



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**ESCOLA D'ENGINYERIA**

**DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA**

**ESTUDI SOBRE L'EFECTE DE BHRF1 EN LA INHIBICIÓ  
DE L'APOPTOSI I EL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR  
EN CÈL·LULES D'HIBRIDOMA**

**Ernest Milián González**

**2013**



# **ESTUDI SOBRE L'EFECTE DE BHRF1 EN LA INHIBICIÓ DE L'APOPTOSI I EL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR EN CÈL·LULES D'HIBRIDOMA**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor  
en Biotecnologia per la Universitat Autònoma de  
Barcelona, per Ernest Milián González.

Aquest treball s'ha realitzat al Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció del Dr. Francesc Gòdia Casablanca, el Dr. Jordi Joan Cairó Badillo i el Dr. Joaquim Vives Armengol, Bellaterra 2013.



# NOMENCLATURA

<b>ADP</b>	Adenosin Difosfat
<b>AIF</b>	Factor Inductor de l'Apoptosi ( <i>Apoptosis Inducing Factor</i> )
<b>AKT/PKB</b>	Proteïna cinasa B ( <i>Protein Kinase B</i> )
<b>AMPK</b>	Proteïna cinasa activada per AMP ( <i>AMP activated protein kinase</i> )
<b>ANT</b>	Translocasa de nucleòtids d'adenina ( <i>Adenine Nucleotide Translocase</i> )
<b>AP1</b>	Activador de proteïnes 1 ( <i>activator protein 1</i> )
<b>APAF-1</b>	Factor activador de proteases apoptòtiques 1 ( <i>Apoptotic protease activating factor-1</i> )
<b>APS</b>	Persulfat d'amoni ( <i>Ammonium Persulfat</i> )
<b>ASK</b>	Cinases reguladores del senyal apoptòtic ( <i>Apoptosis Signal-Regulating Kinases</i> )
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfosfat
<b>BAG</b>	Atanògen associat a Bcl2 ( <i>Bcl2 associated athanogen</i> )
<b>Bak</b>	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>B Cell lymphoma 2</i>
<b>Bcl-X<sub>L</sub></b>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
<b>BH</b>	Domini d'homologia a Bcl-2 ( <i>Bcl-2 homology domain</i> )
<b>Bid</b>	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
<b>Bim</b>	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
<b>Bim<sub>EL</sub></b>	<i>Bim extra large</i>
<b>Bim<sub>L</sub></b>	<i>Bim large</i>
<b>BSA</b>	Albúmina de sèrum boví ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>cel.</b>	cèl·lules
<b>CAD</b>	<i>Caspase-activated DNase</i>
<b>CARD</b>	Domini reclutador de caspases ( <i>Caspase Recruitment Domain</i> )
<b>CDK</b>	Cinasa depenent de ciclina ( <i>Cyclin-dependent kinases</i> )
<b>CDKi</b>	Inhibidors de cinases depenents de ciclins ( <i>Cyclin-dependent kinases inhibitors</i> )
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>CHAPS</b>	<i>Cholamidopropyl(dimethylammonio)-1-Propanesulfonic Acid</i>
<b>Cip</b>	Proteïna interaccionadora amb Cdk ( <i>Cdk-interacting protein</i> )
<b>cm<sup>2</sup></b>	centímetres quadrats
<b>CREB</b>	Proteïna d'unió a l'element de resposta AMPcíclic ( <i>CyclicAMP response element binding protein</i> )
<b>C<sub>T</sub></b>	Cicle llindar ( <i>Threshold Cycle</i> )
<b>Cy3</b>	Cianina 3
<b>Cy5</b>	Cianina 5
<b>DcR</b>	<i>Decoy-receptor</i>
<b>DD</b>	Domini de mort ( <i>Dead Domain</i> )

<b>DED</b>	Domini efector de mort ( <i>Death Effector Domain</i> )
<b>DISC</b>	Complex d'inducció a la mort cel·lular
<b>DMEM</b>	medi Eagle modificat de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfòxid
<b>DNA</b>	<i>Desoxy Ribonucleic Acid</i>
<b>dNTP</b>	nucleòtid
<b>DR</b>	Receptor de mort ( <i>Death Receptor</i> )
<b>dsRNA</b>	molècules llargues de doble cadena de RNA
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	àcid etilendiaminotetracètic
<b>ERK</b>	Cinasa regulada per senyal extracel·lular ( <i>Extracellular signal Regulated Kinase</i> )
<b>FACS</b>	<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
<b>FADD</b>	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
<b>Fas/CD95</b>	<i>FS-7 Associated Surface antigen</i>
<b>FBS</b>	<i>Sèrum fetal boví (Foetal Bovine Serum)</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>FLIP</b>	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
<b>FRET</b>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>g</b>	gram
<b>gel 2D</b>	gel en 2 dimensions
<b>h</b>	hora
<b>HK</b>	Hexocinasa
<b>HSP 70</b>	Proteïna de xoc tèrmic 70 ( <i>Heat Shock Protein 70</i> )
<b>IAP</b>	Proteïnes inhibidores de l'apoptosi ( <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i> )
<b>ICAD</b>	<i>inhibitor of Caspase Recruitment Domain</i>
<b>IF</b>	immunofluorescència
<b>IκB</b>	Inhibidor de NF-κB ( <i>Inhibitor of NF-κB</i> )
<b>IKK</b>	<i>IκB inhibitor</i>
<b>IP</b>	iodur de propidi
<b>JNK</b>	<i>c-Jun NH2-terminal kinases</i>
<b>Jun</b>	Oncogen aïllat d'un virus de sarcoma d'aus (avian sarcoma virus 17, el nom ve de "ju-nana" en japonès)
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>Kip</b>	Proteïnes inhibidores de cinases ( <i>Kinase inhibitor protein</i> )
<b>mA</b>	mil·liamper
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
<b>Mcl1</b>	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
<b>MDM2</b>	<i>Mouse double minute 2</i>
<b>MEKK</b>	<i>Mitogen activated protein Extracellular signal regulated Kinase</i>
<b>min</b>	minuts
<b>mg</b>	mil·ligram
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>mL</b>	mil·lilitre
<b>mM</b>	mil·limolar

