K y catalasa.	179
Figura 11: Comparativa de los anticuerpos monoclonales disponibles frente a catalasa en la base de datos on line Antibodypedia.	180

CAPÍTULO 1:

Figura 1.1: Hipótesis explicativa de la polireactividad conformacional.	71
Figura 1.2: Expresión de los AcMo GG5B6.1F9 y GG13B5.1B3 en citometría de flujo con la línea HS181.	78
Figura 1.4: Citometría de flujo de GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 frente a células sanguíneas.....	79
Figura 1.3: Reactividad de GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 con células HS181.	80
Figura 1.5: Expresión de los AcMo GG1B6.1E2, GG1C6.1F5 y GG4E4.1D3 en citometría de flujo con la línea HS181.....	81
Figura 1.6: Western blot sobre diferentes lisados celulares con el AcMo GG3B2.2F7 (A) , GG8H3.1C9 (B) y GG14B3.1E9 (C)	83
Figura 1.7: Citometría de flujo de los AcMo GG3B2.2F7, GG3E7.1F2, GG8H3.1C9 y GG14B3.1E9 frente a diferentes líneas celulares..	85

Figura 1.8: Citometría de flujo de los AcMo GG3B2.2F7, GG3E7.1F2, GG8H3.1C9 y GG14B3.1E9 frente a células sanguíneas.87

Figura 1.9: Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de los antígenos reconocidos por GG3B2.2F7, GG3E7.1F2, GG8H3.1C9 y GG14B3.1E9 en diferentes estados de diferenciación celular.. 88

Figura 1.10: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG3B2.2F7 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. 90

Figura 1.11: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG3E7.1F2 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica.91

Figura 1.12: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG8H3.1C9 por inmunocitoquímica. 92

Figura 1.13: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG14B3.1E9 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. 93

Figura 1.14: Western blot sobre diferentes lisados celulares con el AcMo GG3H5.1C4 **(A)**, GG9E2.1E5 **(B)** y GG11D8.1D6 **(C)**.95

Figura 1.15: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG9E2.1E5 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica 98

Figura 1.16: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG11D8.1D6 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. 99

Figura 1.18: Núcleos fragmentados en células en apoptosis.100

Figura 1.17: Reactividad del AcMo GG6E7.1E9 con células troncales embrionarias HS181 por inmunocitoquímica. 101

Figura 1.19: Inmunocitoquímica en suspensión de la línea HS181 incubada con el AcMo GG8F3.1A2.....102

CAPÍTULO 2:

Figura 2.1: Citometría de flujo del anticuerpo GG6H9.1C3 frente a diferentes líneas celulares..... 119

Figura 2.2: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 con células troncales embrionarias humanas HS181 por inmunocitoquímica..120

Figura 2.3: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 con células troncales embrionarias humanas Shef6 por inmunocitoquímica. 121

Figura 2.4: Análisis mediante citometría de flujo de la expresión del antígeno reconocido por GG6H9.1C3 en diferentes estados de diferenciación celular. . 122

Figura 2.5: Western blot con el anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 y diferentes lisados totales de las líneas NTERA-2/D1, n2102Ep y D3..... 124

Figura 2.6: Análisis de la proteína reconocida por GG6H9.1C3 con MALDI-TOF/TOF..... 125

Figura 2.7: Western blot de lisados de proteína total de las líneas celulares NTERA-2/D1, n2102Ep y D3.. 127

Figura 2.8: Análisis por Western blot de diferentes lisados proteicos. 128

CAPÍTULO 3:

Figura 3.1: Dos vías de muerte, necrosis y apoptosis..... 135

Figura 3.2: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con células troncales embrionarias humanas HS181 por inmunocitoquímica..... 142

Figura 3.3: Reactividad en condiciones de apoptosis del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con células troncales embrionarias humanas HS181 por inmunocitoquímica. 145

Figura 3.4: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con fibroblastos por inmunocitoquímica. 146

Figura 3.5: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con fibroblastos en apoptosis por inmunocitoquímica..... 147

Figura 3.6: Western blot con diferentes lisados celulares de la línea HS181 en diferentes estados de apoptosis con el AcMo GG15H5.1D2. 148

Figura 3.7: Sección histológica correspondiente a nódulo linfático porcino. . 149

Figura 3.8: Células HS181 comenzando un proceso apoptótico. 150

CAPÍTULO 4:

Figura 4.1: Citometría de flujo del anticuerpo GG3G5.1E5 frente a diferentes líneas celulares.. 161

Figura 4.2: Citometría de flujo del anticuerpo GG3G5.1E5 frente a células sanguíneas..... 162

Figura 4.3: Análisis mediante citometría de flujo de la expresión del antígeno reconocido por GG3G5.1E5 en diferentes estados de diferenciación celular. ..163

Figura 4.4: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG3G5.1E5 con células troncales embrionarias humanas Shef6 por inmunocitoquímica.164

Figura 4.5: Análisis por Western blot de diferentes lisados proteicos de fibroblastos humanos con el AcMo GG3G5.1E5.165

Figura 4.6: Análisis por Western blot de leucocitos humanos con el AcMo GG3G5.1E5.166

Figura 4.7: Western blot de leucocitos humanos..168

Figura 4.8: Sección histológica correspondiente a hígado porcino.....168

Figura 4.9: Anticuerpo monoclonal comercial específico de catalasa.....170

Tabla 1: Técnicas empleadas utilizando anticuerpos monoclonales.....25

Tabla 2: Calendario de inmunizaciones y fusiones..... 40

Tabla 3: Éxito de fusión.. 60

Tabla 4: Hibridomas seleccionados en las diferentes fusiones..... 61

Tabla 5: Clasificación preliminar de los 62 hibridomas atendiendo a su expresión en diferentes estados de diferenciación.63

Tabla 6: Lista final con los anticuerpos monoclonales que se utilizaron en el trabajo.65

CAPÍTULO 1:

Tabla 1.1: Lista completa de todos los anticuerpos monoclonales obtenidos. ..74

Tabla 1.2: Citometría de flujo de los anticuerpos monoclonales producidos, frente a células mononucleares de sangre periférica de humano.....75

Tabla 1.3: Pesos moleculares en kDa.76

Tabla 1.4: Reactividad de los AcMos con diferentes líneas celulares por citometría de flujo.....97

CAPÍTULO 2:

Tabla 2.1: Expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo GG6H9.1C3 en diferentes estados de diferenciación celular..... 123

Tabla 2.2: Identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF MS..... 126

CAPÍTULO 4:

Tabla 4.1: Identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF MS. 167

ABREVIATURAS

ABTS	2,2'azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid)
AcMo	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
APS	Persulfato de amonio
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
BSA	Albúmina de suero bovino
Co-Ip	Co-inmunoprecipitación
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECL	Emitting Chemoluminiscense (quimioluminiscente)
EDTA	Acido etilén-diaminotetraacético
ELISA	Inmunoensayo enzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FITC	Isocianato de fluoresceína
HAT	Hipoxantina/aminopterin/timidina
hESC	células troncales embrionarias humanas
Ig	Inmunoglobulinas
IMF	Intensidad media de fluorescencia
KDa	Kilodalton
NAF	Fluoruro de sodio
NP-40	Nonidet-40
PAGE	Poliacrylamide gel eletrophoresis
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline)

PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PMFS	Fluoruro fenilmetilsufónico
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SSEA-1	Stage-specific embryonic antigen-1
SSEA-3	Stage-specific embryonic antigen-3
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen-4
TBS-T	Tampón Tris- fosfato-salino con Tween
TEMED	N,N,N',N-tetrametil-etiléndiamina)

INTRODUCCIÓN GENERAL

En la tesis doctoral que presento se describen una serie de anticuerpos y las moléculas que estos reconocen. Trata de un tipo específico de anticuerpos, los **anticuerpos monoclonales murinos**, y de las técnicas inmunológicas que he empleado para su caracterización. Trata de las moléculas (proteínas) que se han detectado en estos tres años de trabajo tras la inmunización de ratones con extractos de **células embrionarias humanas** como inmunógeno, y de las diversas técnicas que han permitido, en tres casos, determinar sus características, la tesis, por ello, se ha dividido en capítulos que presentan a las diferentes moléculas. Trata, también, del posible empleo que estos anticuerpos puedan tener en el **diagnostico de enfermedades** y, de cómo se pueden hacer visibles, **como herramientas útiles**, para el trabajo en laboratorios de biomedicina de universidades, centros de investigación y hospitales, siendo como lo son, la última tecnología, de libre uso y no sujeto, por tanto, a ninguna patente que impida su aplicación sin restricciones.

1. ANTICUERPOS

Los anticuerpos¹ y su estudio históricamente han ocupado un lugar fundamental para llegar a entender el complejo funcionamiento del sistema inmune. Los trabajos de Emil von Ehrlich y su teoría de las “cadenas laterales”, “side-chain theory” en inglés, sobre la idea de que los anticuerpos eran consecuencia de una respuesta celular a la interacción del antígeno² con un receptor en la superficie de la célula. Esta teoría sigue siendo considerada, en lo básico, como correcta y los esquemas que llenaban sus trabajos, de los que presentamos dos (figura 1), siguen sirviendo para explicar la generación de la diversidad de anticuerpos, en respuesta a los inmunógenos (antígenos

¹ El primer uso del término “anticuerpo” aparece en un artículo de P. v Ehrlich en Octubre de 1891, donde se hace notar que si dos sustancias dan lugar a dos diferentes “anticuerpos” las sustancias son distintas.

² Tiene su origen en, “**antibody generator**”.

específicos) que puedan entrar en contacto con las células productoras de anticuerpos, células B.

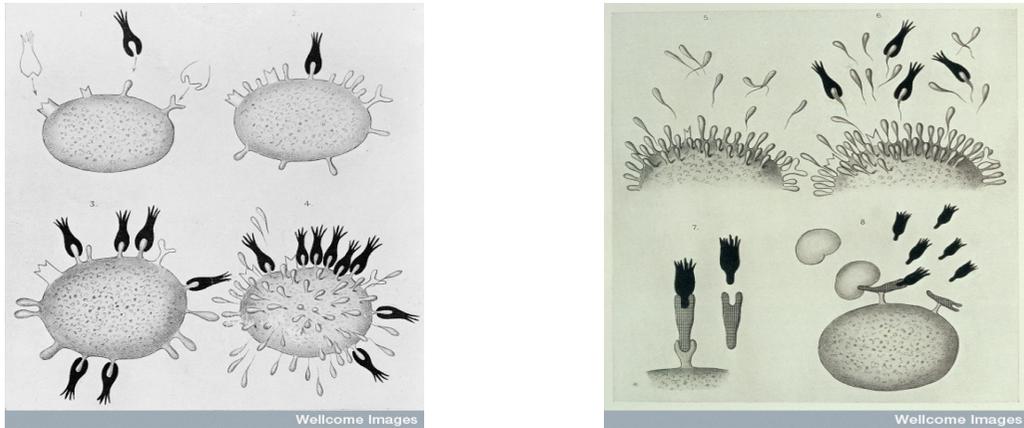


Figura 1: Esquema de la teoría de las cadenas laterales tomado del artículo de P. Ehrlich. Proc. Roy. Soc. B. 66,424 (1900)

Son muchos los autores que, siguiendo la teoría de Ehrlich, hicieron aportaciones para mejorarla, dando lugar a la “teoría de la selección clonal” que incluye los procesos de diferenciación y proliferación celular necesarios, (aportación de M. Burnet), la existencia desde el nacimiento de gran número de “anticuerpos naturales”, (aportación de N. Jerne) así llamados para distinguirlos de los que necesitan para generarse del contacto con los inmunógenos, contacto que induce los procesos de mutación somática y de recombinación de los genes de las inmunoglobulinas, (aportación de J. Lederberg). Un breve resumen de la situación tal como la vemos hoy se presenta en la figura 2.

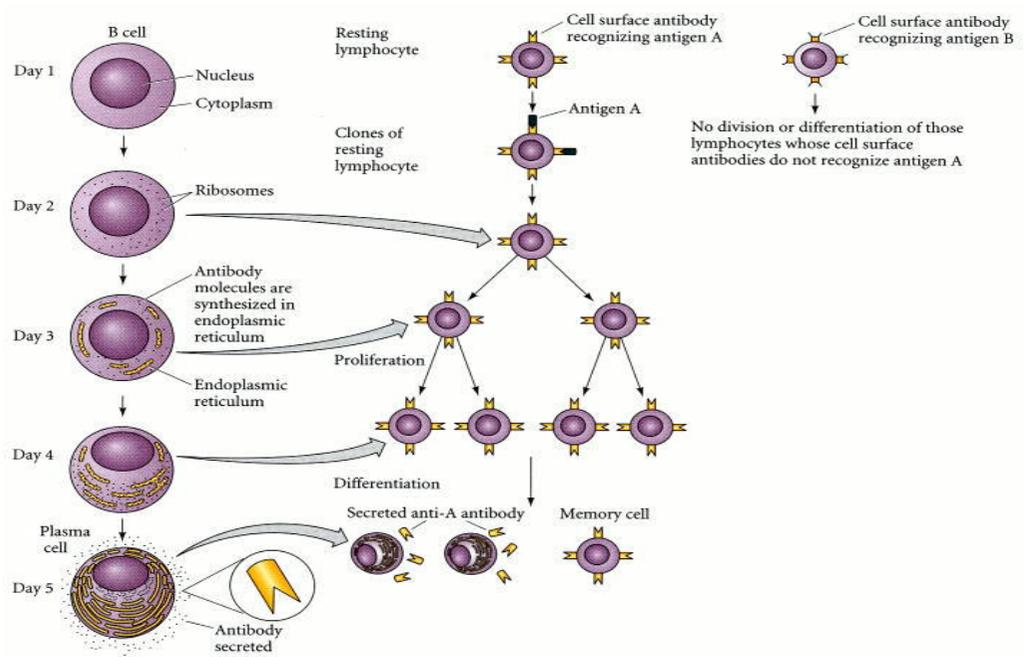


Figura 2: Modelo de selección clonal de la formación de anticuerpos. Cada célula B produce un tipo particular de anticuerpo (inmunoglobulina) de la proteína y la muestra en su superficie celular. Cuando un antígeno (cuerpo extraño) se une a las proteínas de los anticuerpos en la membrana de las células B, las células B son capaces de dividirse y diferenciarse en una célula plasmática que secreta anticuerpos. La célula plasmática sólo segrega el tipo particular de anticuerpo que fue originalmente hecho por la célula B. Figura tomada del capítulo 22 del libro Environmental Regulation of Animal Development.

Damos a continuación una breve semblanza de la estructura de los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig). Los anticuerpos pueden presentarse en distintas variedades conocidas como isotipos o clases, en humanos existen anticuerpos con cinco isotipos conocidos como Ig A, Ig D, Ig E, Ig G e Ig M. Hay también pequeñas diferencias dentro de cada isotipo, estas diferencias se conocen por alotipos. Los más comunes isotipos y alotipos en humanos se presentan en la Figura 3.

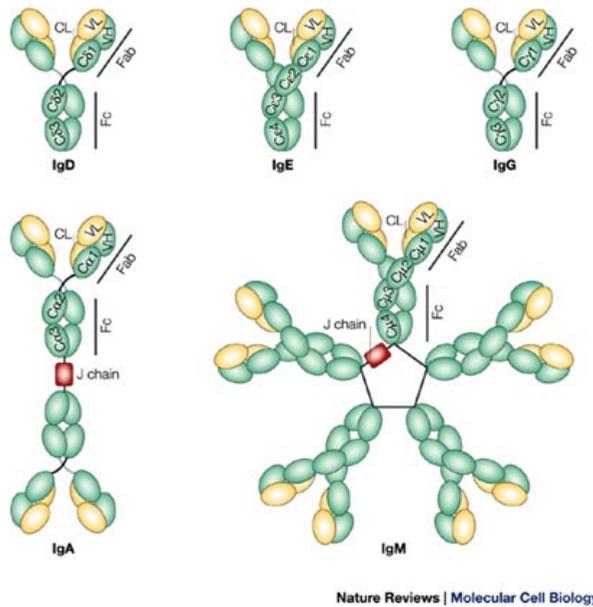


Figura 3: Diferentes clases de anticuerpos. Isotipos, D, M, G, A y E. Rojas R. Nature Reviews, Molecular Cell Biology 3, 944-956 (December 2002).

Las **inmunoglobulinas** se incluyen dentro del grupo de las glicoproteínas y funcionan como la parte específica del denominado complejo receptor de células B reconociendo al antígeno a nivel de la membrana del linfocito B, y como moléculas circulantes secretadas por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación de células B. Estructuralmente todas están formadas por dos cadenas polipeptídicas pesadas H (del término anglosajón “Heavy” pesado) y dos cadenas ligeras L (del término anglosajón “Light” ligero) unidas entre sí mediante enlaces covalentes. Las cadenas ligeras consisten en una región variable (VL) y una constante (CL) mientras que las pesadas presentan una región variable (VH) y tres constantes (CH1, CH2, CH3). Funcionalmente podemos distinguir dos porciones en los anticuerpos: una de ellas implicada en el reconocimiento y unión al antígeno

denominada región Fab (antigen binding Fragment) y otra implicada en las funciones de los anticuerpos y en su vida media en sangre, llamada región Fc (crystallizable fragment). En la figura 4 se presenta un esquema de la estructura básica de una Ig.

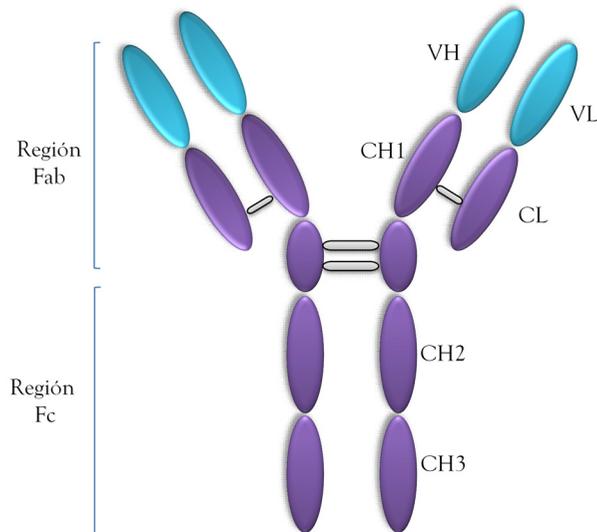


Figura 4: Estructura básica de una inmunoglobulina.

Los anticuerpos solubles son secretados por un linfocito B activado (en su forma de célula plasmática) para unirse a sustancias extrañas y señalarlas para su destrucción por el resto del sistema inmune. El isotipo de cada anticuerpo cambia durante el desarrollo y la activación de los linfocitos B, primero se produce en forma de clase M y tras diversos procesos de diferenciación celular se producen los de clase G, A y E. Cuando aún no se han expuesto a su antígeno, los linfocitos B llamados vírgenes y expresan los conocidos como “anticuerpos naturales” que en su gran mayoría son del isotipo M.

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES MURINOS

Hemos visto que la selección clonal implica una respuesta inmune distribuida clonalmente entre muchos y diferentes linfocitos B, de tal forma que cada uno de ellos está programado para responder a un único determinante antigénico o epítipo. Por tanto la respuesta inmune a, por ejemplo, una proteína es policlonal contra todos los determinantes antigénicos presentes en la proteína pero la respuesta a cada determinante antigénico es monoclonal. Los inmunólogos dedicaron gran cantidad de tiempo en realizar adsorciones para intentar que un suero policlonal producido en respuesta a un inmunógeno, se convirtiera en monoclonal. El desarrollo de las técnicas que permiten la obtención de anticuerpos monoclonales específicos ha sido de capital importancia para la inmunología. En el año 1975 en la revista Nature se publicó un artículo cuya trascendencia revolucionaría las investigaciones biológicas (Kohler & Milstein 1975). Milstein y Kohler, autores de dicho artículo describieron la obtención de anticuerpos de especificidad predeterminada, mediante la fusión celular (híbrido) de esplenocitos de ratón inmunizados con hematíes y células de una línea celular de un plasmacitoma de ratón derivada de linfocitos B. Fueron estos los primeros anticuerpos monoclonales (AcMos) obtenidos por fusión celular. Este resultado constituyó la culminación de una larga carrera de inmunólogos e inmunoquímicos en el rescate de la función productora de anticuerpos en una estirpe celular de crecimiento indefinido, que permitiera disponer de una fuente prácticamente ilimitada de anticuerpos muy específicos.

En esta tecnología innovadora de la producción de híbridos, denominados **hibridomas**, fue decisivo el diseño de un medio selectivo para el crecimiento de los híbridos obtenidos mediante la deficiencia en la enzima Hipoxantina-Guanina-Fosforibosil-Transferasa (HGPRT) y su complementación con un medio que contenía Hipoxantina, Timidina y Aminopterina, HAT, que

es un bloqueador de la síntesis de novo de los ácidos nucleicos (Littlefield 1964). Por tanto una línea celular productora de anticuerpos generada por esta tecnología, proviene de la integración física, mediante un agente fusógeno, de células productoras de anticuerpos de un animal inmunizado, en nuestro caso ratones de la estirpe BALB/c, y células de una línea de plasmacitoma con un similar estadio de diferenciación. El hibridoma resultante puede preservar la capacidad de excretar inmunoglobulinas específicas y la posibilidad de reproducirse indefinidamente, además de la capacidad selectiva de expresar actividad HGPRT que le ha permitido sobrevivir. En la siguiente figura se muestra un resumen del proceso seguido de producción de anticuerpos monoclonales.

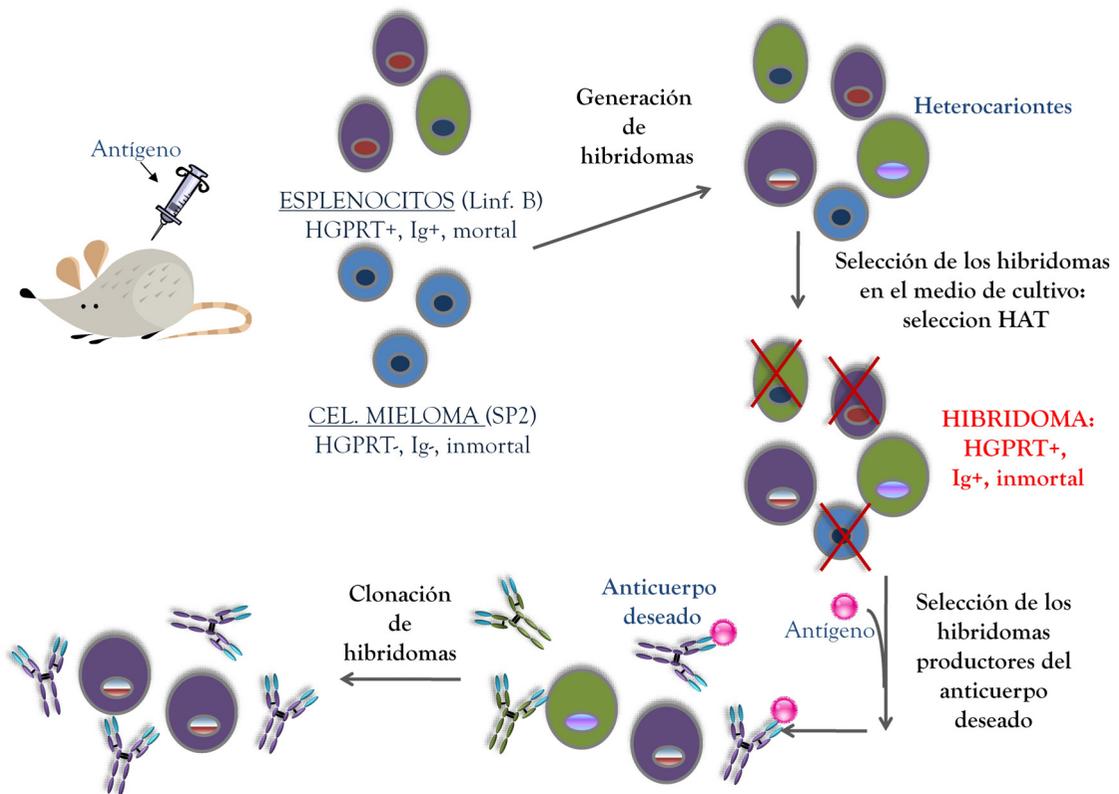


Figura 5: Esquema representativo de las etapas para producir anticuerpos monoclonales murinos.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales murinos ha producido, durante estos últimos 35 años, un gigantesco avance en el conocimiento del funcionamiento del sistema inmune y de las moléculas implicadas en sus diferentes procesos. Su empleo ha sido imprescindible para el conocimiento de centenares de nuevas moléculas y receptores. Ello dio lugar a una serie de iniciativas conjuntas por parte de la comunidad científica³, como ocurrió desde 1982 hasta el 2004 con los HLDA “Human Leukocyte Differentiation Antigens workshop” que servían para definir los diferentes receptores celulares (CD) que se iban descubriendo por medio de anticuerpos monoclonales murinos. A partir de 2005 la iniciativa pasa a llamarse “Human Cell Differentiation Molecules” (HCDM) y con ello se amplía el campo de estudio a todas las moléculas cuya expresión refleje diferenciación, sin la restricción que significaba el estar presente en la superficie de la célula. Es en este nuevo campo donde el trabajo que presentamos encuentra su mejor acomodo.

La importancia de los anticuerpos monoclonales murinos, no restringió su uso a herramienta de trabajo científico. Pronto se trató de ampliar el campo de influencia de los anticuerpos monoclonales murinos a los campos del diagnóstico y la terapia de enfermedades humanas. Con ello se volvía al concepto de “balas mágicas” que habían tenido los anticuerpos desde su descubrimiento allá por 1900. Aunque escapa al objetivo del presente trabajo dedicamos unos breves comentarios al tema.

³ Es interesante hacer notar como el trabajo de desarrollo de anticuerpos monoclonales murinos es quizás el que más iniciativas de colaboración estimula, frente a otras tecnologías que fomentan el trabajo individual y aislado.

3. ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS. LAS BALAS MÁGICAS.

Fue Ehrlich el que utilizó en los comienzos del siglo XX por primera vez el término de “magic bullets”⁴ (Winau et al 2004). Tras 35 años de su descubrimiento, vencidos los procesos alérgicos, citotóxicos que produjeron en sus primeros ensayos, aparecen en el mercado los primeros medicamentos que son anticuerpos monoclonales. Ha sido necesario poner en marcha las técnicas para humanizar los anticuerpos murinos o desarrollar métodos que permiten obtener anticuerpos monoclonales humanos, para una revisión ver (Leavy 2010). Todos estos procedimientos de humanización se han llevado a cabo mediante patentes y son las compañías farmacéuticas las que han impulsado el sector. Las posibles ganancias de este mercado, que se espera alcance los 26 mil millones de dólares en 2010, es un estímulo para las multinacionales farmacéuticas⁵ Otro sector interesante para los anticuerpos monoclonales es el del diagnóstico de enfermedades, y en este campo los anticuerpos monoclonales murinos, tienen reservado un sitio preferente. La necesidad de contar con las correspondientes patentes implica que sólo las empresas más potentes podrán acceder a este mercado. Una lista actualizada y completa de los anticuerpos, humanos, humanizados o murinos utilizados para el diagnóstico y terapia, puede consultarse en la siguiente página,⁶ dando también una idea de la importancia que alcanza el sector de los anticuerpos en el sector de la sanidad.

⁴ “The immune substances...in the manner of magic bullets seek out the enemy”. P.V. Ehrlich.

⁵ <http://www.drugresearcher.com/Research-management/Worldwide-antibody-market-to-reach-26-billion>

⁶ http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_monoclonal_antibodies

4. NUESTRO INMUNÓGENO: CÉLULAS EMBRIONARIAS HUMANAS.

Para la obtención de nuestros anticuerpos monoclonales se utilizó como inmunógeno células de origen embrionario humano. Nuestro primer objetivo era obtener marcadores de estas células. Éramos conscientes de que la utilización de un inmunógeno tan complejo dificultaría este primer objetivo, aunque por otro lado facilitaría la obtención de anticuerpos monoclonales que permitieran el análisis de moléculas presentes en estas células. En cualquier caso, era un tipo de proyecto que se acometía por primera vez en nuestro país.

El cultivo in vitro de células de blastocitos humanos fue el primero que se describió en el año 1980, y se sugirió que estas células podrían tener potencial para reparar tejidos (Fishel et al 1984; Edwards 2002). El cultivo de células de la masa celular interna de blastocitos humanos y el consecuente crecimiento de células denominadas “ESC-like” que aparecen a los dos pases del cultivo, las describieron por primera vez Bongso y colegas (Bongso et al 1994). El concepto de utilizar las células embrionarias humanas en trasplantes obtuvo gran interés en los primeros estudios de líneas celulares derivadas de blastocitos humanos ya que mostraban su pluripotencialidad en su capacidad de desarrollo (Reubinoff et al 2000).

Por definición, las células embrionarias humanas tienen la capacidad de crecer en cultivo indefinidamente, manteniendo un cariotipo diploide normal, así como de contribuir a las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. La capacidad de la diferenciación a múltiples linajes celulares es reproducida en cultivo donde las células embrionarias pueden espontáneamente formar una amplia gama de tipos celulares o después del trasplante a un modelo vivo. En particular las células pueden participar activamente en el desarrollo fetal cuando se introduce en un embrión temprano. Sin embargo, este tipo de experimentos no se pueden realizar con células embrionarias humanas por razones éticas.

Desde la primera descripción de células embrionarias humanas, se han considerado como la fuente de los precursores celulares que se podían diferenciar en cualquier tipo celular, para el tratamiento degenerativo, enfermedades genéticas malignas o diabetes, Parkinson, Alzheimer, o de lesiones de espina dorsal o fallo cardíaco. Aunque se ha prestado gran atención en la utilización potencial de estas células como terapia es igual de importante la investigación para estudiar el desarrollo en sí, tanto de células normales como de células malignas.

Las células embrionarias humanas se conocen por su espontánea diferenciación si no se mantienen las condiciones óptimas en el cultivo. Las condiciones no óptimas serían alta densidad celular, cambio en el tipo de sustrato donde crecen y adición de factores que inducen diferenciación. La diferenciación espontánea de estas células se observa como agregados celulares en suspensión, a los que se les denomina cuerpos embrioides. Una amplia gama de tipos celulares han sido reconocidos.

4.1 Antígenos de superficie como marcadores de células troncales embrionarias humanas.

De todos los enfoques para definir y caracterizar las células embrionarias, quizás el más versátil es el que se basa en el reconocimiento fenotípico mediante antígenos de las células. Siguiendo el desarrollo de técnicas de anticuerpos monoclonales, un antígeno, stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA1) (Solter & Knowles 1978), ha sido aceptado como un marcador de indiferenciación estándar en células de carcinoma de ratón. Este antígeno también se encuentra presente en células embrionarias de ratón y en la masa celular interna de la cual corresponden estas células. En ausencia de líneas embrionarias humanas, se identificaron una serie de antígenos de superficie característicos de células de carcinoma humano. Sorprendentemente, las células de carcinoma humano no expresan SSEA1, aunque si se exprese en otras líneas celulares. Sin embargo sí

que expresan otros antígenos de superficie que no expresan las células de carcinoma de ratón ni las células embrionarias de ratón, en particular SSEA3 y SSEA4. Estos antígenos son glicolípidos, pero hay también varios antígenos glicoproteicos que son diferencialmente expresados como son Thy1, complejo mayor de histocompatibilidad clase I (HLA-I en humanos, HLA-2 en ratón), y una serie de proteoglicanos de queratán-sulfato como son TRA-160, TRA-1-81 y GCTM2, todos ellos expresados en humano y no en ratón. Estudios posteriores de células embrionarias humanas han mostrado que los antígenos de superficie que expresan son muy similares a los expresados por células de carcinoma humano y a su vez diferentes a los expresados en ratón tanto en células embrionarias como de carcinoma. La diferencia en el patrón de expresión de antígenos de superficie entre humano y ratón no está del todo clara, incluso, la función de muchos de estos antígenos es todavía desconocida.

5. PROTEOMA Y ANTICUERPOS: INICIATIVAS.

Las inmunizaciones con extractos de células troncales humanas han permitido generar un conjunto de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopos presentes en las proteínas de las células troncales. Los resultados se deberán integrar en el conjunto de iniciativas que tratan de analizar el proteoma de las células humanas y como todo trabajo con los anticuerpos monoclonales ha requerido y requerirá de la colaboración entre laboratorios.

Diversas iniciativas están en marcha para aumentar el número de anticuerpos monoclonales disponibles para el estudio del proteoma humano. Entre estas iniciativas destacaremos la financiada por el NCI de EE.UU (National Cancer Institute) para generar anticuerpos monoclonales que incrementen el número de biomarcadores necesarios para el diagnóstico y curación del cáncer. (http://proteomics.cancer.gov/programs/reagents_resources/). Otra iniciativa sería el HPR (Human Protein Atlas Resource) que está siendo financiada por una fundación sueca (<http://www.proteinatlas.org/cdesc.php>). Esta iniciativa tiene

por objetivo el permitir la sistemática exploración del proteoma humano mediante anticuerpos mono específicos para cada una de las proteínas presentes en las células humanas. Por último citaremos el HPO (Human Proteome Organization) (<http://www.hupo.org/research/hai/>) que financiada por diversas instituciones y universidades canadienses tiene entre sus objetivos la generación de un catálogo de anticuerpos monoclonales con objeto de elaborar también un atlas del proteoma humano. Las iniciativas citadas en último lugar (HPR y HPO) han unido sus fuerzas para generar una base de datos de anticuerpos comercialmente disponibles para ser consultada “online” en <http://www.antibodypedia.org/>.

La necesidad de estas iniciativas, frente al trabajo aislado de centenares de grupos alrededor del mundo, entre los que estaría el nuestro, tiene a nuestro entender una clara justificación. Sólo el modelo de propiedad intelectual imperante en nuestro sistema económico podrá impedir que iniciativas de este tipo alcancen el éxito. Un reciente intento, con un amplio eco, de aunar esfuerzos es el proyecto llamado “Minimum Information About a Protein Affinity Reagent” (MIAPAR) (Bourbeillon et al 2010). Consultar <http://www.psidev.info/index.php?q=node/281>.

Un esquema del procedimiento a seguir en la producción de los anticuerpos, se presenta en la siguiente figura.

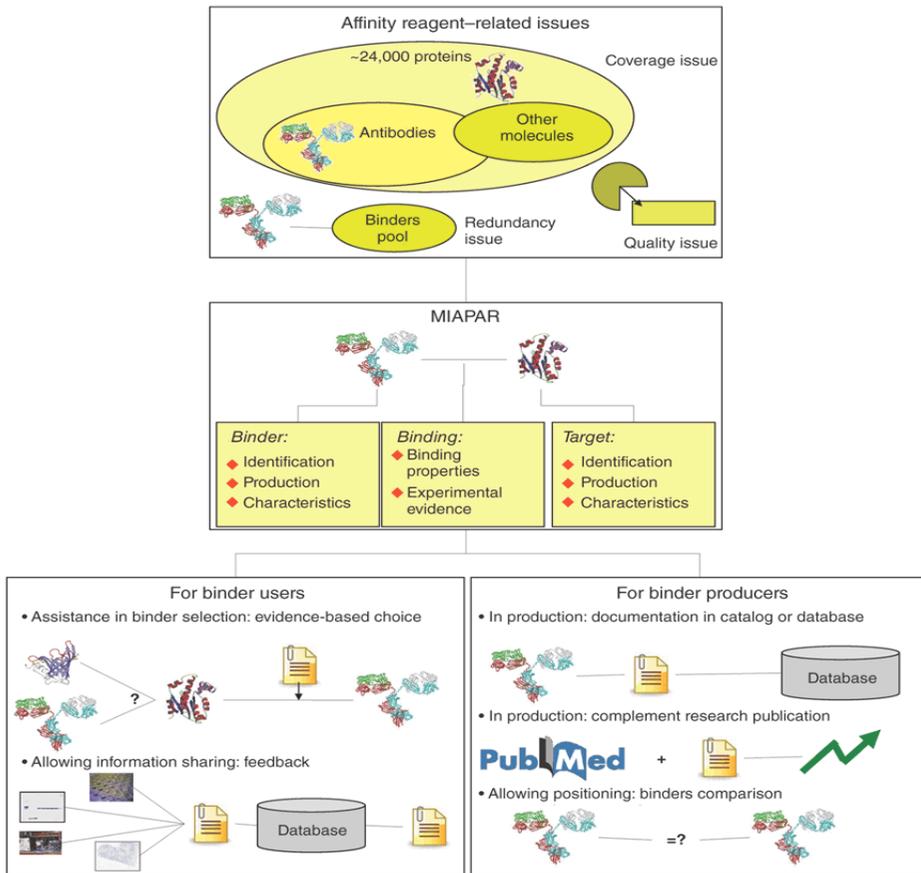


Figura 6: El ámbito de aplicación de MIAPAR. (Bourbeillon J. et al, 2010)

Las razones que justifican especialmente estas iniciativas serían dos: Primero: la dificultad del objetivo propuesto, que significaría la producción de un mínimo de entre 20-25.000 reactivos. El número de las proteínas de las células humanas y su elevado número de epítomos, que puedan ser usados como marcadores, da una idea de la complejidad y tamaño que pueden alcanzar estos proyectos. Se trataría, en su conjunto, del desarrollo de una batería de reactivos (anticuerpos monoclonales principalmente) que permitirían dibujar un atlas de las proteínas presentes en cada tipo celular. El número de tipos de células humanas se aproximan a las 300, número obtenido a partir de combinaciones

del limitado número de genes diferentes. El “International Human Genome Consortium” lo sitúa entre 20-25000 (Ahn et al 2008). El número de proteínas no redundantes en esas 274 tipos de células estaría próximo a las 24.000⁷ (Uhlen & Ponten 2005). Si la propuesta es obtener como mínimo entre dos o tres anticuerpos frente epítomos distintos por proteína, estamos hablando de entre 50.000 y 75.000 anticuerpos monoclonales diferentes. El segundo motivo, para acometer iniciativas conjuntas en la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales, es: la necesidad de validar estos reactivos, el hacerlos herramientas útiles una vez obtenidos y este será el último apartado de esta introducción.

6. HACER DE LOS ANTICUERPOS HERRAMIENTAS ÚTILES.

Es difícil contabilizar el número de anticuerpos monoclonales murinos que reconocen diferentes proteínas humanas. La base de datos más importante disponible, Linscott´s Directory, (<http://www.linscottsdirectory.com>) nos da un número de 80.040 anticuerpos monoclonales murinos que reconocen epítomos presentes en células humanas, sin embargo, como nos han indicado por email, a una consulta nuestra, desde la propia base de datos⁸, en este número se incluyen como diferentes a los anticuerpos que son comercializados por diferentes casas comerciales, se incluyen como distintos anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos. Además hemos observado que muchas proteínas son reconocidas por más de 20 anticuerpos diferentes, en tanto otras, sólo son reconocidas por uno o dos. Por tanto no estaría lejos de la realidad que su número se moviera

⁷ Estimándose entre 50.000 y 500.000 las obtenidas por procesos de “splicing” alcanzando los 10.000.000 si consideramos las proteínas que pueden generarse por reagrupaciones somáticas del ADN.

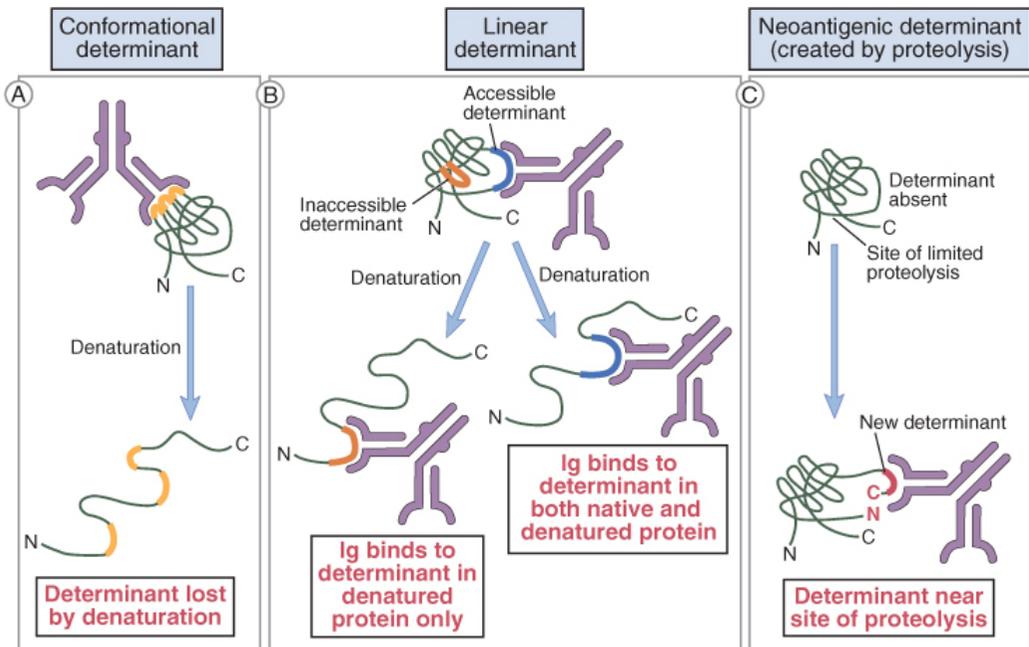
⁸ Unfortunately, there is no easy way to obtain the information you want from our data. Many of our listed mAbs are listed many times (for sizes, formats etc.), and any antigens have multiple antibodies that recognize them. Thank you for using inscott's Directory.

entre 8 y 10.000 anticuerpos diferentes. Otro dato a tener en cuenta es la utilidad como herramienta de estos anticuerpos. En un reciente estudio se ha descubierto que de una muestra de 5.000 anticuerpos comerciales sólo un 50% podían ser utilizados con garantías en inmunohistoquímica (Bjorling & Uhlen 2008).

Por tanto la necesidad de validar como reactivos los anticuerpos monoclonales se ha convertido en una necesidad urgente y así lo han visto iniciativas como HPO y HPR cuando proponen procesos de validación de anticuerpos para el proteoma humano. Véase <http://www.proteinatlas.org/cdesc.php> y <http://www.hupo.org/research/hai/>, y la web Ab-Miner una herramienta bioinformática creada por el Instituto Nacional del Cáncer en USA, con más de 600 anticuerpos validados. <http://discover.nci.nih.gov/abminer/>.

Los motivos que hacen necesaria una validación escapan a veces a la voluntad y al trabajo de los investigadores que generan los anticuerpos. La propia estructura del anticuerpo monoclonal y de su capacidad para reaccionar con su epítipo es, muchas veces, la causa de la no validación. La zona de reconocimiento del antígeno (**epítipo** o determinante antigénico) en el anticuerpo se conoce por **parátipo** y está formada por 10-20 aminoácidos de la zona variable de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina. El tipo de epítipo que es reconocido por el parátipo tiene especial importancia.