<b>MMP</b>	<i>Mitochondrial Membrane Permeabilization</i>
<b>MOMP</b>	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
<b>mRNA</b>	missatge de l'àcid ribonucleic
<b>mTOR</b>	Diana de la rapamicina en mamífers ( <i>mammalian target of rapamicin</i> )
<b>n</b>	nombre de repeticions
<b>N.C.</b>	nivell de canvi
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid
<b>NCCD</b>	<i>Nomenclature Committee on Cell Death</i>
<b>neo</b>	neomicina
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear kappa B ( <i>Nuclear Factor kappa B</i> )
<b>ng</b>	nanogram
<b>nm</b>	nanòmetres
<b>nt</b>	nucleòtid
<b>°C</b>	graus centígrads
<b>OPG</b>	osteoprotegerina
<b>o/n</b>	<i>overnight</i>
<b>p21</b>	Cinasa inhibidora dependent de ciclines 1 ( <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i> )
<b>p53</b>	proteïna anti-oncogènica supressora de tumors
<b>PARP1</b>	Poli(ADP-ribosa) Polimerasa-1
<b>pb</b>	parells de bases nucleotídiques
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCNA</b>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>PDK1</b>	Phosphoinositide-dependent kinase-1
<b>PFA</b>	Paraformaldehid
<b>pl</b>	punt Isoelèctric
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-inositol-3 cinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfat
<b>PIP3</b>	Fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfat
<b>polyA</b>	poliadenosines
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>PTPC</b>	<i>Permeability Transition Pore Complex</i>
<b>ras</b>	<i>retrovirus associated sequences</i>
<b>Rheb</b>	<i>Ras-homolog enriched in Brain</i>
<b>RIP</b>	<i>Receptor Interacting Protein</i>
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>rpm</b>	revolucions per minut
<b>RT-PCR</b>	transcripció reversa de la PCR
<b>s</b>	segons
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SGK</b>	<i>SG Kinase</i>
<b>SOB</b>	<i>Super Optimal Broth</i>
<b>SOC</b>	<i>Super Optimal Catabolite repression</i>

<b>STAT</b>	Transductors de senyal i activadors de la transcripció ( <i>Signal transducers and activators of transcription</i> )
<b>T</b>	Temperatura
<b>TAE</b>	Tris Acetat EDTA
<b>TBS</b>	Tris Buffered Saline
<b>TEMED</b>	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
<b>T<sub>h</sub></b>	temperatura d'hibridació
<b>TLR3</b>	<i>Toll-like Receptors</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusió ( <i>Melting temperature</i> )
<b>TNF</b>	Factor de necrosi tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
<b>TNFR1</b>	Receptor TNF ( <i>TNF Receptor</i> )
<b>TNFRSF</b>	Receptor de la superfamília TNF ( <i>TNF Receptor Super Family</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Receptor TNF alfa ( <i>TNF alpha receptor</i> )
<b>TOM</b>	<i>Translocase Outer Membrane</i>
<b>TRADD</b>	<i>TNF receptor type 1-associated death domain protein</i>
<b>TRAF2</b>	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
<b>TRAIL-R</b>	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor</i>
<b>TSC</b>	Complex d'esclerosi tuberosa ( <i>tuberous sclerossi complex</i> )
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	volum/volum
<b>VDAC</b>	Canal aniònic depenent de voltatge ( <i>voltage dependant anionic channel</i> )
<b>p/v</b>	pes/volum
<b>WB</b>	Western Blot
<b>xg</b>	vegades la gravetat
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	microgram
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	microlitre
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	micrometre
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	micromolar



## AMINOÀCIDS

Ala	A	Alanina	Leu	L	Leucina
Arg	R	Arginina	Lys	K	Lisina
Asp	D	Àcid aspàrtic	Met	M	Metionina
Asn	N	Asparragina	Phe	F	Fenilalanina
Cys	C	Cisteïna	Pro	P	Prolina
Gln	Q	Glutamina	Ser	S	Serina
Glu	E	Àcid glutàmic	Thr	T	Treonina
Gly	G	Glicina	Trp	W	Triptòfan
His	H	Histidina	Tyr	Y	Tirosina
Ile	I	Isoleucina	Val	V	Valina



## ÍNDEX

---



---

RESUM	3
INTRODUCCIÓ	
1. IMPORTÀNCIA I PROBLEMÀTIQUES DEL CULTIU in vitro DE CÈL·LULES ANIMALS 7	
1.1 ASPECTES GENERALS DEL CULTIU IN VITRO DE CÈL·LULES ANIMALS 7	
1.1.1. La mort per apoptosi de l'hibridoma KB26.5	13
2. MORT CEL·LULAR	17
2.1. AUTOFAGIA	18
2.2. NECROSI	19
2.3. APOPTOSI	19
2.3.1. Rutes extrínseques de senyalització de l'apoptosi	21
2.3.1.1. La ruta Fas-FasL	22
2.3.1.2. La ruta TRAIL-DR	23
2.3.1.3. La ruta TNF $\alpha$ -TNFR1	24
2.3.2. Rutes intrínseques de senyalització de l'apoptosi	25
2.3.3. La família de Bcl-2	28
2.3.4. Mecanismes de permeabilització de la membrana mitocondrial	32
2.3.4.1. Permeabilització mediada per Bax/Bak	32
2.3.5. Senyals aferents d'altres orgànuls	36
2.3.5.1. Danys al DNA nuclear	36
2.3.5.2. Citosol	37
2.3.6. Inductors de la mort cel·lular alliberats des del mitocondri	40
2.3.6.1. Citocrom <i>c</i>	40
2.3.6.2. Smac/DIABLO	41
2.3.6.3. AIF	41
2.3.6.4. Endonucleasa G	41

2.3.7. Les caspases	41
3. CICLE CEL·LULAR	46
4. ESTRATÈGIES PER INHIBIR L'APOPTOSI EN CULTIUS EN BIOREACTORS	51
4.1. BHRF1	54
4.1.1. Efecte de l'expressió de BHRF1 en l'hibridoma KB26.5	59
OBJECTIUS	65
RESULTATS I DISCUSSIÓ	
1. EXPRESSIÓ DE BHRF1, APOPTOSI i CICLE CEL·LULAR EN CULTIUS D'HIBRIDOMA	69
2. EXPRESSIÓ GÈNICA i PROTEICA ASSOCIADA A BHRF1	88
2.1. EXPRESSIÓ GÈNICA	89
2.2. EXPRESSIÓ PROTEICA	106
3. LOCALITZACIÓ DE BHRF1	111
4. ACTUACIÓ DE BHRF1	125
4.1. INTERACCIONS PROTEIQUES DE BHRF1	125
4.2. IMPLICACIÓ DE Bcl-2 EN EL MECANISME D'ACCIÓ DE BHRF1	128
5. MODEL D'ACTUACIÓ DE BHRF1	136
CONCLUSIONS	143
MATERIALS I MÈTODES	
1. MATERAILS	147
1.1. MATERIAL BIOLÒGIC	147
1.1.1. Bacteris	147
1.1.2. Cultiu cel·lular	147
1.2. PLASMIDIS, CONSTRUCCIONS I OLIGONUCLEÒTIDS	147
1.2.1. Plasmidis i construccions	147
1.2.1.1. pIRESneo	148
1.2.1.2. pcDNA3	148