Los epítipos se pueden formar por una estructura covalente de una molécula, o en el caso de proteínas y ácidos nucleicos, por el plegamiento no covalente de la molécula (figura 7). Los epítipos de carbohidratos complejos y fosfolípidos están usualmente formados por estructuras covalentes. En el caso de las proteínas, la formación de algunos epítipos solo depende de la estructura covalente, y la formación de otros epítipos se refleja la estructura terciaria.



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Figura 7: Diferentes tipos de epítomos. Los epítomos (mostrados en naranja, rojo y azul) dependen de la conformación de la proteína así como de la estructura covalente. Algunos epítomos son accesibles en la proteína nativa y se pierden después de la desnaturalización **(A)**, otros sin embargo son expuestos solamente en proteínas desnaturalizadas **(B)**. Los neoepítomos aparecen tanto de las modificaciones covalentes como de la escisión del enlace peptídico **(C)**.

Los epítomos formados por varios residuos adyacentes de aminoácidos se denominan **epítomos lineales**. El sitio de unión del anticuerpo al antígeno por lo general se puede acomodar a un epítopo lineal que puede estar formado por unos 6 aminoácidos. Si el epítopo lineal aparece en la superficie externa o en una región extendida de la conformación de la proteína nativa, pueden estar accesibles a los anticuerpos. A menudo, los epítomos lineales pueden estar inaccesibles en la conformación nativa y aparecer solamente cuando la proteína es desnaturalizada. Por el contrario, los **epítomos conformacionales** están formados por residuos de aminoácidos que no están en la secuencia de la proteína, pero que se yuxtaponen en la proteína plegada. Anticuerpos

específicos tanto para epítopos lineales como para epítopos conformacionales se pueden utilizar para determinar si una proteína está desnaturalizada o en su conformación nativa, respectivamente. Por otro lado, las proteínas pueden estar sujetas a modificaciones como fosforilaciones o proteólisis. Estas modificaciones al alterar la estructura covalente pueden producir nuevos epítopos. Estos epítopos se denominan **neoepítopos**, que también pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos.

Incluimos, a modo de resumen, una tabla explicativa (tabla 1) del efecto que sobre las proteínas tienen los tratamientos a que se someten las células/tejidos, para las diferentes técnicas que usan anticuerpos. Tenemos en cuenta si el epítipo que reconoce los anticuerpos es conformacional ya que el lineal no debería ser afectado por los diferentes métodos.

Otro aspecto que influirá sobre la validación de un anticuerpo hace también referencia a la afinidad y avidez con que el parátipo reconoce al epítipo, lo que determinará su capacidad para reconocer un solo epítipo o varios. Cuando el parátipo presenta una elevada afinidad el antígeno reconocerá sólo un epítipo aunque este podría estar presente en varias proteínas, a este fenómeno se conoce por reacción cruzada y es más usual si el anticuerpo reconoce un epítipo lineal que si lo hace sobre un epítipo conformacional

EJEMPLOS DE TÉCNICAS EMPLEADAS CON ANTICUERPOS.			
APLICACION	TRATAMIENTO	ESTADO MAS TÍPICO DE LA PROTEINA	EPITOPO
ELISA DE PROTEINAS	Ninguno	NATURAL	Conf. No afectada.
ELISA DE CELULAS	Poly-lysina	DESNATURALIZADA	Conf. Afectado
ARRAY DE PROTEINAS	Variable	VARIABLE	Conf. No afectada
ARRAY DE ANTICUERPOS	Ninguno	NATURAL	Conf. No afectada
WESTERN BLOTS	Detergentes	DESNATURALIZADA	Conf. Afectado
IHC	Formalina	DESNATURALIZADA	Conf. Afectado
IF	Aldehidos,alcoholes	DESNATURALIZADA	Conf. Afectado
MICROSCOPIA ELECT..	Aldehidos,Alcoholes	DESNATURALIZADA	Conf. Afectado
INMUNOPRECIPITACION	Ninguno	NATURAL	Conf. No afectado
TEJIDOS CONGELADOS	Acetona	DESNATURALIZADA	Conf. Afectado
FLOW SORTING	Ninguno	NATURAL (CELULAS VIVAS)	Conf. No afectado
THERAPY	Ninguno	NATURAL (IN SITU)	Conf. No afectado

Tabla 1: Técnicas empleadas utilizando anticuerpos monoclonales.

Cuando el parátipo presenta una baja afinidad pero una elevada avidéz, como ocurre con algunos anticuerpos de clase M se puede producir un reconocimiento de varios epítomos que no tienen nada en común. Se produce en este caso una polireactividad del anticuerpo y que han sido descritos y estudiados desde el inicio de la producción de anticuerpos monoclonales murinos (Vollmers & Brandlein 2006). Este fenómeno de polireactividad se ha ligado a veces con la existencia de los “anticuerpos naturales”, descritos por N. Jerne, y que son capaces de reaccionar con varios antígenos, bien antígenos del propio individuo (autoanticuerpos) y/o antígenos de origen bacteriano. Estos anticuerpos naturales, la mayor parte de clase M, aunque se han descrito de clase G y A, son producidos por algunas células B presentes en el sistema inmune de individuos sanos desde su nacimiento (Bouvet & Dighiero 1998; Zhou et al 2007). Un anticuerpo monoclonal polireactivo podría ser considerado como un anticuerpo procedente de la fusión de las células de mieloma con las células B naturales del ratón que generan estos “anticuerpos naturales” (Guilbert et al 1985). Un dato que vendría a ratificarlo sería el que la polireactividad no

tuviera relación alguna con los inmunógenos empleados en la generación de los hibridomas. Datos obtenidos por varias experiencias indican que en una fusión se producirán alrededor del 2% de clones que producen anticuerpos polireactivos (Guilbert et al 1985).

Estas dos causas, reacción cruzada y polireactividad, junto a otras que podrían ser responsabilidad del laboratorio productor del anticuerpo, por ejemplo clonación errónea, hacen necesario ser cuidadosos en el uso de los anticuerpos ofrecidos en el mercado (Saper 2005). Son varios los requisitos exigidos para la validación de un anticuerpo (Bordeaux et al 2010). Algunas plataformas consideran validado a un anticuerpo cuando produce por “Western blot” una banda o bandas del peso molecular esperado para la proteína que se considera reconoce el anticuerpo (Major et al 2006). En la discusión de nuestros anticuerpos tendremos oportunidad de ampliar los datos sobre este tema.

OBJETIVOS

La realización del presente trabajo tenía como principal objetivo el descubrimiento de moléculas que pudieran ser marcadores de células embrionarias humanas. La dificultad de realizar dicho estudio, siendo el primero que se realizaba en nuestro país, ha hecho que nuestro primer objetivo haya tenido que modificarse a lo largo de nuestro trabajo.

Por todo ello se hace necesario la caracterización y validación de los reactivos obtenidos, al hacerlos herramientas útiles para posibles aplicaciones, principalmente en aspectos clínicos, de investigación y como herramientas de estudio en determinados estados patológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Los ratones empleados en este estudio fueron de la cepa BALB/c. Para las inmunizaciones se utilizaron hembras de 6 semanas de edad aproximadamente. Para la generación de tumores ascíticos se emplearon machos mayores de 3 meses de edad.

Este y todos los procedimientos llevados a cabo con ratones a lo largo del presente trabajo se realizaron de acuerdo con la normativa europea de manejo de animales de experimentación, “Guidelines for the Utilization of Rodents in Experimental Neoplasia and Ascites Production” (2002), siendo los animales tratados en todo momento por personal cualificado y autorizado para este fin del Servicio Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba.

2. CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES

2.1 HS181

La línea de células troncales embrionarias humanas HS181 (Hovatta et al 2003) se cultivó rutinariamente sobre fibroblastos de prepucio humano (CRL-2429, ATCC), inactivados durante 3 horas con mitomicina C (Sigma, St. Louis, MO). Para el mantenimiento del estado indiferenciado la línea HS181 fue cultivada en medio DMEN-KO (KnockOut-Dubelcco’s modified Eagle’s médium), suplementado con 20% de suero KnockOut, 2 mM L-Glutamina, 0,1 mM 2-mercaptoethanol, 1% aminoácidos no esenciales, 50 U/ml/ 50mg/ml penicilina/estreptomicina (todos de Gibco, Carlsbad, CA) a 37°C, 5% CO₂. El medio de cultivo fue suplementado con 8 ng/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos). Se subcultivaron mecánicamente cada 7 días.

Cuando las células HS181 se utilizaron específicamente para experimentos como inmunocitoquímica o citometría de flujo se cultivaron sobre Matrigel (BD Biosciences, San José, CA) en medio condicionado, suplementado con 8 ng/ml de bFGF y fueron subcultivadas cada 10 días. El medio

condicionado se obtiene por el cultivo de fibroblastos inactivados, se filtra y guarda hasta su uso. Este medio se suplementa y se añade directamente a las células.

Cuando las células se utilizaron para inmunocitoquímica o citometría de flujo, se mantuvieron cinco días aproximadamente en matrigel con medio condicionado. Cuando las células se utilizaron como inmunógeno, las placas se mantuvieron en cultivo una semana, se recogieron y congelaron directamente a -80°C .

2.2 SHEF-4, SHEF6

Shef-4 y Shef-6 son líneas de células embrionarias humanas que se cultivaron en medio de cultivo DMEN-KO suplementado con 20% de suero Knockout, 1% de aminoácidos no esenciales, 1mM L-glutamina, 4 ng/ml de bFGF (todos de Gibco) y 0,1 mM de b-mercaptoetanol (Sigma) a 37°C bajo atmosfera húmeda de CO_2 5%. Los pases se realizaron semanalmente por disección manual. Para ello se hizo una digestión de 5 minutos con 1 mg/ml de colagenasa tipo IV y las colonias fueron despegadas utilizando el extremo de una punta desechable de 1 ml. Las células se cultivaron sobre una capa de fibroblastos de ratón inactivados. Los fibroblastos fueron previamente cultivados en DMEM-KO (Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco) e inactivados con 10 ng/ml de mitomicina C (Sigma) durante 3 horas.

2.3 H7(S6), H7(S14)

La línea de células embrionaria humana H7 (Thomson et al 1998) fue cultivada sobre una capa de fibroblastos de ratón inactivados. Se utilizaron dos líneas, H7(S14) de cariotipo normal (46XY) y H7(S6) de cariotirpo anormal (47/48XY)El medio de cultivo utilizado fue DMEN-KO suplementado con 4 ng/ml de bFGF y 20% de Suero Knockout (todos de Gibco) a 37°C bajo

atmosfera húmeda de CO₂ 5%. Posteriormente las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfatos (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM fosfato sódico dibásico, 2 mM fosfato potásico monobásico, pH de 7.4), y se les añadió Tripsina-EDTA para despegarlas y se sembraron a razón de 10⁴ células/placa. Los pases se realizaron con 1mg/ml de colagenasa tipo IV (Sigma) en DMEM:F12 durante 10 minutos a 37 °C y se despegaron utilizando bolitas de cristal (Andrews 1984). Posteriormente se lavaron por centrifugación y se repartieron en placas con fibroblastos inactivados.

2.4 NTERA-2/clon D1

Las líneas celulares de carcinoma se utilizan en la actualidad como sustitutas en investigación de células embrionarias humanas, ya que expresan marcadores de diferenciación exclusivos de células embrionarias (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60), crecen muy bien “*in vitro*” y presentan menos diferenciación espontánea que las líneas de células embrionarias.

La línea embrionaria de carcinoma NTERA-2 clon D1 es una línea pluripotencial, la cual bajo inducción con ácido retinoico puede diferenciarse entre otros tipos, en líneas celulares neuronales (Andrews 1984; Andrews et al 1984b). Se cultivaron a 37°C bajo atmosfera húmeda de CO₂ 10% (Andrews et al 1982) en medio de cultivo HG-DMEM (Gibco) enriquecido en glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). El subcultivo de las células NTRA-2 se realizó por raspado, con bolitas de cristal, ya que un uso prolongado de tripsina altera el fenotipo de estas células.

2.5 n2102Ep/clon 2A6,

La línea embrionaria de carcinoma n2102Ep clon 2A6 es una línea casi nulipotencial, la cual a diferencia de NTERA-2/D1, no responde a la tradicional inducción química del ácido retinoico, pero si se cultiva a baja densidad en

placa, las células son capaces de diferenciarse en derivados de trofoblastos (Andrews et al 1982). En particular esta línea es un estándar para comparar las líneas embrionarias humanas y las líneas embrionarias de carcinoma. Las células se cultivaron a 37 °C bajo atmosfera húmeda de CO₂ 10% en medio de cultivo enriquecido en glucosa, HG-DMEM (Gibco) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH). Estas células se despegaron con tripsina al 0,25% en PBS libre de calcio y magnesio conteniendo 1mM/L EDTA (Gibco).

2.6 1411H (Human yolk sac carcinoma), RD (Human Caucasian embryo rhabdomyosarcoma, BEWO (Human choriocarcinoma)

1411H es una línea celular humana derivada del saco vitelino. Esta línea celular no expresa los marcadores de diferenciación clásicos de células embrionarias sin embargo expresa SSEA-1 que es un receptor de células embrionarias de ratón. Las células **RD** provienen de un miosarcoma embrionario. La línea celular **BEWO** fue el primer tipo celular endocrino de trofoblasto humano que se mantuvo en cultivo. Las células 1411H y RD se cultivaron a 37° C en medio de cultivo enriquecido en glucosa, HG-DMEM (Gibco) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH) con una atmosfera al 10% de CO₂ (Andrews et al 1982). Las células BEWO se cultivaron en medio Ham´s F12 (Gibco) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH) bajo atmosfera húmeda de CO₂ 5%. Para los subcultivos sucesivos se utilizó tripsina al 0,25% en PBS (sin calcio ni magnesio) conteniendo 1mM/L EDTA (Gibco).

2.7 P-19

Es una línea de teratocarcinoma de ratón derivada de un carcinoma embrionario. Estas células son inducidas a células neuronales y células gliales en presencia de ácido retinoico. En presencia de DMSO se forman agregados de células diferenciadas en músculo cardíaco y músculo esquelético. Estas células

expresan SSEA-1 en su estado no diferenciado. Se cultivaron en medio Alpha-MEM, con 1% de aminoácidos no esenciales, 2.5% de SFB (PAA Laboratories GmbH) a 37% bajo atmósfera húmeda de CO₂ 5%. Para los subcultivos sucesivos se utilizó tripsina al 0,25% en PBS (sin calcio ni magnesio) conteniendo 1mM/L EDTA (Gibco).

2.8 Fibroblastos

Los fibroblastos que se utilizaron fueron de prepucio humano (CRL-2429, ATCC), y se cultivaron en nuestro laboratorio con la finalidad de utilizarlos como control negativo de la fusión en los primeros screening que se realizaron por ELISA. Para ello se mantuvieron en cultivo con DMEN modificado (Gibco), suplementado con un 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH) y 5000 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco). Se cultivaron a razón de 50.000/ml en placas de 75cm² y se subcultivaron cada 7 días, cambiándole el medio de cultivo en días alternos.

2.9 Leucocitos mononucleares de sangre periférica y plaquetas

La sangre fue donada por el centro regional de transfusión sanguínea de Córdoba y se recogieron en tubos de extracción sanguínea por vacío estéril de 5 ml con anticoagulante (EDTA). La sangre obtenida se diluyó 1:1 en tampón de fosfatos (PBS) antes de someterla a la separación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque 1.077 g/ml (Sigma) con el fin de obtener la células mononucleares de la sangre total. En tubos de 50 ml, se añadieron 20 ml de Ficoll-Hypaque y 30 ml de sangre total diluída y se centrifugaron a 1600 g durante 30 minutos en centrífuga Heraeus-Sepatech Megafuge 1.0. Posteriormente se recogieron los leucocitos de la interfase entre el Ficoll y el plasma y se lavaron dos veces con PBS centrifugando a 600 g. En aquellos casos en los que después del primer lavado se observaron eritrocitos residuales, se trataron con 5 mililitros de tampón de lisis de eritrocitos (155 mM CINH₄, 0,1

mM EDTA, 10 mM CO₃HK) manteniendo el pellet durante 10 minutos a temperatura ambiente y después centrifugando 1100 g. Las plaquetas se recogieron del plasma y se lavaron una vez con PBS a 1600 g y posteriormente se resuspendieron en solución EDTA 10mM en PBS pH8 y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con dos veces con PBS. Después de los diferentes lavados, tanto los leucocitos como las plaquetas se cuantificaron en cámara de Neubauer con una solución de azul tripán al 0.2% en PBS.

2.10 Células de mieloma (SP2/O-AG14)

Para la producción de hibridomas se utilizó la línea celular de mieloma de ratón SP2/O-AG14) (Shulman et al 1978). La línea celular SP2 es un híbrido entre esplenocitos de ratones BALB/c y la línea celular P3X63AG8. Las células se describen como no sintetizadoras ni secretoras de inmunoglobulinas, y carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT-) no creciendo en un medio selectivo con HAT (Hipoxantina-aminopeptirina-timidina).

Las células crecen de forma individual y en suspensión en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza, Basel, Switzerland) con 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH), 2mM Glutamina (Sigma), y penicilina (100UI/ml)/estreptomocina (100 µg/ml) (Gibco) a 37 °C bajo atmósfera húmeda de CO₂ 5%. Se mantuvieron a una concentración de 0.1-0.5 x 10⁶ cells/ml, dividiéndose a 1:3 cada 2-4 días. Aproximadamente 10 días antes de la fusión las células de mieloma fueron descongeladas y cultivadas hasta alcanzar su estado de confluencia. Previo a cada fusión las células fueron testadas frente a micoplasma con un Kit comercial (Mycoplasma PCR detection Kit, Minerva biolabs GmbH, Germany).

2.11 Esplenocitos de ratón

Se emplearon ratones de la cepa BALB/C, de 4-5 semanas de edad aproximadamente, se sacrificaron mediante dislocación cervical y se les hizo una apertura en la región abdominal donde se le extrajo el bazo. Dicho bazo fue perfundido varias veces con medio de cultivo RPMI sin SFB para obtener el mayor número posible de esplenocitos. El bazo se disgregó con un émbolo de jeringa estéril y junto con los esplenocitos se filtra con una malla de nylon estéril para eliminar los agregados tisulares. Las células se obtuvieron por centrifugación durante 10 minutos a 450 g, se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI con 10% SFB y se contabilizaron en la cámara de Neubauer.

2.12 D3

Las células troncales embrionarias de ratón D3 se cultivaron sobre plástico adherente sin necesidad de utilizar feeder, con medio de cultivo DMEM High Glucose (Gibco) suplementado con un 15% de SFB (Hyclone, Logan, UT), 0.1mM MEM aminoácidos no esenciales (Gibco), 5000 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco), 1000 U/ml LIF (ESGRO, Chemicon, Charlottesville, VA), 2 mM de L-Glutamina, 0.5mM b-mercaptoethanol (Gibco).

3. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

3.1 Inmunizaciones y fusiones

Los anticuerpos monoclonales generados durante el desarrollo de esta tesis fueron obtenidos a partir de fusiones realizadas con células de bazo de ratones BALB/c, inmunizados con colonias de la línea de células troncales embrionarias humanas HS181.

Las colonias utilizadas para las inmunizaciones se dispusieron en viales congelados directamente a -80°C y se disgregaron mecánicamente en el

momento de la inmunización en solución tamponada de fosfatos en un volumen total de 200 μ l.

Aproximadamente se inocularon 15 colonias a cada ratón por vía intraperitoneal o intravenosa en cada inyección (tabla 2). 2 días después de la última inmunización se realizó la fusión.

Ratones	1ª INM	2ª INM	3ª INM	4ª INM	5ª INM	6ª INM	FUSIÓN
1	(IP) 0 Días	(IP) 21 Días	(IP) 58 Días				60 Días
	(IP) 0 Días	(IP) 21 Días	(IP) 58 Días	(IP) 91 Días			
2	(IP) 0 Días	(IP) 21 Días	(IP) 58 Días	(IP) 91 Días			93 Días
	(IP) 0 Días	(IP) 21 Días	(IP) 58 Días	(IP) 191 Días	(IV/IP) 198 Días	(IV) 208 Días	
3	(IP) 0 Días	(IP) 21 Días	(IP) 58 Días	(IP) 191 Días	(IV/IP) 198 Días	(IV) 208 Días	210 Días

Tabla 2: Calendario de inmunizaciones y fusiones. INM: Inmunización, IP: intraperitoneal, IV: intravenosa.

Las células del bazo de los ratones inmunizados (esplenocitos) se fusionaron con la línea no secretora de mieloma SP2/O-Ag14 (Shulman et al 1978), siguiendo los protocolos establecidos (Kohler & Milstein 1975), ligeramente modificados en nuestro laboratorio (Arce et al 2002).

Previo a las diversas inmunizaciones y al sacrificio del ratón, se extrajo sangre a cada uno de los ratones y se obtuvo el suero. Estos sueros fueron titulados mediante ELISA para conocer la eficiencia de la inmunización.

3.2 Selección de clones positivos (ELISA)

La selección de los hibridomas positivos se realizó por inmunoensayo enzimático ELISA sobre células troncales embrionarias humanas HS181 y sobre fibroblastos.

Se emplearon placas microtest p96 (Greiner) especiales para la realización de ELISA. Previamente, se adhirieron las células a los pocillos de estas placas utilizando el método de Lansdorp modificado (Lansdorp et al 1980). Para ello se añadieron 50 μ l de Poli L-lisina (Sigma) a una concentración de 5 mg/ml en PBS y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el exceso de Poli L-lisina por aspiración y se añade 50 μ l de la suspensión celular a una concentración aproximada de 500.000 células por pocillo. Las placas se centrifugaron a 1100 g durante 10 minutos, y tras retirar el sobrenadante, se añadieron 50 μ l por pocillo de glutaraldehído (Sigma) al 0,5% en PBS. Tras incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas dos veces con PBS y se añadieron 200 μ l por pocillo de solución de bloqueo (Albumina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS) y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Una vez bloqueados los sitios inespecíficos de unión de la placa con la solución de bloqueo, se retiró el líquido de los pocillos y se lavaron con PBS dos veces. A continuación se añadieron 100 μ l por pocillo de sobrenadante de los hibridomas, o PBS como control negativo, y se incubaron durante una hora a 37 °C en agitación o toda la noche a 4°C. Como control positivo se utilizó el suero diluido del ratón inmunizado. Tras lavar tres veces con PBS-T (0,05% de Tween-20 en PBS), se añadieron 50 μ l por pocillo de una solución 1/250 de anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón, conjugado con peroxidasa (Sigma) en PBS durante una hora a 37°C en agitación.

Posteriormente se lavaron las placas 3 veces con TBS-T y se añadieron 100 μ l por pocillo de una solución de revelado (0,5M ácido cítrico [pH4] + 1/100 (v/v) 2% ABTS (Boehringer Ingelheim GmbH, Alemania) + 0,03% H₂O₂). Transcurridos 1-3 minutos, se evaluó la reacción positiva por la aparición del color verde. La reacción se detuvo añadiendo 50 μ l por pocillo de NAF 0,5M (Panreac Química S.A.U., España) en PBS. La medida de la absorbancia se realizó con un lector de placas de ELISA (Microplate Reader. Modelo550, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hércules, CA) a una longitud de onda de 405 nm, considerándose positivos aquellos valores de absorbancia como mínimo doble del control negativo.

Todos los hibridomas fueron testados en primer lugar frente a la línea de células troncales embrionarias HS181. Los hibridomas positivos se volvieron a testar frente a fibroblastos, descartando los dobles positivos.

3.3 Clonaje de los hibridomas

El objetivo de la clonación es garantizar la monoclonalidad del anticuerpo, resolver los problemas de segregación, pérdida de producción de anticuerpo e inestabilidad de los híbridos.

Mediante la clonación de los hibridomas se pretende asegurar que el clon elegido proceda de una sola célula positiva frente al inmunógeno empleado. La clonación de los hibridomas seleccionados se efectuó por el método de la dilución límite. Para ello los pocillos seleccionados como positivos después del inmunoensayo enzimático ELISA se dejaron crecer, se contaron las células y se diluyeron de manera que en cada pocillo quedaron 0.5, 1 ó 2 células en 100 μ L. Este procedimiento se repitió hasta 3 veces para asegurar la monoclonalidad. Cada hibridoma se congeló y conservó en nitrógeno líquido.

3.4 Determinación del isotipo de las inmunoglobulinas

Los isotipos de los anticuerpos monoclonales se determinaron por ELISA mediante un kit comercial (Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA kit (BD Biosciences)).

4. PRODUCCIÓN DE SOBRENADANTE Y ASCITIS

Una vez clonados los híbridos positivos se expandieron a botellas de cultivo de 75 cm², cultivándose en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza), 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH), 2mM Glutamina (Sigma), y penicilina (100UI/ml)/estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco) a 37° C bajo atmósfera húmeda de CO₂ 5%, para producir un volumen de sobrenadante suficiente para posteriores estudios.

Para la obtención de líquido ascítico se emplearon ratones BALB/c machos, de 4-5 meses de edad. Una vez que se les inyectó el hibridoma y pasadas de una a dos semanas se procedió al sacrificio de los ratones por dislocación cervical y se obtuvo la totalidad del fluido ascítico. Se centrifugó a 25.800 g durante 5 minutos para retirar los restos celulares y se conservó a -20°C hasta su purificación.

5. INMUNOCITOQUÍMICA

Las células que se utilizaron para testar los anticuerpos monoclonales por inmunocitoquímica fueron células troncales embrionarias humanas HS181 y SHEF-6. La línea HS181 antes de cada inmunotinción se subcultivó al menos en los dos últimos pases en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc, Dinamarca) tapizadas con Matrigel (BD Biosciences). El proceso con las células embrionarias SHEF-6 fue diferente, en este caso también se utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos pero tapizadas con fibroblastos.

El marcaje de células troncales embrionarias humanas HS181 fue el siguiente: las células en primer lugar se lavaron con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo, y a continuación se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución al 5% de FBS (PAA Laboratories GmbH) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó cada pocillo con el anticuerpo monoclonal a testar (aproximadamente 2 ml por pocillo) y se dejó toda la noche a 4° C. Tras lavar los pocillos 3 veces durante 10 minutos con TBST (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0,15M NaCl, 0,05% Tween-20) se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG+IgM (H+L) de ratón y desarrollado en cabra conjugado con FITC (1:100, Caltag, Buckingham, UK) durante 1 hora a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-SSEA-4 de humano desarrollado en ratón (CHEMICON, Millipore) conjugado con FITC a una dilución 1:100 en BSA. Como control de isotipo se utilizó el anticuerpo secundario anti IgG de ratón desarrolla en burro y conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a una dilución 1:100 en PBS. Para la contratinción de los núcleos se utilizó 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma). Los resultados fueron observados en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus modelo IX71 (Olympus, Hamburg, Germany). Las imágenes fueron adquiridas con un software específico de adquisición de imágenes.

El marcaje de células troncales embrionarias humanas SHEF-6 fue el mismo descrito para la línea HS181, incluyendo un paso intermedio para permeabilizar las células: después de fijarlas con paraformaldehído al 4% se lavaron las células con PBS durante 10 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,3% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de Tritón X-100 con un lavado de PBS 10 minutos. Como control

positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-SSEA3 de humano desarrollado en ratón (Shevinsky et al 1982). El resto del proceso fue igual que la línea HS181.

6. CITOMETRÍA DE FLUJO

En citometría de flujo se utilizaron células troncales embrionarias humanas y también líneas de células de carcinoma humano y de ratón, leucocitos mononucleares de sangre periférica y la línea 3D4/31. En primer lugar todas las líneas fueron marcadas de forma extracelular y posteriormente intracelular.

Las células troncales embrionarias que se utilizaron para testar los anticuerpos monoclonales por citometría de flujo fueron HS181, Shef-4, Shef-6, H7(S6) y H7(S14). Para despegar e individualizar los cultivos se utilizó 1 ml de tripsina a baja concentración (0.05% tripsina:1M EDTA) (Gibco), por botella T25 durante 10 segundos, se retiró el exceso de tripsina y al cabo de 2-5 minutos en el incubador a 37° C bajo atmósfera húmeda de CO₂ 5%, se añadió 9 ml de PBS con suero fetal bovino al 5% para inactivar dicha tripsina y se procedió al conteo de células. A continuación se centrifugó a 200 g durante 5 minutos y se añadió el volumen necesario para tener una concentración celular de 10⁷ células por tubo de citometría.

El proceso para el resto de líneas celulares (NTERA-2/D1, n2102Ep CI2A/6, 1777NRp met, 1411H, Bewo, RD, P-19) fue ligeramente modificado: se utilizó tripsina a alta concentración (0.25% tripsina:5 mM EDTA) (Gibco), 1 ml de tripsina por botella T75 durante 5 minutos en el incubador a 37° C bajo atmósfera húmeda de CO₂ 10%. Posteriormente se centrifugaron, contaron y repartieron a razón de 10⁵ células por tubo de citometría.

Una vez obtenidas las células en suspensión se procedió al marcaje extracelular. Por cada tubo de citometría se añadió 100-200 µl del anticuerpo monoclonal a testar (anticuerpo primario) y se incubó durante 30 minutos a

4°C. En cada ensayo de citometría se utilizó una batería de anticuerpos monoclonales específicos de cada estado de diferenciación: MC631, anti-Stage Specific Embryonic Antigen-3 (SSEA3) (Shevinsky et al 1982), MC480, anti-Stage Specific Embryonic Antigen-1 (SSEA1) (Solter & Knowles 1978), TRA-1-60 (Andrews et al 1984a). Trascurrido el tiempo de incubación se lavaron 2 veces los tubos (3 ml de PBS + 5% SFB) a 200 g durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG+IgM (H+L) de ratón desarrollado en cabra (Caltag) y conjugado con FITC a una dilución de 1:100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se volvieron a lavar dos veces cada tubo (PBS+5%FBS).

Para el marcaje intracelular antes de la primera incubación con el anticuerpo las células se fijaron (paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente) y se permeabilizaron (Tritón X-100 al 0,3% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente). Se eliminó el exceso de Tritón X-100 con un lavado de PBS durante 10 minutos.

La adquisición de los datos se realizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD, Immunocytometry System, USA) y los resultados se analizaron con el software de análisis Cell Quest.

7. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas son técnicas indirectas de tipo puente basadas en la unión no inmunológica de la avidina (técnica del ABC) o de la estreptavidina con la biotina. Todos los cortes fueron en parafina.

7.1 Procesado de las muestras

Los órganos a estudiar se trocearon en piezas de aproximadamente 1 cm de grosor y se fijaron por inmersión durante un mínimo de 24 horas en formaldehído tamponado al 10% (Merk). Una vez fijadas, las muestras fueron talladas e incluidas en parafina. Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizaron cortes de 5 μm de grosor montados sobre portaobjetos tratados con poly-L-lisina (Sigma), seccionados en un micrótopo Shandon Finesse ME+ (Thermo electron corporation, Beverly, MA).

7.2 Desarrollo de la técnica

Las muestras en primer lugar se desparafinaron mediante 3 baños de 10 minutos cada uno, en xilol (Panreac). Se hidrataron al principio con dos baños en etanol absoluto de 10 minutos cada uno. Después se inhibió la actividad peroxidasa endógena en los cortes analizados con la técnica del ABC, mediante la incubación de los cortes de tejido con peróxido de hidrógeno (Merk) al 3% en metanol durante 30 minutos, en agitación suave y a temperatura ambiente. La hidratación finaliza mediante incubaciones sucesivas en alcoholes de gradación decreciente y un lavado en agua (5 minutos en etanol de 96° y 5 minutos en etanol de 70° y, por último, agua destilada).

Tras lavar los cortes de tejidos en PBS (5 minutos, 3 veces), se sometieron a un tratamiento térmico de desenmascaramiento antigénico, para lo cual se mantuvieron al baño maría en una solución 10 mM de citrato monosódico pH 6 en microondas. Terminado el tratamiento las muestras se dejaron enfriar gradualmente en agua destilada durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron en PBS y se incubaron en suero normal de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, con el fin de bloquear los sitios inespecíficos.

Se procedió entonces a la incubación con los correspondientes anticuerpos a las diluciones adecuadas, en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. A continuación, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-Ig de ratón desarrollado en cabra conjugado con biotina (Dako) a una dilución 1/20 en PBS, 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se volvieron a lavar con PBS, los cortes de tejido se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Sigma) diluido 1/50 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, los cortes se lavaron tres veces con PBS y se expusieron durante 1 minuto con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma) diluido al 0,5% en solución Tris con 0,3% de peróxido de hidrógeno, que actúa como sustrato, 5 minutos a temperatura ambiente. Los cortes de tejido se lavaron en agua corriente durante 3 minutos y se pasó a la contratinción del núcleo con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Después de un lavado de 5 minutos en agua para eliminar los restos de colorante, se procedió a deshidratar los cortes, para su conservación, en alcoholes de gradación creciente de 70° a 96°, 2 incubaciones cada una de 1 minuto en etanol absoluto y otros dos de 1 minuto en xilol. Los cortes histológicos se montaron con Eukit (O. Kindler GmbH & Co) y se fotografiaron en un fotomicroscopio.

8. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS ANTÍGENOS

Con objeto de determinar el peso molecular e identificar los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales obtenidos se realizaron las siguientes aproximaciones.

8.1 Western blot

8.1.1 Fraccionamiento celular

Con el objetivo de localizar los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en la célula, se obtuvieron diferentes fracciones celulares y para ello se utilizaron diferentes tampones de lisis.

Para la extracción de las proteínas se utilizó el buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM [pH 8.0], NaCl 150 mM, NP-40 1%, Sodio deoxicolate 0,5%, SDS 0,1%) utilizado para estudiar las proteínas que están en el citoplasma, las proteínas que están unidas a la membrana celular o para estudiar extractos de proteínas totales a partir de células enteras. En el momento de lisar las células al buffer de lisis se le añadió 1% de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma).

Para extraer proteínas del citoplasma unidas al citoesqueleto se utilizó el buffer de lisis Tris-Triton (Tris-HCl 10 mM [pH 7,4], NaCl 100 mM, TritonX-100 1%, glicerol 10%, SDS 0,1%, Sodio deoxicolate 0,5%, EDTA 1mM, EGTA 1mM).

Tanto para extraer proteínas totales de células enteras (RIPA) como unidas al citoesqueleto (Tris-Tritón) el proceso de lisis celular fue el siguiente: las botellas de cultivo se dispusieron en hielo y se lavaron las células con PBS a 4°C. Se retiró el PBS y se añadió el buffer de lisis a razón de 0,5 ml por botella de cultivo de 75 cm² y utilizando un rascador se despegaron las células hasta que quedaron suspendidas en el buffer. A continuación se sometieron a agitación fuerte durante 1 hora a 4°C, se centrifugaron a 25800 g durante 30 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante (lisado celular).

Para el fraccionamiento del núcleo y citoplasma se utilizó el protocolo de Lamond (<http://www.lamondlab.com>). Se utilizaron dos botellas de cultivo de 75 cm² para obtener proteínas solubles del citoplasma y proteínas del núcleo. Una vez obtenidas las células en suspensión celular (tripsinizadas o con

bolitas de cristal) se lavaron con PBS, se centrifugaron a 250 g y se recogió el pellet celular. Dicho pellet se resuspendió en 2,5 ml de Buffer A muy frío (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, 1% cocktail inhibidor de proteasas) y se dejó en reposo en hielo durante 5 minutos. A continuación con un homogeneizador manual Dounce, previamente enfriado en hielo, se rompió el pellet, presionando unas 20 veces. Se recogió el lisado y se centrifugó a 250 g durante 5 minutos: el sobrenadante se consideró la fracción citoplasmática y en el pellet nos quedó restos celulares y los núcleos.

A los 2,5 ml de fracción citoplasmática se le añadió 1 ml de buffer RIPA 5X, se mezcló y se centrifugó a 875 g a 4°C. Se recogió el sobrenadante que contenía el lisado de proteínas citoplasmáticas.

El pellet compuesto por restos celulares y núcleos se resuspendió en 3 ml de buffer S1 (Sacarosa 0.25 M, MgCl₂ 10 mM, 1% inhibidores de proteasas) y se le añadieron 3 ml de buffer S3 (Sacarosa 0.88 M, MgCl₂ 0.5 mM, 1% inhibidores de proteasas). A continuación se centrifugó a 875 g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet en 0,5 ml del tampón S1. El pellet se consideró la fracción nuclear a la cual se le añadieron 1 ml de buffer RIPA 1X y se sonicó en hielo 10 segundos, repitiendo el proceso 5 veces. Por último, la fracción nuclear se centrifugó a 875 g durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante ó lisado nuclear.

Para determinar la concentración de proteínas solubles que se habían obtenido en los lisados de las diferentes líneas celulares, se utilizó el método Bradford (Bio-Rad protein Assay) según las indicaciones del fabricante.

8.1.2 Electroforesis, transferencia y revelado

La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo siguiendo el método de Laemmli (Laemmli 1970) con modificaciones, y se utilizó un Protean II xi 2-D Cell (Bio-Rad Laboratories). Se emplearon geles con distintos porcentajes de

acrilamida y condiciones reductoras o no reductoras dependiendo de la naturaleza de la proteína que se pretende visualizar. En algunos casos fue necesario la utilización de geles con gradiente de acrilamida 5-15% que nos permitieron una mejor resolución de las muestras. Se utilizó para el gel separador acrilamida/Bisacrilamida al 30% (Bio-Rad Laboratories) a la que se le añadió un 25% de Tris-HCl 1,5 M [pH 8,8], Dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1%, persulfato amónico (APS) al 0,05%, Tretacetmetiletildiamina (TEMED) al 0,005% y el volumen necesario se completó con agua destilada para tener una concentración final de 5% y de 15%. El gel concentrador se preparó al 4% de acrilamida y se le añadió un 25% de Tris-HCl 0,5 M [pH 6,8], el resto de soluciones a la misma concentración que en el gel separador. La electroforesis se llevo a cabo a 35 miliAmperios durante 6 horas.

Las proteínas obtenidas de los diferentes lisados proteicos que se sometieron a SDS-PGE, se diluyeron a la mitad en tampón de carga 2X (Tris-HCl 0,125 M [pH 6,8], Dodecil sulfato sódico (SDS) al 4%, glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0,04% y/o un 10% de 2-mercaptoetanol) (condiciones reductoras o no reductoras) dependiendo de la naturaleza de la proteína que se pretendía visualizar.

Las proteínas separadas en función de su peso molecular en el gel se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Billerica, MA) en tampón de transferencia (Tris base 48mM, glicina 39mM, SDS 0,038%, metanol 20%, ajustado a pH 9,2 con HCl) durante 2 horas a 100 V o toda la noche a 30V y a 4°C. Para ello se utilizó un equipo de transferencia a membrana húmeda Trans-Blot Cell (Bio-Rad laboratories). Tras la transferencia se procedió a bloquear los sitios de unión inespecífica de las membranas sumergiendo las mismas en una solución de PBS con 5% de leche descremada en polvo (BD Biosciences) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de bloquear y lavar la membrana con PBS durante 10 minutos, se cortó en diferentes tiras que se

incubaron toda la noche en agitación orbital a 4° C con los diferentes anticuerpos monoclonales (sobrenadantes). Transcurrida la incubación se lavaron las tiras 3 veces con TBST (Tris-HCl 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%) y se incubaron una hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:10.000 en PBS con 5% de leche descremada. Por último, tras 3 lavados con TBST de 10 minutos cada uno, se visualizó la actividad peroxidasa. Para ello se utilizó el sistema de detección ECL (GE Healthcare, Amersham Place, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante, donde se visualizaron las bandas específicas.

8.1.3 Identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF MS

Para la identificación de las proteínas se cortaron las bandas en el gel correspondientes a las bandas positivas que se habían observado al revelar las membranas con ECL. Estas bandas se enviaron a la Unidad de Proteómica de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, que forma parte de la Red de Servicios de Proteómica (ProteoRed) de Genoma España para su secuenciación. Para ello las bandas se digirieron con tripsina y se aplicaron en una placa MALDI automáticamente. Los espectros se adquirieron mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la identificación se llevó a cabo por huella peptídica y búsqueda en base de datos SWISS-PROT, NCBI Y MSDB, empleando el motor de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Una vez obtenida la huella peptídica, se confirmó la identificación de la proteína por fragmentación y secuenciación (MS/MS) de hasta 3 péptidos seleccionados en cada espectro. Los datos de MS y MS/MS se analizaron conjuntamente mediante búsqueda en base de datos.

Para la interpretación de los resultados de la identificación de proteínas por huella peptídica (MALDI TOF/TOF MS) es conveniente revisar los siguientes términos:

Protein Score: es una puntuación que da el motor de búsqueda (MASCOT) a cada identificación, según un sistema probabilístico basado en la distribución de las masas de los péptidos según la masa de la proteína a la que pertenecen (Sistema Mowse).

Protein Score C.I. %: Intervalo de confianza para el Protein Score. Cuanto más cerca esté de 100, más creíble es la búsqueda, pero para creérsela debe estar por encima del 99%.

Peptide Count: El motor de búsqueda usado es el llamado MASCOT, y como la mayoría de ellos, lo que hace es buscar incidencias entre las masas de los péptidos experimentales (obtenidos después de la digestión de nuestra muestra) y las masas de los péptidos teóricos, es decir, obtenidos directamente de la digestión teórica de las secuencias anotadas en las bases de datos.

Peptide count es por tanto el número de péptidos que ha logrado emparejar.

En el caso de que las fragmentaciones de péptidos (MSMS) hayan sido buenas y las haya usado en la búsqueda aparecerán rellenas otras dos columnas del informe:

Total Ion Score: suma de los “scores” de cada uno de los iones fragmentados

Total Ion Score C.I.%: intervalo de confianza para el “total ion score”, es decir, cómo de creíble es el dato. Por encima de un 95% ya sería significativo.

Las demás columnas del informe corresponden con Pm y nº de acceso de la proteína.

9. DIFERENCIACIÓN CELULAR (NTERA-2/D1)

Con el objetivo de inducir la diferenciación celular de las células NTERA-2/D1, se dispusieron entre 1×10^6 a 2×10^6 en botellas de 75 cm² en medio de cultivo enriquecido con glucosa, HG-DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0,2 mM de L-Glutamina, con una atmosfera al 10% de CO₂ y se le añadió ácido retinoico a una concentración de 10^{-5} M. El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada 7 días. El procedimiento ha sido descrito previamente en detalle por Andrews P.W. y colaboradores (Andrews 1984). Se muestra una figura representativa de la expresión de algunos los receptores específicos de células NTERA-2D1 después de ser inducidas a diferenciación con ácido retinoico (figura 8)

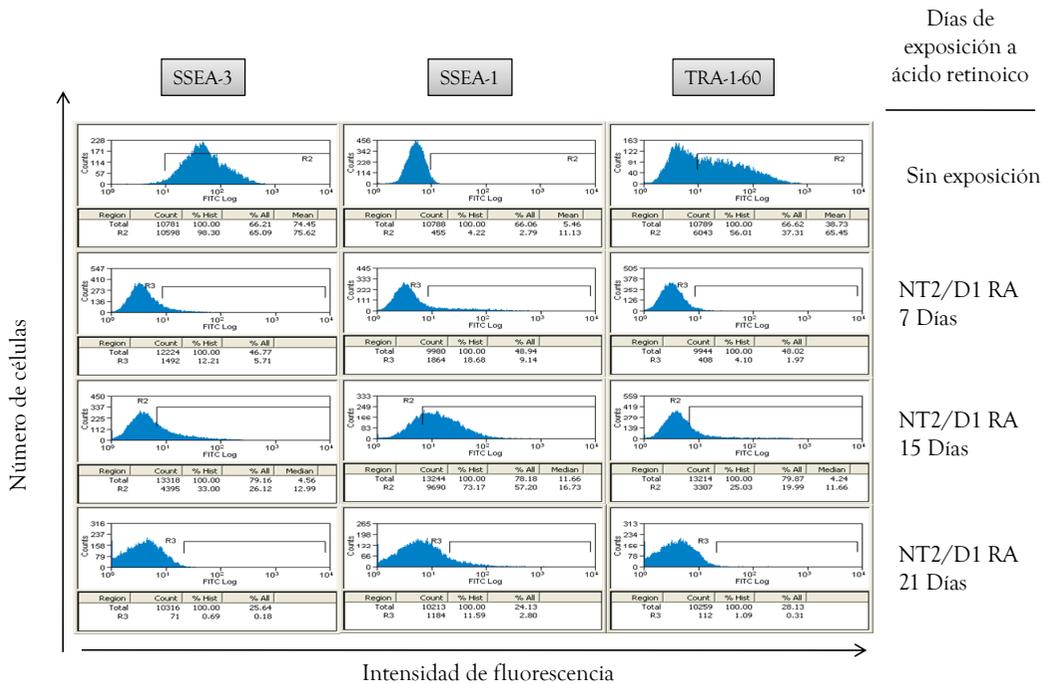


Figura 8: Expresión de SSEA-3, SSEA-1 y TRA-1-60 en células NTERA-2/D1 después de ser inducidas a diferenciación con ácido retinoico.

10. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CON ESTAUSPORINA

Para inducir apoptosis se utilizó estaurosporina (Sigma) a una concentración de 1mM en una solución de DMSO.

Para la línea de células troncales embrionarias humanas HS181 cultivadas sobre matrigel, fue suficiente el mantenimiento durante 4 horas a 37°C a una concentración de 1mM con estaurosporina, para inducir apoptosis. Sin embargo, para el cultivo de fibroblastos hicieron falta 6 horas de cultivo con estaurosporina a la misma concentración para que se indujera la apoptosis.

RESULTADOS

1. ANTICUERPOS: PRODUCCIÓN, DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN

1.1 Antígeno e inmunizaciones

Durante esta tesis se han generado anticuerpos monoclonales (AcMos) procedentes de 3 fusiones. Como inmunógeno se utilizaron células HS181 que habían sido cultivadas sobre una matriz de fibroblastos en CABIMER y que una vez recogidas y congeladas a -80° C fueron enviadas periódicamente en eppendorf a nuestro laboratorio en nieve carbónica o hielo seco. Cada eppendorf contenía entre 9-30 colonias, en las que se encontraban presentes células embrionarias HS181 y fibroblastos en proporciones variables.

Se realizaron tres inmunizaciones intra-peritoneales en un lote de seis ratones BALB/c de 4-5 semanas de edad. El contenido de un eppendorf era utilizado para la inmunización de seis ratones, aproximadamente 20 colonias por ratón en la primera y segunda inmunización y 70 colonias por ratón en la tercera inmunización.

La inmunización fue llevada a cabo con el homogeneizado celular procedente de la descongelación de cada eppendorf. Antes de cada fusión, con objeto de conocer el título de los anticuerpos que se estaban produciendo, los seis ratones fueron sangrados mediante punción en el rabo y el suero se analizó por ELISA frente al “inmunógeno” procedente de un eppendorf. Este procedimiento se hizo con la finalidad de utilizar para las fusiones aquellos ratones que presentaban un título más elevado.

Los ratones seleccionados recibieron una cuarta inmunización intravenosa con un homogeneizado de células HS181 procedente de 2-5 colonias y tras un periodo de tres-cinco días fueron sacrificados y su bazo utilizado en las correspondientes fusiones.

1.2 Fusiones

Se realizaron 3 fusiones inmunizando ratones BALB/c con homogeneizados celulares obtenidos después de descongelar colonias de la línea de células troncales embrionarias HS181. En la fusión I se utilizaron 192×10^6 linfocitos de bazo de ratón en una proporción 1:1'5 con células de mieloma, en la fusión II se utilizaron 198×10^6 de células a una proporción 2:1, y en la fusión III fueron 220×10^6 de células a la misma proporción 2:1. En la siguiente tabla se muestra el éxito de cada fusión.

	Pocillos totales	Pocillos con hibridomas	Éxito fusión
Fusión 1	840	191	22,70%
Fusión 2	720	445	61,81%
Fusión 3	1632	1097	67,40%

Tabla 3: Éxito de fusión. Porcentaje de pocillos en los cuales crecen hibridomas, frente a los pocillos totales de los que se parte en la fusión.

Los sobrenadantes de los clones obtenidos se analizaron por inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto, comparando su reactividad frente a células troncales embrionarias humanas HS181.

1.3 Selección de hibridomas

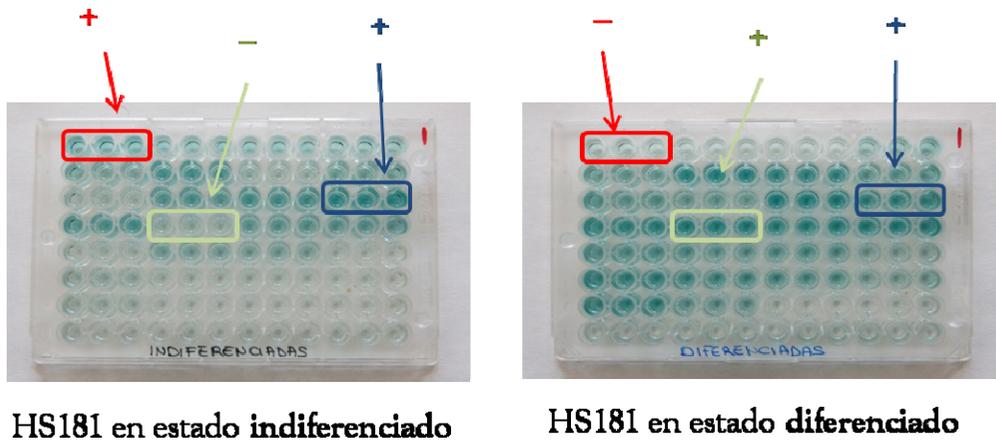
El sistema de selección empleado se basó en un doble análisis mediante ELISA. El sobrenadante de cada hibridoma fue analizado frente al mismo inmunógeno que se había inmunizado a los ratones, colonias de la línea HS181 y fibroblastos. Todos los hibridomas que resultaron ser positivos, se volvieron a

testar por ELISA frente a fibroblastos. Se descartaron los positivos frente a fibroblastos. En la tabla siguiente se muestran los hibridomas finales, positivos frente a HS181, negativos frente a fibroblastos y perdidos por causas ajenas (perdida de la producción del anticuerpo por reorganización cromosómica, muerte en el cultivo celular, etc.)

	Hibridomas + HS181	Hibridomas + fibroblastos	Hibridomas + HS181, - fibroblastos	Perdidos	+ hESC finales
Fusión 1	23	4	19	19	0
Fusión 2	59	24	35	15	20
Fusión 3	314	207	107	65	42
Total	396	235	161	99	62

Tabla 4: Hibridomas seleccionados en las diferentes fusiones. La selección de los hibridomas se realizó por ELISA y se seleccionaron los que fueron positivos frente al inmunógeno inicial y negativos frente a fibroblastos.

Con el objetivo de poder clasificar los 62 hibridomas, se realizó una primera aproximación en la cual, se antigenaron placas de ELISA con el mismo inmunógeno que se inyectaron a los ratones (células troncales embrionarias humanas HS181, sobre matriz de fibroblastos en estado indiferenciado) y otras placas de ELISA con células diferenciadas (HS181 en matriz de fibroblastos que de manera visual cambiaban de morfología y que se consideraron por tanto indiferenciadas). Los hibridomas se incubaron por triplicado en cada uno de los estados (figura 9). En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos.



HS181 en estado indiferenciado

HS181 en estado diferenciado

Figura 9: Expresión de los hibridomas en dos estadios de diferenciación de la línea HS181 por ELISA. +: Reacción positiva; —: Reacción negativa.

Los resultados nos muestran lo siguiente: en primer lugar observamos algunos hibridomas que reaccionan de manera positiva en células HS181 en estado indiferenciado pero no lo hacen en estado diferenciado de la misma línea (marcado en rojo en la figura 9). Otro de los grupos se comporta de manera inversa, es decir, reaccionan de manera negativa con células HS181 en estado indiferenciado pero positivamente en estado diferenciado (marcado en verde en la figura 9) y un tercer grupo que reacciona de manera positiva en los estados de diferenciación (marcado en azul en la figura 9).

En la siguiente tabla se muestra la clasificación preliminar de los 62 hibridomas que se obtuvieron.

Hibridoma	Isotipo	HS181		Hibridoma	Isotipo	HS181	
		Indif	Dif			Indif	Dif
GG2D3(F3)	IgM _k	+	—	GG5E3(F3)	IgG1 _k	+	+
GG6B8(F3)	IgM _k	+	—	GG5B6(F2)	IgM _k	+	+
GG6C4(F3)	IgM _k	+	—	GG5C7(F3)	IgM _k	+	+
GG3B2(F3)	IgM _k	—	+	GG5G4(F3)	IgG1 _k	+	+
GG4B3(F3)	IgM _k	—	+	GG6E10(F2)	IgM _k	+	+
GG6A9(F3)	IgM _k	—	+	GG6E7(F3)	IgM _k	+	+
GG9C5(F3)	IgM _k	—	+	GG6E9 (F2)	IgM _k	+	+
GG14A11(F3)	IgM _k	—	+	GG6C10 (F2)	IgG3 _k	+	+
GG15H5(F3)	IgM _k	—	+	GG6F4(F3)	IgM _k	+	+
GG17C4(F3)	IgM _k	—	+	GG6F5 (F2)	IgM _k	+	+
GG7H7(F3)	IgM _k	—	+	GG6G9 (F2)	IgM _k	+	+
GG12C3(F3)	IgM _k	—	+	GG6H9(F3)	IgM _k	+	+
GG1B1 (F2)	IgA _k	—	+	GG7E5 (F2)	IgM _k	+	+
GG6B3(F2)	IgM _k	—	+	GG7B8(F3)	IgM _k	+	+
GG1B6 (F2)	IgM _k	+	+	GG7D1(F2)	IgM _k	+	+
GG1C6 (F2)	IgM _k	+	+	GG7D9(F2)	IgM _k	+	+
GG1F7 (F2)	IgM _k	+	+	GG7G11 (F2)	IgM _k	+	+
GG1G6(F3)	IgM _k	+	+	GG8D5(F3)	IgM _k	+	+
GG1H2(F3)	IgM _k	+	+	GG8F3(F3)	IgM _k	+	+
GG3E4(F3)	IgM _k	+	+	GG8H11(F2)	IgM _k	+	+
GG3E7(F3)	IgM _k	+	+	GG8H3(F3)	IgM _k	+	+
GG3B12(F2)	IgM _k	+	+	GG9E2(F3)	IgM _k	+	+
GG3B2(F2)	IgM _k	+	+	GG10C3(F3)	IgM _k	+	+
GG3B5(F3)	IgM _k	+	+	GG11D8(F3)	IgM _k	+	+
GG3G12 (F2)	IgM _k	+	+	GG13B5(F3)	IgM _k	+	+
GG3G5(F3)	IgM _k	+	+	GG14B3(F3)	IgM _k	+	+
GG3H5(F2)	IgM _λ	+	+	GG14B6(F3)	IgM _k	+	+
GG4E4(F3)	IgM _k	+	+	GG14C10(F3)	IgM _k	+	+
GG4C10(F3)	IgM _k	+	+	GG16E12(F3)	IgM _λ	+	+
GG4D6(F3)	IgM _k	+	+	GG16F11(F3)	IgM _k	+	+
GG4F11(F3)	IgM _k	+	+	GG17H10(F3)	IgM _k	+	+

Tabla 5: Clasificación preliminar de los 62 hibridomas atendiendo a su expresión en diferentes estados de diferenciación. Indif: estado indiferenciado de HS181; Dif: estado diferenciado de HS181; F2: fusión 2; F3: fusión3.

Atendiendo a esta clasificación preliminar observamos que dentro del primer grupo (en rojo) encontramos 3 hibridomas, en el segundo grupo (en verde) 11 hibridomas y en el tercer grupo (en azul) 48 hibridomas.

1.4 Determinación de los isotipos de las cadenas ligeras y pesadas.

La determinación del isotipo, cadena pesada de cada anticuerpo (tabla 5), muestra que de los 62 hibridomas 58 son de clase M, 3 de clase G (2 G₁ y 1 G₃) y uno de clase A. La cadena ligera correspondía en la mayoría de los casos analizados a una cadena kappa, solo 2 de ellos fueron de cadena lambda (GG3H5 y GG16E12).

1.5 Clonación de los hibridomas

Un grupo de los hibridomas presentados en la tabla 5 fueron clonados siguiendo el método de dilución límite. Como criterios de prioridad para el inicio de la clonación, debido al gran número de hibridomas obtenidos, se utilizó: en primer lugar, el que presentaran reacción específica con células HS181 diferenciadas. En segundo lugar que presentaran reacción específica solamente con células indiferenciadas. En tercer lugar que presentaran isotipo G y A, y por último, el orden en que se presentan en la tabla 5. Hemos de decir que de los 62 hibridomas había tres copias congeladas en nitrógeno líquido que se conservan hasta finalizar el proceso de clonación positivamente. Una vez que los hibridomas eran clonados, las copias (madres), que quedaron se dejaron congeladas en nitrógeno líquido, y seguidamente se guardaron entre 3 y 5 viales con 10-15 millones de células del clon correspondiente.

En la tabla 6 se presenta la lista de anticuerpos monoclonales, con su nombre⁹ final y su clase, nombre que será empleado en todo el trabajo. El resto

⁹ No hay normativa sobre la nominación de los anticuerpos monoclonales de uso en investigación. Sin embargo se avanza en una normativa cuando su uso es terapéutico o de diagnóstico. http://en.wikipedia.org/wiki/Nomenclature_of_monoclonal_antibodies. En nuestro laboratorio los nombres de los anticuerpos siguen las siguientes reglas. En primer lugar las iniciales del nombre y primer apellido de la autora. En este trabajo Gema García, GG. Seguido del número de la placa de 96 pocillos con la letra y número que indica la posición de hibridoma en la misma. Por ejemplo 8H11, indica que el hibridoma aparece en la placa 8 fila H columna 11. A continuación y separado por un punto aparece el número de la placa y posición del clon. Por ejemplo, placa 1 fila B columna 2. Dando el nombre GG8H11.1B2. Esta nomenclatura nos permite diferenciar hibridomas sin clonar de aquellos que han sido clonados.

de hibridomas, hasta completar los 62 originales, no fue posible finalizar su clonación por diversas causas, entre ellas la pérdida del híbrido.

Hibridoma	Isotipo	Hibridoma	Isotipo
GG2D3.1F8	IgM _k	GG5B6.1F9	IgM _k
GG6B8.1E3	IgM _k	GG5G4.1C6	IgG1 _k
GG6C4.1E9	IgM _k	GG6E10.1D7	IgM _k
GG4B3.1B6	IgM _k	GG6E7.1E9	IgM _k
GG15H5.1D2	IgM _k	GG6E9.1D4	IgM _k
GG1B1.1B3	IgA _k	GG6C10.2C3	IgG3 _k
GG1B6.1E2	IgM _k	GG6G9.1D3	IgM _k
GG1C6.1F5	IgM _k	GG6H9.1C3	IgM _k
GG1G6.1C5	IgM _k	GG7E5.1B6	IgM _k
GG1H2.1B3	IgM _k	GG7D1.3G6	IgM _k
GG3E4.1D6	IgM _k	GG7D9.1B3	IgM _k
GG3E7.1F2	IgM _k	GG8F3.1A2	IgM _k
GG3B2.2F7	IgA _k	GG8H11.1B2	IgM _k
GG3B5.1F4	IgM _k	GG8H3.1C9	IgM _k
GG3G12.1D5	IgM _k	GG9E2.1E5	IgM _k
GG3G5.1E5	IgM _k	GG11D8.1D6	IgM _k
GG3H5.1C4	IgM _λ	GG13B5.1B3	IgM _k
GG4E4.1D3	IgM _k	GG14B3.1E9	IgM _k
GG4C10.1C3	IgM _k	GG14C10.1E6	IgM _k
GG5E3.1D2	IgG1 _k	GG16E12.1G5	IgM _λ

Tabla 6: Lista final con los anticuerpos monoclonales que se utilizaron en el trabajo.

En el apartado de discusión general podremos comprobar que los resultados obtenidos, en cuanto al número de anticuerpos monoclonales, son claramente satisfactorios si se comparan con otros datos disponibles. Respecto al elevado número de anticuerpos con cadena pesada de clase M y de cadena ligera kappa, en el mismo apartado, tendremos oportunidad de adelantar algunas hipótesis sobre las causas de este sesgo.

CAPÍTULO 1

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE MOLÉCULAS PRESENTES EN LA
LÍNEA CELULAR EMBRIONARIA HUMANA HS181 Y MOLÉCULAS
PRESENTES EN TODAS LAS LÍNEAS CELULARES**

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo incluimos un grupo de anticuerpos que reconocen moléculas que ha sido imposible caracterizar de forma completa y definitiva. Incluyen dos grupos de anticuerpos diferentes, por un lado, los que reconocen moléculas que parecen específicas de un único tipo de células, y por otro, un grupo de anticuerpos que reconocen moléculas presentes en prácticamente todas las células analizadas.

1.1 Anticuerpos frente a moléculas específicas de líneas celulares estudiadas

El desarrollo de anticuerpos que pudieran ser marcadores de células embrionarias humanas ha sido, y lo sigue siendo aun hoy, un objetivo que permitiría una eficiente separación de las células pluripotenciales en los cultivos de células embrionarias. Hasta 2005, y durante más de 20 años, se habían generado diez anticuerpos que podían utilizarse como marcadores de superficie de las células embrionarias humanas y dos que eran marcadores de factores de transcripción presentes en estas células (Laslett et al 2003). Sólo cuatro de los anticuerpos contra receptores reconocen epítomos de los que se sabe el gen que controla la proteína que lo alberga (Kolle et al 2009). La dificultad del objetivo principal de nuestro trabajo se hace más evidente cuando desde 2005 un solo nuevo marcador ha sido descrito mediante el uso de anticuerpos (Choo et al 2008). Nuevas aproximaciones, relacionadas con el análisis del proteoma y transcriptoma de las células embrionarias humanas, han recientemente permitido determinar que son alrededor de 90 los genes que controlan receptores celulares específicos de las células embrionarias humanas. En la actualidad son sólo cuatro los anticuerpos que reconocen epítomos presentes en alguno de estos hipotéticos receptores, por lo tanto será necesario acometer trabajos encaminados a generar los anticuerpos que reconozcan esas proteínas y posteriormente ensayar su uso en los cultivos celulares (Kolle et al 2009). La asignación de nuevos marcadores por medio de anticuerpos ha tenido además

otras complicaciones ligadas al hecho de que determinados anticuerpos pueden reconocer epítomos conformacionales que pueden variar, o incluso desaparecer, en su expresión sobre la proteína. Un caso bien conocido es el del receptor de células embrionarias conocido como CD133. Los anticuerpos AC133 y AC141, que reconocen un epítomo glicosilado presente en la región extracelular del CD133 fueron considerados útiles como marcadores, sin embargo el epítomo reconocido por los anticuerpos puede o no estar presente en el receptor, y por tanto inducir a error sobre la presencia del receptor CD133 en algunas células (Bidingmaier et al 2008).

Todo ello ha hecho que nuestro primer objetivo haya necesitado modificarse a lo largo de nuestro trabajo, aunque son varios los anticuerpos que se han generado que pueden ser de valiosa ayuda, debido a su especificidad, en el estudio de las células embrionarias humanas sin llegar a ser marcadores de su pluripotencialidad.

1.2 Anticuerpos frente a moléculas presentes en prácticamente todas las líneas celulares estudiadas

Aunque los anticuerpos monoclonales se consideran generalmente altamente específicos (véase introducción), en nuestro trabajo hemos producido este tipo de anticuerpos, específicos para alguna molécula que puede estar presente en pocas o muchas líneas celulares (Véase capítulos dos, tres y cuatro de la presente tesis doctoral). En contraste con esta especificidad también hemos encontrado otros anticuerpos que reconocen epítomos presentes en varias moléculas y expresadas en todas las líneas celulares. La explicación más inmediata sería considerar que estos anticuerpos son monoreactivos y reconocen una sola molécula presente en todas las líneas, tal como sucede con los anticuerpos que se van a describir en los capítulos 2 y 3 de la presente tesis doctoral. Sin embargo, desde el desarrollo de los primeros anticuerpos monoclonales se conoce que algunos de ellos, pese a su teórica especificidad,

pueden reaccionar con antígenos presentes en distintas moléculas. (Gould et al 1983; Kramer et al 1997).

La posibilidad de que un anticuerpo pueda reconocer a varios antígenos requiere por tanto tratamiento separado. El fenómeno de que un anticuerpo pueda reconocer varios antígenos puede ser explicado de dos formas (Bouvet & Dighiero 2000): que el anticuerpo reconozca un “epítipo público” presente en varias proteínas, que podemos llamar “verdadera reacción cruzada” (Chitarra et al 1993) o que el parátipo del anticuerpo debido a su débil afinidad por su epítipo sea capaz de reconocer y unirse a diversas moléculas, en este caso nos encontramos con los anticuerpos conocidos como polireactivos (Notkins 2004; Zhou et al 2007; Elkon & Casali 2008). Un esquema que explica la acción de los anticuerpos polireactivos se presenta en la figura 1.1 sacado de Notkins (2004) (Notkins 2004).

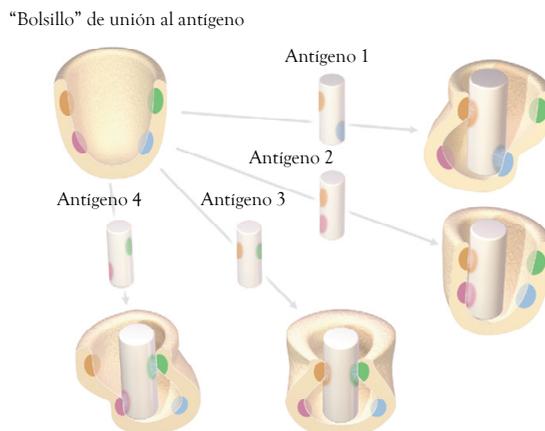


Figura 1.1: Hipótesis explicativa de la polireactividad conformacional. El clásico modelo de “llave” de la interacción antígeno anticuerpo propone estructuras rígidas de los componentes que interactúan y se ha utilizado durante años para explicar la monoreactividad de los anticuerpos. Estudios recientes sugieren que el “bolsillo” de unión al antígeno es más flexible de lo esperado adaptándose a diferentes configuraciones antigénicas. En la figura se muestra cuatro diferentes antígenos que interactúan con diferentes residuos de aminoácidos dentro del bolsillo de unión al antígeno de una sola molécula de un anticuerpo ampliamente polireactivo. Cada interacción altera el plegamiento o conformación del bolsillo de unión al antígeno de una manera diferente (Notkins, 2004).

En ambos casos los anticuerpos de clase M tienen un papel decisivo (Vollmers & Brandlein 2006). La polireactividad desde el punto de vista evolutivo es una característica muy conservada por el sistema inmune ya que anticuerpos polireactivos se dan en el hombre y en el tiburón, una excelente revisión puede consultarse en Notkins A.L. (2004) (Zhou et al 2007). En el presente capítulo describimos a varios anticuerpos monoclonales de clase M que reconocen moléculas presentes en prácticamente todas las líneas celulares empleadas y discutimos sobre su posible reacción cruzada o polireactividad.

En este capítulo describimos por tanto anticuerpos, obtenidos tras la inmunización con extractos celulares de la línea HS181 y que reconocen moléculas presentes en dichas células. Para todos ellos se hará necesario un mayor e intensivo estudio hasta la determinación de los epítomos reconocidos. Este trabajo podrá ser desarrollado de continuar la “Plataforma para la producción de reactivos de la Red-Tercel” que ha sido uno de las consecuencias de nuestro trabajo iniciado como una colaboración entre el CABIMER y la Universidad de Córdoba.

2. RESULTADOS

Con los anticuerpos clonados que aparecen en la tabla 1.4 (capítulo de resultados generales), se han llevado a cabo diversos análisis con objeto de determinar las moléculas que reconocían. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la tabla 1.1. Entre las técnicas que se utilizaron encontramos: análisis inmunocitoquímicos con diversas líneas celulares, citometría de flujo intra y extra celular con diversas líneas celulares, el estudio sobre células mononucleares de sangre periférica humana, que se presenta en una tabla diferente (tabla 1.2) y los análisis por Western blot que nos puedan indicar el peso molecular de las moléculas reconocidas (tabla 1.3).

AcMos	Isotipo	ICQ		Citometría de flujo									Western blot	
		HS181	Shef6	HS181	Shef6	H7	NTERA-2	n2101Ep	1411H	P-19	3D4/31	PBMCs		
GG2D3.1F8	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG6B8.1E3	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG6C4.1E9	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG4B3.1B6	IgM _k	+/-	-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-	-
GG1B1.1B3	IgA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GG1B6.1E2	IgM _k	-	ND	+(7%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG1C6.1F5	IgM _k	-	-	+(12%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG1G6.1C5	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG1H2.1B3	IgM _k	+/-	+/-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-	+
GG3E4.1D6	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG3E7.1F2	IgM _k	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
GG3B2.2F7	IgM _k	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GG3B5.1F4	IgM _k	+/-	ND	+(33%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GG3G12.1D5	IgM _k	+/-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GG3H5.1C4	IgM _λ	+/-	+/-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-	+
GG4E4.1D3	IgM _k	-	-	+(17%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG4C10.1C3	IgM _k	+/-	+/-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-	-
GG5E3.1D2	IgG1 _k	+/-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG5B6.1F9	IgM _k	+/-	ND	+(17%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG5G4.1C6	IgG1 _k	+/-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG6E10.1D7	IgM _k	+/-	ND	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-	-
GG6E7.1E9	IgM _k	+	-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-	-
GG6E9.1D4	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG6C10.2C3	IgG3 _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG6G9.1D3	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG7E5.1B6	IgM _k	+/-	+/-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-	-

AcMos	Isotipo	ICQ		Citometría de flujo									Western blot
		HS181	Shef6	HS181	Shef6	H7	NTERA-2	n2101Ep	1411H	P-19	3D4/31	PBMCs	
GG7D1.3G6	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG7D9.1B3	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG8F3.1A2	IgM _k	+/-	+/-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-
GG8H3.1C9	IgM _k	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GG8H11.1B2	IgM _k	-	-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	-
GG9E2.1E5	IgM _k	+	+	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	+
GG11D8.1D6	IgM _k	+	+	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	-	+
GG13B5.1B3	IgM _k	+/-	-	+(;16%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG14B3.1E9	IgM _k	+	+/-	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+ (v)	+	-
GG14C10.1E6	IgM _k	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG16E12.1G5	IgM _λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1.1: Lista completa de todos los anticuerpos monoclonales obtenidos. ICQ, inmunocitoquímica; PBMC: leucocitos humanos; +: positivo; -: negativo; +/-: marcaje débil; +(v): expresión variable.

AcMos	Linfocitos (CD3+)	Monocitos (CD14+)	Plaquetas (CD41a+)
GG3E7.1F2	40	17	45
GG3B2.2F7	23	15	96
GG3B5.1F4	15	19	82
GG3G12.1D5	12	20	46
GG8H3.1C9	65	22	98
GG14B3.1E9	11	7	2

Tabla 1.2: Citometría de flujo de los anticuerpos monoclonales producidos, frente a células mononucleares de sangre periférica de humano. Los resultados se muestran como porcentaje de cada subpoblación en la muestra total.

A la vista de estos datos hemos realizado una primera clasificación de estos anticuerpos en dos grandes grupos atendiendo al criterio de si las moléculas reconocidas presentaban algún tipo de especificidad en su expresión o bien estaban presentes en todas o en una gran mayoría de las células analizadas.

PESO MOLECULAR (Inmunoblot)		
AcMo	C. Reductoras	C. no Reductoras
GG4B3.1B6	(—)	(—)
GG3E7.1F2	(—)	(—)
GG3B2.2F7	+250/120/60	+250/120/60
GG3H5.1C4	100	100
GG4C10.1C3	(—)	(—)
GG6E10.1D7	(—)	(—)
GG6E7.1E9	(—)	(—)
GG7E5.1B6	(—)	(—)
GG8F3.1A2	(—)	(—)
GG8H11.1B2	(—)	(—)
GG9E2.1E5	55/45	55/45
GG11D8.1D6	50/45/35	50/45/35
GG14B3.1E9	110/60	110/60
GG8H3.1C9	140/130/120/100	140/130/120/100

Tabla 1.3: Pesos moleculares en kDa.(—) Indica que no se ha obtenido ninguna banda específica.

2.1 Anticuerpos que reconocen moléculas que podrían tener una expresión específica en las líneas estudiadas

- Los anticuerpos **GG5B6.1F9** y **GG13B5.1B3**, son capaces de reconocer por inmunocitoquímica una molécula presente en la línea utilizada como inmunógeno, HS181, línea de células embrionarias humana y que estaría ausente en la línea Sheffield 6, también de células embrionarias humana. Ambos son positivos por citometría de flujo con HS181 y negativos con el resto de células estudiadas.
- Los anticuerpos **GG3B5.1F4** y **GG3G12.1D5** son positivos únicamente en inmunocitoquímica con células HS181 y reconocen también una molécula que está presente en células mononucleares sanguíneas. GG3B5.1F4 es también positivo por citometría de flujo, reaccionando con un 33% de la población de células HS181. En el resto de células estudiadas fueron negativos.
- Los anticuerpos, **GG1B6.1E2**, **GG1C6.1F5** y **GG4E4.1D3**, solo se expresan en HS181 por citometría de flujo aunque en un porcentaje bajo, y no en el resto de líneas.

2.2.1 GRUPO I: **GG5B6.1F9** y **GG13B5.1B3** reconocen sólo HS181

En este primer grupo encontramos dos anticuerpos monoclonales que reconocen a la línea HS181 por inmunocitoquímica y por citometría de flujo. El antígeno que reconocen es intracelular. Con todas las líneas que se han testado (células troncales embrionarias humanas, Shef-6 y H7, células de carcinoma humano y de ratón, NTERA-2, n2102Ep, 1411H, P-19, una línea de macrófagos alveolares porcina, 3D4/31) los resultados fueron negativos. En la figura 1.2 se muestran los resultados de citometría de flujo con la línea HS181.

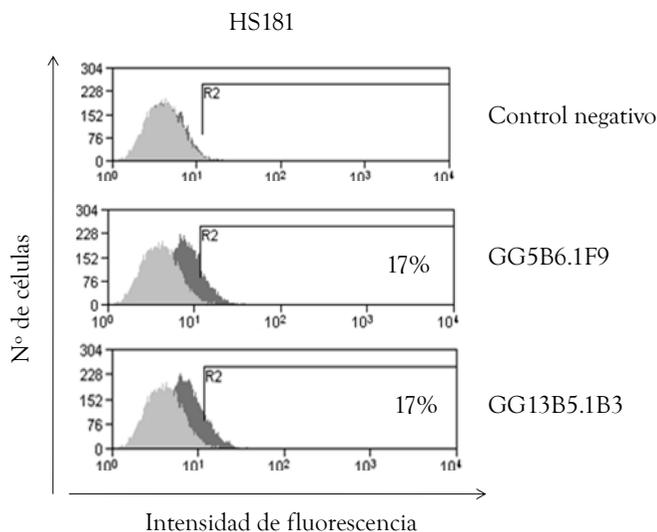


Figura 1.2: Expresión de los AcMo GG5B6.1F9 y GG13B5.1B3 en citometría de flujo con la línea HS181. El histograma gris tenue de la figura corresponde con el control negativo.

2.2.2 GRUPO II: GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 reconocen HS181 y células sanguíneas

En este grupo encontramos dos anticuerpos monoclonales que reconocen a la línea HS181 y también reconocen alguna molécula de células mononucleares de sangre periférica. Hay que resaltar que el antígeno reconocido es intracelular. Se han testado con células troncales embrionarias humanas (Shef-6 y H7), células de carcinoma humano y de ratón (NTERA-2, n2102Ep, 1411H, P-19), una línea de macrófagos alveolares porcina (3D4/31), siendo los resultados negativos.

El AcMo GG3B5.1F4 fue positivo con la línea HS181 por citometría de flujo, mostrándose una expresión del 33% de células (figura 1.3A). El AcMo GG3G12.1D5 fue negativo por citometría de flujo. Sin embargo en inmunocitoquímica los dos anticuerpos mostraron una reacción positiva débil (figura 1.3B).

Los AcMo de este grupo también reaccionaron de manera positiva con células de sangre periférica, (figura 1.4) observándose expresión en una pequeña población de linfocitos, monocitos y plaquetas.

Al ser positivos estos anticuerpos solo con la línea HS181 y con PBMCs y a pesar de ser negativos con otras líneas de carcinoma humano, se testaron con la línea NTERA-2/D1 con ácido retinoico a diferentes tiempos para ver si estaban reconociendo un antígeno de diferenciación celular. Los resultados que se obtuvieron fueron negativos, no hubo expresión de ninguno de los dos anticuerpos en ninguno de los estados (datos no mostrados).

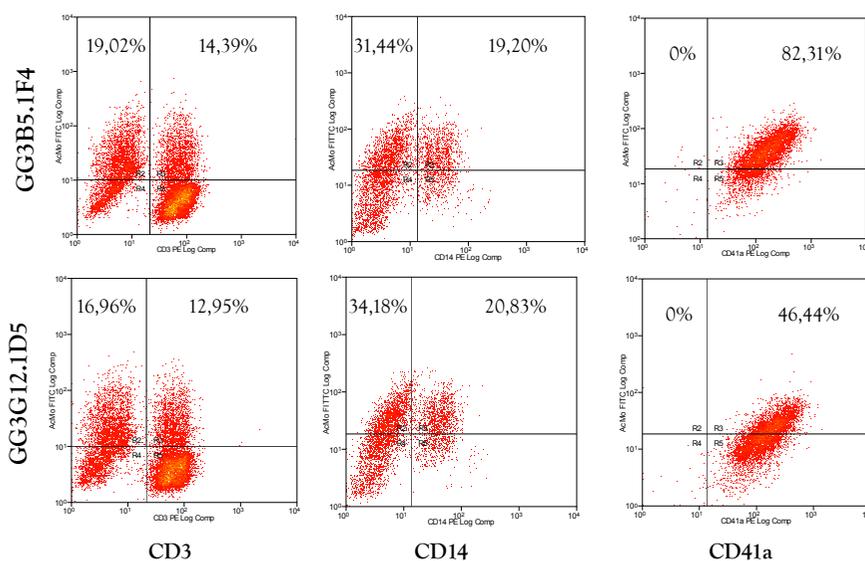


Figura 1.4: Citometría de flujo de GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 frente a células sanguíneas. Doble marcaje de linfocitos sanguíneos (CD3+), monocitos (CD14+) y plaquetas (CD41a).

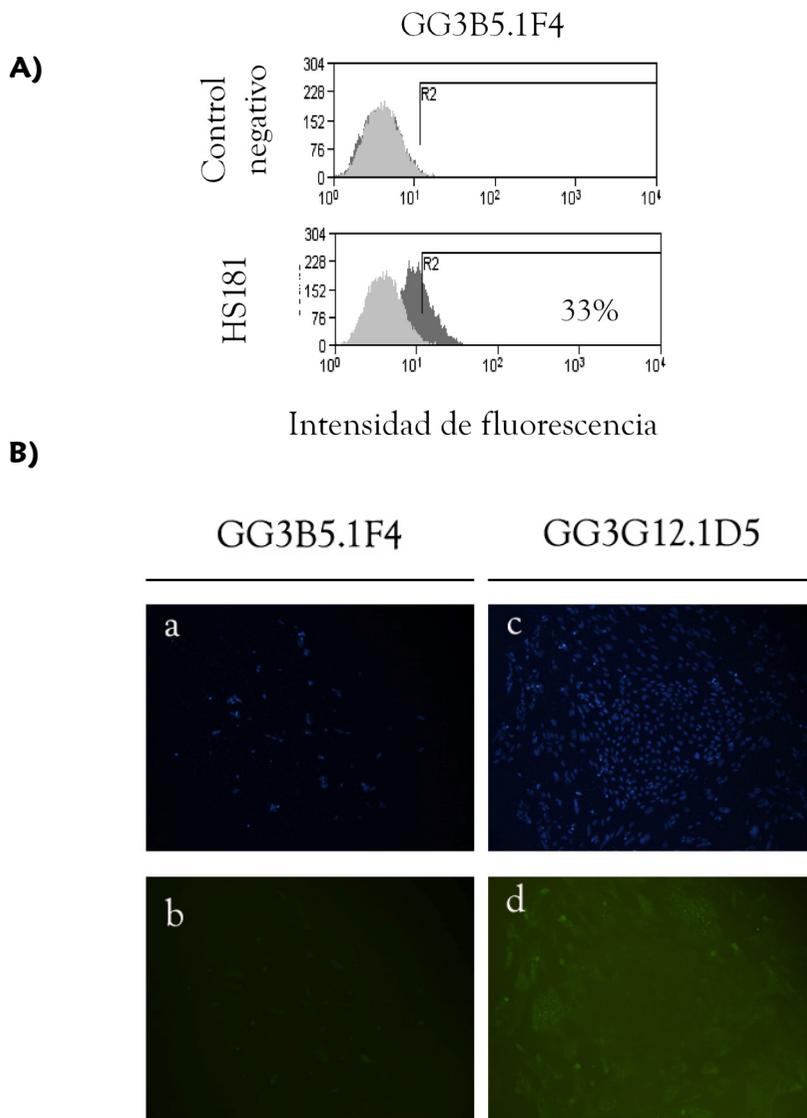


Figura 1.3: Reactividad de GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 con células HS181. **A)** Análisis de expresión del AcMo GG3B5.1F4 en células troncales embrionarias humanas HS181 por citometría de flujo, **B)** Inmunocitoquímica de GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 con HS181. Los AcMo se marcaron con anti-mouse conjugado con FITC para ambas técnicas y para la contratinción del núcleo en inmunocitoquímica se utilizó DAPI (c y d). Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

2.2.3 GRUPO III: GG1B6.1E2, GG1C6.1F5 y GG4E4.1D3: Reconocen débilmente sólo a HS181

En este tercer grupo de anticuerpos encontramos a GG1B6.1E2, GG1C6.1F5 y GG4E4.1D3 que solo se expresaron en la línea HS181 débilmente y no en el resto de líneas testadas. No dieron tampoco resultados positivos en inmunocitoquímica con la misma línea. En la figura 1.5 se muestra el porcentaje de expresión de cada uno de los anticuerpos.

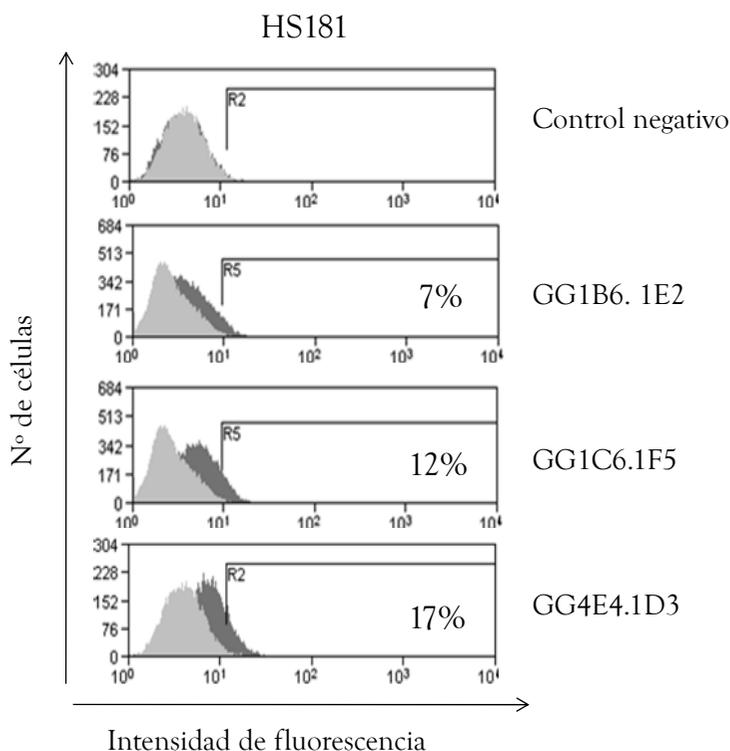


Figura 1.5: Expresión de los AcMo GG1B6.1E2, GG1C6.1F5 y GG4E4.1D3 en citometría de flujo con la línea HS181. El histograma gris tenue de la figura corresponde con el control negativo.

2.2 Anticuerpos que reconocen moléculas presentes en varias o todas las líneas celulares

- Los anticuerpos **GG3B2.2F7**, **GG3E7.1F2**, **GG8H3.1C9** y **GG14B3.E9**, presentan reacción con todas las células analizadas incluyendo las células mononucleares sanguíneas. Los resultados por Western blot nos indican que este grupo incluye una amplia variedad de moléculas. GG3B2.2F7, 250/120/60 kDa; GG3E7.1F2, sin determinar; GG8H3.1C9, 140/130/120/100 y GG14B3.E9, 110/60.
- Los anticuerpos, **GG1H2.1B3**, **GG3H5.1C4**, **GG4B3.1B6**, **GG4C10.1C3**, **GG6E10.1D7**, **GG6E7.1E9**, **GG7E5.1B6**, **GG8F3.1A2**, **GG8H11.1B2**, **GG9E2.1E5** y **GG11D8.1D6** reconocen una molécula presente en las líneas celulares analizadas, y ausente en las células sanguíneas. Una variedad de moléculas también se incluye en este grupo dado los resultados por Western blot. GG1H2.1B3 sin determinar; GG3H5.1C4, 100 kDa; GG4B3.1B6; sin determinar; GG4C10.1C3, sin determinar; GG6E10.1D7, sin determinar; GG6E7.1E9, sin determinar; GG7E5.1B6, sin determinar; GG8F3.1A2, sin determinar; GG8H11.1B2, sin determinar; GG9E2.1E5, 55/45 kDa y GG11D8.1D6 50/45/35.