---

1.2.2. Oligonucleòtids	149
1.2.3. Anticossos	150
1.3. MEDIS DE CULTIU	151
1.3.1 Bacteris	151
1.3.2. Cèl·lules de mamífer	152
1.4 TAMPONS I SOLUCIONS	152
1.4.1. Relacionats amb proteïnes	152
1.4.2. Relacionats amb els àcids nucleics	154
1.4.3. Tampons i solucions generals	154
2. MÈTODES	155
2.1. CULTIU CEL·LULAR	155
2.1.1. Sistemes de cultiu de la soca bacteriana	155
2.1.2. Cultiu de cèl·lules animals	155
2.1.2.1. Sistemes de cultiu de cèl·lules animals	156
2.1.2.2. Recompte cel·lular	156
2.1.2.3. Càlcul de la concentració i viabilitat cel·lular	157
2.1.2.4. Càlcul del temps de duplicació i de la durada de les fases del cicle cel·lular	157
2.1.2.5. Cultiu amb inhibidors de Bcl-2	158
2.1.2.6. Cultiu en perfusió	159
2.2. ANÀLISI I MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS	159
2.2.1. Extracció i purificació de DNA plasmídic	159
2.2.2. Extracció i purificació de DNA genòmic	159
2.2.3. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis	159
2.2.3.1. Reaccions de modificació del DNA	159
2.2.3.2. Electroforesi en gel d'agarosa no desnaturalitzant	160
2.2.3.3. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa	160

---

2.2.3.4. Preparació i transformació de cèl·lules competents d' <i>E.coli</i>	160
2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)	162
2.3.1. Condicions generals de PCR	162
2.3.2. RT-PCR	163
2.3.3. Reacció de PCR en Temps Real (Real-Time PCR)	165
2.3.3.1. Extracció de RNA <sub>TOTAL</sub>	168
2.3.3.2. Quantificació de RNA <sub>TOTAL</sub>	168
2.3.4. Microarrays de DNA	168
2.4. MICROSCÒPIA	171
2.4.1. Fixació i muntatge de les cèl·lules	171
2.4.2. Marcatge fluorescent de proteïnes	171
2.4.3. Immunocitoquímica	172
2.4.3.1. Immunocitoquímica amb fixació PFA 4%	172
2.4.3.2. Col·localització	173
2.5. TÈCNiques PROTEIQUES	174
2.5.1. Gels desnaturalitzants d'acrilamida per a proteïnes (SDS-PAGE)	174
2.5.1.1. Obtenció del lisat cel·lular total	174
2.5.1.2. Extracció de la fracció mitocondrial	174
2.5.1.3. Quantificació de proteïna	174
2.5.2. Transferència de proteïnes (Western Blot)	177
2.5.3. Anticossos	179
2.5.4. Immunoprecipitació	180
2.6. PROTEOMA	
2.6.1. Preparació de les mostres pel gel d'electroforesi de dos dimensions i anàlisi proteòmic	184
2.6.2. Electroforesi de gels 2-D	184
2.6.3. Tinció de plata i anàlisi de les imatges	185



2.7. ANÀLISI DE CICLE CEL·LULAR I APOPTOSI PER CITOMETRIA DE FLUX	185
2.7.1. Determinació de l'apoptosi	186
2.7.2. Determinació de la integritat mitocondrial	187
2.7.3. Assaigs de cicle cel·lular	188
2.8. CARIOTIPATGE DE LA LÍNIA D'HIBRIDOMA KB26.5	189
BIBLIOGRAFIA	193



## RESUM

---



En l'actualitat, la indústria farmacèutica utilitza la tecnologia basada en el cultiu *in vitro* de cèl·lules animals per a la producció de compostos d'elevat interès terapèutic i també, com a model biològic per assajar l'activitat de nous fàrmacs. Moltes empreses fan ús d'aquesta tecnologia ja que es tracta del sistema biològic més apropiat per obtenir proteïnes complexes. Tot i així, pel que fa a l'ús de cèl·lules animals, existeixen una sèrie de limitacions importants, entre les que es troba la pèrdua de viabilitat de les cèl·lules en cultiu, degut a l'activació del procés de mort cel·lular programada, o apoptosi.

La principal causa de l'activació d'aquest tipus de mort cel·lular és l'esgotament de determinats nutrients essencials o factors de creixement i l'acumulació de metabòlits tòxics per a la cèl·lula al llarg del cultiu. L'apoptosi representa un greu inconvenient a nivell del cultiu *in vitro* en bioreactors, ja que disminueix dràsticament la viabilitat del cultiu i, en conseqüència, la productivitat del bioreactor.

En aquest treball, s'han utilitzat cèl·lules d'hibridoma KB26.5 productores de la immunoglobulina IgG<sub>3</sub>, transfectades amb el gen *bhrf1* i s'ha comprovat com aquesta modificació és capaç de reduir el nivell de mort per apoptosi, i garantir la supervivència de les cèl·lules durant un període on hi ha una situació d'inducció a l'apoptosi. Aquesta capacitat s'ha observat en dos sistemes de cultiu cel·lular com són el discontinu i la perfusió. Aquest últim sistema de cultiu ha posat en evidència que, a més de conferir una major resistència a la mort cel·lular, BHRF1 afecta al cicle cel·lular tant sols en els moments de limitació de nutrients.

Aquestes observacions han portat a estudiar els efectes intracel·lulars de BHRF1 per entendre com aquest gen víric era capaç de produir aquests efectes fenotípics. S'ha determinat que l'activitat de BHRF1 no es limita tant sols a l'aturada de l'apoptosi a nivell mitocondrial, sinó que és capaç d'influir en diverses rutes que intervenen en processos vitals per la cèl·lula.

Les anàlisis realitzades amb *microarrays* de DNA revelen una capacitat de BHRF1 d'induir de forma diferencial l'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi, el cicle cel·lular, la ruta Akt/mTOR i la via de JNK. A més, estudis realitzats mitjançant PCR en temps real han indicat que, tant sols en condicions inductores de l'apoptosi, es produeix una sobreexpressió de *bcl2* en les cèl·lules KB26.5 transfectades amb el gen

*bhrf1*, indicant que hi ha una relació entre les dues proteïnes codificades per aquests gens.

Per tal de veure els efectes de la sobreexpressió de *bcl2* s'han utilitzat inhibidors químics específics per la proteïna Bcl-2. Com a resultat s'ha anul·lat la resistència a l'apoptosi per part d'aquelles cèl·lules amb expressió de BHRF1. La sobreexpressió de *bcl2* es pot relacionar, a més, amb l'aturada observada del cicle cel·lular en la fase G<sub>1</sub>.

La relació entre BHRF1 i Bcl-2 no s'ha constatat a través d'una interacció directa, ja que tant sols s'han determinat interaccions de BHRF1 amb la proteïna proapoptòtica Bim i amb VRK2, proteïna relacionada amb la ruta JNK. Aquestes interaccions proteiques poden explicar la conservació de la integritat mitocondrial que s'ha observat en aquelles cèl·lules amb presència de BHRF1 i la resistència a l'apoptosi en condicions d'estrès.

En aquest treball s'ha determinat també que BHRF1 és una proteïna exclusivament mitocondrial, ja que aquesta no varia la seva localització cel·lular tant en un context d'alta viabilitat cel·lular com d'apoptosi, per tant les interaccions proteiques s'ha de donar a nivell del mitocondri.