2.2.1 GRUPO IV: **GG3B2.2F7**, **GG3E7.1F2**, **GG8H3.1C9** y **GG14B3.1E9**: Reconocen todas las líneas testadas

En este grupo IV englobamos 4 anticuerpos que presentan reacción con todas las células analizadas incluyendo las células mononucleares sanguíneas. Los resultados por Western blot nos indican que este grupo incluye una amplia variedad de moléculas.

En primer lugar y para obtener el peso molecular del antígeno reconocido por cada uno de los anticuerpos monoclonales del grupo, se realizó Western blot sobre diferentes lisados proteicos. En los anticuerpos de este grupo encontramos alguna o varias bandas positivas, menos en el AcMo GG3E7.1F2, donde los resultados no dieron ninguna banda claramente diferenciada. Se utilizaron lisados proteicos de distintas líneas celulares y células, de las cuales a su vez, en algunos casos, se obtuvieron diferentes fracciones (citoplasma, citoesqueleto y núcleo). NTERA-2/D1, n2102Ep y fibroblastos fueron fraccionados y la línea celular D3 y leucocitos humanos se obtuvo utilizó el lisado total. Todos los anticuerpos fueron testados con todos los lisados disponibles, en la figura 1.6 se muestran los resultados más representativos de cada uno de los AcMo.

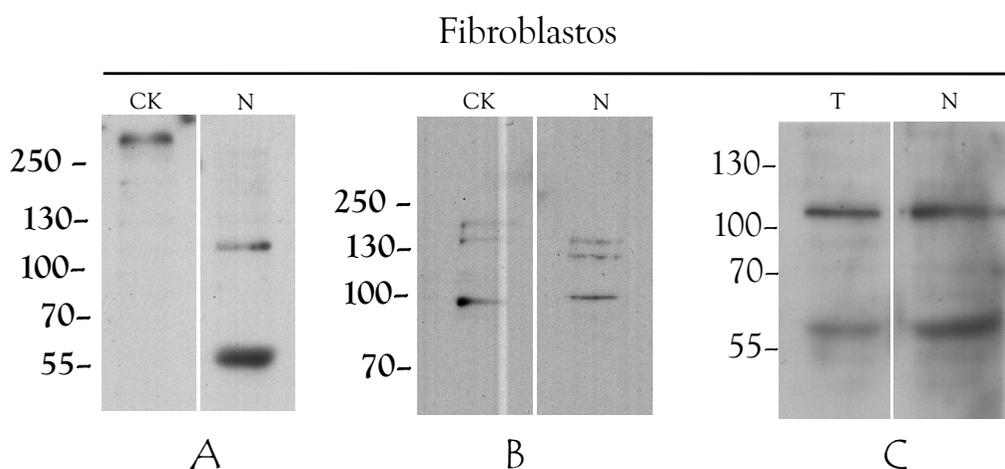


Figura 1.6: Western blot sobre diferentes lisados celulares con el AcMo GG3B2.2F7 (A), GG8H3.1C9 (B) y GG14B3.1E9 (C). SDS-10% PAGE en condiciones reductoras. T: lisado total; CK: fracción de proteínas del citoesqueleto, N: fracción de proteínas del núcleo.

Cuando se analizaron los 3 AcMo los resultados no fueron muy decisivos al testarlos con células NTERA-2/D1, n2102Ep, D3 y leucocitos humanos, sin embargo cuando se analizaron con diferentes fracciones celulares de fibroblastos sí que se obtuvieron una serie de bandas.

En la figura 1.6A correspondiente al anticuerpo **GG3B2.2F7**, se pueden observar diferentes bandas, en la fracción de proteínas del citoesqueleto se observa una banda mayor de 250 KDa, sin embargo cuando observamos la fracción de proteínas del núcleo vemos dos bandas, una alrededor de 120 KDa y otra alrededor de 60 KDa.

En la figura 1.6B correspondiente al anticuerpo **GG8H3.1C9**, se observan en este caso diferentes bandas, una banda de 100 KDa y otra de 130 KDa que comparten tanto la fracción proteica del citoesqueleto como la fracción proteica del núcleo, y dos bandas que no comparten los dos lisados como una banda de aproximadamente 150 KDa en la fracción de proteínas del citoesqueleto y otra de 120 KDa en la fracción de proteína del núcleo.

El AcMo **GG14B3.1E9** presentaba dos bandas una de aproximadamente 110 kDa y otra de 60 kDa. En este caso coincidían ambas bandas en las fracciones proteínas, la total y la nuclear (figura 1.6C).

Posteriormente y mediante citometría de flujo se analizó la expresión relativa del antígeno reconocido por cada anticuerpo monoclonal. Todos los anticuerpos fueron intracelulares y positivos en todas las líneas celulares que se testaron, tanto en células troncales embrionarias humanas, como de carcinoma de humano y de ratón (figura 1.7).

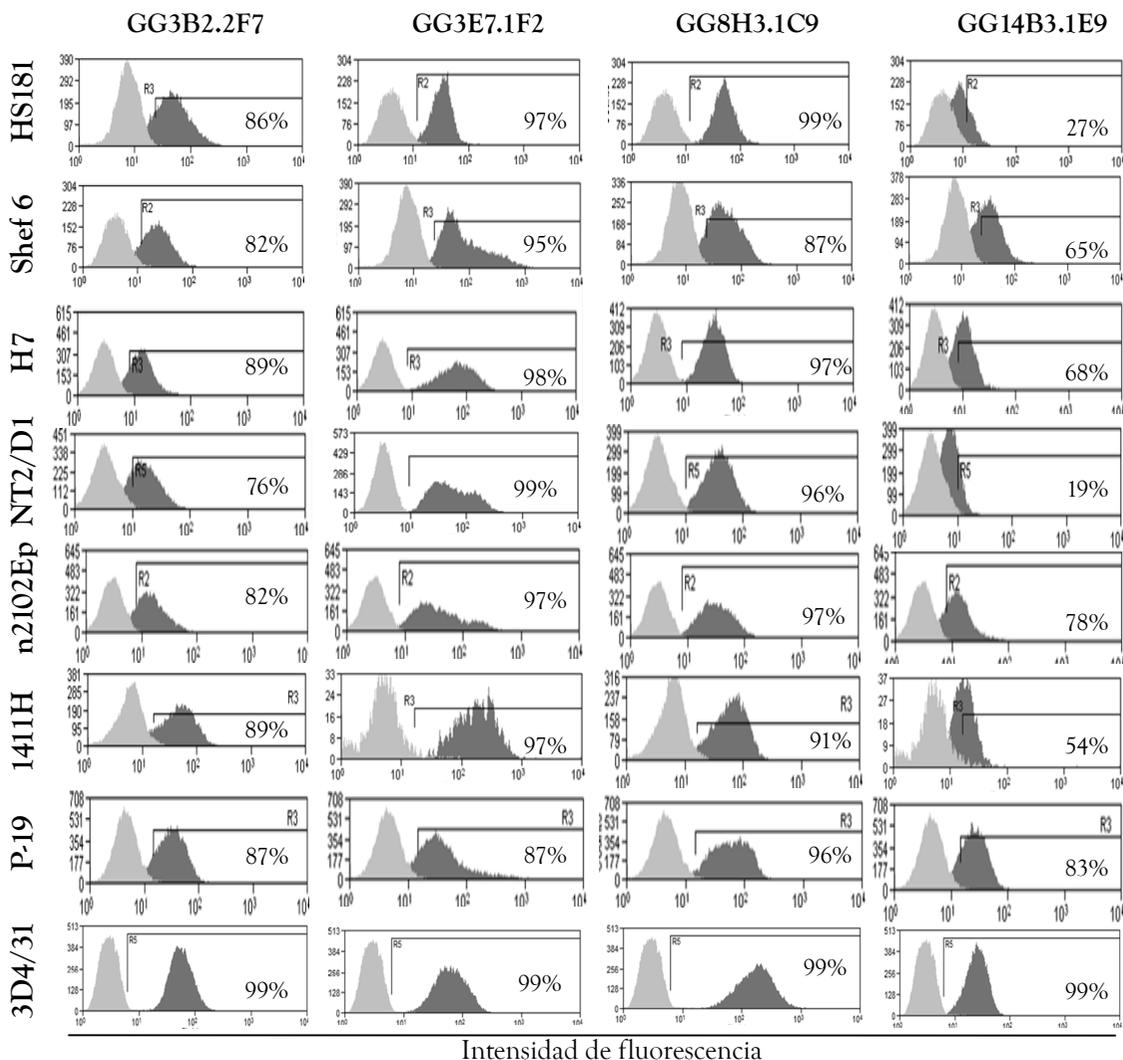


Figura 1.7: Citometría de flujo de los AcMo GG3B2.2F7, GG3E7.1F2, GG8H3.1C9 y GG14B3.1E9 frente a diferentes líneas celulares. Análisis de expresión en células troncales embrionarias humanas HS181, Shf-6 y H7, en células de carcinoma humano n2102Ep, 1411H y carcinoma de ratón P-19, células porcinas 3D4/31. El histograma gris corresponde con el control negativo.

En **GG3B2.2F7** la expresión oscila entre un 81 y un 89%, en **GG3E7.1F2** es de un 100% aproximadamente al igual que en **GG8H3.1C9** y en **GG14B3.1E9** la expresión fue muy variable oscilando entre un 27 y un 83%. La intensidad media de fluorescencia (IMF) en todos los casos fue la misma para cada anticuerpo, menos en el caso de GG3E7.1F2 que se observó un aumento considerable cuando se expresaba en la línea de carcinoma 1411H, oscilando entre 50 y 80 en todas la líneas donde se testó y de 180 cuando se trataba de células 1411H.

También se analizó la expresión en diferentes subpoblaciones celulares de sangre periférica, realizando un doble marcaje. Con respecto a la subpoblación de linfocitos, representada por las células CD3+, vemos que no todas las células expresan el antígeno reconocido por los diferentes AcMo. Si observamos la población de monocitos (CD14+) ocurre lo mismo, no todos los monocitos son doble positivos, sin embargo en el caso de las plaquetas (CD41a+) vemos que en el caso de GG3B2.2F7 y GG8H3.1C9 todas son dobles positivas (figura 1.8).

Tras estudiar los resultados que se obtuvieron en citometría de flujo, donde, por ejemplo en GG3E7.1F2 se pueden apreciar en algunas líneas celulares dos subpoblaciones diferentes (figura 1.7) y una mayor IMF en la línea 1411H, nos preguntamos si las dos subpoblaciones se expresarían de igual manera en células en diferentes estados de diferenciación. Para ello se realizó citometría de flujo con la línea NTERA-2/D1 incubada con ácido retinoico en diferentes tiempos para ver al reactividad del AcMo. Esto mismo se realizó con el resto de AcMo del grupo. Los resultados que se obtuvieron se muestran en el figura 1.9.

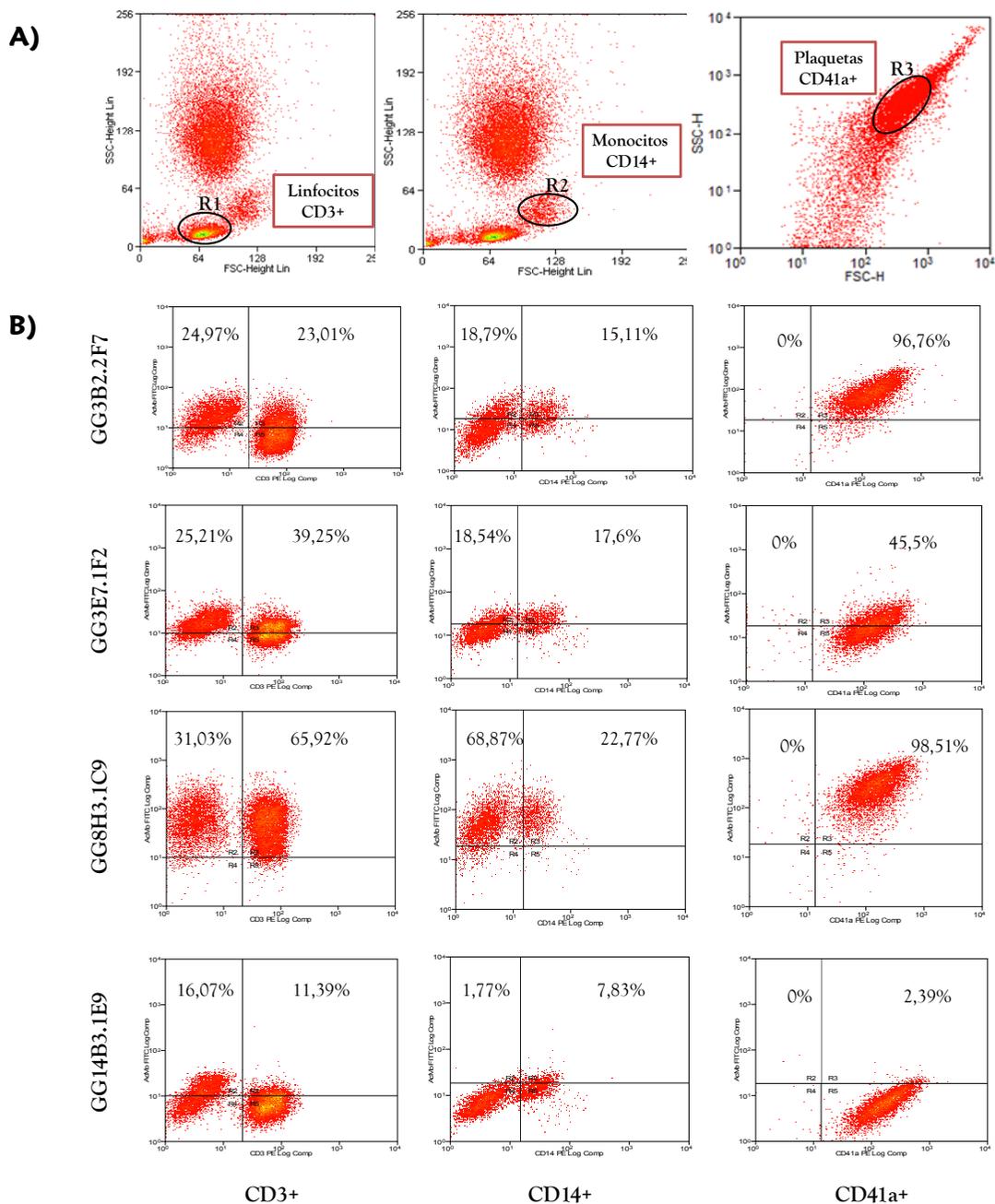


Figura 1.8: Citometría de flujo de los AcMo GG3B2.2F7, GG3E7.1F2, GG8H3.1C9 y GG14B3.1E9 frente a células sanguíneas. **A)** Esquema representativo de las subpoblaciones que se han testado, R1 (linfocitos), R2(monocitos) y R3 (plaquetas). **B)** Doble marcaje de linfocitos sanguíneos (CD3+), monocitos (CD14+) y plaquetas (CD41a) con cada anticuerpo.

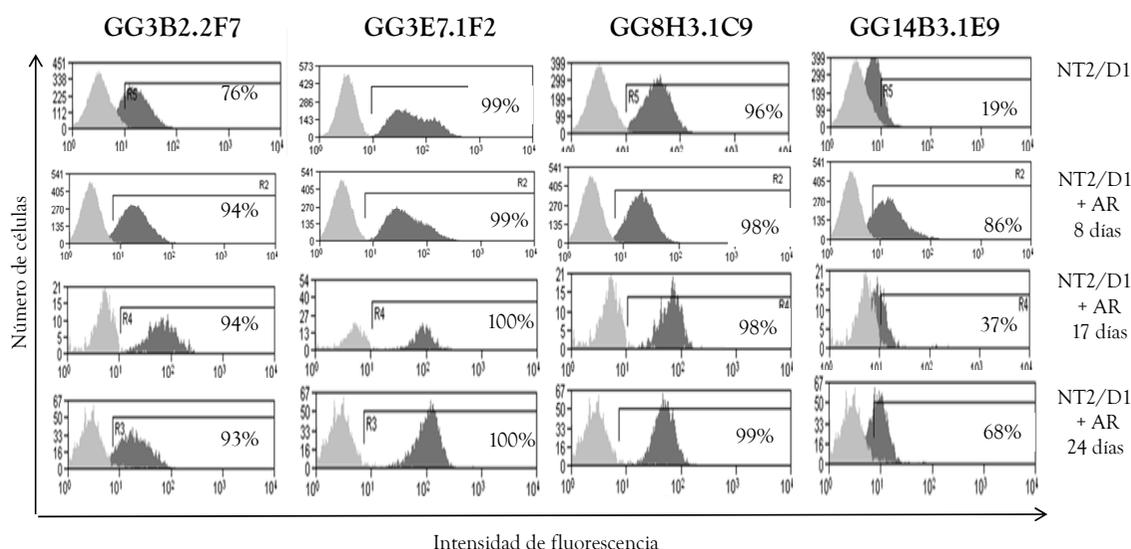


Figura 1.9: Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de los antígenos reconocidos por GG3B2.2F7, GG3E7.1F2, GG8H3.1C9 y GG14B3.1E9 en diferentes estados de diferenciación celular. El histograma gris tenue corresponde con el control negativo. NT2/D1: células de carcinoma embrionario humano, AR: ácido retinoico.

En el caso de **GG3B2.2F7** se observa que la expresión es similar en los 4 estados y la IMF fue similar también. En **GG3E7.1F2** observamos que el resultado es del 100% de expresión tanto en las células NTERA-2/D1 sin y con ácido retinoico en diferentes días y como consecuente en diferentes estados de diferenciación. Sin embargo, como se observó en la figura 1.7, aparecen dos subpoblaciones tanto en células NTERA-2/D1 sin ácido retinoico y en células NTERA-2/D1 con ácido retinoico a los 8 días.

El AcMo **GG8H3.1C9** presenta una expresión constante del 100% y sin cambios en la IMF. Y por último el AcMo **GG14B3.1E9** presenta una expresión variable en los cuatro tiempos (19-86%) y una IMF similar. Por tanto en ninguno de los cuatro casos el antígeno reconocido estaría relacionado con procesos de diferenciación celular.

Posteriormente y con la finalidad de poder localizar mejor al antígeno reconocido por cada anticuerpo en la célula, se realizó inmunocitoquímica con las líneas embrionarias humanas HS181 y Shef-6 y 1411H. A continuación se presentan los resultados obtenidos de cada AcMo.

En la figura 1.10 se muestran los resultados del AcMo **GG3B2.2F7** y como se observa el antígeno se localizaría en el citoplasma y núcleo, pero si observamos la figura 1.8A más detenidamente, no todas las células se marcan, hay un porcentaje del 80% que están marcadas y aproximadamente un 20% de las células que no se marcan. Sin embargo cuando observamos la figura 1.8B, que corresponde a la línea Shef-6, el 100% de las células se marcan. Este resultado podría ser debido a la metodología utilizada en el caso de HS181, en la cual quizás no se permeabilizó la célula de manera adecuada.

Posteriormente se realizó inmunocitoquímica con el AcMo **GG3E7.1F2**, y al observar las imágenes en la figura 1.11, vemos que se marcan tanto el citoplasma como el núcleo, aunque los núcleos en el caso de los fibroblastos (figura 1.11B) se marcan con más intensidad que el resto de la colonia celular.

En el caso del AcMo **GG8H3.1C9** se analizaron las líneas HS181, Shef-6 y 1411H. Analizando las que se muestran en la figura 1.12 observamos lo siguiente: en las colonias de células HS181 (figura 1.12A) la cuales fueron cultivadas sobre matrigel, el AcMo solo lo vemos en el núcleo de las células. Al igual ocurre con las células 1411H (figura 1.12B). Sin embargo en las colonias de células Shef-6 donde se cultivaron sobre una matriz de fibroblastos, en las células solo vemos marcado el núcleo (figura 1.12C1) pero en los fibroblastos se marca también el citoplasma (figura 1.12C2)

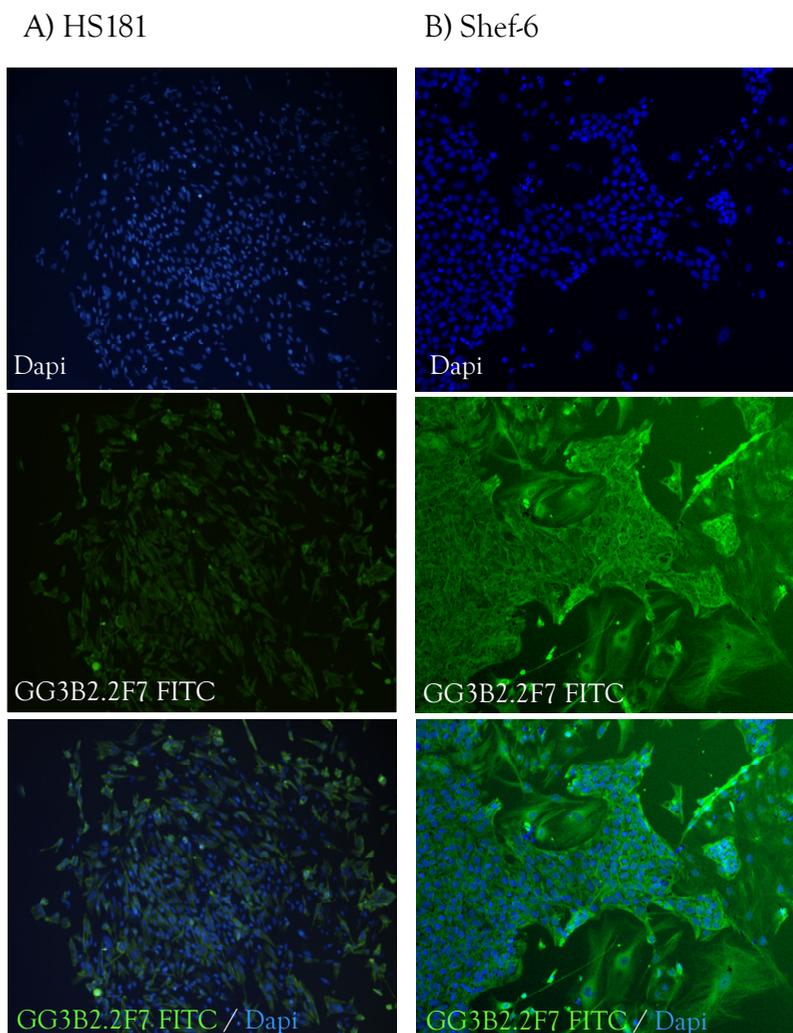


Figura 1.10: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG3B2.2F7 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. Se realizó sobre dos líneas HS181 (**A**) y Shef-6 (**B**). El AcMo GG3B2.2F7 se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

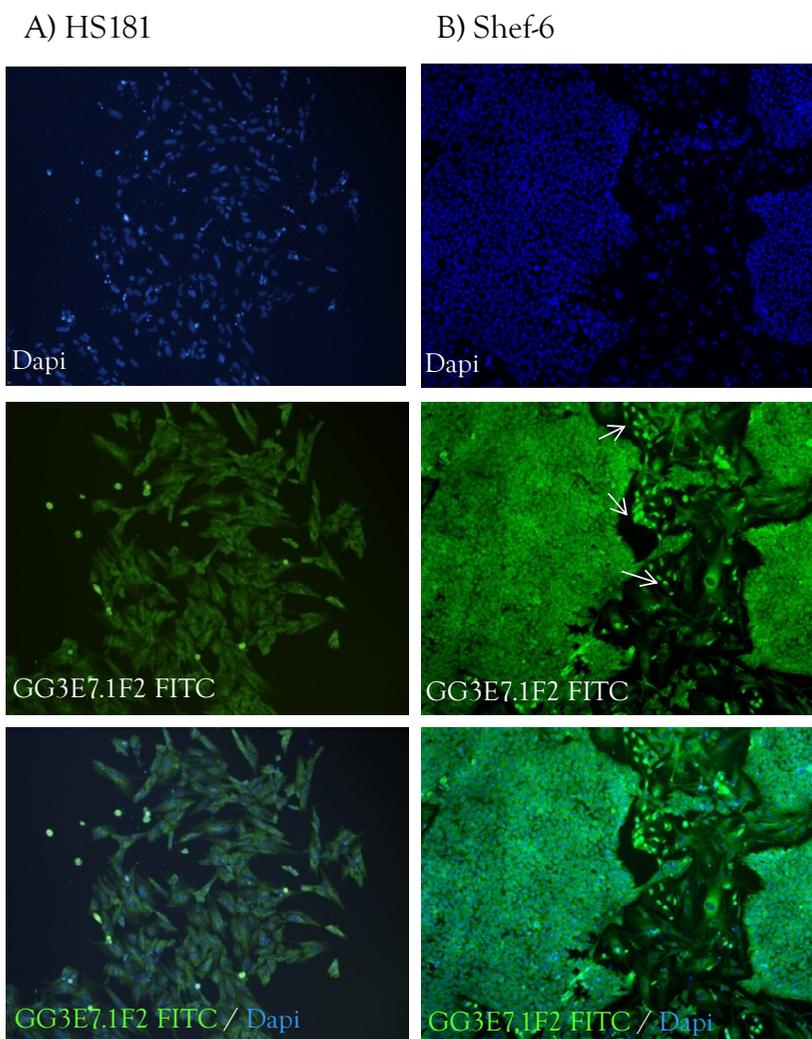


Figura 1.11: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG3E7.1F2 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. Se realizó sobre dos líneas HS181 (A) y Shef-6 (B). El AcMo GG3E7.1F2 se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

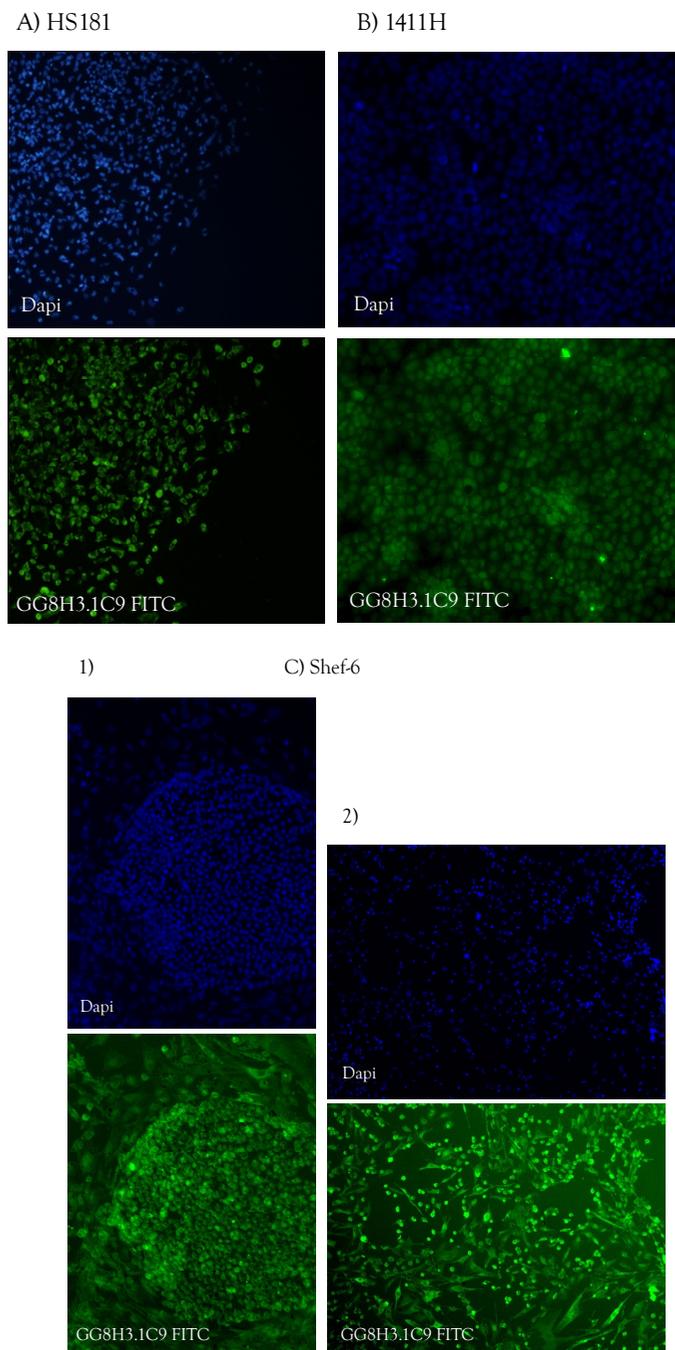


Figura 1.12: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG8H3.1C9 por inmunocitoquímica. Se realizó sobre dos líneas de células troncales embrionarias HS181 (A) y Shef-6 (C) y sobre una línea de carcinoma 1411H (B). Diferentes secciones de una colonia de Shef-6 (C1 y C2). El AcMo GG8H3.1C9 se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

El AcMo **GG14B3.1E9** se testó con HS181 y con Shef-6 y los resultados mostraron que marcada tanto el citoplasma como el núcleo (figura 1.13).

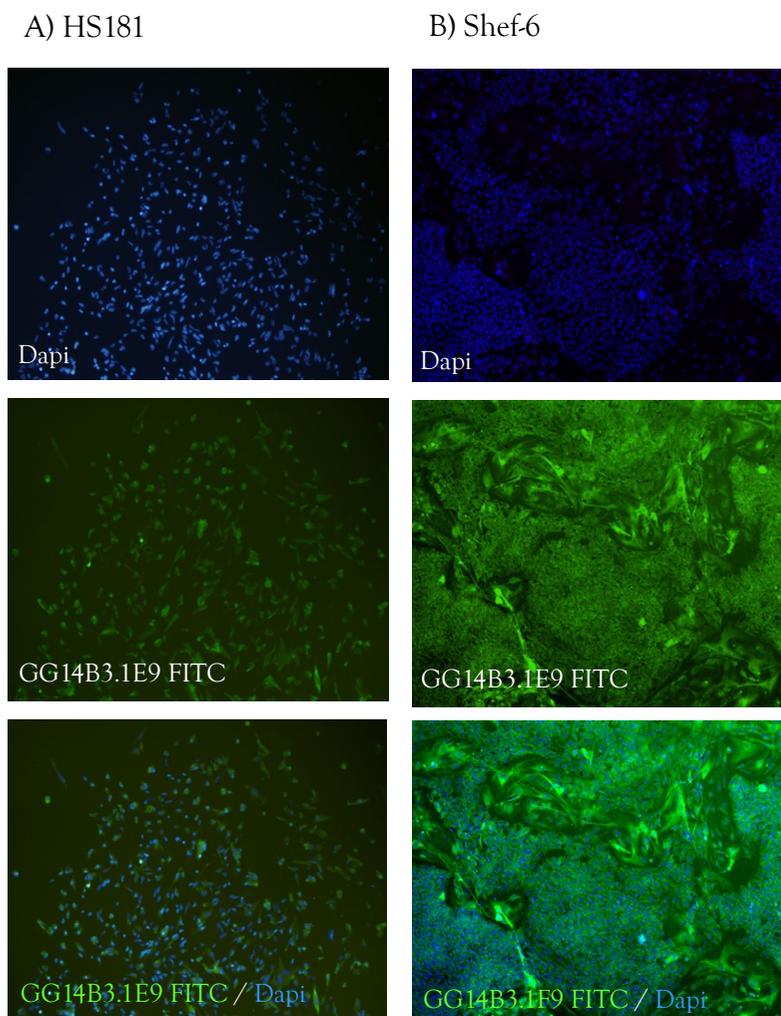


Figura 1.13: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG14B3.1E9 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. Se realizó sobre la línea HS181 (**A**) y Shef-6 (**B**). El AcMo GG14B3.1E9 se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

2.2.2 GRUPO U: GG1H2.1B3, GG3H5.1C4, GG4B3.1B6, GG4C10.1C3, GG6E10.1D7, GG6E7.1E9, GG8F3.1A2, GG8H11.1B2, GG9E2.1E5 y GG11D8.1D6: Reconocen todas las líneas testadas pero no células sanguíneas

Los anticuerpos de este quinto grupo se caracterizan por reconocer una molécula presente en todas las líneas analizadas menos en células sanguíneas. Su característica principal es que su expresión es muy variable en citometría de flujo, encontrando resultados muy dispares incluso en la misma línea celular. Este grupo de anticuerpos es por tanto difícil de caracterizar, ya que el antígeno no se expresa de manera constante en ningún caso. Se presentarán los resultados obtenidos de cada anticuerpo monoclonal y se analizarán con mas detalles los obtenidos por le AcMo GG8F3.1A2 por su especial comportamiento.

En primer lugar y para obtener el peso molecular del antígeno reconocido por cada uno de los anticuerpos monoclonales del grupo, se realizó Western blot sobre diferentes lisados proteicos. En los anticuerpos de este grupo encontramos que en la mayoría no había bandas claramente diferenciadas, con lo que no se pudieron determinar y solo en 3 de ellos, GG3H5.1C4, GG9E2.1E5 y GG11D8.1D6 encontramos alguna o varias bandas positivas. Se utilizaron lisados proteicos de distintas líneas celulares y células, de las cuales a su vez, en algunos casos, se obtuvieron diferentes fracciones (citoplasma, citoesqueleto y núcleo). NTERA-2/D1, n2102Ep y fibroblastos fueron fraccionados y la línea celular D3 y leucocitos humanos se obtuvo utilizó el lisado total. Todos los anticuerpos fueron testados con todos los lisados disponibles, en la figura 1.14 se muestran los resultados obtenidos.

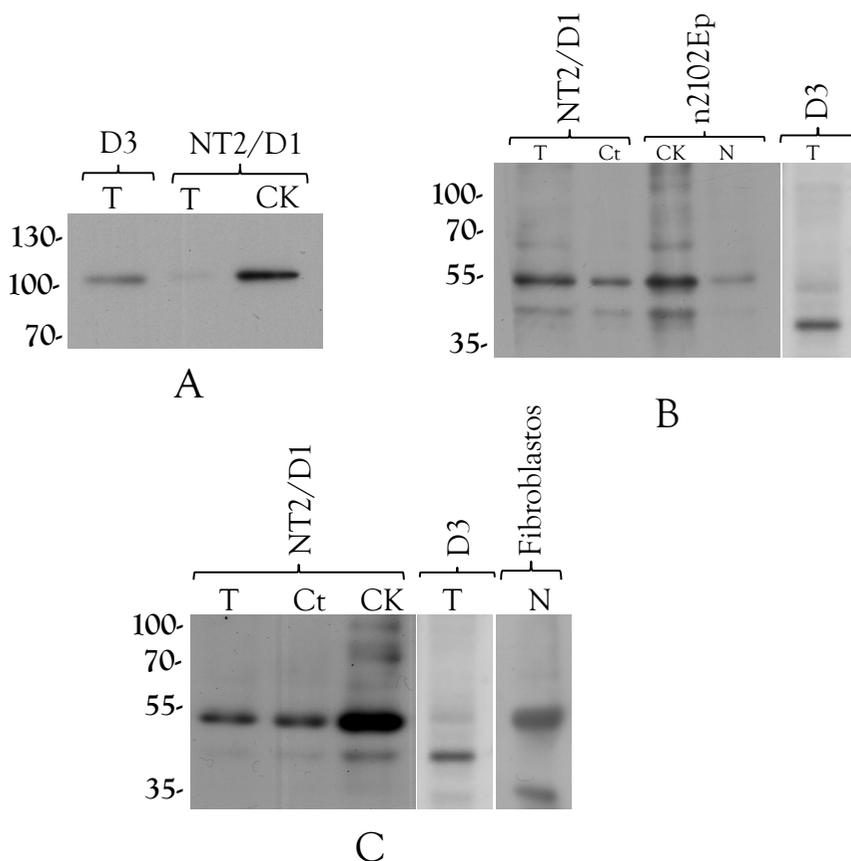


Figura 1.14: Western blot sobre diferentes lisados celulares con el AcMo GG3H5.1C4 (A), GG9E2.1E5 (B) y GG11D8.1D6 (C). SDS-10% PAGE en condiciones reductoras. T: lisado total; CK: fracción de proteínas del citoesqueleto; Ct: fracción de proteínas del citoplasma; N: fracción de proteínas del núcleo.

Los resultados en el AcMo **GG3H5.1C4** muestran una banda de alrededor de 100 KDa en células NTERA-2/D1 (fracción total de proteínas y fracción de proteínas del citoesqueleto) y D3 (fracción total de proteínas) (Figura 1.14A).

En el caso del AcMo **GG9E2.1E5** (figura 1.14B) se observan dos bandas de 55 kDa en células NTERA-2/D1 (fracción total y fracción citoplasmática de proteínas), n2102Ep (fracción del citoesqueleto y fracción del núcleo de proteínas) y de 45 kDa en D3 (fracción total de proteínas).

En la figura 1.14C, se muestran los resultados del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal **GG11D8.1D6**. En este caso se observan diferentes bandas dependiendo del lisado proteico. En el caso de lisado proteico total, citoplasmático y del citoesqueleto de las células de carcinoma NTERA-2/D1 observamos una banda de 50 KDa. En el caso del lisado proteico total de células D3 la banda que se observa es de 45 KDa. Y por último en lisado de proteico de núcleo en fibroblastos observamos dos bandas, una de 50 KDa que coincide con la banda observada en células NTERA-2/D1 y otra de 35 KDa.

Por citometría de flujo se analizó la expresión relativa del antígeno reconocido por cada anticuerpo monoclonal. Todos los anticuerpos fueron intracelulares y como se comentaba al principio la expresión no fue constante en los diferentes ensayos con las diferentes líneas testadas (células embrionarias humanas, células de carcinoma de humano y ratón y células porcinas). En la tabla 1.4 se muestran los resultados obtenidos de cada AcMo y se expresan en rango de expresión.

Posteriormente y con la finalidad de poder localizar mejor al antígeno reconocido por cada anticuerpo en la célula, se realizó inmunocitoquímica con las líneas embrionarias humanas HS181 y Shef-6 y 1411H. En la mayoría de los AcMo la expresión fue débil (datos no mostrados) menos en el caso de tres de ellos, GG6E7.1E9, GG9E2.1E5 y GG11D8.1D6, en el que el marcaje fue fuerte. El AcMo GG8F3.1A2 por sus características especiales se comentará al final del capítulo.

AcMo	Expresión en diferentes líneas celulares	AcMo	Expresión en diferentes líneas celulares
GG1H2.1B3	0 – 96,51	GG7E5.1B6	0 – 44,92
GG3H5.1C4	2,1 – 64,15	GG8F3.1A2	3,3 – 40,27
GG4B3.1B6	0 – 85,05	GG8H11.1B2	0 – 93,65
GG4C10.1C3	7,1 – 85,77	GG9E2.1E5	25,25 – 98,74
GG6E10.1D7	0 – 98,67	GG11D8.1D6	26,39 – 99,03
GG6E7.1E9	1,22 – 15,35		

Tabla 1.4: Reactividad de los AcMos con diferentes líneas celulares por citometría de flujo. Los datos se expresan como rango de expresión.

Los anticuerpos **GG9E2.1E5** y **GG11D8.1D6** muestran un marcaje citoplasmático y nuclear en ambas líneas testadas, HS181 y Shef-6 (figura 1.15 y 16). Hasta el momento y con los datos que se recopilaban, se pensó que estos dos anticuerpos estaban reconociendo el mismo antígeno, pero al parecer por las imágenes mostradas en inmunocitoquímica no es así, ya que GG11D8.1D6 parece marcar más fuertemente la zona del núcleo que de citoplasma y GG9E2.1E5 parece que marca más la zona del citoplasma.