## INTRODUCCIÓ

---





# 1. IMPORTÀNCIA I PROBLEMÀTIQUES DEL CULTIU *in vitro* DE CÈL·LULES ANIMALS

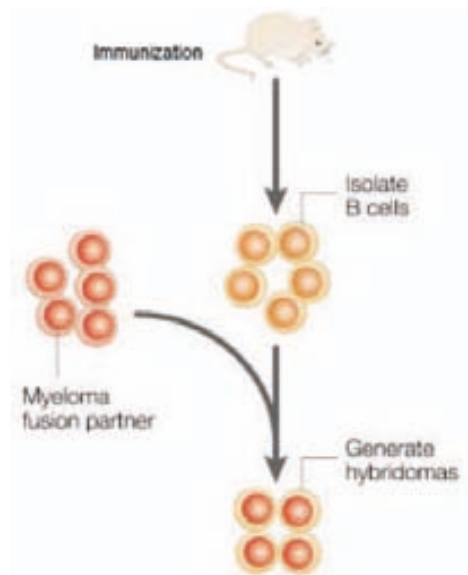
## 1.1. ASPECTES GENERALS DEL CULTIU *IN VITRO* DE CÈL·LULES ANIMALS

El cultiu de cèl·lules animals és utilitzat àmpliament en la producció de certes biomolècules complexes com hormones, anticossos, factors de creixement i vacunes, entre altres, amb aplicacions en diagnosi i teràpia, degut a que aquestes, a diferència de les cèl·lules bacterianes o de llevat, són les úniques que poden produir molècules amb un plegament adequat i les modificacions postraduccionals necessàries per la seva correcta funcionalitat. Tot i que les cèl·lules animals tenen uns requeriments nutricionals més elevats que els bacteris o llevats, menor velocitat específica de creixement, una productivitat limitada i una alta sensibilitat als metabòlits tòxics [1], actualment, entre el 60 i el 70% de totes les proteïnes recombinants amb aplicació farmacèutica són obtingudes mitjançant el cultiu de cèl·lules animals.

La millora dels rendiments en productes obtinguts en bioprocessos basats en cèl·lules animals ha vingut donat per avenços tant en els vectors d'expressió, els medis de cultiu, les pròpies línies cel·lulars utilitzades per la producció de les biomolècules així com per millores en el bioprocés [2]. Entre les línies cel·lulars més utilitzades en el cultiu cel·lular *in vitro* a gran escala trobem les Chinese Hamster Ovary (CHO), les cèl·lules NS0, les Human Embryo Kidney (HEK 293) i les cèl·lules d'hibridoma, essent totes elles aprovades per les agències regulatòries per a la producció de fàrmacs o productes per diagnòstic.

Les cèl·lules d'hibridoma foren descrites per primer cop per Köhler i Milstein l'any 1975 [3]. Aquestes cèl·lules són el resultat de la fusió d'un únic limfòcit B, secretor d'anticossos procedents d'un ratolí immunitzat, amb cèl·lules derivades d'un tumor de limfòcits B, generant cèl·lules híbrides que presenten una capacitat de produir un determinat anticòs i dividir-se indefinidament en cultiu. Aquests hibridomes són una font indefinida i estable d'un anticòs monoclonal, que reconeixerà un únic lloc antigènic (figura 1).

L'avantatge més gran dels hibridomes és que poden produir anticossos monoclonals contra molècules no purificades, encara que siguin minoritàries dins d'una mescla complexa.



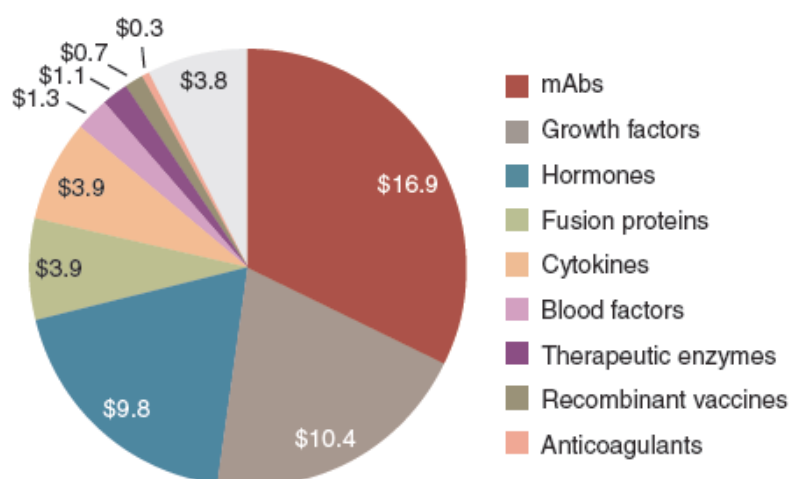
**Fig. 1.- Les cèl·lules d'hibridoma** són una línia de cèl·lules B secretores d'anticòs, obtingudes a partir de la fusió de cèl·lules B derivades de la melsa amb un plasmacitoma. L'hibridoma produeix el mateix anticòs que la cèl·lula B parental i es divideix i creix en cultiu com la cèl·lula cancerosa. L'anticòs produït és monoclonal.

Els anticossos monoclonals tenen una àmplia aplicació ja sigui com a molècules terapèutiques, per exemple en la lluita contra el càncer [4], en el tractament de malalties infeccioses [5], en el tractament de malalties rares (el 35% dels anticossos que es troben actualment en fase III de les proves clíniques, han rebut la designació de medicaments orfes [6]), o en el camp del diagnòstic. La demanda estimada dels anticossos monoclonals terapèutics de més aplicació al 2009 va ser de 7 tones i es preveu que aquest 2013 hagi crescut fins a les 25 tones, si bé la demanda varia substancialment segons el producte [7].

Al 2009 el volum de vendes de fàrmacs biològics es va enfilars fins als 48.000 milions de dòlars als Estats Units i 99.000 milions de dòlars a nivell mundial [8,9]. En el cas dels anticossos monoclonals, el mateix any, es van mantenir al primer lloc com a més venuts dintre dels productes biològics, arribant als 16.900 milions de dòlars als EUA (38.000 milions de dòlars a nivell global), com es pot veure a la figura 2. Al 2009, hi havia 31 anticossos monoclonals registrats als EUA per la FDA (*Food and Drug Administration*) i les seves vendes representaven un 35% del total de productes biològics. Els 2 productes més venuts dins dels anticossos continuen sent els destinats al tractament de càncer i de desordres inflamatoris, amb el 40% i 38% del total de vendes d'anticossos monoclonals.

De fet, els anticossos contra el càncer van continuar augmentant les seves vendes un 15% respecte el 2008, degut al llançament de nous productes al mercat. Alguns dels productes presents al mercat es poden veure a la taula 1.

El desenvolupament de sistemes d'expressió eficients és essencial per la completa explotació del potencial d'aquestes molècules. L'expressió d'anticossos monoclonals funcionals correctament plegats o fragments d'anticossos i la producció a escala industrial és el principal repte en el desenvolupament d'anticossos terapèutics. La tria del millor sistema d'expressió està en funció del format d'anticòs (complet, fragment, mono o bivalent), l'aplicació de l'anticòs (terapèutic, diagnòstic, reactiu experimental), però factors com l'escala de producció, la producció anual, les modificacions post-traduccionals i aspectes regulatoris també tenen una gran influència.