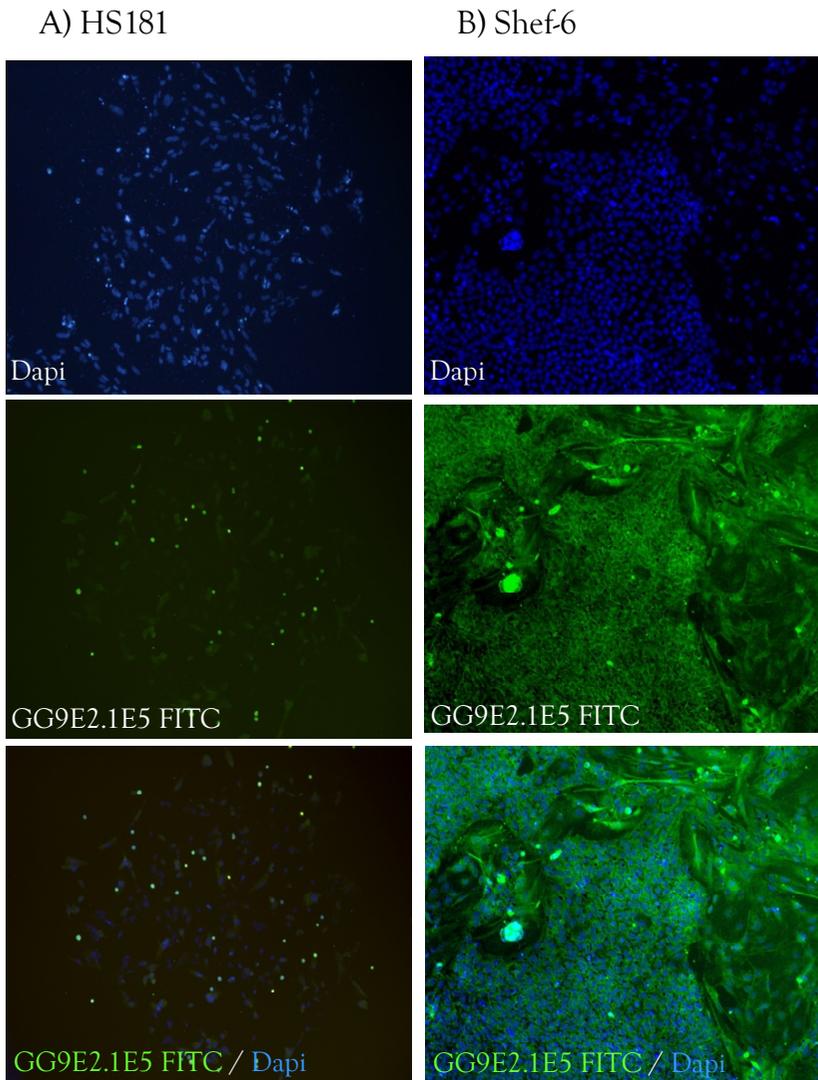


Figura 1.15: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG9E2.1E5 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. Se realizó sobre la línea HS181 (A) y Shef-6 (B). GG9E2.1E5 se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó. Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

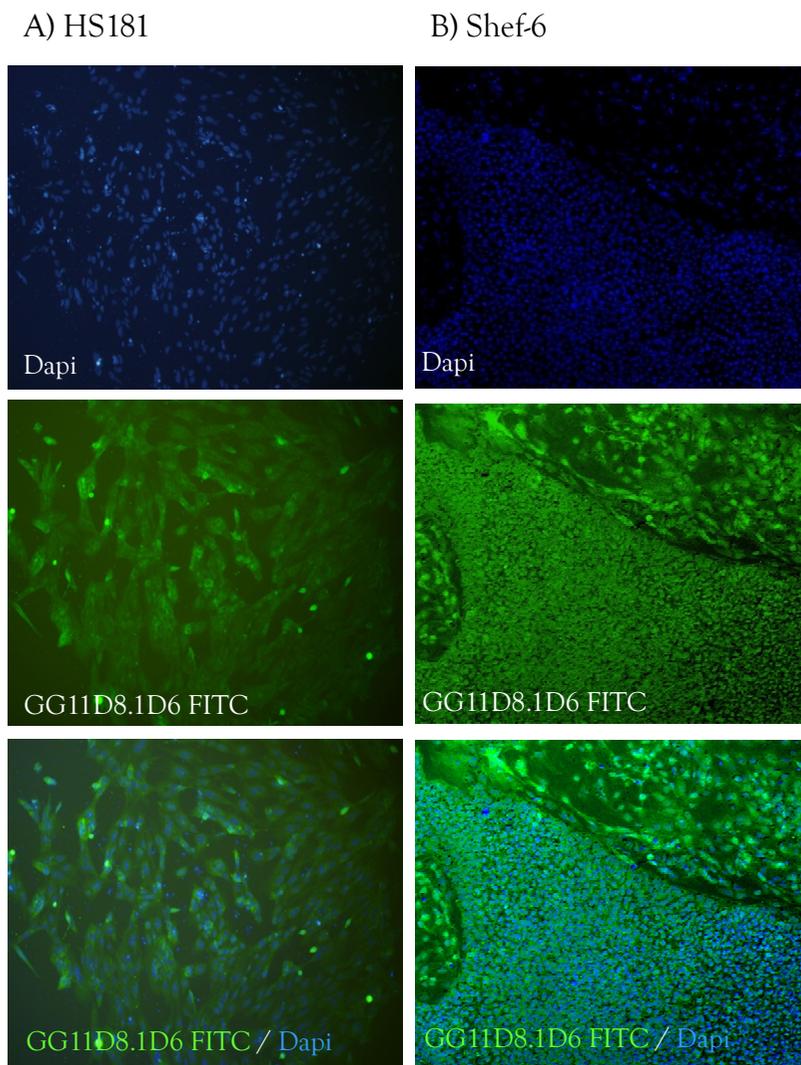


Figura 1.16: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG11D8.1D6 con células troncales embrionarias humanas por inmunocitoquímica. Se realizó sobre la línea H5181 (A) y Shef-6 (B). GG11D8.1D6 se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó. Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

Con respecto al AcMo **GG6E7.1E9**, nos llamó la atención la morfología de la colonia, ya que un gran porcentaje de ella presentaba células redondeadas, que corresponderían con una morfología típica de células apoptóticas. Se amplió la imagen para ver mejor el marcaje (figura 1.17 b,c,d,e) y confirmamos que las células por una razón desconocida estarían en un estado apoptótico. En la figura 1.18 más ampliada, observamos los núcleos marcados con DAPI, donde las células muestran condensación y empaquetamiento de la cromatina. Se podría afirmar que este AcMo estaría marcando células en estado apoptótico. Esto explicaría el resto de resultados de citometría de flujo (tabla 1.4) donde el porcentaje de expresión es nulo o muy bajo y los resultados negativos de Western blot, ya que estas células no se encontraban en estado de apoptosis. Podríamos concluir por tanto, que el AcMo GG6E7.1E9 posiblemente esté reconociendo algún epítipo o neoepítipo presente en estas células apoptóticas.

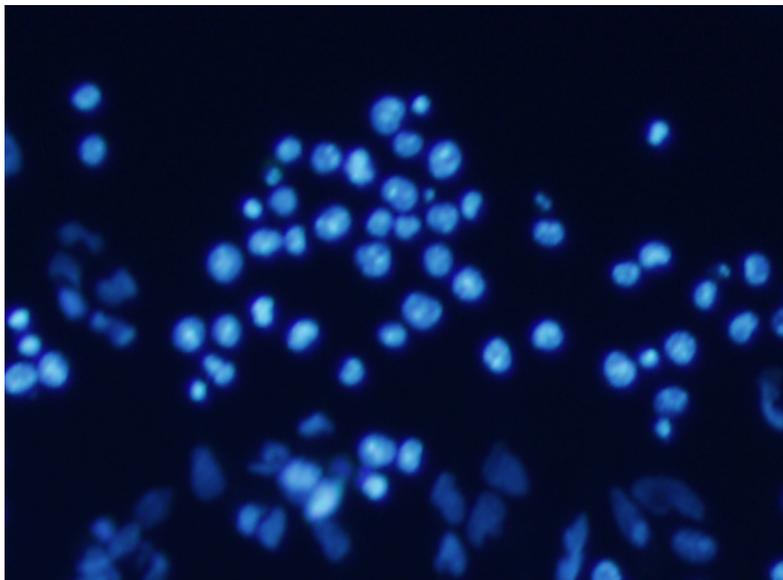


Figura 1.18: Núcleos fragmentados en células en apoptosis. Los núcleos están marcados con DAPI.

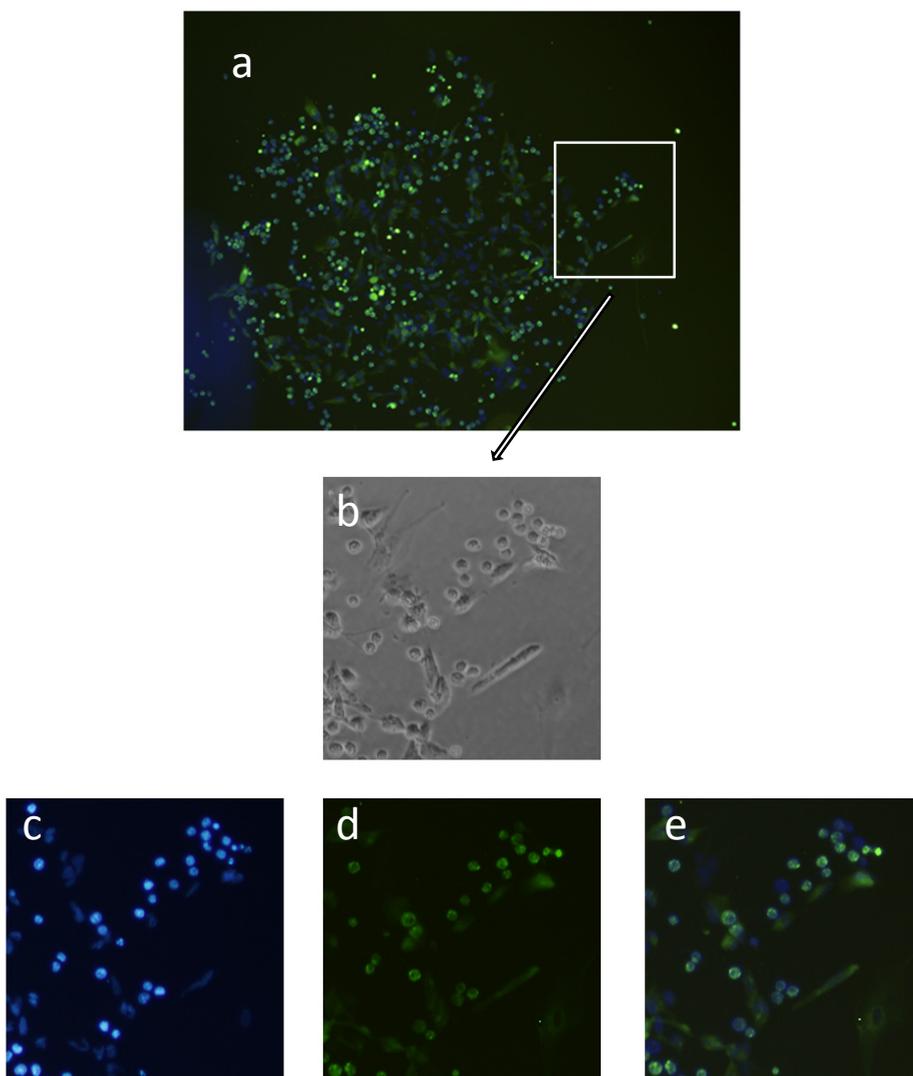


Figura 1.17: Reactividad del AcMo GG6E7.1E9 con células troncales embrionarias H9iPS por inmunocitoquímica. **(a)** y **(e)** corresponden a la composición de la imagen con FITC **(d)** y DAPI **(c)**. Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

El AcMo **GG8F3.1A2** cuando se testó con células embrionarias humanas por inmunocitoquímica, se observó que marcaba las colonias débilmente (imagen no mostrada). Tampoco tiene resultados positivos en Western blot, aunque por citometría de flujo, aunque variable, en algunas ocasiones si vimos una mayor expresión (tabla 1.4). En una de las ocasiones en las cuales se hizo citometría con la línea HS181, se visualizaron las muestras en un microscopio de fluorescencia y en el caso concreto de este anticuerpo vimos que no se marcaban todas las células la muestra, sino que solo se marcaba un pequeño porcentaje de ellas, las cuales presentaban una morfología diferente, en las que el citoplasma era muy grande y contenía un número de vacuolas elevado (figura 1.19). Esto nos hizo pensar que reconocía un antígeno que solo estaría presente en este tipo de células.

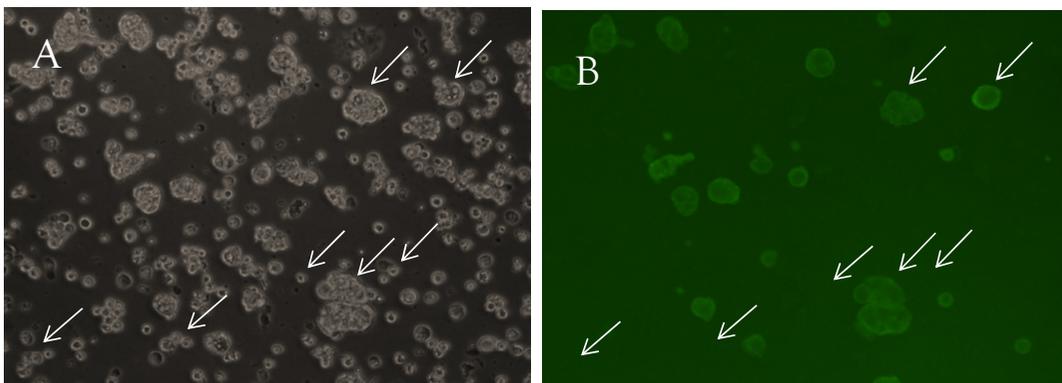


Figura 1.19: Inmunocitoquímica en suspensión de la línea HS181 incubada con el AcMo GG8F3.1A2. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC, A) Campo claro de células en suspensión, B) células reconocidas por el AcMo marcado en FITC. Las flechas indican un grupo de células marcadas y el marcaje de células individuales.

3. DISCUSIÓN

En primer lugar haríamos notar que la gran mayoría de los anticuerpos obtenidos son de clase M. Este fenómeno se debería principalmente al inmunógeno empleado y no al número de inmunizaciones. La utilización de un extracto celular de la línea embrionaria HS181 implica la no existencia de proteínas con una expresión dominante (glicoproteínas de membrana) y presentes en las células diferenciadas, por tanto, cada inmunización (hasta 6 realizadas en la tercera fusión) daba lugar a la presentación por parte de las células presentadoras de antígenos de un nuevo conjunto de epítomos sin permitir el proceso de maduración celular que llevaría a la producción de inmunoglobulinas de clase G.

En la experiencia de nuestro laboratorio, en la inmunización con extractos celulares de células polimorfonucleares (PBMC) se generaban una mayoría de anticuerpos contra sus proteínas de membrana más abundantes e inmonógenas, por ejemplo integrinas. Los anticuerpos de clase M son, por tanto, el resultado de una primera respuesta inmune, su forma pentamérica se caracteriza por una escasa afinidad y una muy fuerte avidéz por su epítomo lo que favorece los procesos de reacción cruzada que se han observado en anticuerpos de este capítulo.¹⁰

El escaso número de anticuerpos específicos para la línea celular utilizada como inmunógeno, HS181, muestran la dificultad de conseguir anticuerpos capaces de reconocer moléculas específicas de líneas celulares embrionarias humanas. Hemos utilizado un inmunógeno complejo como es el extracto de la línea HS181 y se ha seguido el protocolo propuesto por otros autores, véase Son et al (2005) (Son et al 2005) y Choo A.B. et al (2008) (Choo et al 2008). Con

¹⁰ http://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin_M

un inmunógeno y un protocolo similar estos autores obtuvieron algún anticuerpo (dos) capaces de reconocer marcadores de las células embrionarias como el HSPA8 y Podocalyxin-like protein-1 respectivamente. En nuestro trabajo se han obtenido dos anticuerpos (**GG13B5.1B3 y GG5B6.1F9**) que son específicos de las células HS181 y, sin embargo, no reaccionan con otras líneas celulares embrionarias (Shef-6, H7), figura 1.2. Estos datos permitirían avanzar la hipótesis de que las moléculas reconocidas no tienen relación con la capacidad pluripotencial de HS181, ya que esta capacidad pluripotencial debería ser común a otras líneas. Pensamos que reconocerían una molécula o moléculas específicas del estado de diferenciación de algunas células HS181, ya que, además, sólo un porcentaje de ellas resultan positivas. Más estudios se hacen necesarios para determinar la molécula reconocida. Un aspecto a tener en cuenta podría ser que las células HS181 se encontrasen en un proceso de diferenciación particular o iniciando un proceso de apoptosis, ver más adelante.

Hemos separado en un grupo diferente a los anticuerpos **GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5** que reconocen una molécula específica de la línea HS181 y que además se expresa en células sanguíneas (figura 1.3). **GG3B5.1F4** se presenta en prácticamente todas las plaquetas, 82%, en tanto **GG3G12.1D5** sólo se presenta en un 46%. La diferencia de expresión en plaquetas indicaría que ambos anticuerpos reconocen moléculas distintas o epítomos distintos de la misma molécula. Dos hipótesis pueden ser adelantadas sobre el comportamiento de estos anticuerpos: la primera que las moléculas presentes en la línea HS181 son moléculas precursoras de otras moléculas, también presentes en algunas células sanguíneas humanas. Esta molécula o moléculas precursoras no se expresarían en el estado de indiferenciación en el que se encontrarían el resto de células embrionarias o de carcinoma estudiadas. Hay que tener en cuenta que HS181 fue cultivada en el CABIMER (Sevilla) y el resto de las líneas lo fue en el Department of Biomedical Science en la Universidad de Sheffield. La segunda hipótesis sería que el epítomo reconocido por los anticuerpos

GG3B5.1F4 y GG3G12.1D5 presenta reacción cruzada con un epítipo, posiblemente linear, presente también en las células sanguíneas, sin que dichas moléculas tengan relación funcional. Experimentos con células sanguíneas humanas y de otros animales podrían aclarar la característica de las moléculas reconocidas.

Un tercer grupo de anticuerpos, **GG1B6.1E2, GG1C6.1F5 y GG4E4.1D3**, parecen reconocer una molécula específica del estado de diferenciación de algunas células H5181, los resultados en citometría indicarían que la proporción de células que lo expresan es muy baja y por tanto será difícil determinar las características de la molécula o moléculas reconocidas.

Con respecto a los anticuerpos incluidos en el segundo bloque (grupo IV y grupo V) son algunos de los que tienen por característica principal la capacidad de reconocer moléculas presentes en varias líneas celulares o en todas las líneas celulares.

Los epítopos reconocidos por este grupo de anticuerpos se encuentran presentes en moléculas de todas las líneas celulares empleadas. Podríamos emitir la hipótesis de que estos anticuerpos reconocen estructuras tridimensionales similares. La repetición de estas estructuras en esos antígenos serían las responsables de estas reacciones. Otra explicación sería que estos anticuerpos reconocen una estructura tridimensional presente en diferentes moléculas, lo que significaría resultados de Western blot diferentes en cada línea, a ello lo que llamaríamos “reacción cruzada verdadera” (Kramer et al 1997; Bouvet & Dighiero 2000). Estas hipótesis serían aplicables a aquellos anticuerpos que por Western blot parecen reconocer una sola molécula en las líneas celulares en que se han analizado, caso de GG3H5.1C4.

Cuando los anticuerpos reconocen varias moléculas de distinto peso molecular y en el mismo individuo, es difícil admitir que estos anticuerpos

puedan estar reconociendo el mismo epítipo tridimensional en todas ellas. Esto último sucede con los anticuerpos **GG3B2.2F7**, **GG8H3.1C9** y **GG11D8.1D6** que reconocen por Western blot varias moléculas en la línea utilizada para el ensayo. En estos casos es más adecuado considerar que se trata de **anticuerpos polireactivos** y que su origen podría estar en los anticuerpos naturales del ratón y no en anticuerpos desarrollados tras la presencia del inmunógeno que se empleó (Guilbert et al 1985). En contraste con los típicos anticuerpos monoreactivos, que se unen sólo a un antígeno conocido, un anticuerpo polireactivo se une a varias moléculas seleccionadas al azar. Ver figura 1.1.

Diversos autores en su intento de generar anticuerpos monoclonales contra varios antígenos, entre ellos linfocitos humanos, han encontrado una importante proporción de anticuerpos contra componentes intracelulares de las células de ratón y además, sin relación alguna con los inmunógenos empleados (Strugnell et al 1983; Guilbert et al 1985; Underwood et al 1985). Cuando se hicieron fusiones con ratones sin inmunizar (Underwood et al 1985), la gran mayoría de las moléculas reconocidas eran intracelulares, sólo en un caso se desarrolló un anticuerpo que reconocía un receptor de células T. La casi inexistencia de anticuerpos naturales contra receptores de superficie podría indicar que los clones de células B productoras de anticuerpos contra estos receptores son eliminados en el proceso de maduración del sistema inmune, en tanto los clones que producen anticuerpos contra algunos antígenos intracelulares permanecen activos. La variedad de antígenos intracelulares reconocidos es muy amplia e incluye actina (los más abundantes), albumina, tubulina, transferrina, miosina, tiroglobulina y ADN de doble cadena (Dighiero et al 1983; Underwood et al 1985).

Strugnell en 1983 (Strugnell et al 1983), describe un anticuerpo monoclonal generado contra *Treponema pallidum* que reconocía también en las células humanas una molécula de 100 kDa que es compatible con una molécula

asociada a la actina (42 kDa) en células humanas. Uno de los anticuerpos descritos el GG3H5.1C4 reconoce una molécula de 100 kDa que podría ser similar a la descrita por este autor.

La hipótesis de que alguno de nuestros anticuerpos son polireactivos podría basarse en: 1º la capacidad para reconocer diversos antígenos no relacionados, 2º la capacidad que estos anticuerpos tienen para reaccionar con moléculas intracelulares y del núcleo incluso en individuos singénicos, genéticamente idénticos (Gould et al 1983; Underwood et al 1985; Vollmers & Brandlein 2006) y 3º la existencia en nuestro panel de AcMos de uno de ellos con isotipo de la clase IgA, una de las características de este grupo de anticuerpos polireactivos.

Todos los anticuerpos de este grupo reconocen moléculas intracelulares y del núcleo y son capaces de producir reacción con la línea embrionaria de ratón P-19. Dos de ellos además reconocen varias moléculas que están presentes en el citoplasma y núcleo, de todas las células analizadas, es el caso del GG3B2.2F7 y GG8H3.1C9. Uno el GG11D8.1D6 reconoce varias moléculas en el citoplasma y núcleo de todas las líneas celulares excepto en las células sanguíneas. Además estos tres anticuerpos reaccionan fuertemente con la línea embrionaria P-19 de ratón que sin ser singénica de la BALBb/c está genéticamente muy próxima.

El anticuerpo **GG14B3.1E9** que reconoce un epítipo en dos moléculas de 60 y 110 kDa presente en todas las líneas, no se ha considerado, por el momento, un anticuerpo polireactivo. Deberíamos probar, primero, que no reconoce las mismas moléculas que el anticuerpo descrito en el capítulo dos, y que reconoce un epítipo común en hnRNP K y PSF. Un estudio de competición serviría para conocer si GG14B3.1E9 reconoce también un epítipo común sobre hnRNP K y PSF.

Confirmar que GG3B2.2F7, GG8H3.1C9 y GG11D8.1D6 son verdaderos anticuerpos polireactivos escapa al objetivo de esta tesis doctoral ya que sería necesario secuenciar su ADN y conocer la secuencia de nucleótidos de la zona variable de las cadenas pesadas y ligeras (VH y VL) de las inmunoglobulinas y determinar si ha existido algún proceso de diferenciación somática en la célula B productora de los anticuerpos. Los anticuerpos polireactivos presentarían una zona CDR3 en la VH específica (Bouvet & Dighiero 1998; Notkins 2004).

A modo de resumen podemos indicar que a la vista de los datos los anticuerpos **GG3B2.2F7**, **GG8H3.1C9** y **GG11D8.1D6** podrían ser considerados anticuerpos polireactivos en tanto que **GG3H5.1C4** sería anticuerpo mono específico con reacción cruzada.

Otro anticuerpo que podría considerarse mono específico, aunque reaccione con todas las líneas celulares, sería el **GG9E2.1E5**, que reconoce una molécula de 55 kDa presente en el núcleo. En este caso no tenemos argumentos para considerarlo un anticuerpo natural polireactivo, ya que además de reconocer un epítipo presente en una sola molécula, está ausente en las células sanguíneas.

Si suponemos como cierto que sólo hay tres anticuerpos cuyo origen está en los llamados anticuerpos naturales esto representaría un 4,8% de hibridomas cuyo origen son células B productoras de estos anticuerpos naturales, porcentaje que se encuentra en el encontrado por otros autores y que se mueve entre el 2 y el 5% de los hibridomas (Guilbert et al 1985; Underwood et al 1985).

Los anticuerpos GG6E7.1E9 y GG8F3.1A2 pueden ser considerados anticuerpos mono específicos capaces de reconocer una molécula que está relacionada con los procesos de apoptosis y por tanto requerirían un estudio similar al realizado con el anticuerpo GG15H5.1D2 en el capítulo cuatro de esta tesis.

La existencia de varios anticuerpos que reconocen moléculas relacionadas con el proceso de apoptosis vendría a indicar que muchas de las células HS181 cuando fueron utilizadas como inmunógeno habían iniciado un proceso de apoptosis. Ello podría también explicar los resultados obtenidos con algunos anticuerpos de este capítulo; los clasificados como específicos de la línea HS181. La línea HS181 debe tener una mayor facilidad para iniciar el proceso de apoptosis en cultivo, al menos nuestros resultados así parecen indicarlo, que otras líneas de células embrionarias humanas y de ratón. Los resultados positivos de nuestros anticuerpos, en los ensayos de inmunocitoquímica y citometría de flujo, sólo con HS181, se podrían explicar si algunas de las células, en proporción variable, estuvieran iniciando el proceso de apoptosis. La diferencia en iniciar el proceso de apoptosis en cultivo de las distintas líneas de células embrionarias también explicaría los resultados negativos obtenidos por nuestros anticuerpos con estas otras líneas celulares, debido a que los anticuerpos reconocerían moléculas que sólo estarían presentes una vez iniciado el proceso de apoptosis, volveremos sobre el tema en la discusión final.

CAPÍTULO 2

**CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL GG6H9.1C3
QUE RECONOCE UN EPÍTOPO PRESENTE EN hnRNP K
(Heterogeneous Nuclear RibonucleoProtein K) Y PSF (Polypyrimidine
tract-binding protein-associated Splicing Factor)**

1. INTRODUCCIÓN

El núcleo es un orgánulo complejo en el cual ocurre un amplio rango de procesos, en los cuales para realizar este tipo de actividades están implicados sobre todo una serie de factores nucleares específicos. Por ejemplo, encontramos los denominados “splicing factor” relacionados directamente con unión a ARN y participación en actividades de “corte y empalme” de ARN. Por otro lado están los “transcription factor”, cuya actividad se centra en procesos de regulación y transcripción del ADN.

En células eucariotas, mientras muchas proteínas son transportadas desde el citoplasma al núcleo, los RNA son exportados del núcleo al citoplasma. El transporte del ARNr, ARNt y ARNm es un paso crítico en la expresión de los genes en las células eucariotas. El transporte es realizado a través de un complejo: RNA-proteína que puede estar presente tanto en el núcleo como en el citoplasma. Los pre mRNA y mRNA son asociados con unas proteínas formando un grupo de proteínas conocidas como: ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs), que se hallan implicadas en una variedad de procesos tales como empaquetamiento del ARN y transporte del ARN dentro del núcleo. Hasta la fecha, se han identificado unas 20 hnRNPs (desde la A hasta la U). Últimamente, este grupo de proteínas han atraído considerablemente la atención en la comunidad científica, evidenciándose su multiplicidad de funciones en biogénesis del ARNm, tráfico de ARNm citoplasmático y su participación en casi todas las etapas del ciclo de vida de ARNm, a partir de la transcripción, transformación, transporte, traducción, incluida su actividad como factores de transcripción (Moore 2005; Martinez-Contreras et al 2007).

Diferentes estudios de estas ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) evidencian que muchas de ellas (si no todas) se unen directamente a ARN a través de diferentes dominios estructurales tales como RBD (dominio de

unión a ARN) y RGG (dominio de unión a caja rica en arginina/glicina) (Gorlach et al 1993; Krecic & Swanson 1999).

HnRNP K, la mayor proteína de unión a poli(C), es a través de 3 motivos repetitivos de KH (homología K) con los cuales se une a los ácidos nucleicos. Todas las proteínas hnRNPs presentan dominios RBD o RGG, siendo la proteína la hnRNP K la que presenta un mayor número, 5 dominios RGG. Esta proteína es abundante en el núcleo pero también se encuentra en el citoplasma y en la mitocondria, implicada en numerosos procesos diferentes como remodelación de la cromatina, transcripción, empalme y procesos de traducción (Mandal et al 2001; Bomsztyk et al 2004).

HnRNP K, no solo interviene en procesos de regulación de traducción de ARNm, sino que también está implicada en controlar procesos como el ciclo celular, proliferación, diferenciación, regulación de genes, siendo considerada un factor de transcripción (Michelotti et al 1996). Concretamente, hnRNP K se une a la región promotora del protooncogén humano c-myc, el cual está implicado en potenciar la transcripción, proliferación celular, supervivencia y migración (Evans et al 2003). El papel de hnRNP K en cáncer está relativamente poco estudiado, sin embargo varias funciones celulares indican claramente que hnRNP K está involucrada en tumorigénesis. Un ejemplo de ello es el incremento de su expresión en varios tipos de cáncer en humanos: leucemia crónica, tumores sólidos como cáncer de mama, esófago, pulmón, nasofaringe, colorrectal y melanoma (Pino et al 2003; Ostareck-Lederer & Ostareck 2004; Carpenter et al 2006; Hatakeyama et al 2006; Sun et al 2007; Wen et al 2010). En este último caso, el incremento en la expresión de hnRNP K está relacionado directamente con una alta expresión de c-myc. Como podemos observar, hnRNP K está intrínsecamente relacionada con procesos cancerosos, utilizándose ya hoy en día como un marcador tumoral, en cáncer de mama, véase la patente (WO/2005/040810, Use of protein hnRNPK as marker for breast cancer), en leucoplasia oral (Matta et al 2009) y anemia aplásica (Qi et al 2010).

HnRNP K también está involucrado en el inicio de la propagación celular y migración, proceso esencial en la invasión tumoral y metástasis en cáncer, lo que hace que sea una diana perfecta en terapia avanzada para evitar dicho proceso (de Hoog et al 2004).

Por último hnRNP K ha sido relacionado con procesos anti apoptóticos ya que su inactivación favorece los procesos de apoptosis y por ello anticuerpos contra hnRNP K podrían ser utilizados como agentes terapéuticos para su tratamiento (Inoue et al 2007; Chen et al 2010; White et al 2010).

PSF, (Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor), es otra proteína imprescindible en el procesamiento del pre-ARNm. En la mayoría de los intrones de eucariotas superiores existe una región rica en polipirimidina, a la cual se le pueden unir varios factores, entre ellos el PSF.

PSF forma parte del espliceosoma, o complejo de corte y empalme, humano y fue identificada y caracterizada formando un complejo con PTB (también denominada hnRNP I). Se caracterizó como una proteína de 100 kDa con propiedades de unión a ARN y ADN localizada en el nucleolo y asociada a la membrana nuclear. Muchas proteínas nucleares interaccionan con los ácidos nucleicos con dominios para ADN o dominios para ARN, una excepción es la proteína PSF que posee ambos dominios (Patton et al 1993). PSF tiene un dominio de unión a ARN RGG, en lugar de cinco como hnRNP K y es probable que esté metilado y por tanto invalidado para unirse al ARN mediante este dominio (Shav-Tal & Zipori 2002).

PSF fue originalmente identificada como un factor esencial en el corte y empalme de ARN mensajero, “splicing”, de los eucariotas superiores mediante sus dos motivos útiles para reconocer al ARN (18). Posteriormente se descubrió su capacidad de unirse al ADN mediante dominio rico en Prolina/Glutamina (19). El PSF ha sido además implicado en múltiples procesos de la actividad

nuclear, entre los que se encontrarían: transcripción, actividad topoisomerasa, retención del ARN en el núcleo y recombinación del ADN (Peng et al 2002).

PSF contribuye a la represión de oncogenes y de genes como el P-450_{scc} (P-450 cholesterol side-chain cleavage) o 20,22-desmolase, miembro de una superfamilia de enzimas mitocondriales que controlan la conversión de colesterol a pregnenolona implicada en la vía de síntesis de esteroides (andrógenos, testosterona)(Song et al 2004). Estas funciones han llevado a la observación de que hay un aumento de la expresión de PSF en células del miometrio durante el embarazo y tiene capacidad de unirse al receptor de estrógenos (Tyson-Capper et al 2009).

Diferentes laboratorios y empresas comercializan anticuerpos que reconocen hnRNP K o PSF, pero hasta el momento no hay ningún anticuerpo monoclonal que reconozca un epítipo común entre hnRNP K y PSF.

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas del complejo de hnRNPs utilizando material purificado poly(a) procedente del núcleo y citoplasma de células Hela irradiadas con luz UV (Dreyfuss et al 1984). El primer anticuerpo monoclonal específico de la proteína K, clon 3C2, fue preparado por inmunización de ratones BALB/C con proteínas purificadas por cromatografía de afinidad con oligo(dC) (Matunis et al 1992). Más recientemente, se han producido otros anticuerpos monoclonales específicos frente a hnRNP K utilizando un péptido C-terminal o una secuencia interna de residuos de arginina no metilados conjugados con ovoalbúmina como inmunógeno (Carpenter et al 2006; Naarmann et al 2008).

También se han producido anticuerpos que reconocen PSF, algunos preparados frente a péptidos 1T25 y 1T13 después de unirlos a BSA (Patton et al 1993). Uno de los anticuerpos monoclonales disponibles se obtuvo utilizando como inmunógeno en ratones BALB/C un lisado celular de una línea de células endoteliales de tejido adiposo, además de una proteína de 49 kDa, dando

como resultado la unión con la proteína PSF en varios órganos (Lee et al 1996). Anticuerpos monoclonales que reconozcan una proteína de 100 kDa, como la proteína PTB, solo se han obtenido cuando se ha utilizado proteína recombinante PTB humana como antígeno (Grossman et al 1998).

En este capítulo se describe la caracterización de un anticuerpo monoclonal, GG6H9.1C3, obtenido mediante inmunización con células HS181, que reconoce específicamente hnRNP K y PSF.

2. RESULTADOS

2.1 Selección y determinación del isotipo

El AcMo GG6H9.1C3 fue seleccionado inicialmente por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a células troncales embrionarias humanas HS181. Posteriormente se determinó su isotipo, que fue IgMk.

2.2 Distribución celular del antígeno

El anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 fue seleccionado por reacción positiva en ELISA indirecto frente a células troncales embrionarias humanas HS181 y fibroblastos, como se ha descrito anteriormente. La distribución celular del antígeno se realizó en primer lugar por citometría de flujo y posteriormente por inmunocitoquímica.

2.2.1 Citometría de flujo

El resultado de citometría de flujo se representa como el porcentaje de fluorescencia, que produce el monoclonal unido, frente a las células control, sin anticuerpo. En primer lugar se hizo marcaje extracelular con la línea HS181, línea con la que se inmunizó a los ratones, siendo los resultados negativos. A continuación se procedió al marcaje intracelular, fijando y permeabilizando las células y los resultados fueron positivos.

Posteriormente se analizó la distribución celular sobre diferentes subpoblaciones de células troncales embrionarias humanas (Shef-6 y H7 (S6)), líneas de carcinoma humano (NTERA-2, n2102Ep, 1411H), líneas de carcinoma de ratón (P-19), subpoblaciones de leucocitos humanos (linfocitos, monocitos y plaquetas) .Los resultados se muestran en la figura 2.1.

Se observa en la figura 2.1A que la expresión del antígeno reconocido por el AcMo GG6H9.1C3 es de un 100% en todas las líneas celulares humanas, tanto en embrionarias como de carcinoma. Si miramos la expresión del antígeno con la línea celular Shef-6, parece como si hubiese dos poblaciones de células diferentes. Lo mismo ocurre en la línea de carcinoma P-19 de ratón y en el resto de líneas parece intuirse. Se observa también que es correactivo con ratón y porcino. También se analizó la expresión en diferentes subpoblaciones celulares de sangre periférica, realizando un doble marcaje. Con respecto a las subpoblaciones estudiadas, linfocitos (R1), monocitos (R2) y plaquetas (R3), vemos que todos expresan el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal (figura 2.1B).

Hay que destacar que el porcentaje de células positivas para el antígeno reconocido por el AcMo en las 8 líneas que se ha testado es el mismo, pero si observamos la intensidad media de fluorescencia de los histogramas cabe destacar que en la línea celular de carcinoma derivada del saco vitelino, 1411H, la IMF es mucho mayor, siendo 157 y en el resto de líneas oscila entre 30 y 80.

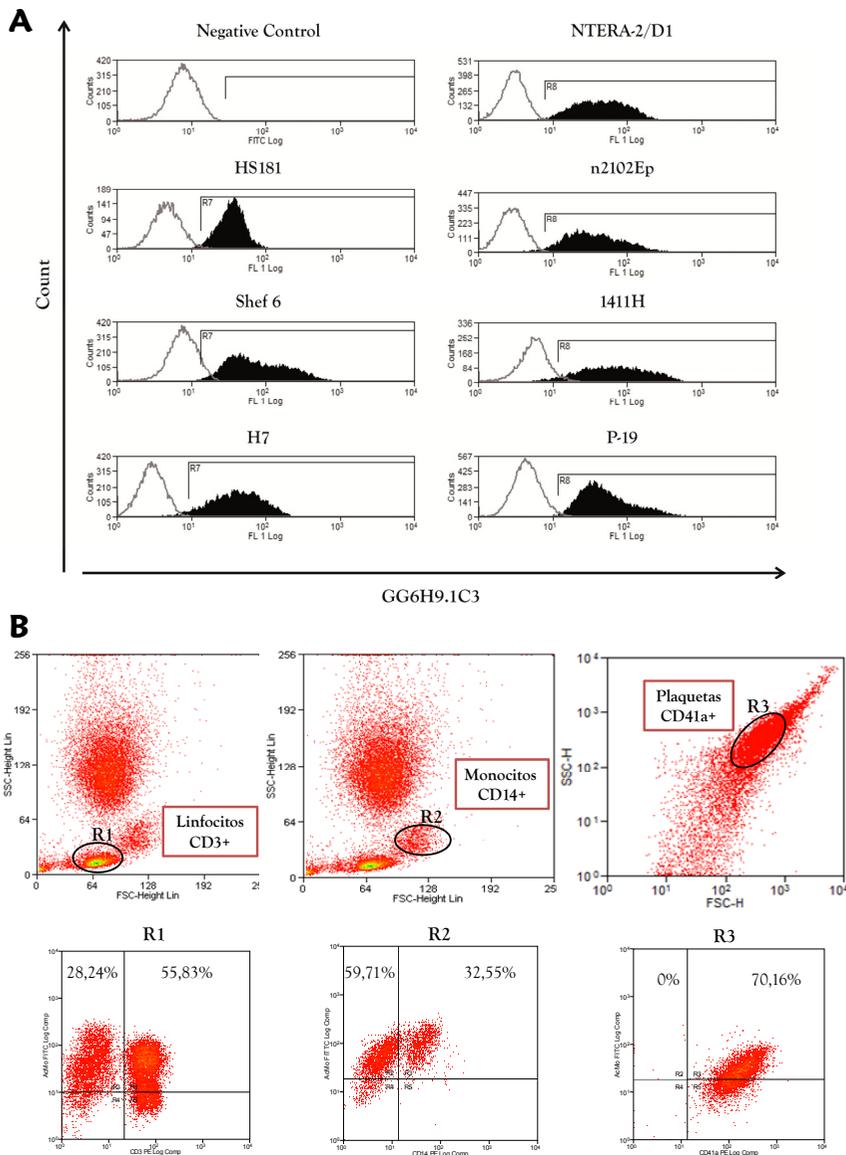


Figura 2.1: Citometría de flujo del anticuerpo GG6H9.1C3 frente a diferentes líneas celulares. **A)** Análisis de expresión en células troncales embrionarias humanas HS181, Shef-6 y H7, en células de carcinoma humano n2102Ep, 1411H, carcinoma de ratón P-19. **B)** Doble marcaje de linfocitos sanguíneos (R1), monocitos (R2) y plaquetas (R3). El histograma de línea gris de la figura A corresponde con el control negativo.

2.2.2 Inmunocitoquímica

A continuación y después de comprobar la expresión del antígeno en diferentes líneas y subpoblaciones celulares, nos propusimos localizar el antígeno en el interior celular (anclado a membrana, citoesqueleto, citoplasma, núcleo). Para ello testamos el anticuerpo con dos líneas celulares embrionarias de humano, la línea HS181 y la línea Shef-6. En primer lugar se testó con la línea HS181, con la que se inmunizó al ratón y los resultados no dejaron de ser curiosos. Si se observa en la figura 2.2, cuando hacemos la composición de la imagen con el AcMo marcado con FITC y los núcleos con Dapi, observamos que no todas las células se marcan, es decir, parece que no todas expresan el antígeno el cual reconoce nuestro AcMo. Aproximadamente un 80% de la colonia expresa el antígeno y el 20% restante parece no expresarlo. La razón por la que no todas las células se marquen con el anticuerpo monoclonal no está del todo clara, pudiendo ser debido a una inadecuada permeabilización de la membrana celular a la hora del proceso del marcaje celular.

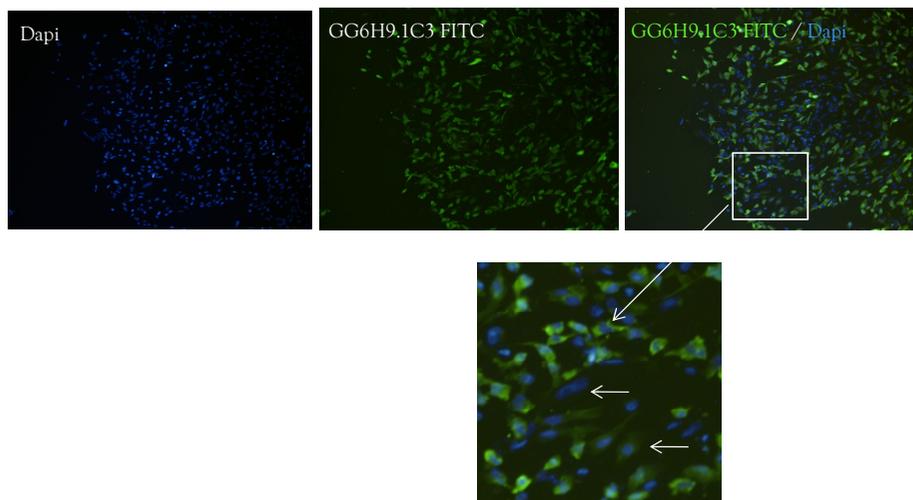


Figura 2.2: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 con células troncales embrionarias humanas HS181 por inmunocitoquímica. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratincción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-4 (imagen no mostrada).

A continuación se hizo inmunocitoquímica con la línea de células troncales embrionarias Shef-6 para comprobar si se marcaba toda la colonia o no. En este caso no observamos diferencias en el marcaje, ya que se marcaba toda la colonia de células, incluidos los fibroblastos. Se concluye por tanto que el antígeno reconocido por el AcMo GG6H9.1C3 se distribuye por el citoplasma y el núcleo de las células (figura 2.3).

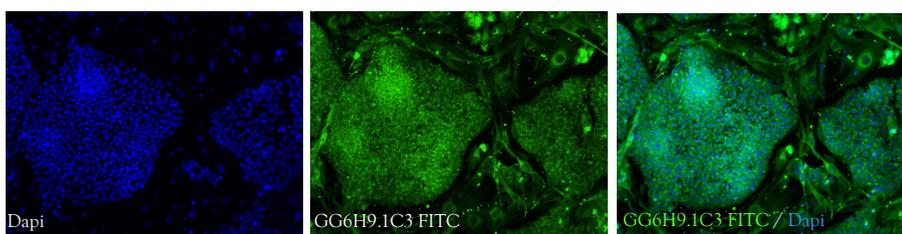


Figura 2.3: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 con células troncales embrionarias humanas Shef6 por inmunocitoquímica. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-3 (imagen no mostrada).

2.3 Estados de diferenciación celular

En la citometría de flujo descrita anteriormente, en la que se observan dos subpoblaciones diferentes, hizo preguntarnos si estas dos subpoblaciones se expresarían de igual manera en células en diferentes estados de diferenciación. Para ello se sometió a exposición con ácido retinoico a la línea de células embrionarias de carcinoma NTERA-2/D1. La diferenciación está marcada por cambios morfológicos y cambios fenotípicos en la superficie celular, específicamente por la desaparición de SSEA-3, marcador de células embrionarias (Andrews 1984).

Se realizó por tanto, citometría de flujo con la línea NTERA-2/D1 a diferentes tiempos de exposición de ácido retinoico y por ello en diferentes

estados de diferenciación celular para ver la reactividad del AcMo GG6H9.1C3 (figura 2.4).