**Fig. 2.- Distribució dels productes biològics** segons les seves vendes als Estats Units l'any 2009 (en milers de milions de dòlars) [8].

Taula 1.- Anticossos monoclonals al mercat [10].

Name	Target	Indication	Company	Year	Antibody type
<b>Monoclonal antibodies</b>					
Orthoclone OKT3	CD3	Acute kidney transplant rejection	Ortho Biotech	1986	Murine
ReoPro	Platelet GP IIb/IIIa	Prevention of blood clot	Centocor	1994	Murine
Rituxan	CD20	Non-Hodgkin's Lymphoma	Genentech/ Biogen-Idec	1997	Chimeric
Panorex	17A-1	Colorectal cancer	GlaxoSmithKline	1995	Murine
Zenapax	IL2Ra (CD25)	Acute kidney transplant rejection	Hoffman-LaRoche	1997	Humanized
Simulect	IL2R	Prophylaxis of acute organ rejection	Novartis	1998	Chimeric
Synagis	RSV	Respiratory Syncytial Virus	Medimmune	1998	Humanized
Remicade	TNFa	Rheumatoid arthritis	Centocor	1998	Chimeric
Herceptin	Her2	Metastatic breast cancer	Genentech	1998	Humanized
Mylotarg	CD33	Acute myelogenous lymphoma	Wyeth-Ayerst	2000	Humanized
Campath	CD52	B cell chronic lymphocytic leukemia	Takeda	2001	Humanized
Zevalin	CD20	Non-Hodgkins Lymphoma	Biogen-Idec	2002	Murine
Humira	TNFa	Rheumatoid arthritis	Abbott	2002	Human
Bexxar	CD20	Non-Hodgkins Lymphoma	Corixa/GSK	2003	Murine
Xolair	IgE	Allergy	Genentech/Novartis	2003	Humanized
Erbix	EGFR/Her1	Colorectal cancer	Bristol-Myers Squibb/Imclone (Eli Lilly)	2004	Humanized
Avastin	VEGF	Colorectal cancer	Genentech	2004	Humanized
Raptiva	CD11a	Psoriasis	Genentech/Xoma	2004	Humanized
Tysabri	A4 integrin	Multiple sclerosis	Biogen-Idec/Elan	2004	Humanized
Vectibix	EGFR	Colorectal cancer	Amgen	2006	Human
Soliris	C5 complement	PNH – paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	Alexion	2007	Humanized
Stelara	IL12 and IL23	Psoriasis	Centocor	2008	Human
Simponi	TNFa	Rheumatoid arthritis	Centocor	2008	Human
Actemra	IL-6	Rheumatoid arthritis	Roche	2009	Humanized

Pel cultiu cel·lular *in vitro* a altes densitats en bioreactors de cèl·lules animals, es poden utilitzar quatre estratègies diferents.

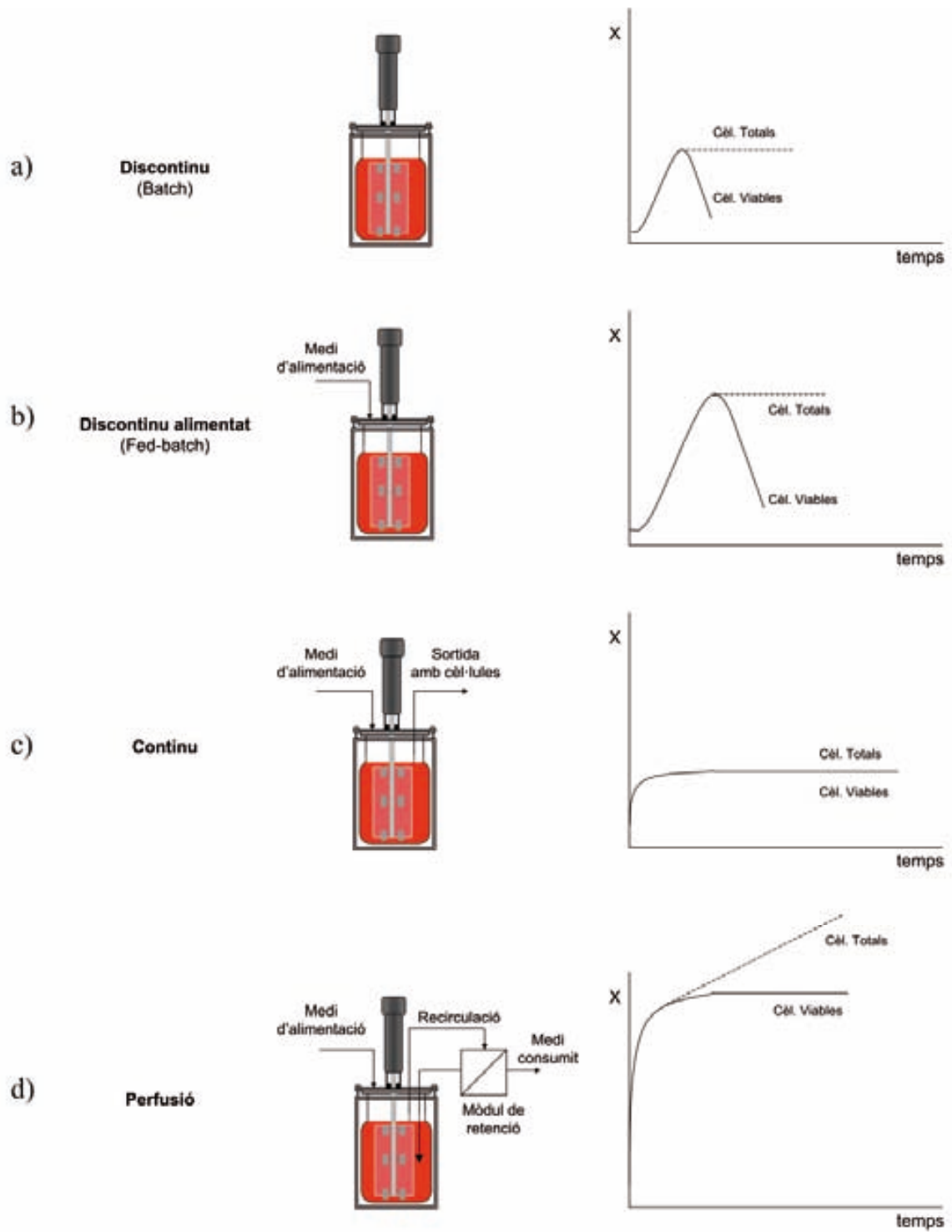
El **cultiu en discontinu (Batch)** (figura 3a) és un procediment simple que consisteix en inocular les cèl·lules en un bioreactor amb un medi òptim pel creixement. Al llarg del temps, la composició del medi varia en funció dels nutrients consumits i dels subproductes produïts per les reaccions metabòliques cel·lulars. A conseqüència d'aquestes variacions en el medi, el creixement cel·lular és limitat i assolida una certa densitat cel·lular, el cultiu entra en una fase irreversible de mort cel·lular.