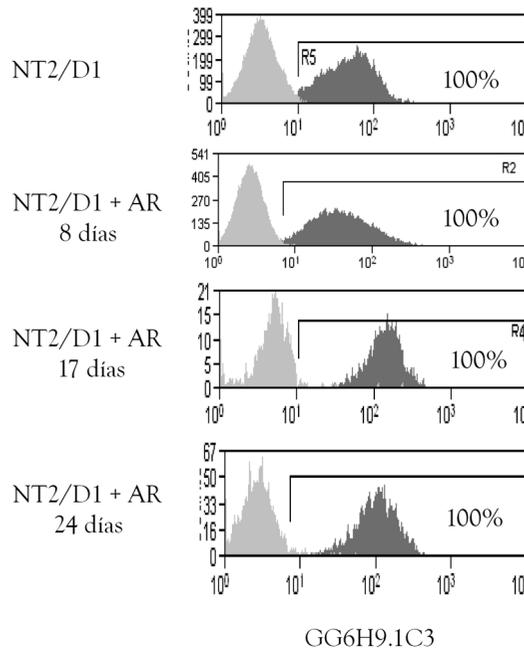


Figura 2.4: Análisis mediante citometría de flujo de la expresión del antígeno reconocido por GG6H9.1C3 en diferentes estados de diferenciación celular. El histograma gris corresponde con el control negativo. NT2/D1: células de carcinoma embrionario humano, AR: ácido retinoico.

El porcentaje de células que expresan el antígeno en los cuatro estados de diferenciación es el mismo, aproximadamente un 100%. Pero si estudiamos la intensidad media de fluorescencia (IMF) en los diferentes estadios observamos que va aumentando a medida que aumenta la diferenciación celular, es decir, mas fluorescencia indica que hay más anticuerpo unido al antígeno (tabla 2.1).

Días de exposición a AR	% células positivas	IMF
NTERA-2/D1 0 días	100%	49,44
NTERA-2/D1 8 días	100%	36,40
NTERA-2/D1 17 días	100%	140,94
NTERA-2/D1 24 días	100%	109,45

Tabla 2.1: Expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo GG6H9.1C3 en diferentes estados de diferenciación celular. Se muestran los porcentajes de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (IMF).

2.4 Peso molecular del antígeno

Para obtener el peso molecular del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 se realizó Western blot sobre diferentes lisados proteicos de distintas líneas celulares. Los resultados muestran dos bandas claramente diferenciadas y que se repiten en las tres líneas celulares que se comprobó (NTERA-2/D1, n2102Ep y D3). Los pesos moleculares correspondientes a las dos bandas son de 100 KDa y de 65 kDa (figura 2.5).

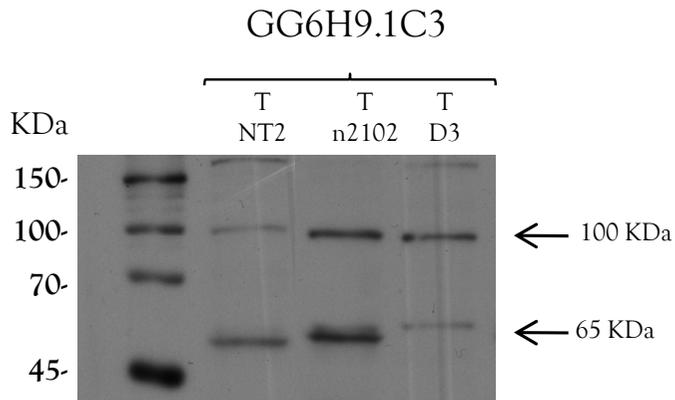


Figura 2.5: Western blot con el anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 y diferentes lisados totales de las líneas NTERA-2/D1, n2102Ep y D3. T: lisado total, NT2: NTERA-2/D1.

2.5 Identificación del antígeno: Espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF MS)

Las dos bandas reconocidas por el anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 se cortaron y enviaron al servicio de Proteómica de la Universidad de Córdoba, donde se sometieron a una digestión con tripsina y posteriormente se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para así generar la huella peptídica. Posteriormente se llevó a cabo una búsqueda en base de datos NCBI, combinando los resultados de huella peptídica (MS) con las posteriores fragmentaciones (MS/MS) de hasta doce péptidos de cada spot, resultando una búsqueda combinada (MS + MS/MS). Para la identificación de las proteínas se utilizó el motor de búsqueda MASCOT. En la figura 2.6 se muestran dos huellas peptídicas una de la banda de 100 KDa y otra de la banda de 65 KDa.

Los resultados obtenidos tras la identificación mostrada en la tabla nos muestran que la banda de 100 kDa correspondería con **PSF protein** (Polypyrimidine tract binding protein (PTB) associated splicing factor) con un MASCOT score de 490 y una secuencia de cobertura del 29% y la banda de 65 kDa correspondería con heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (**hnRNP K**) con un MASCOT score de 121 y una secuencia de cobertura del 25%.

Banda de 100 kDa

Rank	Protein Score	Protein Score C. I. %	Protein Name	Species	Protein MW	Accession No.	Pep. Count	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	490	100	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_e [Homo sapiens]	Homo sapiens	66350.8	gi 119627830	11	439	100
2	486	100	splicing factor, proline- and glutamine-rich [Homo sapiens]	Homo sapiens	76215.7	gi 4826998	11	439	100
3	484	100	SFPQ protein [Homo sapiens]	Homo sapiens	68702	gi 38014635	11	439	100
4	474	100	Splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated) [Homo sapiens]	Homo sapiens	76254.7	gi 29881667	10	439	100
5	407	100	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_a [Homo sapiens]	Homo sapiens	66420.3	gi 119627826	10	363	100
6	401	100	SFPQ protein [Homo sapiens]	Homo sapiens	55549.3	gi 33879558	8	363	100
7	397	100	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_c [Homo sapiens]	Homo sapiens	67885.8	gi 119627828	9	363	100
8	394	100	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_b [Homo sapiens]	Homo sapiens	72288.8	gi 119627827	9	363	100
9	364	100	splicing factor, proline- and glutamine-rich [Mus musculus]	Mus musculus	75508.3	gi 23956214	11	325	100
10	363	100	NonO/p54nrb homolog [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	75553.3	gi 70778983	11	325	100

Banda de 65 kDa

Rank	Protein Score	Protein Score C. I. %	Protein Name	Species	Protein MW	Accession No.	Pep. Count	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	186	100	unnamed protein product [Mus musculus]	Mus musculus	51259.4	gi 74225344	11	125	100
2	177	100	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform a isoform 18 [Canis familiaris]	Canis lupus familiaris	48622.2	gi 73946465	10	125	100
3	176	100	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform a isoform 14 [Canis familiaris]	Canis lupus familiaris	47669.6	gi 73946457	10	125	100
4	175	100	unnamed protein product [Mus musculus]	Mus musculus	51261.5	gi 74177637	10	125	100
5	174	100	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, [Monodelphis domestica]	Monodelphis domestica	52186.9	gi 126330639	10	125	100
6	170	100	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform 20 [Canis familiaris]	Canis lupus familiaris	42551.1	gi 73946469	9	125	100
7	168	100	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform CRA_b [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	43058.5	gi 149039794	9	125	100
8	167	100	PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [Pan troglodytes]	Pan troglodytes	47878.9	gi 114625230	9	125	100
9	166	100	hypothetical protein PANDA_003005 [Ailuropoda melanoleuca]	Ailuropoda melanoleuca	50057.9	gi 281337729	9	125	100
10	165	100	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform 2 [Macaca mulatta]	Macaca mulatta	50400.1	gi 109111949	9	125	100

Tabla 2.2: Identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF MS.

A continuación y para confirmar que el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 reconocía a las dos proteínas identificadas como PSF protein y hnRNP K, se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial específico para hnRNP K (clone 3C2, (Matunis et al 1992)), comercializado por Santa Cruz Biotechnology (USA), y se realizó un Western blot donde se cargaron lisados de proteína total de las líneas celulares NTERA-2/D1, n21o2Ep y D3. Se cargaron en el gel por duplicado cada lisado y se incubaron de manera alternativa para comparar las bandas reconocidas por los dos AcMos. Como se observa en la figura 2.7 la banda de 65 KDa reconocida por el AcMo comercial hnRNP K coincide con la banda que reconoce el AcMo GG6H9.1C3.

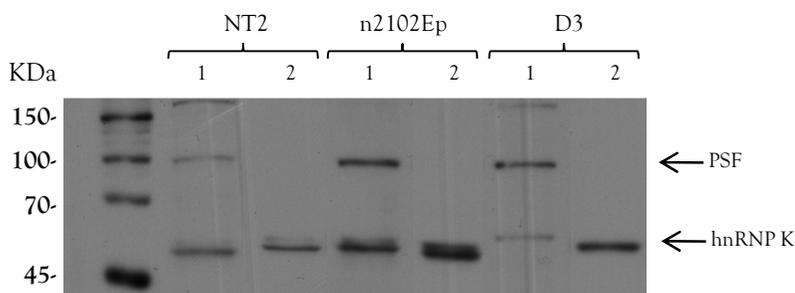


Figura 2.7: Western blot de lisados de proteína total de las líneas celulares NTERA-2/D1, n2102Ep y D3. Expresión del AcMo GG6H9.1C3 (carril 1) y el AcMo comercial hnRNP K (carril 2) sobre el mismo lisado celular.

Se realizó otro ensayo mas para comprobar la localización celular del AcMo, que por inmunocitoquímica observamos en el núcleo y citoplasma. Para ello se fraccionó la célula en diferentes lisados proteicos, lisado proteico del núcleo o fracción nuclear y lisado proteico del citoesqueleto. En la figura 2.8A se incubó con GG6H9.1C3 las diferentes tiras del Western donde se habían cargado previamente en el gel diferentes fracciones nucleares de líneas celulares como NTERA-2/D1, n2102Ep y HELA y uno de los carriles se había cargado con una fracción de citoesqueleto de NTERA-2/D1. A continuación en otro gel se

cargaron los mismos lisados proteicos en el mismo orden pero esta vez se incubó con el anticuerpo comercial que reconocía la proteína hnRNP K. Como vemos en la figura 2.8B, las bandas que reconoce este AcMo comercial coinciden con las reconocidas por nuestro AcMo GG6H9.1C3.

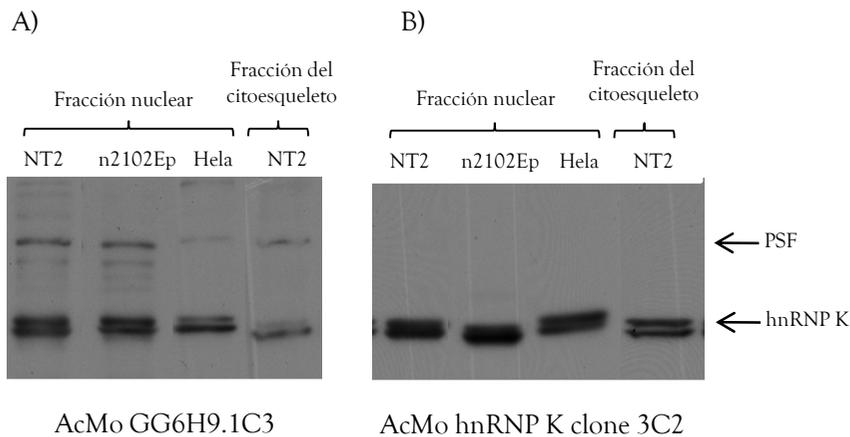


Figura 2.8: Análisis por Western blot de diferentes lisados proteicos. Se cargaron en un gel de gradiente 5-15% y se separaron las proteínas, tanto del citoesqueleto como del núcleo y se incubaron **(A)** con el AcMo GG6H9.1C3 y **(B)** con el AcMo comercial hnRNP K.

Estos resultados confirman que GG6H9.1C3 reconoce un epítipo de la proteína hnRNP K (65 kDa), un epítipo que también se presenta en la proteína PSF (100 kDa). La localización de la proteína PSF como se puede observar difiere bastante de la localización de hnRNP K, localizándose en fracciones nucleares y no en fracciones citoplasmáticas. La banda débil que vemos en la fracción del citoesqueleto puede ser debida a una contaminación del citoplasma.

3. DISCUSIÓN

Una vez que se conocía la identidad del antígeno reconocido por nuestro anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3, se hizo una revisión bibliográfica para ver si se podía explicar la sobreexpresión encontrada en células embrionarias de carcinoma humano NTERA-2/D1 expuestas a ácido retinoico durante varios días. La localización celular de hnRNP K es uno de los puntos de regulación que tiene este factor de transcripción. Está descrito que su fosforilación mediante la quinasa ERK es capaz de inducir su acumulación citoplasmática, de modo que facilita la inhibición de la traducción de mRNAs específicos. Por ello hay estudios que afirman que la exposición a AR (ácido retinoico), provoca una redistribución celular, pasando a ocupar zonas del núcleo a ocupar homogéneamente todo el núcleo y el citoplasma (Laserna et al 2009). Esto podría ser la causa del aumento de expresión observada en citometría de flujo como IMF, en células de carcinoma embrionario humano NTERA-2/D1 cuando son sometidas a exposición con AR (tabla 2.1).

Carpenter y colaboradores en el 2006 (Carpenter et al 2006), descubrieron que en cáncer de colon la sobreexpresión de hnRNP K era aberrante. En tejidos de colon de individuos sanos la proteína se localizaba exclusivamente en el núcleo, sin embargo en tejidos de individuos con cáncer de colon se encontró tanto en el núcleo como en el citoplasma. Este fenómeno también fue observado por Laury-Kleintop y colaboradores en 2005 (Laury-Kleintop et al 2005) en células de musculo liso, donde en respuesta a la estimulación *in vitro* con suero, los niveles de proteínas de hnRNP K aumentaban y la proteína se trasladaba del núcleo al citoplasma. Parece ser que la diferencia de localización de hnRNP K es modulada por modificaciones post-traduccionales, concretamente una fosforilación de hnRNP K por MAPK (mitogen-activated protein kinase) que es la responsable de la localización citoplasmática.

Por último, los anticuerpos contra hnRNP K pueden tener una función terapéutica. HnRNP-K puede mediar la señal que de origen a la migración celular y a la metástasis. Anticuerpos contra esta molécula podrían bloquear estas señales (Inoue et al 2007). Una posibilidad que se abre para ensayos con anticuerpos similares a GG6H9.1C3 (Barboro et al 2009).

Podemos concluir, por tanto, que se ha producido y caracterizado un nuevo anticuerpo monoclonal GG6H9.1C3 que podría ser muy útil para detectar hnRNP K y PSF en núcleo o citoplasma de diferentes células y tejidos. Este anticuerpo puede ser empleado utilizando diferentes técnicas como ELISA, citometría de flujo, inmunocitoquímica o Western blot. Con los datos aportados en este capítulo de tesis, no se puede determinar que epítipo es el que está reconociendo el AcMo GG6H9.1C3, pero sí que podemos presuponer la posibilidad de que GG6H9.1C3 reconozca un epítipo metilado de un dominio RGG. Los dominios RGG están presentes en ambas proteínas, cinco en hnRNP K y uno en PSF, estando este dominio siempre metilado en la proteína PSF (Shav-Tal & Zipori 2002). Si comparamos con otros anticuerpos monoclonales frente a epítopos no metilados de hnRNP K, como por ejemplo en el descrito por Naarmann y colaboradores (Naarmann et al 2008), podría ofrecernos alguna luz sobre las características del epítipo reconocido por GG6H9.1C3 en hnRNP K y PSF.

CAPÍTULO 3

**DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS UTILIZANDO EL
ANTICUERPO MONOCLONAL GG15H5.1D2**

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Apoptosis y vías básicas de señalización

La apoptosis o muerte celular programada se puede definir como el conjunto de reacciones fisiológicas, bioquímicas y morfológicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte.

En sistemas vivos los cambios que sufren las células apoptóticas culminan cuando son fagocitadas por los macrófagos evitando así liberar el contenido al medio y provocar una respuesta inflamatoria local.

Una inapropiada inducción de la apoptosis tiene implicaciones patológicas y ha sido asociada con enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica), diabetes (disminución crítica de las células beta pancreáticas), autoinmunidad (no eliminación de linfocitos autorreactivos, inducción de la apoptosis sin control en órganos específicos) rechazo en trasplantes, cáncer (acumulación de células, resistencia a terapias, vigilancia defectuosa de tumores por parte del sistema inmunitario), isquemia (accidente cerebrovascular, infarto de miocardio) y Sida (agotamiento de los linfocitos T) (Desjardins & Ledoux 1998; Reed 2002).

En el año 1964, Lockshin y Williams (Lockshin 1964) describieron el concepto de muerte celular programada como aquella que ocurría en lugares y momentos determinados como eventos programados. Años después, en el 1972, Kerr, Wyllie y Currie (Kerr et al 1972), describieron dos tipos de muerte celular, la muerte celular patológica que ocurre en el centro de una lesión, donde hay ruptura celular, a la que denominamos necrosis celular, y otro tipo de muerte celular fisiológica que ocurre durante el desarrollo o la hemostasis del organismo, donde se mantiene la integridad de la célula y a la que se denominó apoptosis.

Posteriormente, en el año 1982, Horvitz publicó estudios genéticos realizados sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Horvitz HR 1982), donde describía los genes encargados del control y la ejecución de la apoptosis en este organismo, y que debido a la homología entre este organismo y los organismos superiores, la apoptosis ha sido tomada como referente en todos los sistemas.

Por tanto cabe destacar la existencia de dos conceptos muy diferentes, **necrosis y apoptosis**. La necrosis es un mecanismo accidental en el cual la célula sufre un proceso de lisis celular generalmente como resultado del aumento del tamaño celular, perdiéndose la integridad de la membrana celular y el contenido de los orgánulos que son liberados al medio, induciendo un mecanismo de inflamación local. Sin embargo la apoptosis es un mecanismo programado genéticamente, en el cual se mantiene la integridad de la membrana, el tamaño celular disminuye, no se libera el contenido intracelular al medio sino que se compartimentan en los cuerpos apoptóticos, rodeados por membrana, que presentan señales específicas que permiten ser reconocidos y fagocitados por el sistema inmune. Se muestra un esquema representativo de los dos tipos de muerte celular en la figura 3.1.

La muerte celular programada está implicada de forma decisiva en determinados procesos entre los que destacan: el desarrollo embrionario, la homeostasis y mecanismos de selección. Prestaremos especial atención al desarrollo embrionario, ya que, nuestro trabajo se ha realizado con una línea de células embrionarias humana, la HS181.

La apoptosis requiere la interacción de una multitud de factores altamente especializados y puede ser desencadenada por diversos estímulos desde el exterior o interior de la célula como daño en el ADN, fármacos citotóxicos o irradiación, falta de señales de supervivencia, entre otras.

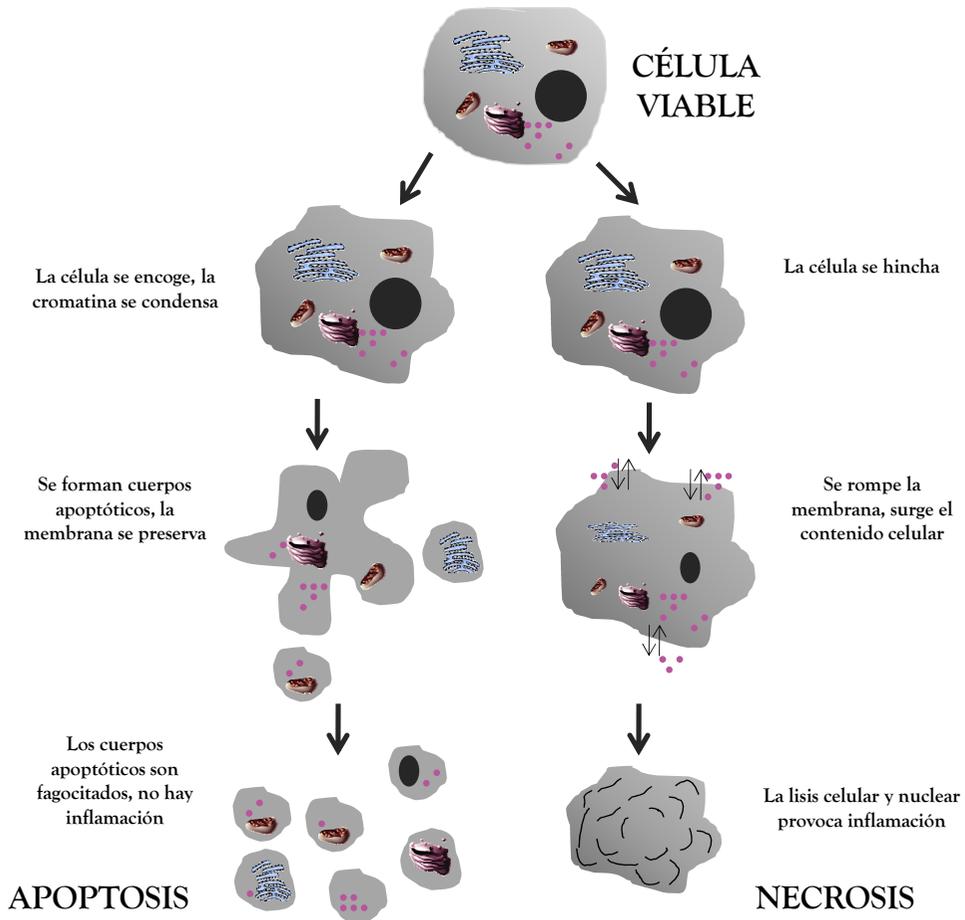


Figura 3.1: Dos vías de muerte, necrosis y apoptosis. La necrosis implica rotura de la membrana celular, la cual deja salir las proteínas intracelulares al espacio extracelular provocando procesos inflamatorios. Necrosis, normalmente afecta a grandes grupos celulares mientras que la apoptosis implica a células individuales que se someten a la destrucción organizada del citoesqueleto celular y formación de cuerpos apoptóticos, que son fagocitados sin una reacción inflamatoria.

La **apoptosis**, por tanto, es un proceso en el que se requiere la actuación de muchos genes y es una “decisión” que la célula no puede tomar a la ligera. Una vez la “decisión” está tomada, la ejecución del programa requiere la actuación coordinada de múltiples subprogramas con una amplia red de moléculas implicadas.

Cuando una célula entra en estado de apoptosis ocurren una serie de fenómenos a nivel celular como son cambios en la membrana plasmática, en la mitocondria, en el núcleo y diversos mecanismos para la eliminación de la célula.

Los cambios en la membrana plasmática son sin duda donde se hace más evidente los efectos de la apoptosis. El aspecto de una célula apoptótica se caracteriza por la disminución del tamaño, el aislamiento respecto de las células que lo limitan y el redondeamiento de su forma. También se generan unas estructuras denominadas “blebs” o pequeñas evaginaciones en la membrana, para distinguirlas de las grandes evaginaciones que también se producen. Estas evaginaciones hacen que la célula tenga un aspecto “hirviente” al inicio del proceso de apoptosis y de “palomita de maíz” al final. Estos cambios morfológicos también hacen que la asimetría de los fosfolípidos en la bicapa lipídica sufra un cambio, haciendo que se externalice la fosfatidilserina.

Todo este proceso de cambio externo va acompañado por una serie de cambios internos como por ejemplo el incremento de una fuerte actividad proteolítica, especialmente de las proteasas que contienen un residuo de cisteína en el sitio activo, llamadas CASPASAS. Esta actividad sucede en las pequeñas y grandes evaginaciones lo que lleva a la degradación de muchas proteínas, algunas de ellas estructurales. Se han descrito al menos 158 proteínas y enzimas diferentes que actúan como sustrato de las caspasas y que se modifican durante la apoptosis (Luthi & Martin 2007; Tadokoro D 2010). Esta actividad proteolítica genera nuevos epítomos que adquieren una clara significación en la generación de autoanticuerpos con importantes consecuencias en los procesos de autoinmunidad (Utz & Anderson 1998).

En el desarrollo embrionario se han encontrado dificultades a la hora de estudiar el proceso de muerte celular programada, ya que parece ser que la tasa real de apoptosis no se recoge en los estudios realizados, identificándose una tasa muy baja y en ocasiones solo se han encontrado células apoptóticas en el

interior de células vecinas encargadas de fagocitarlas (Cornillon et al 1994). Esto puede ser debido a la gran eficacia de aclaramiento que presentan las células apoptóticas.

A pesar de los inconvenientes encontrados en el proceso de la apoptosis en el estudio del desarrollo embrionario se han determinado una serie de objetivos que cumple la apoptosis en el desarrollo de un organismo, estando encaminados en último término a la eliminación de células inútiles en ese momento y lugar determinados. Por tanto los objetivos de la apoptosis en el desarrollo embrionario son los siguientes:

- Escultura de distintas estructuras, como eliminación de membranas interdigitales para la formación de los dedos y vaciado de cuerpos sólidos para crear una luz.
- Eliminación de estructuras, como restos vestigiales y estructuras necesarias para un sexo y no para el otro.
- Control de la sobreproducción de células, donde se ajusta por apoptosis al número necesario de células final.
- Control de las células defectuosas, anormales, con localización errónea, no funcionales o potencialmente peligrosas. Es un mecanismo de contra el daño celular en el que interviene la apoptosis.
- Formación de células diferenciadas especiales, como queratinocitos de la piel o como hematíes.

1.2 Inducción de apoptosis

La inducción de la apoptosis depende de varios factores, uno de ellos del tipo celular. Existen dos vías de inducción de apoptosis experimental: una de naturaleza biológica y otra de naturaleza física y química. La vía biológica se

basa en la activación de los receptores Fas o el receptor de TNF por sus respectivos ligandos o por su activación con el anticuerpo monoclonal anti-Fas o Anti-TNF receptor (Tewari & Dixit 1995). La inducción de apoptosis por vías física y químicas depende del agente seleccionado. También hay que tener en cuenta que no todas las proteínas se ven afectadas por la inducción con un mismo agente. Por tanto existe gran variabilidad de agentes químicos para la inducción de apoptosis. A continuación se enumeran algunos:

- Para la línea celular humana promielocítica HL-60 se utilizan inhibidores de síntesis de proteínas como *anisomicina*, o inhibidor de ADN topoisomerasa I, *camptotecina* (Del Bino et al 1991).
- La retirada del medio de cultivo de suero fetal de bovino y/o de factores de crecimiento específicos como NGF, bFGF y LIF inducen apoptosis en los diferentes modelos celulares como las células beta pancreáticas, las células de la línea neuronal PC-12, las células madre embrionarias humanas y células madre embrionarias de ratón (Batistatou & Greene 1991; JR Tejedo 2010).
- En linfocitos del timo de ratón, el tratamiento con el glucocorticoide dexametasona induce apoptosis (Cohen & Duke 1984; Gavrieli et al 1992).
- Por irradiación gamma, agua oxigenada, luz UV-C y cisplatino se puede inducir apoptosis en una serie de líneas celulares (Sayan et al 2001).
- Hay una diversidad de agentes químicos que inducen apoptosis en líneas celulares y tejidos, la mayoría utilizados en procesos de quimioterapia contra el cáncer, como ejemplos tenemos: dexametasona (Aroui et al 2009), 5-fluorouracil (Weigel et al 2000; Rigas et al 2002), vinblastina (Kolomeichuk et al 2008), estaurosporina (Belmokhtar et al 2001).

1.3 Estaurosporina

La estaurosporina, un alcaloide aislado de cultivos de *Streptomyces staurosporeus*, es un potente inhibidor de amplio espectro de proteínas

quinasas e induce apoptosis en una variedad de líneas celulares (Bertrand et al 1994). A concentraciones (1-20 nM), la estaurosporina inhibe a la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG), proteína quinasa dependiente de Calmodulina II (CAMKII), quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) entre otras (Ruegg & Burgess 1989). A altas concentraciones de 0,2-1 μM la estaurosporina induce apoptosis en la mayoría de los tipos celulares incluido las células madre embrionarias (Couldwell et al 1994; Yue et al 1998; Mora-Castilla et al 2010).

Los mecanismos por los cuales la estaurosporina induce apoptosis no están del todo claros. En primer lugar está claramente definida la participación de las proteínas quinasas en la regulación de vías de supervivencia, por lo que su inhibición dispararía un proceso apoptótico. En segundo lugar algunos autores han planteado que la vía de apoptosis por la cual la estaurosporina actúa es vía mitocondria (Tafani et al 2001; Tafani et al 2002), aunque la sobreexpresión de Bcl-2, que tiene efecto protector sobre la apoptosis mitocondrial, fue ineficaz en la protección de la célula en presencia de estaurosporina (Yuste et al 2002). En general algunos conceptos relacionados con la apoptosis inducida por estaurosporina están bien establecidos, tales como la activación de caspasas ejecutoras (Caspasa 3) y la degradación de proteínas claves en la reparación del ADN (PARP) (Xue et al 2003). Por tanto, en la inducción de apoptosis por estaurosporina, pueden estar implicados múltiples mecanismos y a su vez pueden variar entre los diferentes tipos celulares.

1.4 Anticuerpos y apoptosis

Hay una necesidad importante de anticuerpos que permitan distinguir los distintos eventos que suceden durante el proceso de apoptosis y por ello ha sido un objetivo durante años la obtención de anticuerpos frente a moléculas

presentes en las células en apoptosis ¹¹. Podríamos hacer una distinción entre ellos: por un lado anticuerpos monoclonales y policlonales que reconocen receptores y moléculas que median en diversas fases del proceso de apoptosis, entre ellos están anticuerpos contra TNFR-1, Porimidina, DR3, DR4, DR5, TRAIL y JNK/p38 (Zhang et al 1998; Ludwig et al 2003) y por otro lado estarían los anticuerpos que reconocen moléculas específicas del proceso de apoptosis y ausentes en las células normales. Estas nuevas moléculas con sus “neoepítomos” pueden ser de gran utilidad para diferenciar a células normales de células apoptóticas, para estudiar los mecanismos de regulación del proceso de apoptosis y para la inmunología celular (Gensler et al 2001; Yang & Wang 2002). Estos anticuerpos capaces de distinguir a las células en apoptosis de las células normales han sido objeto de patentes, entre ellas véase US6350452.

En este capítulo describimos una molécula que es reconocida por el anticuerpo GG15H5.1D2 producido tras la inmunización de ratones BALB/c con células embrionarias humanas, línea HS181. La molécula reconocida está presente en células apoptóticas y no en las células normales lo que puede tener un evidente interés en los estudios de apoptosis en células embrionarias humanas.

2. RESULTADOS

2.1 Selección y determinación del isotipo.

El AcMo GG15H5.1D2 fue seleccionado inicialmente por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a extractos de células troncales embrionarias humanas HS181. Posteriormente se determinó su isotipo, que fue IgM_k.

¹¹ Ver en la siguiente página un array con 35 anticuerpos frente a moléculas relacionadas con el proceso de apoptosis.

http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_humanapoptosisarray.aspx

2.2 Distribución celular del antígeno

La distribución celular del antígeno se realizó en primer lugar por citometría de flujo y posteriormente por inmunocitoquímica.

2.2.1 Citometría de flujo

El resultado de citometría de flujo se representa como el porcentaje de fluorescencia, que produce el monoclonal unido, frente a las células control, sin anticuerpo. En primer lugar se hizo marcaje extracelular con la línea HS181, línea con la que se inmunizó a los ratones, siendo los resultados negativos. A continuación se procedió al marcaje intracelular de la misma línea celular HS181, fijando y permeabilizando las células y los resultados fueron también negativos.

Posteriormente se testó dicho anticuerpo frente a diferentes subpoblaciones celulares: células troncales embrionarias humanas (Shef-6 y H7 (S6)), líneas de carcinoma humano (NTERA-2, n2102Ep, 1411H), líneas de carcinoma de ratón (P-19), subpoblaciones de leucocitos humanos (linfocitos, monocitos y plaquetas) y una línea de macrófagos alveolares porcina (3D4/31), siendo nuevamente los resultados negativos.

2.2.2 Inmunocitoquímica

Después de comprobar que el anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 era negativo en citometría de flujo en todas las líneas celulares testadas, se determinó si por inmunocitoquímica dicho anticuerpo era positivo. En primer lugar se testó con la línea HS181 cultivada sobre matrigel y medio condicionado con fibroblastos. En la figura 3.2 se muestra que una pequeña población de células son positivas al marcaje con este anticuerpo (algunas de ellas son indicadas con una flecha roja) (figura 3.2).

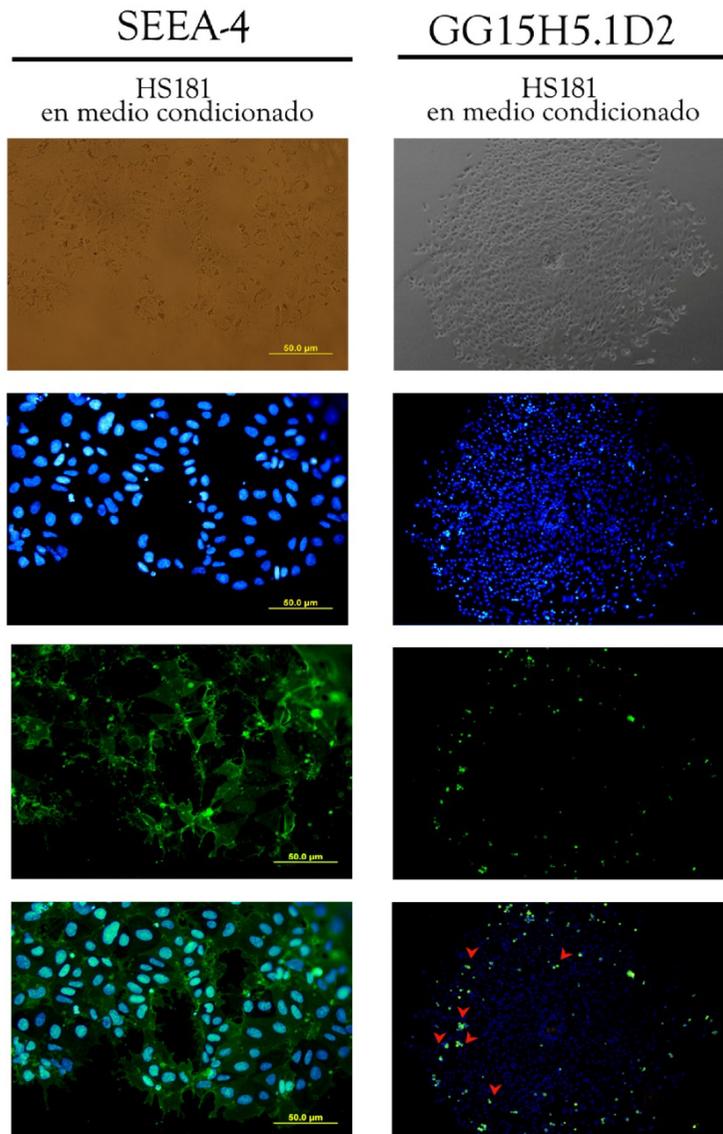


Figura 3.2: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con células troncales embrionarias humanas HS181 por inmunocitoquímica. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-4. Las flechas rojas indican algunos de las células marcadas por el anticuerpo.

Como se puede observar en la figura 3.2, no toda la colonia celular está marcada por el anticuerpo, sino que un porcentaje muy pequeño de células que se encuentran en la zona periférica de la colonia son las que son reconocidas por el anticuerpo. Cabe destacar la morfología redondeada y la reducción del tamaño de las células marcadas.

A continuación se realizó inmunocitoquímica con la línea de células troncales embrionarias Shef-6, cultivada sobre monocapas de fibroblastos. Los resultados en este caso fueron negativos, no observándose ninguna célula marcada con el anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2. De estas observaciones podemos concluir que cuando las células son cultivadas en condiciones óptimas, el caso de las Shef-6, nuestro anticuerpo no marca. Sin embargo cuando se cultivan en condiciones no tan óptimas, caso de las HS181, algunas células son marcadas. Estos resultados hicieron sospechar que las células marcadas son células que están sufriendo un proceso apoptótico espontáneo.

2.3 Inducción de apoptosis con estaurosporina

Los resultados mostrados en la figura 3.2 hicieron sospechar que el AcMo GG15H5.1D2 podía reconocer una molécula relacionada con el proceso de apoptosis. Para probar esta hipótesis las células HS181 fueron sometidas a diferentes estados de estrés celular, provocando así diferentes estados de apoptosis celular. Los estados a los que se sometieron las células fueron dos: cultivo de las células con medio no condicionado y cultivo de las células con estaurosporina. En el primer caso, con medio no condicionado, se induce un estado de apoptosis débil, sin embargo cuando se le añade al medio estaurosporina durante 4 horas se induce una apoptosis mayor.

A continuación se procedió a someter al cultivo celular a dos condiciones diferentes de apoptosis, una débil, en la cual se mantenían las células con medio no condicionado y otra en la cual se le añadía al medio

estaurosporina, para así provocar una apoptosis más fuerte. Los resultados mostrados en la figura 3.3 nos muestran en este caso que si hay marcaje celular. Observamos como en el caso de una inducción débil de apoptosis (HS181 con medio no condicionado), las células se marcan débilmente, sin embargo, en presencia de estaurosporina se observa un marcaje más fuerte.

Posteriormente se hizo el mismo experimento pero en este caso utilizando monocapas de fibroblastos, los mismos que las células troncales embrionarias humanas HS181 utilizan como matriz para poder crecer adecuadamente. Estos fibroblastos que se utilizan como matriz están inactivados con mitomicina C previamente, por lo tanto se hizo en primer lugar un marcaje con los dos tipos de fibroblastos, unos inactivados con mitomicina C y otros en condiciones de cultivo normales, es decir sin inactivar. Los resultados fueron negativos en los dos casos, como se puede observar en la figura 3.4.

A continuación se sometió al cultivo de fibroblastos en condiciones normales, sin inactivar con mitomicina, a apoptosis añadiendo estaurosporina, esta vez, a diferencia de las células troncales embrionarias humanas HS181, las condiciones fueron las mismas solo que durante 6 horas de cultivo. Como control positivo de la apoptosis se utilizó anti-caspasa 3, anticuerpo que detecta niveles endógenos de un fragmento largo (17-19 kDa) de caspasa 3 activa. En la figura 3.5 observamos como el anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 es positivo, marcando las células que están en apoptosis.

GG15H5.1D2

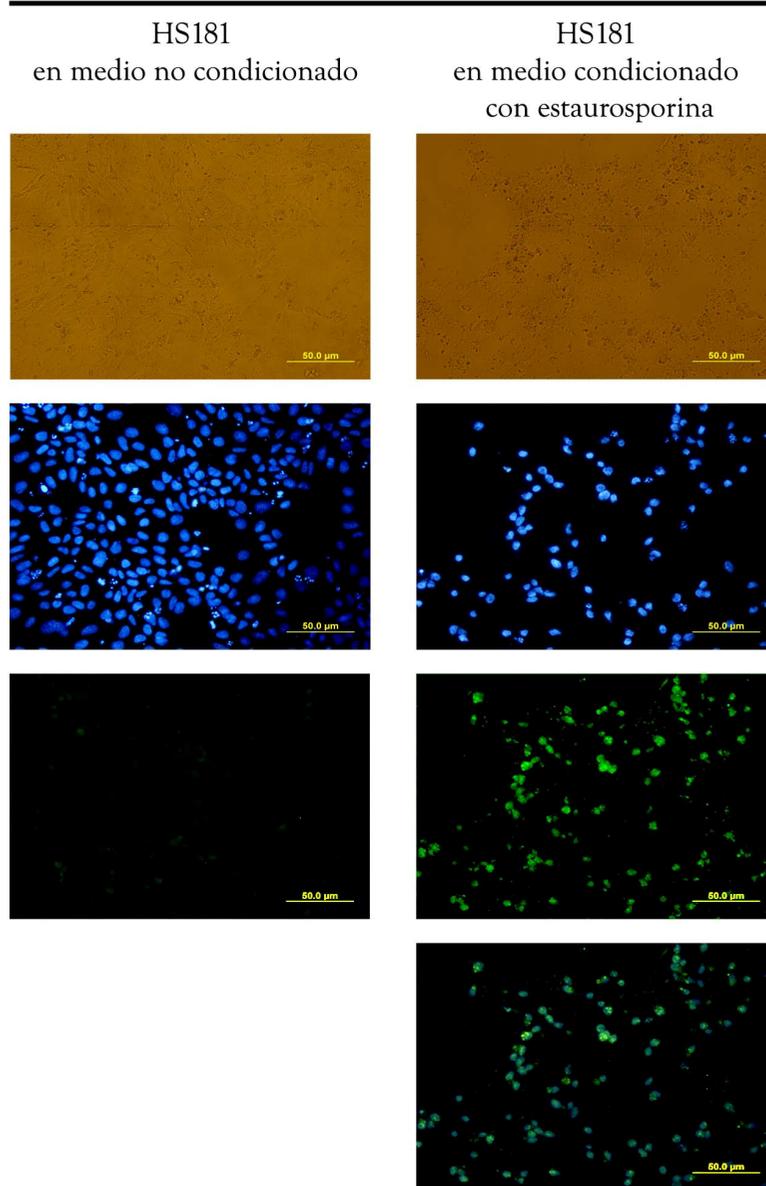


Figura 3.3: Reactividad en condiciones de apoptosis del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con células troncales embrionarias humanas HS181 por inmunocitoquímica. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole).

GG15H5.1D2

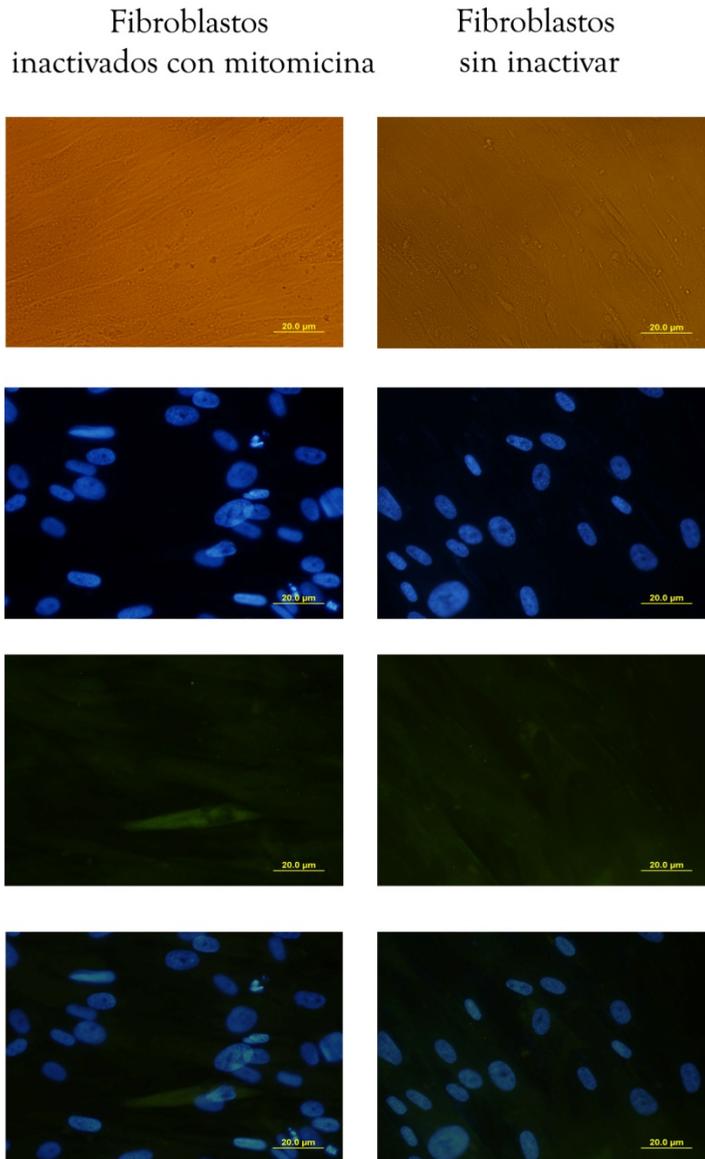


Figura 3.4: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con fibroblastos por inmunocitoquímica. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole)

Fibroblastos sin inactivar mas estaurosporina

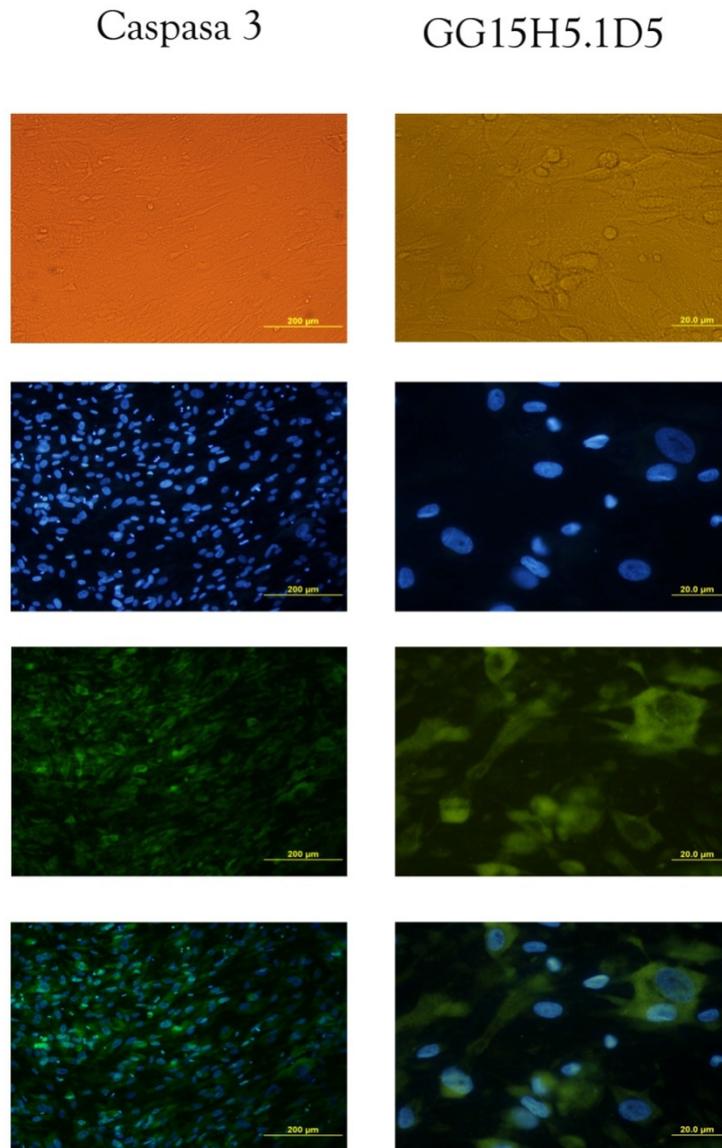


Figura 3.5: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 con fibroblastos en apoptosis por inmunocitoquímica. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contra tinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo de apoptosis se utilizó un anticuerpo frente a caspasa 3 activa.

Una vez comprobado que el anticuerpo monoclonal GG15H5.1D2 reconocía un antígeno que se expresaba cuando las células entraban en un estado de apoptosis, se realizó un Western blot con diferentes lisados celulares, para poder identificar el antígeno que estaba reconociendo nuestro anticuerpo. En la figura 3.6 se muestran: carril 1 corresponde con células HS181 cultivadas en condiciones normales, es decir, con medio condicionado, el carril 2 corresponde con células HS181 cultivadas en medio no condicionado, es decir sin bFGF y el carril 3 corresponde con células HS181 en condiciones normales de cultivo e incubadas 4 horas con estaurosporina 1mM. Cada lisado se incubó en una membrana diferente tanto con las células HS181, con un control positivo del proceso de apoptosis, la caspasa 3 y con un control constitutivo, la beta actina.

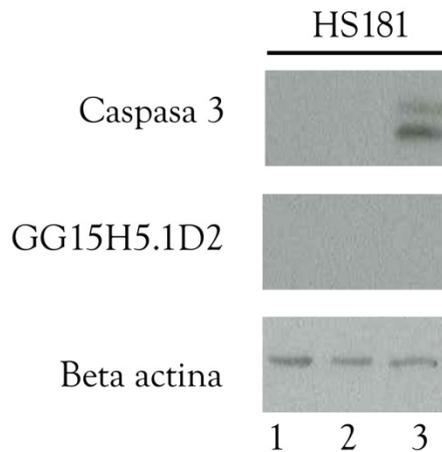


Figura 3.6: Western blot con diferentes lisados celulares de la línea HS181 en diferentes estados de apoptosis con el AcMo GG15H5.1D2. 1: HS181 condiciones normales de cultivo; 2: HS181 en medio no condicionado; 3: HS181 con estaurosporina.

Si observamos los resultados deducimos que la células del carril 1 y del carril 2, es decir, cultivadas en condiciones normales y cultivadas con medio no condicionado no expresan caspasa 3, por lo que no están en estado de apoptosis. GG15H5.1D2 no reconoce ningún ligando por Western blot en las condiciones ensayadas. Sin embargo en el último carril, el 3, donde las células están inducidas a un estado de apoptosis por la incubación con estaurosporina, expresándose la caspasa 3, el antígeno que reconoce el AcMo GG15H5.1D2 no se expresa. Esto puede ser debido a que las proteínas del lisado celular no estaban en condiciones nativas, sino en condiciones reductoras, lo cual implicaría que la proteína estaría alterada y nuestro AcMo no pudiera reconocerla.

Se hizo un ensayo posterior de inmunohistoquímica con el AcMo GG15H5.1D2 para comprobar si reconocía células en estado de apoptosis, ya que previamente en nuestro laboratorio se habían realizado estudios con nódulo linfático mesentérico de cerdo infectado con *Salmonella typhimurium*, donde por PCR cuantitativa se había verificado la existencia de apoptosis (Martins y colaboradores 2010, artículo en preparación). Los resultados mostraron células en estado apoptótico, figura 3.7.

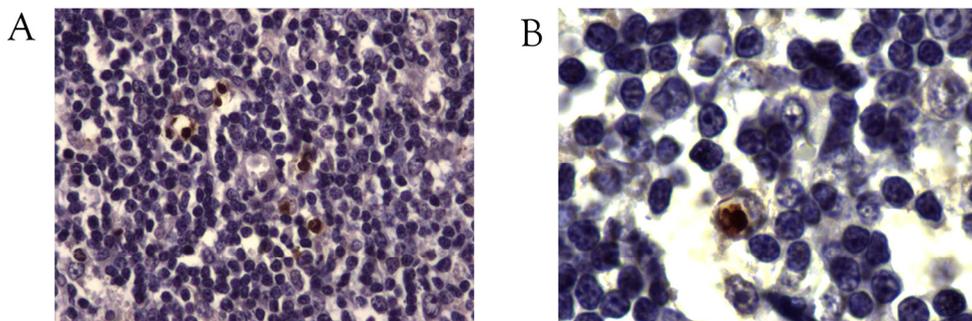


Figura 3.7: Sección histológica correspondiente a nódulo linfático porcino. El anticuerpo GG15H5.1D2 muestra reacción positiva con algunas células en apoptosis (**A**, 40X, **B**, 100X).

Por tanto GG15H5.1D2 podría reconocer un epítipo nuevo, neoepítipo, que se expresaría en las células que ya han comenzado un proceso de apoptosis. Este proceso lo podemos observar en la siguiente figura 3.8, donde las células marcadas con una flecha roja no habrían expresado aún el neoepítipo, aunque hay evidencias de fragmentación del núcleo, como se observa en 3.8c.

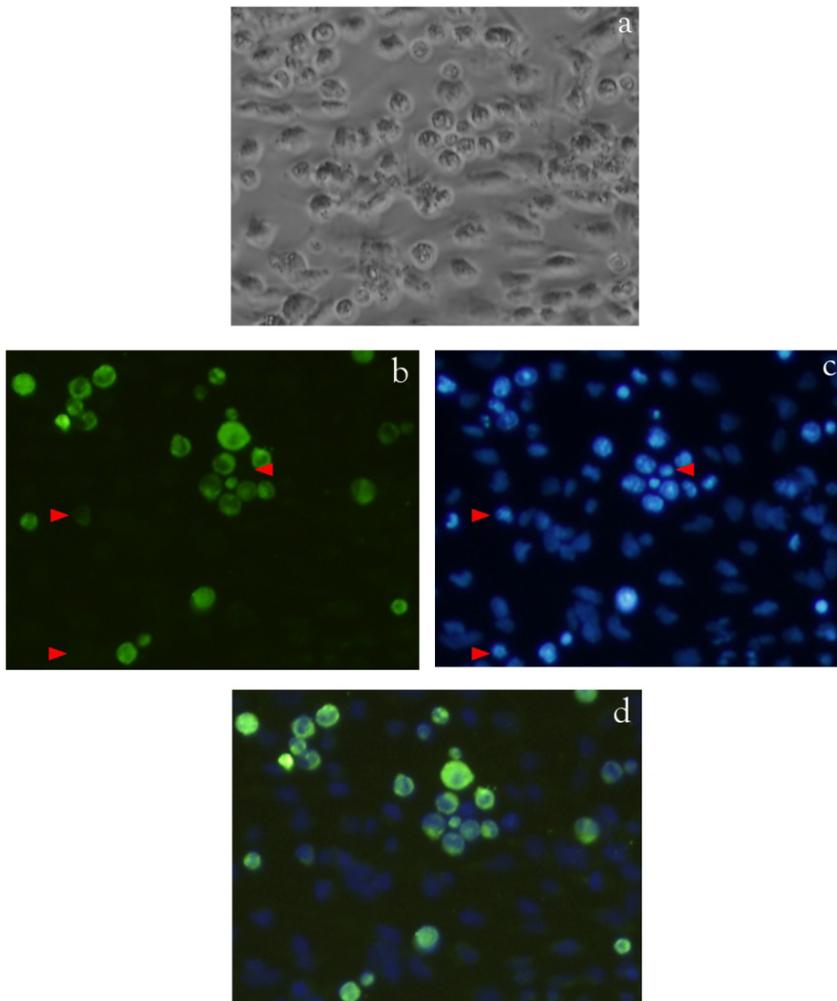


Figura 3.8: Células H5181 comenzando un proceso apoptótico. **a)** campo claro, **b)** células marcadas con GG15H5.1D2-FITC, **c)** células marcadas con DAPI, **d)** composición de b y c. Las flechas rojas indican células que aún no expresan el neoepítipo que reconoce el AcMo GG15H.1D2.

3. DISCUSIÓN

La producción de anticuerpos monoclonales que reconozcan nuevas moléculas relacionadas con procesos de apoptosis tendrá utilidad para investigar los cambios moleculares asociados a procesos de apoptosis tanto en la superficie como en el interior celular, es importante en muchos campos de estudios biomédicos, como el mecanismo de transducción de señales, regulación celular, inmunología molecular, etc.

Por el momento la generación de anticuerpos que puedan descubrir moléculas asociadas al proceso de apoptosis y ausentes en las células normales ha sido una tarea complicada y los anticuerpos que cumplen esta característica no son muchos (Zhang et al 1996). En general, las moléculas y anticuerpos que la reconocen han llevado a que sus autores consideren de interés económico el solicitar la correspondiente patente (patente nº: US 6,350,452 B1).

Los métodos usuales de inmunización no han servido y se han puesto en marcha nuevos métodos (Anderson et al 1989). Entre ellos destacamos la inmunización substractiva mediante células normales y apoptóticas (Yang & Wang 2002), ya que con este método se perseguía el objetivo de obtener anticuerpos contra moléculas específicas de células apoptóticas.

Otras técnicas han permitido determinar que estas moléculas diferenciadoras entre células apoptóticas y normales existen, por ejemplo Maxwell y colaboradores descubrieron en 1994, por el método de electroforesis 2D, 17 nuevas proteínas (Maxwell 1994).

Una técnica que ha mostrado ser útil para obtener anticuerpos contra moléculas presentes en las células apoptóticas consiste en la inmunización de ratones BALB/c con extractos de células humanas o de ratón en apoptosis y la posterior selección de únicamente anticuerpos que demostraran reacción con moléculas intracelulares de las células en apoptosis (Mevorach et al 1998;

Gensler et al 2001). Con este método Gensler TJ y colaboradores, (2001) han obtenido una batería de anticuerpos monoclonales que reconocen autoantígenos en células apoptóticas humanas, aunque ninguno de ellos parecía específico de estas células. Los resultados obtenidos por estos autores indican que las células apoptóticas son un importante reservorio de autoantígenos y que, tras sufrir las modificaciones correspondientes, son capaces de generar una respuesta inmune conducente a la generación de autoanticuerpos (Mevorach et al 1998). Algunos de estos anticuerpos monoclonales, los que reconozcan epítomos nuevos (autoantígenos modificados) presentes únicamente en el citoplasma de las células apoptóticas, pueden ser utilizados como marcadores de células apoptóticas. El anticuerpo GG15H5.1D2 podría ser uno de estos anticuerpos monoclonales que reconocen un autoantígeno cuyo epítomo ha sido modificado en el proceso de apoptosis y sólo presente en las células apoptóticas.

La aparición de un autoantígeno modificado en nuestro trabajo se justificaría por el proceso de inmunización y selección empleado. En nuestro trabajo la inmunización se realizó con extractos de células HS181. Estas células no se cultivaban en condiciones óptimas sobre monocapas de fibroblastos sino que se cultivaban sobre una matriz proteína (matrigel). El proceso de cultivo y almacenamiento para su traslado al Departamento de Genética en la UCO desde el CABIMER, podría haber generado un proceso de estrés que habría dado lugar al proceso de apoptosis en las células HS181. La posterior selección de los hibridomas mediante ELISA con extractos celulares de HS181, obtenidos de igual forma que el inmunógeno, favoreció la selección de moléculas intracelulares.

Los resultados que permitieron descubrir que este anticuerpo reconoce células en apoptosis, figura 3.2, corroboran que estas células en algunos casos tras su cultivo en el CABIMER iniciaban el proceso de apoptosis. Por tanto nuestro sistema de inmunización y selección se aproxima al empleado por

Gensler TJ y colaboradores, (2001) y que les permitió obtener una batería de anticuerpos que reconocen autoantígenos intracelulares de las células apoptóticas, con la diferencia de que en nuestro caso el inmunógeno era una mezcla procedente de células apoptóticas y células normales.

Los resultados obtenidos con el resto de células analizadas son prueba de que la molécula reconocida por GG15H5.1D2 está relacionada con el proceso de apoptosis, ya que no se detecta en ninguna de las líneas normales analizadas. Los resultados obtenidos con fibroblastos humanos indican que la molécula se expresa no solo en células apoptóticas embrionarias y nuevos ensayos que están en marcha con otras líneas servirán para confirmarlo. En la Figura 3,7 se presenta el resultado preliminar obtenido al teñir con GG15H5.1D2 un nódulo linfático mesentérico porcino infectado con *Salmonella typhinurium*, en el que puede observarse un grupo de células marcadas, células apoptóticas, lo que vendría a corroborar que el epítipo de esta molécula no está sólo en las células humanas.

Hasta el momento no ha sido posible determinar el peso molecular y las demás características de la molécula reconocida por GG15H5.1D2. Una serie de experimentos están en marcha para la caracterización de la molécula.

Es sabido que los anticuerpos monoclonales desarrollados para identificar marcadores moleculares asociados a células apoptóticas, pueden ser utilizados para distinguir células apoptóticas de células normales, estudiar los mecanismos moleculares de la apoptosis y diagnosticar enfermedades relacionadas con la apoptosis, monitorizar la eficacia de algunas terapias, y de identificar nuevos agentes los cuales puedan inducir o inhibir apoptosis (Thompson 1995), todo ello vendría a avalar el interés de aumentar los estudios con el anticuerpo el GG15H5.1D2.

En resumen podemos concluir que se ha obtenido un anticuerpo monoclonal, GG15H5.1D2 que reconoce una molécula asociada al proceso de

apoptosis. Esta molécula por el momento puede ser detectada por ELISA, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y se encuentra pendiente de determinar su funcionamiento por citometría de flujo, igualmente está en marcha la caracterización molecular lo que una vez realizado podría hacernos pensar en la solicitud de una patente que haga de este anticuerpo y de la molécula reconocida un marcador de apoptosis.

CAPÍTULO 4

**DETECCIÓN DE LA ENZIMA CATALASA POR EL ANTICUERPO
MONOCLONAL GG3G5.1E5.**

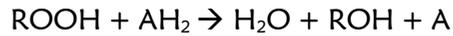
1. INTRODUCCIÓN

1.1 ROS y enzimas antioxidantes

Vivir con el oxígeno es peligroso. Contamos con el oxígeno para alimentar nuestras células, pero el oxígeno es una molécula reactiva que puede causar serios problemas si no es controlada cuidadosamente. Uno de los peligros del oxígeno es que se convierte rápidamente en otros componentes reactivos. El término ROS (reactive oxygen species) se utiliza para agrupar a moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno, como son radicales hidroxilo (-OH), radicales alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) o radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), radical nitroxilo ($\text{NO}\cdot$). También se incluye el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y el ácido hipocloroso (HOCl). ROS son generadas por células inflamatorias que se acumulan tanto en inflamaciones alérgicas como no alérgicas. ROS tiene función destructora sobre el ADN y las proteínas, así bajas concentraciones de ROS pueden ser beneficiosas o incluso indispensables en procesos como señalización celular o defensa frente a microorganismos. Esta acción debe de ser muy específica ya que altas concentraciones de ROS se relacionan con procesos de envejecimiento así como en un número importante de enfermedades humanas como cáncer, isquemia, y fallos en el sistema inmune y endocrino. Por tanto, el equilibrio entre las diferentes ROS es delicado y se mantiene gracias a **enzimas antioxidantes**: catalasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa. Por tanto, alteraciones en estas enzimas están directamente relacionadas con procesos de patogénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Mates et al 1999).

La **catalasa** es producida por organismos aerobios que van desde las bacterias hasta el hombre. En humanos es una enzima tetramérica compuesta por 4 subunidades idénticas de 60 kDa, que contiene un grupo único de ferriprotoporfirina por subunidad, y tiene una masa molecular de alrededor de 240 kDa (Aebi 1983). Su función es catalizar la conversión de peróxido de

hidrógeno a agua y oxígeno molecular y con donantes de hidrógeno (metanol, etanol, ácido fórmico, o fenoles) con actividad peroxidasa y así proteger a las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno:



La catalasa es localizada en al menos dos formas en las células humanas: una en el citoplasma celular y otra en los peroxisomas. Estas dos catalasas se diferencian ligeramente en su terminación carboxiteminal (Korneluk et al 1984). Se encuentra a altas concentraciones en hígado y riñón.

Existen diferentes laboratorios y empresas que comercializan anticuerpos monoclonales y policlonales frente a catalasa. En la mayoría de los casos, la producción de anticuerpos monoclonales fue utilizando como inmunógeno catalasa purificada de eritrocitos humanos (Wiemer et al 1992) aunque en algunos casos también se han utilizado péptidos sintéticos (Jin et al 2003).

1.2 Catalasa y apoptosis

La oxidación celular puede funcionar como un mediador de la inducción de la apoptosis. Esto se ve apoyado por la capacidad que tienen las especies reactivas del oxígeno (ROS) de causar muerte celular y por el contrario, la capacidad de prevenir la muerte celular de los agentes antioxidantes (Troyano et al 2001). Más concretamente algunos estudios se centran en el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como inductor de muerte celular y la actuación protectora de la catalasa, denominada a menudo como un “limpiador específico de H_2O_2 ”. Por ejemplo, la adición de catalasa exógena atenúa la inducción de apoptosis, incluso cuando la superóxido dismutasa, que actúa también específicamente frente al peróxido de hidrógeno, no lo hace (Gorman et al 1997; Ikeda et al 1999; Katschinski et al 2000). Por tanto, la catalasa junto con la peróxido

dismutasa, es una de las mayores enzimas intracelulares responsables del catabolismo del H_2O_2

Por otra parte, se ha demostrado que la sobreexpresión de la catalasa tiene un papel protector frente a la inducción de apoptosis por radiación ultravioleta (UV) (Rezvani et al 2006). En este estudio Rezvani y colaboradores estudiaron el efecto en queratinocitos humanos normales, a temperatura ambiente y a 4°C, llegando a la conclusión de que existe un refuerzo de la defensas naturales antioxidantes fotoprotectoras para prevenir quemaduras solares severas y probablemente el cáncer de piel (Rezvani et al 2007).

Hay también estudios que aseguran que la catalasa tiene un papel importante en el desarrollo de la hipertensión y daño renal, relacionado con una sobreexpresión de la misma (Godin et al 2010).

En este capítulo se describe la producción de un anticuerpo monoclonal, GG3G5.1E5, que reconoce un epítipo en la enzima catalasa. Este anticuerpo se ha obtenido usando como inmunógeno células embrionarias humanas HS181 lo que vendría a demostrar que en estas células en el momento de su empleo existía una sobreexpresión de esta enzima.

2. RESULTADOS

2.1 Selección y determinación del isotipo

El AcMo GG3G5.1E5 fue seleccionado inicialmente por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a células troncales embrionarias humanas HS181. Posteriormente se determinó su isotipo, que fue IgM_k.

2.2 Distribución celular del antígeno

El anticuerpo monoclonal GG3G5.1E5 fue seleccionado por reacción positiva en ELISA indirecto frente a células troncales embrionarias humanas HS181 y fibroblastos, como se ha descrito anteriormente. La distribución celular del antígeno se realizó en primer lugar por citometría de flujo y posteriormente por inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

2.2.1 Citometría de flujo

El resultado de citometría de flujo se representa como el porcentaje de fluorescencia, que produce el monoclonal unido, frente a las células control, sin anticuerpo. En primer lugar se hizo marcaje extracelular con la línea HS181, línea con la que se inmunizó a los ratones, siendo los resultados negativos. A continuación se procedió al marcaje intracelular, fijando y permeabilizando las células y los resultados fueron positivos.

Posteriormente se analizó la distribución celular sobre diferentes subpoblaciones de células troncales embrionarias humanas (Shef-6 y H7 (S6)), líneas de carcinoma humano (NTERA-2, n2102Ep, 1411H), líneas de carcinoma de ratón (P-19), subpoblaciones de leucocitos humanos (linfocitos, monocitos y plaquetas) y una línea de macrófagos alveolares porcina (3D4/31). Los resultados se muestran en las figura 4.1 y 4.2.

Observamos en la figura 4.1 que todas las células expresan el antígeno reconocido por nuestro AcMo GG3G5.1E5 en un rango que va desde el 72% hasta el 99%. No se encontraron en ninguna de las líneas testadas resultados negativos. El anticuerpo presenta reacción cruzada con células de ratón y cerdo. Cuando se analizó la expresión en diferentes subpoblaciones celulares de sangre periférica realizando un doble marcaje, vemos que todos expresan el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal. Las subpoblaciones estudiadas fueron

linfocitos (R1), monocitos (R2) y plaquetas (R3) (fig 4.2). En cuanto a la intensidad media de fluorescencia no se aprecian cambios significativos en las líneas testadas.

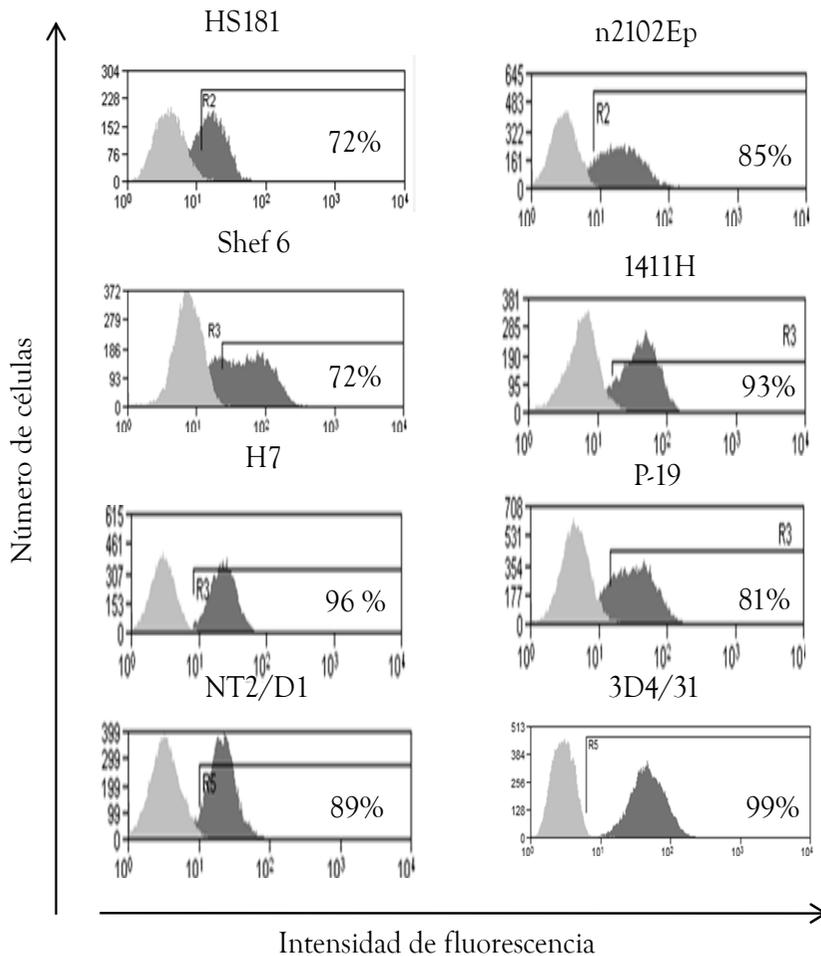


Figura 4.1: Citometría de flujo del anticuerpo GG3G5.1E5 frente a diferentes líneas celulares. Análisis de expresión en células troncales embrionarias humanas HS181, Shef-6 y H7, en células de carcinoma humano NTERA-2/D1, n2102Ep, 1411H, carcinoma de ratón P-19 y línea de macrófagos alveolares porcina 3D4/31. El histograma gris tenue corresponde con el control negativo.

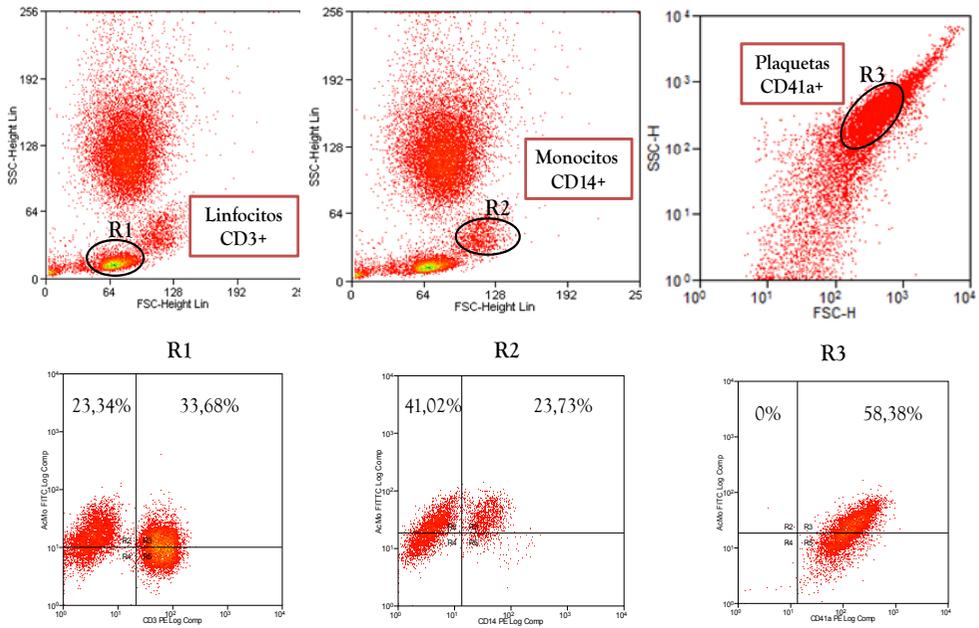


Figura 4.2: Citometría de flujo del anticuerpo GG3G5.1E5 frente a células sanguíneas. Doble marcaje de linfocitos sanguíneos (R1), monocitos (R2) y plaquetas (R3).

También se realizó citometría de flujo con la línea NTERA-2/D1 expuesta a ácido retinoico a diferentes tiempos para ver la reactividad del nuestro anticuerpo en distintos estados de diferenciación celular. Los resultados no mostraron cambios significativos, ni en el porcentaje de fluorescencia ni en la intensidad media de fluorescencia en los diferentes tiempos de exposición (figura 4.3).

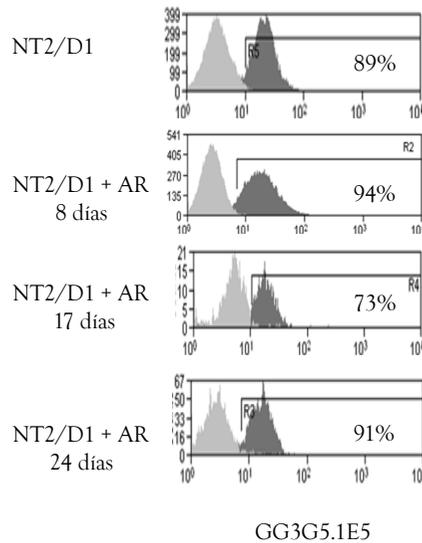


Figura 4.3: Análisis mediante citometría de flujo de la expresión del antígeno reconocido por GG3G5.1E5 en diferentes estados de diferenciación celular. El histograma gris tenue corresponde con el control negativo. NT2/D1: células de carcinoma embrionario humano, AR: ácido retinoico.

2.2.2 Inmunocitoquímica

A continuación y después de comprobar la expresión del antígeno en diferentes líneas y subpoblaciones celulares, nos propusimos localizar el antígeno en el interior celular por inmunocitoquímica. Para ello se testó el anticuerpo con dos líneas celulares embrionarias de humano, la línea HS181 y la línea Shef-6. En primer lugar se testó con la línea HS181, con la que se inmunizó al ratón y los resultados fueron positivos, marcando núcleo y citoplasma (imagen no mostrada). Posteriormente se testó el AcMo con la línea de células troncales embrionarias Shef-6, figura 4.4. En este caso también se marcaba claramente el núcleo y el citoplasma pero se observaba en algunas de las imágenes tomadas como el núcleo tenía más intensidad. (figura 4.4).

Shef6

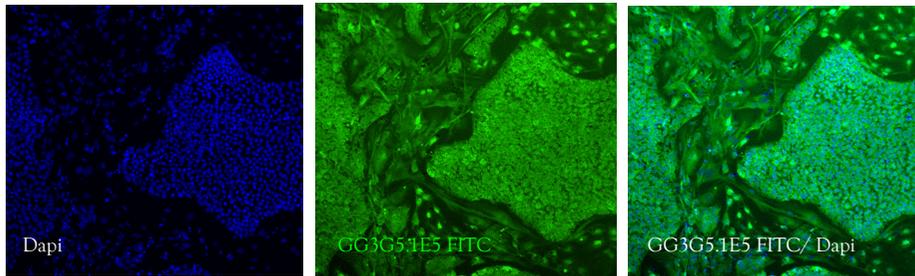


Figura 4.4: Reactividad del anticuerpo monoclonal GG3G5.1E5 con células troncales embrionarias humanas Shef6 por inmunocitoquímica. El AcMo se marcó con anti-mouse conjugado con FITC y para la contratinción del núcleo se utilizó DAPI (4,6 diamidino-2- phenylindole). Como control positivo se utilizó SSEA-3 (imagen no mostrada).

Si observamos la imagen de inmunocitoquímica con nuestro anticuerpo detenidamente, se puede apreciar como el núcleo está más marcado que el citoplasma. Esto podría indicarnos que el antígeno que está reconociendo nuestro AcMo estaría distribuido efectivamente en el citoplasma y el núcleo pero quizás se localizaría en mayor cantidad en el núcleo celular.

2.3 Peso molecular del antígeno

Para obtener el peso molecular del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal GG3G5.1E5 se realizó Western blot sobre diferentes lisados proteicos de distintas líneas celulares: NTERA-2/D1, n2102Ep y D3. No se observó ninguna banda en las tres líneas testadas, siendo sin embargo positivo en citometría de flujo con las mismas líneas celulares, con una expresión cercana al 90%. Con estos resultados se pensó en hacer Western blot con un lisado total de una línea de fibroblastos humanos, la misma con la que se cultivaron las células HS181, inmunógeno utilizado en este trabajo. En este caso los resultados fueron satisfactorios, obteniéndose dos bandas diferenciadas, una cercana a 70 kDa y otra de aproximadamente 60 kDa.

Estos resultados no nos mostraban información de la localización del antígeno en el interior celular, así que nos propusimos repetir el Western blot con dos lisados diferentes: un lisado del citoplasma y otro lisado del núcleo. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 4.5 y como puede observarse tanto en el citoplasma como en el núcleo encontramos las dos bandas cercanas a 70 y 60 kDa. Si comparamos la intensidad de la banda cercana a 60 kDa en los dos lisados, citoplasma y núcleo, vemos como en este último es más gruesa la banda. Esto se puede traducir en una mayor expresión del antígeno a nivel del núcleo, tal como habíamos observado anteriormente en inmunocitoquímica.

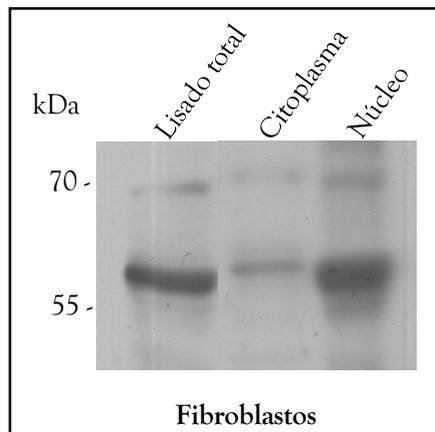


Figura 4.5: Análisis por Western blot de diferentes lisados proteicos de fibroblastos humanos con el AcMo GG3G5.1E5.

Antes de enviar a secuenciar las dos bandas obtenidas por Western blot en fibroblastos humanos se incubó el AcMo con un lisado total de leucocitos humanos, ya que se había observado que en citometría de flujo, GG3G5.1E5 reconocía también el antígeno en las diferentes subpoblaciones. Los resultados se repitieron, se volvían a expresar las mismas dos bandas que en fibroblastos, una cercana a 70 kDa y otra cercana a 60 kDa (Figura 4.6)

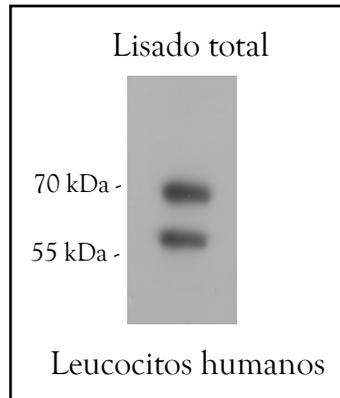


Figura 4.6: Análisis por Western blot de leucocitos humanos con el AcMo GG3G5.1E5.

2.4 Identificación del antígeno: espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF MS)

Las dos bandas reconocidas por el anticuerpo monoclonal GG3G5.1E5 se cortaron y enviaron al servicio de Proteómica de la Universidad de Córdoba, donde se sometieron a una digestión con tripsina y posteriormente se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para así generar la huella peptídica. Posteriormente se llevó a cabo una búsqueda en base de datos NCBI, combinando los resultados de huella peptídica (MS) con las posteriores fragmentaciones (MS/MS) de hasta doce péptidos de cada spot, resultando una búsqueda combinada (MS + MS/MS). Para la identificación de las proteínas se utilizó el motor de búsqueda MASCOT. Los resultados obtenidos tras el análisis de espectrometría de masas realizado para la identificar la banda de 70 kDa, no permitieron llegar a una identificación concluyente de la proteína. En el caso de la banda cercada a 60 kDa la identificación fue correcta. En la tabla 4.1 se muestran las 10 proteínas más probables que el motor de búsqueda encuentra en la base de datos.

Rank	Protein Score	Protein Score C. I. %	Protein Name	Species	Protein MW	Pep. Count	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	674	100	catalase [Homo sapiens]	Homo sapiens	59946.8	20	519	100
2	661	100	catalase [Homo sapiens]	Homo sapiens	51549.6	18	520	100
3	558	100	catalase [Pongo abelii]	Pongo abelii	59967.8	18	427	100
4	548	100	Chain A, Human Erythrocyte Catalase 3-Amino-1,2,4-Triazole Complex	Homo sapiens	58831.2	19	402	100
5	546	100	PREDICTED: hypothetical protein isoform 3 [Pan troglodytes]	Pan troglodytes	58686.2	19	402	100
6	544	100	PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 [Pan troglodytes]	Pan troglodytes	59939.8	19	402	100
7	533	100	catalase [Homo sapiens]	Homo sapiens	59923.9	18	402	100
8	529	100	unnamed protein product [Homo sapiens]	Homo sapiens	53481.6	17	403	100
9	518	100	PREDICTED: catalase isoform 1 [Pan troglodytes]	Pan troglodytes	52406	16	403	100
10	514	100	RecName: Full=Catalase	Callithrix jacchus	60047.9	15	418	100

Tabla 4.1: Identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF MS.

Los resultados obtenidos tras la identificación mostrada en la tabla nos muestran que la banda de aproximadamente 59 kDa correspondería con **catalasa** con un MASCOT score de 674 y una secuencia de cobertura del 41%.

A continuación y para confirmar que el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal GG3G5.1E5 reconocía a catalasa, se utilizó un lisado de la enzima catalasa purificada de eritrocitos humanos (USBiological, Massachusetts (MA) y se realizó un Western blot donde se cargaron dos carriles con diferentes lisados, uno con leucocitos humanos y otro contiguo con la proteína pura catalasa. La membrana se incubó posteriormente con nuestro anticuerpo monoclonal y se observó que efectivamente GG3G5.1E5 reconocía la catalasa cargada en el gel (figura 4.7).

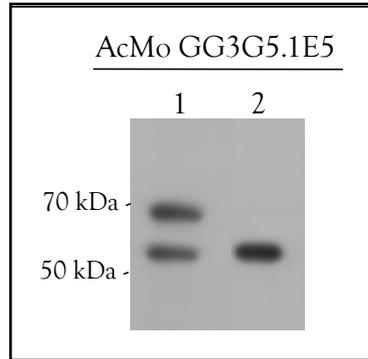


Figura 4.7: Western blot de leucocitos humanos. Expresión del AcMo GG3G5.1E5 en leucocitos humanos (carril 1) y catalasa pura (carril 2).

Por otra parte y para confirmar la identificación de catalasa se testó el AcMo por inmunohistoquímica en hígado y riñón porcino (figura 4.8) con resultados positivos.

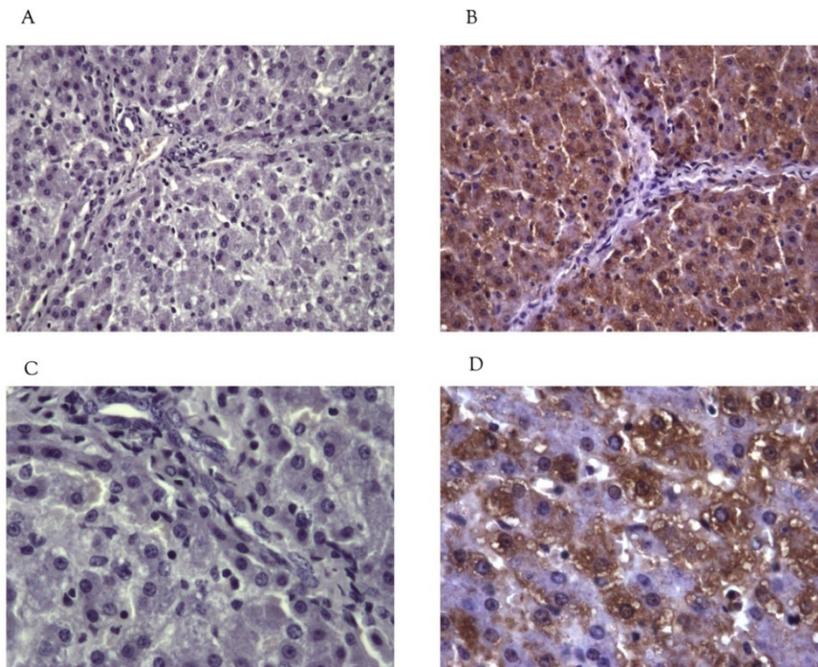


Figura 4.8: Sección histológica correspondiente a hígado porcino. El anticuerpo GG3G5.1E5 muestra reacción positiva, B (20X) y D (40X), en A y C se muestra el control negativo.

3. DISCUSIÓN

En este capítulo se ha obtenido un anticuerpo monoclonal específico que reconoce catalasa, obtenido como contemplábamos en el capítulo 3, mediante la inmunización de todas o parte de células que se encontraban en proceso de apoptosis (Troyano et al 2001; Rezvani et al 2006).

Los resultados obtenidos muestran con claridad que el anticuerpo monoclonal GG3G5.1E5 reconoce la **catalasa**, en su forma de monómero o de dímero. Como vemos en la figura 4.7 en leucocitos humanos también reconoce además de la banda de 59 kDa que es la catalasa otra banda cerca de 70 kDa. Tao Yan y colaboradores en 1998 (Yan et al 1998), hicieron un estudio del uso de anticuerpos comerciales para detectar enzimas antioxidantes, donde 4 anticuerpos eran específicos de catalasa de eritrocitos. Los cuatro anticuerpos eran policlonales y se consideraban buenos en sensibilidad y especificidad como para hacer un estudio fiable. Hicieron Western blot con dos lisados celulares de dos líneas tumorales y en otro carril cargaron catalasa pura. En primer lugar encontraron diferencias entre las bandas de catalasa de los lisados celulares y la banda de catalasa. Lo que observaron fue que una de las bandas tenía una posición ligeramente más alta que la de catalasa pura. Esto se atribuyó a que en las células la catalasa se puede encontrar en dos formas diferentes, la catalasa del citoplasma y la catalasa localizada en los peroxisomas (Korneluk et al 1984). Parece ser que la catalasa reconocida en las líneas celulares correspondería con la catalasa de los peroxisomas. Otro fenómeno que hallaron fue que la banda de la catalasa tiene un peso molecular de aproximadamente 60 kDa y que en algunos casos se encontraba también otra banda de mayor peso molecular, 69 kDa. La explicación a este fenómeno es atribuida a la posible existencia de un dímero de la molécula. En nuestros resultados nos encontramos con este mismo fenómeno, una banda de 59 kDa y otra banda de 69 kDa, y una de las explicaciones que se han barajado sea la existencia de un dímero.