En el **cultiu discontinu alimentat (Fed-batch)** (figura 3b), els nutrients necessaris es van addicionant al llarg del temps. L'addició progressiva d'algun dels nutrients del medi al llarg del cultiu permet eliminar possibles problemes derivats de la inhibició per substrat o l'exhauriment d'algun nutrient, o bé controlar la generació d'un subproducte tòxic. Malgrat l'addició de nutrients, la població cel·lular acaba morint per l'acumulació de metabòlits tòxics produïts per la pròpia cèl·lula. Amb aquest sistema es regula millor el creixement cel·lular, assolint una densitat cel·lular final més gran que el cultiu en discontinu, gràcies al manteniment del cultiu durant més temps.

En el **cultiu continu** (figura 3c), el medi és subministrat i extret de forma constant per tal de mantenir el cultiu en estat estacionari, sense canvis en la concentració cel·lular ni en la composició del medi al llarg del temps. Donat que es regula l'aportació de nutrients a la cèl·lula i s'evita l'acumulació de subproductes cel·lulars, s'allarga la durada dels cultius durant mesos. L'inconvenient d'aquest sistema és que la concentració cel·lular és més baixa que en un cultiu en discontinu donat que s'eliminen cèl·lules en la sortida del bioreactor, el producte obtingut és molt diluït i l'estat estacionari pot sofrir pertorbacions.

En el **cultiu en perfusió** (figura 3d), el medi també és subministrat i extret de forma contínua al bioreactor, però a diferència del cultiu en continu, les cèl·lules queden retingudes a l'interior del bioreactor, mitjançant un sistema específic, com ara un mòdul de membranes, cosa que permet treballar a velocitats de dilució més elevades i per tant, aconseguir concentracions cel·lulars i productivitats molt més grans que les obtingudes en cultius en discontinu. De totes maneres, al llarg del temps al haver-hi concentracions cel·lulars elevades, s'assoleixen condicions limitants i, com a conseqüència, una part de les cèl·lules entren inevitablement en una fase de mort cel·lular.

Com a model cel·lular en aquest treball s'ha utilitzat la línia d'hibridoma KB26.5, que produeix la  $\gamma$ -immunoglobulina 3 (IgG<sub>3</sub>) utilitzada en la determinació del grup sanguini A del sistema ABO humà. Aquesta línia va ser cedida per Laboratoris Knickerbocker (Barcelona) l'any 1991, i ha estat àmpliament estudiada en diferents treballs duts a terme en el grup de recerca d'Enginyeria Cel·lular i Tissular de la UAB.

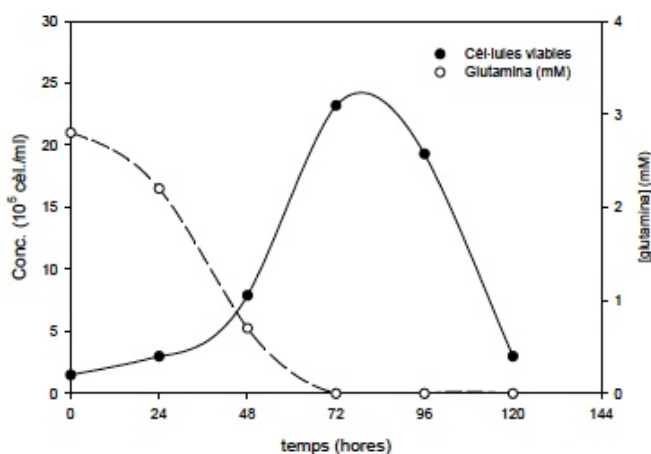


**Fig. 3.- Comparació esquemàtica dels perfils típics de creixement de cèl·lules animals en bioreactors en funció de la forma en què es du a terme el cultiu. La 'X' de l'eix de les abscisses representa la concentració de cèl·lules.**

### 1.1.1. La mort per apoptosi de l'hibridoma KB26.5

En el cultiu *in vitro* de cèl·lules d'hibridoma, l'exhauriment de determinats nutrients essencials o factors de creixement, l'acumulació de subproductes cel·lulars o canvis en les condicions de cultiu, provoca l'entrada de la població cel·lular en una fase irreversible de mort cel·lular programada (PCD) o apoptosi [11]. De fet, una gran fracció de les cèl·lules presents en els bioreactors participa activament en la seva pròpia mort [12].

A la figura 4, es mostra el perfil de creixement típic de l'hibridoma KB26.5 en un cultiu en discontinu en medi òptim. Al final de la fase de creixement exponencial, quan s'assoleix la màxima densitat cel·lular, hi ha una dràstica davallada de la viabilitat del cultiu que coincideix amb l'esgotament de la glutamina. Aquesta davallada és provocada per l'inici de l'apoptosi, induïda per l'exhauriment de la glutamina. Aquest fet és molt generalitzat, i s'ha descrit per altres línies cel·lulars [13, 14].



**Fig. 4.-** Corba de creixement de l'hibridoma KB26.5 i evolució de la concentració de glutamina en un cultiu en discontinu en medi DMEM 2% FBS.

Diversos estudis realitzats sobre els principals factors inductors de l'apoptosi en cultius d'hibridomes revelen que l'exhauriment de les principals fonts de carboni, nitrogen i energia de la cèl·lula com ara la glucosa i la glutamina, la limitació d'oxigen i l'absència de factors de creixement presents en el sèrum, indueixen l'apoptosi [15, 16]. La mort cel·lular programada sembla produir-se per la interrupció de les principals vies metabòliques de la cèl·lula, ja que tant la glucosa com la glutamina són imprescindibles a l'hora de subministrar energia a la cèl·lula (ATP) o de sintetitzar els diferents components cel·lulars: glúcids, lípids, proteïnes i àcids nucleics (figura 5), i l'oxigen és necessari per a la síntesi energètica de la cèl·lula. No és estrany, doncs, que l'absència de glucosa, glutamina i oxigen desencadeni de manera molt ràpida i dràstica el procés de mort per apoptosi (figura 6).

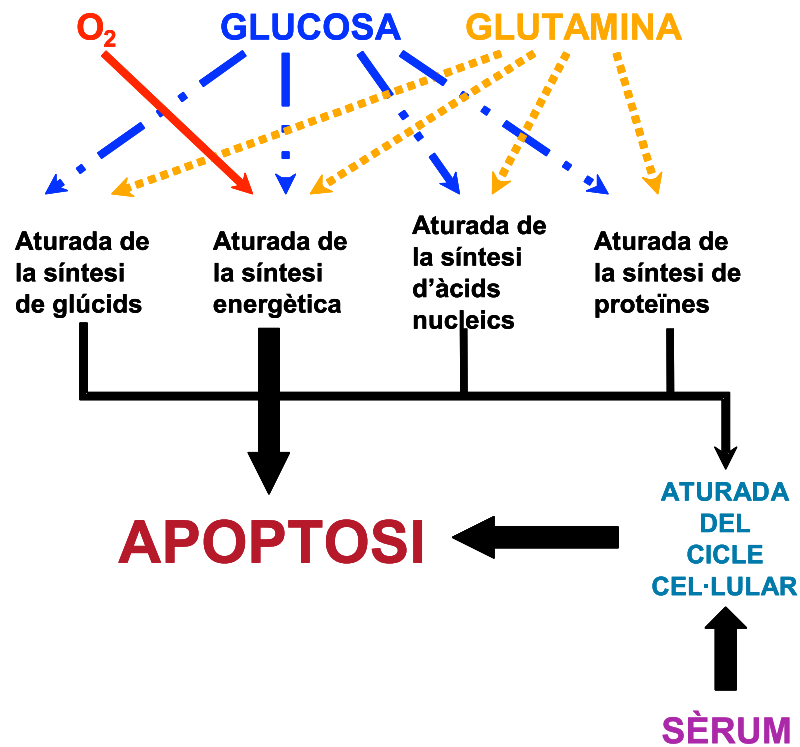


Fig. 5.- Esquema de les principals rutes metabòliques implicades en el procés d'inducció de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5 [16].