Hoy en día se están comercializando anticuerpos monoclonales que parecen reconocer también dos bandas de catalasa, ya que reconocen además de la banda de 59 kDa, otra de aproximadamente 69 kDa. En la figura 4.9 se muestra el anticuerpo comercial (SantaCruz biotechnology) de ratón específico de catalasa y que reconoce un epítipo que mapea entre los aminoácidos 415-453 dentro de una región interna de catalasa de origen humano.

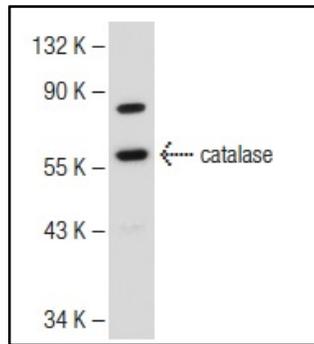


Figura 4.9: Anticuerpo monoclonal comercial específico de catalasa.

Como conclusión final diremos que se ha producido un anticuerpo monoclonal específico frente a catalasa, que podría ser utilizado para detectar catalasa en diferentes células, líneas celulares, tejidos y fluidos. Este anticuerpo es específico de células humanas y presenta reacción cruzada con ratón y cerdo. Puede ser empleado utilizando diferentes técnicas como son ELISA, citometría de flujo, Western blot, inmunocitoquímica o inmunohistoquímica.

DISCUSIÓN GENERAL

1. LOS ANTICUERPOS

Durante esta tesis y como ya se mencionó en el apartado de resultados, se ha generado un panel de 62 anticuerpos monoclonales murinos procedentes de 2 fusiones de células B (una tercera no dio ningún anticuerpo) procedentes de bazos de ratones BALB/c inmunizados con extractos de células embrionarias humanas HS18, y células SP2. Hay que destacar en este trabajo, por un lado, los resultados en cuanto al número de hibridomas obtenidos tras la fusión y por otro el número de hibridomas productores de anticuerpos. No es corriente encontrar estos datos, número total de hibridomas obtenidos y número de hibridomas productores de anticuerpos contra el inmunógeno empleado, en los trabajos sobre anticuerpos monoclonales, más atentos a referirse sólo a los clones positivos. La comparación con los datos procedentes de otros trabajos (Son et al 2005; Choo et al 2008) que han hecho pública esta información indican que nuestros resultados han sido excelentes, confirmando que la tecnología empleada, el estado de las células y las pautas de inmunización han sido muy acertadas. En nuestro caso, se obtuvo un éxito de fusión (porcentaje de pocillos con hibridomas con respecto al total de pocillos de la fusión) con un porcentaje de eficiencia en la fusión 2 y 3 del 61 y 67% respectivamente, mientras que en otros trabajos el porcentaje oscila entre el 20 y el 40% (Son et al 2005; Choo et al 2008). Por otro lado, el éxito de inmunización (porcentaje de pocillos con hibridomas positivos para el antígeno con respecto a los pocillos totales con hibridomas) también fue alto, de un 28% en la tercera fusión, comparado con un 16% de otros trabajos (Underwood et al 1985).

Se ha generado un panel de anticuerpos, que respecto a los epítomos que reconocen incluyen: anticuerpos monoreactivos, que reconocen un epítomo presente en una sola molécula, anticuerpos monoreactivos que presentan reacción cruzada con varias moléculas debido a que reconocen epítomos

comunes en varias moléculas y anticuerpos polireactivos capaces de reconocer varios epítomos.

La obtención de un alto número de anticuerpos con isotipo IgM se debería, como ya se ha explicado en el capítulo 1, principalmente al tipo de inmunógeno que se ha empleado, células completas, y no a las pautas de inmunización. El papel de las IgM ha sido motivo de interés durante años pero su función no habría sido bien definida hasta que recientemente se han generado ratones que pierden completamente en su suero la IgM.

Estos ratones que pierden la capacidad de generar anticuerpos naturales, conocidos así por estar presentes en el organismo a pesar de no haber sido expuesto el animal al antígeno que reconoce, son incapaces de defenderse de las infecciones bacterianas y otros patógenos. Además, la presencia de IgM impide o disminuye el efecto de los autoanticuerpos IgG en las enfermedades autoinmunes. Estos anticuerpos IgM en su unión con autoantígenos inducen tolerancia (Boes 2000).

Las características especiales de células embrionarias humanas de no poseer proteínas que se expresan de manera dominante habrían contribuido a dicho resultado. El empleo de extractos celulares embrionarios humanos que contienen gran cantidad de proteínas intracelulares antigénicamente similares a las del ratón habría estimulado el reconocimiento de éstas por los anticuerpos naturales presentes en el ratón que habrían impedido el desarrollo de una respuesta específica por medio de las IgG. El resultado ha sido la no maduración de las células B que precede al cambio de isotipo M por G, A o E. La falta de maduración llevaría a la no aparición de inmunoglobulinas IgG.

Se puede manejar la hipótesis de que se trataría de antígenos que escapan de la presentación por parte de las células T y por tanto incapaces de inducir la maduración de las células B al isotipo G. Este fenómeno ya ha sido descrito para los antígenos que son carbohidratos (Vollmers & Brandlein 2006).

Tras cada inmunización con los extractos celulares no habría dado lugar, por parte de las células T presentadoras de antígenos, al proceso que induce una respuesta inmune adaptativa, lo que reduciría la posibilidad de maduración de las células B para dar IgG, quedando la respuesta inmune restringida únicamente a la respuesta inmediata donde el isotipo IgM es el dominante.

Cuando se inmuniza con un inmunógeno complejo o sea células, la selección de los anticuerpos depende enormemente del procedimiento de “screening” o selección. En nuestro caso particular las inmunizaciones se realizaron con extractos celulares lo que impidió la selección células completas.¹² El método de selección elegido fue por ELISA indirecto, método en el cual los sobrenadantes de los cultivos reaccionarían con el inmunógeno fijado con glutaraldehído, lo que dificultaría el reconocimiento de epítomos conformacionales. Con este método además, se identifican solo la mitad de los anticuerpos que podrían ser detectados de usarse inmunofluorescencia (Perrot et al 1986).

Por tanto, la utilización de extractos celulares como inmunógeno, no de células enteras, y del ELISA como método de “screening” ha llevado a la selección de anticuerpos fundamentalmente dirigidos frente a moléculas intracelulares. La inmunofluorescencia directa y la citometría de flujo, unido al uso de células completas, hubieran, probablemente, llevado a resultados diferentes.

Otro aspecto relacionado con el inmunógeno empleado y con la obtención de anticuerpos IgM dirigidos contra moléculas intracelulares sería la posible presencia entre nuestros hibridomas de algunos secretores de anticuerpos naturales polireactivos. Estos anticuerpos naturales los producirían hibridomas procedentes de la fusión de las células SP2 con células B

¹² Debido a la imposibilidad de sacar células embrionarias humanas vivas del CABIMER para utilizarlas en la Universidad de Córdoba.

(procedentes del sistema inmune innato) presentes en el animal antes del contacto con inmunógeno alguno, también animales inmunizados con extractos celulares de células de ratón o humanas en apoptosis son capaces de generar este tipo de anticuerpos polireactivos con auto antígenos intracelulares (Perrot et al 1986; Mevorach et al 1998; Gensler et al 2001).

Los anticuerpos de isotipo M con la gran mayoría de los anticuerpos producidos han sido usualmente considerados de segunda categoría, especialmente por el hecho de ser más complicada su purificación. El redescubrimiento de los anticuerpos naturales, formados en su gran mayoría por anticuerpos de isotipo M, aunque los hay de isotipo A y G, ha ido eliminando los prejuicios originados en mitad de los años 80. Con los años, estas moléculas fueron consideradas como los parias entre las moléculas inmunes competentes y su características propias, como baja afinidad, reacciones cruzadas y estructura pentamérica, fueron evaluados como inútiles, dificultosos, nebulosos, etc. Hoy en día, y gracias al trabajo persistente de unos pocos científicos en el descubrimiento de la respuesta inmune innata, los anticuerpos naturales, ha sido la llave para la “vuelta a los escenarios” de este tipo de anticuerpos (Vollmers & Brandlein 2006). Su papel en la respuesta inmune contra bacterias, virus, hongos y posiblemente con componente modificados, es hoy en día bien aceptado así como en terapia y diagnóstico de neoplasias malignas (Janeway 1989; Ben-Aissa-Fennira et al 1998; Boes et al 1998; Ochsenbein et al 1999; Ulvestad et al 2001). Todas las características que hasta el momento se habían juzgado negativamente, como la baja afinidad, que no excluye especificidad, se reconoce como buena para la función de vigilancia y eliminación de una gran variedad de agentes patógenos extraños y células propias modificadas y su reactividad cruzada, es una forma muy económica de reconocimiento inmunológico. Y al fin, con el uso de anticuerpos IgM naturales, se ha encontrado un campo nuevo en las dianas específicas de tumores, los carbono-epítomos. Por lo tanto, por haber aprendido de la naturaleza, el

renacimiento de los anticuerpos IgM naturales abre una nueva área de terapia y diagnóstico frente al cáncer (Vollmers et al 1995; Hensel et al 1999; Hensel et al 2001; Brandlein et al 2002; Vollmers & Brandlein 2002; Brandlein et al 2003; Brandlein et al 2004; Brandlein & Vollmers 2004; Vollmers & Brandlein 2005b; a).

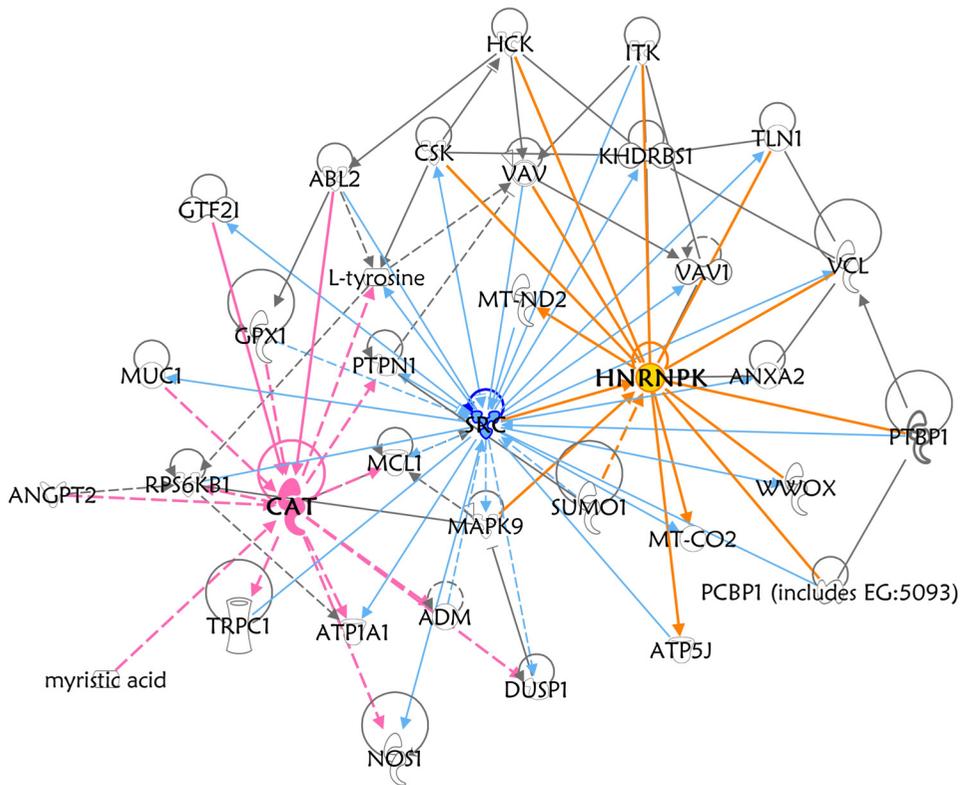
2. LOS ANTÍGENOS

La existencia en el inmunógeno de células embrionarias que podrían estar sometidas a un proceso de apoptosis, queda demostrado con la obtención de un anticuerpo específico, GG15H5.1D2, que reconoce un antígeno encontrado solamente en células apoptóticas, así como la evidencia de dos AcMos más, GG6E7.1D6 y GG8F3.1A2 a falta de caracterizar. Esto podría justificar también la obtención de dos anticuerpos monoclonales que reconocen moléculas también relacionadas con procesos de apoptosis, y que podrían estar sobreexpresadas, el hnRNP K y la catalasa (GG6H9.1C3 y GG3G5.1E5).

El caso de hnRNP K, previamente asociada a la biología de ARN y la expresión génica de *myc*, se ha vinculado en los últimos años en respuesta a daños en el ADN celular, considerándose como un nuevo co-factor para *p-53*, necesario para que las células comiencen el análisis del ciclo celular G1/S en respuesta al daño en el ADN (Moumen et al 2005). Autores como White M.C. (2010) afirman que la inactivación de hnRNP K induce apoptosis (White et al 2010). La obtención de nuestro anticuerpo específico de la molécula hnRNP k se justificaría por la sobreexpresión de esta molécula, en las células utilizadas como inmunógeno, para combatir el daño en el ADN. La reacción del anticuerpo anti hnRNP K con la proteína PSF sería el resultado de una reacción cruzada ya que ambas moléculas comparten dominios. El epítipo reconocido por el anticuerpo GG6H9.1C3 estaría presente en uno de esos dominios comunes, dominio RGG.

En el caso de la catalasa, como se ha comentado más detalladamente en el capítulo 4 de esta tesis, está relacionado directamente con procesos de apoptosis, considerándose como un protector frente a la inducción de apoptosis.

Se analizaron hnRNP K y catalasa en el programa de análisis funcional Ingenuity, en el cual a partir de información contenida en bases de datos y referencias bibliográficas, crea una serie de redes moleculares que relacionan funcionalmente a moléculas. En nuestro caso, lo utilizamos para ver en que procesos éstas dos proteínas podrían estar relacionadas. En la figura 10A se muestran los resultados de la red de interacción en la que están implicadas ambas proteínas. Entre ellas, no hay interconexión directa, pero se observa que CAT (catalasa) interactúa de forma indirecta y hnRNPK interactúa de forma directa con SRC, molécula central de la red de interacción. Este proto-oncogén juega un papel importante en la regulación del desarrollo embrionario y el crecimiento celular y está implicado en procesos como transformación, apoptosis, proliferación y muerte celular entre otros. En la red de interacción cabe destacar que la catalasa en general interactúa de forma indirecta con el resto de moléculas mientras que HNRNPK solo establece relaciones directas. Esto puede ser explicado en base a la funcionalidad de HNRNPK, ya que es una proteína de unión a ARN. Analizando la ruta completa de moléculas que nos aparecen en la red de interacción, encontramos 34 moléculas implicadas, de las cuales 25 de ellas están involucradas con procesos de muerte celular y entre ellas 24 con apoptosis.



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 10: Análisis funcional mediante el programa de análisis Ingenuity. Red de interacción molecular asociada a hnRNP K y catalasa.

La existencia de células en apoptosis utilizadas como inmunógeno puede justificar los resultados obtenidos, ya que repetidas inmunizaciones a ratones con células apoptóticas por vía intravenosa es capaz de inducir auto anticuerpos, sugiriendo que algunos de los anticuerpos generados pueden ser de baja afinidad y poli reactivos (Mevorach et al 1998). Incluso algunos autores han demostrado que las inmunizaciones de ratones normales con células apoptóticas dan como resultado la formación de anticuerpos con múltiples dianas a auto antígenos complejos como rRNPs, snRNPs y vimentina (Gensler et al 2001).

3. LAS APLICACIONES

Para poder demostrar que los anticuerpos producidos tienen un valor como herramientas útiles para los estudios en proteómica humana, es necesaria su validación, como explicábamos más detalladamente en la introducción de esta tesis. Para ello se están validando en la actualidad los anticuerpos GG3G5.1E5 (anti-human catalasa) y GG6H9.1C3 (anti hnRNP K/PSF) en la base de datos <http://www.antibodypedia.org/>, creada conjuntamente por las iniciativas HPR y HPO.

Al introducir los datos disponibles para validar los anticuerpos en [antibodypedia.org](http://www.antibodypedia.org/), con GG3G5.1E5, anti-human catalasa, observamos que los anticuerpos monoclonales disponibles actualmente son tres, incluyendo el nuestro, el cual es el que más aplicaciones validadas posee (ELISA, Western blot, Inmunofluorescencia, Inmunocitoquímica, Inmunohistoquímica y citometría de flujo) figura 11. Actualmente se encuentra en proceso de revisión.

Binder comparison

	C0979	MS721	GG3G5.1E5 Not published
Gene	CAT	CAT	CAT
Provider	Sigma-Aldrich	MitoSciences Inc.	University of Cordoba
Product name	Monoclonal Anti-Catalase antibody produced in mouse	Catalase monoclonal antibody	anti-human catalase
Link to binder	Product page at Sigma-Aldrich	Product page at MitoSciences Inc.	Product page at University of Cordoba
Ab type	mAb	mAb	mAb
Antigen	human erythrocyte catalase		human embryonic cells HS181
Validated applications	ELISA, Immunohistochemistry, Immunocytochemistry	Immunoprecipitation, Immunocytochemistry	Western blot, ELISA, Immunofluorescence, Immunohistochemistry, Flow cytometry, Immunocytochemistry
Description	purified immunoglobulin		
Reactivity	Human, Mouse, Rat, Bovine	Human, Rat, Bovine	Human, Mouse, Porcine
Isotype	IgG	IgG	IgM
Concentration (mg/ml)	~2 mg/mL	1 mg/mL in HEPES-Buffered Saline (HBS) with 0.02% azide as a preservative.	
Storage	-20C	Store at 4°C. Do not freeze.	-20°C
Host		Mouse	Mouse
Vial size (µl)		100 µg	

Figura 11: Comparativa de los anticuerpos monoclonales disponibles frente a catalasa en la base de datos on line Antibodypedia.

El anticuerpo anti hnRNPK/PSF se encuentra también registrado para ser validado y actualmente en proceso de revisión.

Por tanto y desde el punto de vista de su utilidad para la comunidad científica, se plantea su comercialización en un futuro próximo. El caso de anti hnRNPK/PSF, único hasta el momento que reconoce un epítipo común de estas dos proteínas, podría ser utilizado para localizarlas tanto en el núcleo como en el citoplasma y una vez analizado y secuenciado su parátipo podría llegar a ser utilizado como anticuerpo terapéutico. En el capítulo 2 de esta tesis se analiza con más detalle su utilidad.

También somos conscientes del interés que podría tener patentar algunas de las aplicaciones que se podrían obtener del uso de nuestros anticuerpos. Este aspecto queda fuera de la presente tesis ya que implica aspectos económicos-éticos que están lejos de nuestros objetivos presentes. La posible patente del anticuerpo anti- hnRNP K/PSF implicaría su uso como herramienta de prognosis en ciertos tumores. En el caso del anticuerpo que reconoce una molécula de apoptosis sería necesario conocer, primero, la molécula que reconoce y el neo epítipo presente en ella.

Para concluir esta tesis me gustaría incluir un párrafo sacado de un trabajo científico sobre anticuerpos de los muchos que he utilizado en la presente tesis y que ha sido redactado por dos investigadores H. Peter Vollmers y Stephanie Brändlein, del Institute for Pathology, University Würzburg, Alemania y que dice

“Los prejuicios son herramientas útiles para una vida supuestamente más feliz, porque el mundo visto en blanco y negro, bueno y malo es más fácil de mirar y de manejar. Los dogmas, las clasificaciones y las categorías, cierto o no, son difíciles de eliminar más, si aún consiguen un apoyo suficiente. Pero con el

*aumento del conocimiento se hace cada vez más y más difícil seguir pegados a los prejuicios. Después de 30 años de xenoimmunizaciones, recombinaciones y todo tipo de mejoras, creemos que ha llegado el momento de aceptar que los mejores anticuerpos terapéuticos ya existen en los seres humanos y están listos para ser utilizados”*¹³

¹³ *“Prejudices are useful tools for a putatively happier life, because a world seen in black and white, in good and bad is easier to overview and to handle. Dogmas, classifications and categories, true or not, are hard to remove, if there still is enough and prominent support. But with increasing knowledge it becomes harder and harder to stick to prejudices. After 30 years of xenoimmunizations, recombinations and all kinds of improvements, we believe it is now time to accept that the best therapeutic antibodies already exist in humans and are ready to be used.”*

CONCLUSIONES FINALES

1. En esta tesis se han producido 62 anticuerpos monoclonales murinos utilizando como inmunógeno extractos celulares de la línea de células troncales embrionarias HS181. Estos anticuerpos monoclonales murinos son los primeros que se han obtenido en nuestro país utilizando células embrionarias humanas
2. Todos los anticuerpos producidos tienen como característica común el reconocer moléculas intracelulares y son en su gran mayoría de isotipo IgM.
3. Se han obtenido varios anticuerpos específicos de la línea utilizada como inmunógeno. Dos de ellos los **GG5B6.1F9** y **GG13B5.1B3** son anticuerpos específicos de las células HS181 y, sin embargo, no reaccionan con otras líneas celulares embrionarias (Shef-6, H7), con lo que no deben estar relacionados con estados de pluripotencialidad.
4. Otros anticuerpos reconocen una molécula específica de la línea HS181 y que además se expresa en células sanguíneas. Dos de ellos **GG3B5.1F4** y **GG3G12.1D5** podrían reconocer moléculas presentes en la línea HS181 que son moléculas precursoras de otras presentes en algunas células sanguíneas humanas.
5. Por el tipo de inmunógeno y el tipo de anticuerpos producidos se considera que podrían haberse producido algunos anticuerpos naturales o polireactivos. Los anticuerpos **GG3B2.2F7**, **GG8H3.1C9** y **GG11D8.1D6** son tres de este tipo de anticuerpos debido a que son de isotipo Ig M, reconocen epítomos presentes en varias moléculas intracelulares por Western blot, y están presentes en todas las células analizadas.
6. **GG6E7.1E9**, **GG8F3.1A2** y **GG15H5.1D2** reconocen epítomos de moléculas que sólo se expresan en células en estado de apoptosis. El AcMo GG15H5.1D2 reconoce un neoepítomo de la línea HS181 y de fibroblastos humanos cuando son inducidos a apoptosis con estaurosporina.

7. Se han caracterizado dos anticuerpos monoclonales específicos de dos moléculas intracelulares: hnRNP K y catalasa. Para su caracterización, las proteínas reconocidas por los anticuerpos se sometieron a espectrometría de masas tipo MALDI-TOF-TOF y se identificaron por huella peptídica.
8. La expresión y localización celular de **hnRNP K**, molécula reconocida por el anticuerpo **GG6H9.1C3**, está regulada por ácido retinoico.
9. El anticuerpo que reconoce hnRNP k también reconoce un epítipo en **PSF**, que lo hace el único descrito que presenta esta característica.
10. El anticuerpo contra hnRNP K hoy en día se utiliza como marcador tumoral en cáncer de mama. El epítipo reconocido por este anticuerpo podría utilizarse también como diana en terapia avanzada, ya que esta molécula está implicada en procesos de invasión tumoral y metástasis.
11. El anticuerpo específico de la **catalasa** reconoce un epítipo presente en la forma monomérica y dimérica de la enzima.
12. Los anticuerpos contra hnRNP k y catalasa han sido validados como herramientas útiles en los estudios de proteómica humana. Estos anticuerpos podrán ser comercializados para su uso en investigación de biología celular humana al igual que lo están siendo otros con iguales o inferiores características.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2002. *Guidelines for the Utilization of Rodents in Experimental Neoplasia and Ascites Production*. <http://www.jefferson.edu/oar/manual/>
- Aebi H. 1983. Catalase. In: H.U. Bergmeyer, Editor. *Enzymes 1: oxidoreductases, transferases. Methods of Enzymatic Analysis Vol. III, Verlag Chemie, Weinheim III:9*
- Ahn SM, Goode RJ, Simpson RJ. 2008. Stem cell markers: insights from membrane proteomics? *Proteomics* 8:4946-57
- Anderson P, Blue ML, O'Brien C, Schlossman SF. 1989. Monoclonal antibodies reactive with the T cell receptor zeta chain: production and characterization using a new method. *J Immunol* 143:1899-904
- Andrews PW. 1984. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* 103:285-93
- Andrews PW, Banting G, Damjanov I, Arnaud D, Avner P. 1984a. Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* 3:347-61
- Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, et al. 1984b. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 50:147-62
- Andrews PW, Goodfellow PN, Shevinsky LH, Bronson DL, Knowles BB. 1982. Cell-surface antigens of a clonal human embryonal carcinoma cell line: morphological and antigenic differentiation in culture. *Int J Cancer* 29:523-31
- Arce C, Moreno A, Millan Y, Martin de las Mulas J, Llanes D. 2002. Production and characterization of monoclonal antibodies against dog immunoglobulin isotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 88:31-41
- Aroui S, Brahim S, De Waard M, Breard J, Kenani A. 2009. Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231. *Cancer Lett* 285:28-38
- Barboro P, Repaci E, Rubagotti A, Salvi S, Boccardo S, et al. 2009. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Br J Cancer* 100:1608-16
- Batistatou A, Greene LA. 1991. Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol* 115:461-71

- Belmokhtar CA, Hillion J, Segal-Bendirdjian E. 2001. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20:3354-62
- Ben-Aissa-Fennira F, Ben Ammar-El Gaaied A, Bouguerra A, Dellagi K. 1998. IgM antibodies to P1 cytoadhesin of *Mycoplasma pneumoniae* are part of the natural antibody repertoire expressed early in life. *Immunol Lett* 63:59-62
- Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y. 1994. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* 211:314-21
- Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. 2008. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med* 86:1025-32
- Bjorling E, Uhlen M. 2008. Antibodypedia, a portal for sharing antibody and antigen validation data. *Mol Cell Proteomics* 7:2028-37
- Boes M. 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 37:1141-9
- Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. 1998. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 188:2381-6
- Bomszyk K, Denisenko O, Ostrowski J. 2004. hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* 26:629-38
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. 1994. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9:2110-7
- Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, et al. 2010. Antibody validation. *Biotechniques* 48:197-209
- Bourbeillon J, Orchard S, Benhar I, Borrebaeck C, de Daruvar A, et al. 2010. Minimum information about a protein affinity reagent (MIAPAR). *Nat Biotechnol* 28:650-3
- Bouvet JP, Dighiero G. 1998. From natural polyreactive autoantibodies to a la carte monoreactive antibodies to infectious agents: is it a small world after all? *Infect Immun* 66:1-4
- Bouvet JP, Dighiero G. 2000. Cross-reactivity and polyreactivity: the two sides of a coin. *Immunol Today* 21:411-2
- Brandlein S, Eck M, Strobel P, Wozniak E, Muller-Hermelink HK, et al. 2004. PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Hum Antibodies* 13:97-104

- Brandlein S, Lorenz J, Ruoff N, Hensel F, Beyer I, et al. 2002. Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. *Hum Antibodies* 11:107-19
- Brandlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. 2003. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 63:7995-8005
- Brandlein S, Vollmers HP. 2004. Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histol Histopathol* 19:897-905
- Carpenter B, McKay M, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, Murray GI. 2006. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 95:921-7
- Cohen JJ, Duke RC. 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132:38-42
- Cornillon S, Foa C, Davoust J, Buonavista N, Gross JD, Golstein P. 1994. Programmed cell death in Dictyostelium. *J Cell Sci* 107 (Pt 10):2691-704
- Couldwell WT, Hinton DR, He S, Chen TC, Sebat I, et al. 1994. Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Lett* 345:43-6
- Chen LC, Chung IC, Hsueh C, Tsang NM, Chi LM, et al. 2010. The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients. *Cell Death Differ* 17:1463-73
- Chitarra V, Alzari PM, Bentley GA, Bhat TN, Eisele JL, et al. 1993. Three-dimensional structure of a heteroclitic antigen-antibody cross-reaction complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7711-5
- Choo AB, Tan HL, Ang SN, Fong WJ, Chin A, et al. 2008. Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells* 26:1454-63
- de Hoog CL, Foster LJ, Mann M. 2004. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* 117:649-62
- Del Bino G, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. 1991. The concentration-dependent diversity of effects of DNA topoisomerase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. *Exp Cell Res* 195:485-91
- Desjardins P, Ledoux S. 1998. The role of apoptosis in neurodegenerative diseases. *Metab Brain Dis* 13:79-96

- Dighiero G, Guilbert B, Femand JP, Lymberi P, Danon F, Avrameas S. 1983. Thirty-six human monoclonal immunoglobulins with antibody activity against cytoskeleton proteins, thyroglobulin, and native DNA: immunologic studies and clinical correlations. *Blood* 62:264-70
- Dreyfuss G, Choi YD, Adam SA. 1984. Characterization of heterogeneous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Mol Cell Biol* 4:1104-14
- Edwards RG. 2002. Personal pathways to embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 4:263-78
- Elkon K, Casali P. 2008. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:491-8
- Evans JR, Mitchell SA, Spriggs KA, Ostrowski J, Bomszyk K, et al. 2003. Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene* 22:8012-20
- Fishel SB, Edwards RG, Evans CJ. 1984. Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured in vitro. *Science* 223:816-8
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501
- Gensler TJ, Hottelet M, Zhang C, Schlossman S, Anderson P, Utz PJ. 2001. Monoclonal antibodies derived from BALB/c mice immunized with apoptotic Jurkat T cells recognize known autoantigens. *J Autoimmun* 16:59-69
- Godin N, Liu F, Lau GJ, Brezniceanu ML, Chenier I, et al. 2010. Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice. *Kidney Int* 77:1086-97
- Gorlach M, Burd CG, Portman DS, Dreyfuss G. 1993. The hnRNP proteins. *Mol Biol Rep* 18:73-8
- Gorman A, McGowan A, Cotter TG. 1997. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett* 404:27-33
- Gould EA, Chanas AC, Buckley A, Clegg CS. 1983. Monoclonal immunoglobulin M antibody to Japanese encephalitis virus that can react with a nuclear antigen in mammalian cells. *Infect Immun* 41:774-9
- Grossman JS, Meyer MI, Wang YC, Mulligan GJ, Kobayashi R, Helfman DM. 1998. The use of antibodies to the polypyrimidine tract binding protein (PTB) to analyze the protein components that assemble on alternatively spliced pre-mRNAs that use distant branch points. *RNA* 4:613-25

- Guilbert B, Mahana W, Gilbert M, Mazie JC, Avrameas S. 1985. Presence of natural autoantibodies in hyperimmunized mice. *Immunology* 56:401-8
- Hatakeyama H, Kondo T, Fujii K, Nakanishi Y, Kato H, et al. 2006. Protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer. *Proteomics* 6:6300-16
- Hensel F, Brandlein S, Eck M, Schmidt K, Krenn V, et al. 2001. A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. *Lab Invest* 81:1097-108
- Hensel F, Hermann R, Schubert C, Abe N, Schmidt K, et al. 1999. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res* 59:5299-306
- Horvitz HR, EH, Sternberg PW. 1982. Programmed cell death in nematode development. *Neurosciences* 1:9
- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, et al. 2003. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 18:1404-9
- Ikeda K, Kajiwara K, Tanabe E, Tokumaru S, Kishida E, et al. 1999. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 57:1361-5
- Inoue A, Sawata SY, Taira K, Wadhwa R. 2007. Loss-of-function screening by randomized intracellular antibodies: identification of hnRNP-K as a potential target for metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8983-8
- Janeway CA, Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:1-13
- Jin LH, Kim DW, Eum WS, Yoon CS, Jang SH, et al. 2003. Human liver catalase: cloning, expression and characterization of monoclonal antibodies. *Mol Cells* 15:381-6
- JR Tejedó RT-L, S Mora-Castilla, GM Cahuana, A Hmadcha, F Martín, FJ Bedoya and B Soria. 2010. Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival. *Cell Death and Disease* 1, e80
- Katschinski DM, Boos K, Schindler SG, Fandrey J. 2000. Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275:21094-8
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57

- Kohler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-7
- Kolomeichuk SN, Bene A, Upreti M, Dennis RA, Lyle CS, et al. 2008. Induction of apoptosis by vinblastine via c-Jun autoamplification and p53-independent down-regulation of p21WAF1/CIP1. *Mol Pharmacol* 73:128-36
- Kolle G, Ho M, Zhou Q, Chy HS, Krishnan K, et al. 2009. Identification of human embryonic stem cell surface markers by combined membrane-polysome translation state array analysis and immunotranscriptional profiling. *Stem Cells* 27:2446-56
- Korneluk RG, Quan F, Lewis WH, Guise KS, Willard HF, et al. 1984. Isolation of human fibroblast catalase cDNA clones. Sequence of clones derived from spliced and unspliced mRNA. *J Biol Chem* 259:13819-23
- Kramer A, Keitel T, Winkler K, Stocklein W, Hohne W, Schneider-Mergener J. 1997. Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell* 91:799-809
- Krecic AM, Swanson MS. 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11:363-71
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
- Lansdorp PM, Astaldi GC, Oosterhof F, Janssen MC, Zeijlemaker WP. 1980. Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell surface antigens. Quantitation of binding and staining of individual cells. *J Immunol Methods* 39:393-405
- Laserna EJ, Valero ML, Sanz L, del Pino MM, Calvete JJ, Baretino D. 2009. Proteomic analysis of phosphorylated nuclear proteins underscores novel roles for rapid actions of retinoic acid in the regulation of mRNA splicing and translation. *Mol Endocrinol* 23:1799-814
- Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF. 2003. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med* 13:295-301
- Laury-Kleintop LD, Tresini M, Hammond O. 2005. Compartmentalization of hnRNP-K during cell cycle progression and its interaction with calponin in the cytoplasm. *J Cell Biochem* 95:1042-56
- Leavy O. 2010. Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nat Rev Immunol* 10:297
- Lee BC, Shav-Tal Y, Peled A, Gothelf Y, Jiang W, et al. 1996. A hematopoietic organ-specific 49-kD nuclear antigen: predominance in immature normal and tumor granulocytes and detection in hematopoietic precursor cells. *Blood* 87:2283-91

- Littlefield JW. 1964. Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in Vitro and Their Presumed Recombinants. *Science* 145:709-10
- Lockshin RA. 1964. Programmed cell death. II Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol.* 10:6
- Ludwig DL, Pereira DS, Zhu Z, Hicklin DJ, Bohlen P. 2003. Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene* 22:9097-106
- Luthi AU, Martin SJ. 2007. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14:641-50
- Major SM, Nishizuka S, Morita D, Rowland R, Sunshine M, et al. 2006. AbMiner: a bioinformatic resource on available monoclonal antibodies and corresponding gene identifiers for genomic, proteomic, and immunologic studies. *BMC Bioinformatics* 7:192
- Mandal M, Vadlamudi R, Nguyen D, Wang RA, Costa L, et al. 2001. Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function. *J Biol Chem* 276:9699-704
- Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset JF, Revil T, Chabot B. 2007. hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol* 623:123-47
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603
- Matta A, Tripathi SC, DeSouza LV, Grigull J, Kaur J, et al. 2009. Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 125:1398-406
- Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G. 1992. Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol Cell Biol* 12:164-71
- Maxwell SA. 1994. Two-dimensional gel analysis of p53-mediated changes in protein expression. *Anticancer Res* 14:2549-56
- Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB. 1998. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med* 188:387-92
- Michelotti EF, Michelotti GA, Aronsohn AI, Levens D. 1996. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell Biol* 16:2350-60
- Moore MJ. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309:1514-8
- Mora-Castilla S, Tejado JR, Hmadcha A, Cahuana GM, Martin F, et al. 2010. Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell Death Differ* 17:1025-33

- Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, Jackson SP. 2005. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell* 123:1065-78
- Naarmann IS, Harnisch C, Flach N, Kremmer E, Kuhn H, et al. 2008. mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem* 283:18461-72
- Notkins AL. 2004. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol* 25:174-9
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, et al. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156-9
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH. 2004. Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: the function of hnRNPs K and E1/E2. *Biol Cell* 96:407-11
- Patton JG, Porro EB, Galceran J, Tempst P, Nadal-Ginard B. 1993. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* 7:393-406
- Peng R, Dye BT, Perez I, Barnard DC, Thompson AB, Patton JG. 2002. PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA. *RNA* 8:1334-47
- Perrot JY, Krief P, Julien C, Benoit P, Mirshahi M, et al. 1986. Screening monoclonal antibodies against cell-surface antigens. High frequency of natural antibodies. *Scand J Immunol* 23:623-9
- Pino I, Pio R, Toledo G, Zabalegui N, Vicent S, et al. 2003. Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer* 41:131-43
- Qi Z, Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Sugimori N, et al. 2010. Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia. *Ann Hematol*
- Reed JC. 2002. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1:111-21
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18:399-404
- Rezvani HR, Cario-Andre M, Pain C, Ged C, deVerneuil H, Taieb A. 2007. Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression. *Cancer Gene Ther* 14:174-86

- Rezvani HR, Mazurier F, Cario-Andre M, Pain C, Ged C, et al. 2006. Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 281:17999-8007
- Rigas A, Dervenis C, Giannakou N, Kozoni V, Shiff SJ, Rigas B. 2002. Selective induction of colon cancer cell apoptosis by 5-fluorouracil in humans. *Cancer Invest* 20:657-65
- Ruegg UT, Burgess GM. 1989. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10:218-20
- Saper CB. 2005. An open letter to our readers on the use of antibodies. *J Comp Neurol* 493:477-8
- Sayan BS, Ince G, Sayan AE, Ozturk M. 2001. NAPO as a novel marker for apoptosis. *J Cell Biol* 155:719-24
- Shav-Tal Y, Zipori D. 2002. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531:109-14
- Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I, Solter D. 1982. Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell* 30:697-705
- Shulman M, Wilde CD, Kohler G. 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276:269-70
- Solter D, Knowles BB. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5565-9
- Son YS, Park JH, Kang YK, Park JS, Choi HS, et al. 2005. Heat shock 70-kDa protein 8 isoform 1 is expressed on the surface of human embryonic stem cells and downregulated upon differentiation. *Stem Cells* 23:1502-13
- Song X, Sui A, Garen A. 2004. Binding of mouse VL30 retrotransposon RNA to PSF protein induces genes repressed by PSF: effects on steroidogenesis and oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:621-6
- Strugnell RA, Underwood JR, Clarke FM, Pedersen JS, Chalmers PJ, et al. 1983. A monoclonal IgM smooth muscle antibody reactive with fibroblast stress fibres produced by immunization with *Treponema pallidum*. *Clin Exp Immunol* 52:537-42
- Sun Y, Yi H, Zhang PF, Li MY, Li C, et al. 2007. Identification of differential proteins in nasopharyngeal carcinoma cells with p53 silence by proteome analysis. *FEBS Lett* 581:131-9
- Tadokoro D TS, Shimizu K, Hayashi S, Endo Y and Sawasaki T. 2010. Characterization of a caspase-3-substrate kinome using an N- and C-

- terminally tagged protein kinase library produced by a cell-free system. *Cell Death and Disease*
- Tafani M, Cohn JA, Karpnich NO, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. 2002. Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 277:49569-76
- Tafani M, Minchenko DA, Serroni A, Farber JL. 2001. Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res* 61:2459-66
- Tewari M, Dixit VM. 1995. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 270:3255-60
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-62
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7
- Troyano A, Fernandez C, Sancho P, de Blas E, Aller P. 2001. Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J Biol Chem* 276:47107-15
- Tyson-Capper AJ, Shiells EA, Robson SC. 2009. Interplay between polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor and human myometrial progesterone receptors. *J Mol Endocrinol* 43:29-41
- Uhlen M, Ponten F. 2005. Antibody-based proteomics for human tissue profiling. *Mol Cell Proteomics* 4:384-93
- Ulvestad E, Kanestrom A, Sonstebj LJ, Jureen R, Omland T, et al. 2001. Diagnostic and biological significance of anti-p41 IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *Scand J Immunol* 53:416-21
- Underwood JR, Pedersen JS, Chalmers PJ, Toh BH. 1985. Hybrids from normal, germ free, nude and neonatal mice produce monoclonal autoantibodies to eight different intracellular structures. *Clin Exp Immunol* 60:417-26
- Utz PJ, Anderson P. 1998. Posttranslational protein modifications, apoptosis, and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum* 41:1152-60
- Vollmers HP, Brandlein S. 2002. Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies. *Hum Antibodies* 11:131-42
- Vollmers HP, Brandlein S. 2005a. Death by stress: natural IgM-induced apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27:185-91

- Vollmers HP, Brandlein S. 2005b. The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol* 20:927-37
- Vollmers HP, Brandlein S. 2006. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 58:755-65
- Vollmers HP, Dammrich J, Ribbert H, Wozniak E, Muller-Hermelink HK. 1995. Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody. *Cancer* 76:550-8
- Weigel TL, Lotze MT, Kim PK, Amoscato AA, Luketich JD, Odoux C. 2000. Paclitaxel-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines is associated with increased caspase-3 activity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:795-803
- Wen F, Shen A, Shanas R, Bhattacharyya A, Lian F, et al. 2010. Higher expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k in melanoma. *Ann Surg Oncol* 17:2619-27
- White MC, Gao R, Xu W, Mandal SM, Lim JG, et al. 2010. Inactivation of hnRNP K by expanded intronic AUUCU repeat induces apoptosis via translocation of PKCdelta to mitochondria in spinocerebellar ataxia 10. *PLoS Genet* 6:e1000984
- Wiemer EA, Ofman R, Middelkoop E, de Boer M, Wanders RJ, Tager JM. 1992. Production and characterisation of monoclonal antibodies against native and disassembled human catalase. *J Immunol Methods* 151:165-75
- Winau F, Westphal O, Winau R. 2004. Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. *Microbes Infect* 6:786-9
- Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. 2003. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Exp Cell Res* 283:135-45
- Yan T, Jiang X, Zhang HJ, Li S, Oberley LW. 1998. Use of commercial antibodies for detection of the primary antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 25:688-93
- Yang LJ, Wang WL. 2002. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. *World J Gastroenterol* 8:808-14
- Yue TL, Wang C, Romanic AM, Kikly K, Keller P, et al. 1998. Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J Mol Cell Cardiol* 30:495-507
- Yuste VJ, Sanchez-Lopez I, Sole C, Encinas M, Bayascas JR, et al. 2002. The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 80:126-39

- Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. 1996. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 157:3980-7
- Zhang C, Xu Y, Gu J, Schlossman SF. 1998. A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6290-5
- Zhou ZH, Tzioufas AG, Notkins AL. 2007. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun* 29:219-28