Cal destacar que, paral·lelament a l'execució de l'apoptosi, en condicions de manca de glutamina, glucosa, oxigen i sèrum, en l'hibridoma KB26.5 es dona l'aturada del cicle

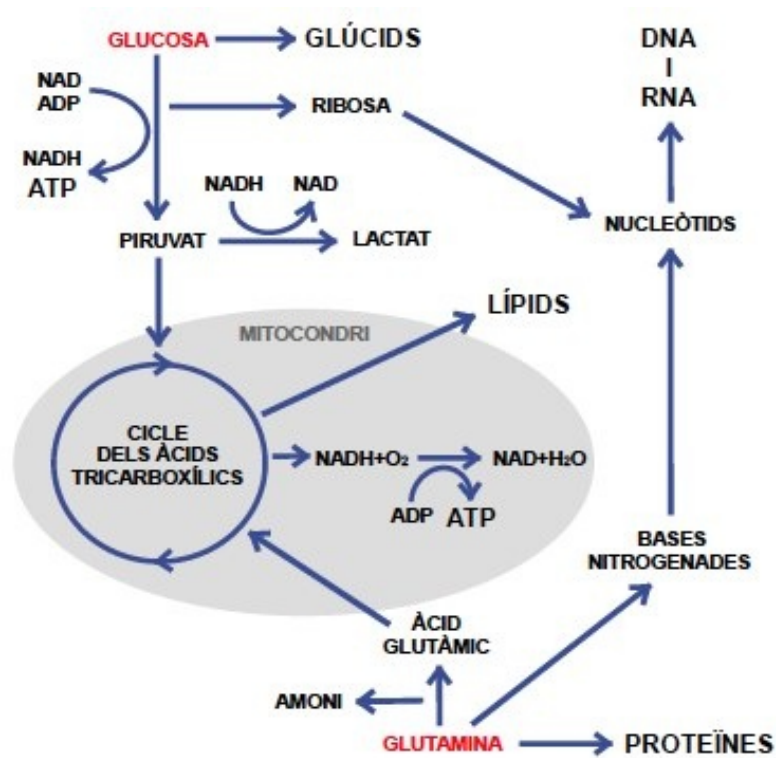


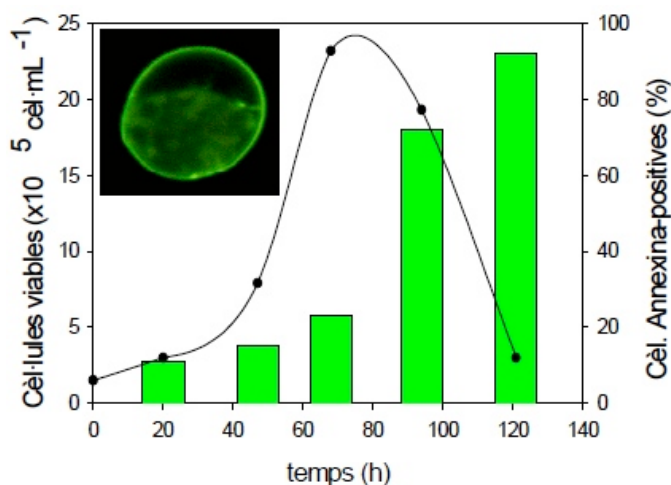
Fig. 6.- Esquema simplificat del metabolisme d'un hibridoma. La glucosa és la principal font de carboni i d'energia dels hibridomes. La glutamina, és la principal font de nitrogen, i també la font alternativa de carboni i energia [17].



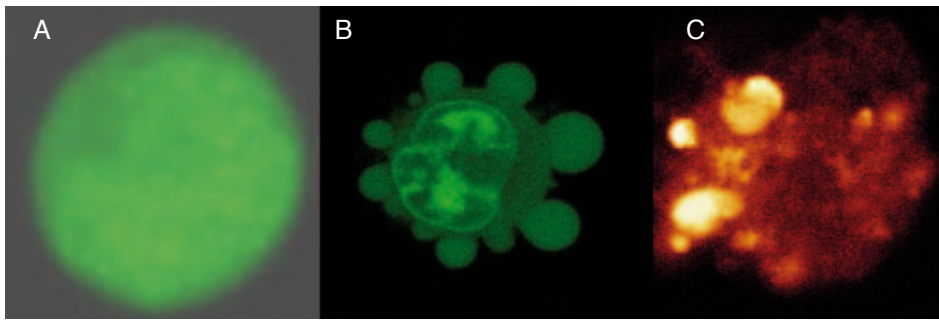
cel·lular a les fases G<sub>1</sub> o S, segurament a conseqüència de les mateixes restriccions metabòliques que activen l'apoptosi a l'hibridoma [16].

El procés de mort cel·lular per apoptosi presenta unes característiques molt específiques.

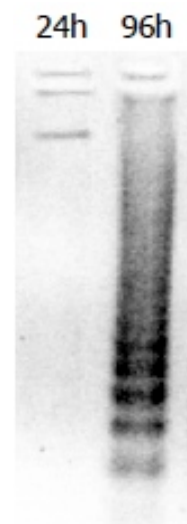
- La translocació de la fosfatidilserina, aquest és un fosfolípid de membrana que actua com a segon missatger en l'activació via receptors de membrana de tota una sèrie d'enzims, entre els que s'inclouen membres de la família de la PKC (*Protein kinase C*), implicats en multitud de processos fisiològics. L'exposició de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica permet el reconeixement i la fagocitosi pels macròfags d'aquelles cèl·lules que tenen activada la PCD (figura 7).
- La proteòlisi del citoesquelet i la lobul·lació de la membrana plasmàtica, el trencament de l'embolcall nuclear i la formació dels cossos apoptòtics (figura 8).
- La condensació de la cromatina i la fragmentació del DNA per l'activació d'endonucleases que tallen el DNA en les regions internucleosomals, originant fragments múltiples de 180 parells de bases [20] (figura 9).



**Fig. 7.-Translocació del fosfolípid fosfatidilserina de la cara interna a l'externa de la membrana plasmàtica i la seva quantificació per citometria de flux.** A la dreta, es mostra el percentatge de cèl·lules d'hibridoma que en un cultiu en discontinu presenten translocació de fosfatidilserina al llarg del temps, mitjançant tinció amb Annexina-V-Fluos. A la gràfica s'hi inclou una fotografia presa per microscòpia confocal d'una cèl·lula marcada amb Annexina-V-Fluos [19].



**Fig. 8.- Visualització per microscòpia confocal dels canvis morfològics** soferts per la cèl·lula durant el procés d'apoptosi en un cultiu en discontinu de l'hibridoma KB26.5 en condicions de manca de glutamina. A) Cèl·lula viable, B) Cèl·lula que es comença a lobular, C) Formació de cossos apoptòtics i desestructuració de la membrana plasmàtica [16].



**Fig. 9.-Fragmentació del DNA genòmic.** A l'esquerra s'observa el DNA intacte extret d'una cèl·lula d'hibridoma KB26.5 en condicions de no inducció de l'apoptosi, a les 24 hores de cultiu. Com que el DNA extret provenia d'una població cel·lular majoritàriament viable, no presentava degradació i mantenia un alt pes molecular. A la dreta, es mostra el DNA extret a les 96 hores de cultiu, on s'observa una degradació en fragments de 180 parells de bases. Aquest és el perfil de bandes típic d'un cultiu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 on s'ha induït l'apoptosi [18].

## 2. MORT CEL·LULAR

En el desenvolupament dels eucariotes superiors, per obtenir la forma i el funcionament correcte, tant important és la divisió com la mort cel·lular. Per exemple, els dits de les extremitats inferiors i superiors es formen a partir de la mort de les cèl·lules que formen l'espai interdigital [21]. La formació del repertori dels limfòcits T i B del sistema immunològic, depèn de la selecció negativa per l'eliminació de cèl·lules que no reconeixen el Complex Major d'Histocompatibilitat (MHC) propi o aquelles cèl·lules que reconeixen antígens propis com a estranys, són eliminades induint-les a l'apoptosi, aquest procés de selecció és tant important com la selecció positiva [22].

La mort cel·lular també és necessària com a mecanisme de protecció, com per exemple en la lisi de cèl·lules infectades o de cèl·lules estranyes, o en l'eliminació de neoplasmes incipients, per part del sistema immunitari [23].

Al cos humà es generen aproximadament  $6 \cdot 10^{10}$  cèl·lules al dia i, per tant el mateix nombre de cèl·lules ha de morir per mantenir l'homeostàsia cel·lular. Aquest procés de mort cel·lular ha d'estar regulat i controlat, ja que qualsevol canvi o desregulació generaria una acumulació de cèl·lules, contribuint a la formació de tumors [24].

Cal considerar que les cèl·lules que s'estan morint es troben sotmeses a un procés reversible fins que es passa un punt de no retorn, a partir del qual la situació és irreversible. Aquest pas pot ser representat per l'activació de caspases [25], la pèrdua de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) [26], la permeabilització completa de la membrana mitocondrial externa [27] o l'exposició de residus de fosfatidilserina (PS), que són senyals que indiquen a les cèl·lules veïnes que la cèl·lula ha de ser digerida per macròfags. Hi ha però, nombrosos exemples en els que s'observen aquests canvis en un context diferent al de mort cel·lular. L'activació de les caspases es pot donar durant els processos de diferenciació cel·lular [28, 29]. La dissipació del potencial de membrana mitocondrial es pot donar sense una progressió immediata de la mort cel·lular [30]. L'exposició de la fosfatidilserina pot ser reversible, per exemple en els granulòcits degut a un canvi de potencial en la membrana plasmàtica [31].

En absència d'un esdeveniment bioquímic clarament definit que pugui considerar-se com a punt de no retorn, el *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) proposa que una cèl·lula sigui considerada morta quan qualsevol dels següents criteris morfològics i moleculars es compleixi: 1) la cèl·lula ha de perdre la integritat de la membrana plasmàtica, observable a través de la incorporació de colorants *in vitro* (per exemple iodur de propidi -IP-). 2) la cèl·lula, incloent el nucli, ha de patir una fragmentació completa en petits cossos, també anomenats cossos apoptòtics. i 3) aquests cossos han de ser deglutits per una cèl·lula adjacent, *in vivo*.

En funció dels estímuls als que responen les cèl·lules al iniciar el procés de mort cel·lular així com els canvis morfològics que s'en deriven, es poden distingir diverses formes de mort cel·lular que es descriuen tot seguit.

## 2.1. AUTOFAGIA

Aquest procés es caracteritza pel segrest de material citoplasmàtic dintre d'autofagosomes per una degradació duta a terme per part dels lisosomes. Aquests autofagosomes tenen per definició una doble membrana i contenen orgànuls o fragments del citosol que han de ser degradats. Els lisosomes es fusionen amb aquests autofagosomes, generant els autolisosomes, de tal manera que les hidrolases lisosomals poden degradar els components que es troben dintre els autofagosomes [32].

En alguns moments d'aquest tipus de mort cel·lular s'observa un augment de vacuoles autofàgiques, per això aquest procés rep el nom de mort cel·lular per autofagia. Morfològicament aquest procés es caracteritza per una absència de condensació de la cromatina, però es dona una vacuolització massiva del citoplasma que no va acompanyada d'una fagocitació.

S'ha observat que aquest procés permet la reposició de regions citoplasmàtiques incloent agregats proteics i orgànuls danyats, evita per tant l'acumulació de proteïnes mal plegades en cossos d'inclusió. En el cas dels mitocondris és un procés essencial per eliminar els que estiguin danyats.

## 2.2. NECROSI

La necrosi ha estat considerada com un procés incontrolat i accidental de mort cel·lular, però s'han observat evidències que l'execució de la necrosi pot ser regulada d'una forma precisa per un conjunt de rutes de senyalització i mecanismes catabòlics [33], [34]. Per exemple els receptors de mort *-death domain receptors-* (TNFR1, Fas/CD95 i TRAIL-R) i *Toll-like receptors* (TLR3 i TLR4) generen necrosi, en particular en presència d'inhibidors de caspases.

Morfològicament les cèl·lules que moren per necrosi augmenten el volum cel·lular (oncosi), els orgànuls s'inflen, la membrana plasmàtica es trenca i es perd el contingut intracel·lular. A més a més, es desencadenen alteracions mitocondrials, com la permeabilització de la membrana mitocondrial, canvis lisosomals, canvis nuclears, degradació de lípids, un increment del calci citosòlic que resulta en una sobresaturació del mitocondri i una activació de proteases diferents a les caspases (calpaïnes i catepsines) [34, 35].

Degut a que no hi ha consens en els canvis bioquímics que poden ser usats de forma inequívoca per identificar la necrosi, s'utilitza una forma negativa de dictaminar-la. En absència de marcadors apoptòtics o autofàgics, en particular quan les cèl·lules desenvolupen la permeabilització primerenca de la membrana plasmàtica (quan es compara amb la permeabilització tardana que es dona en estadis finals de l'apoptosi) es considera mort per necrosi.

## 2.3. APOPTOSI

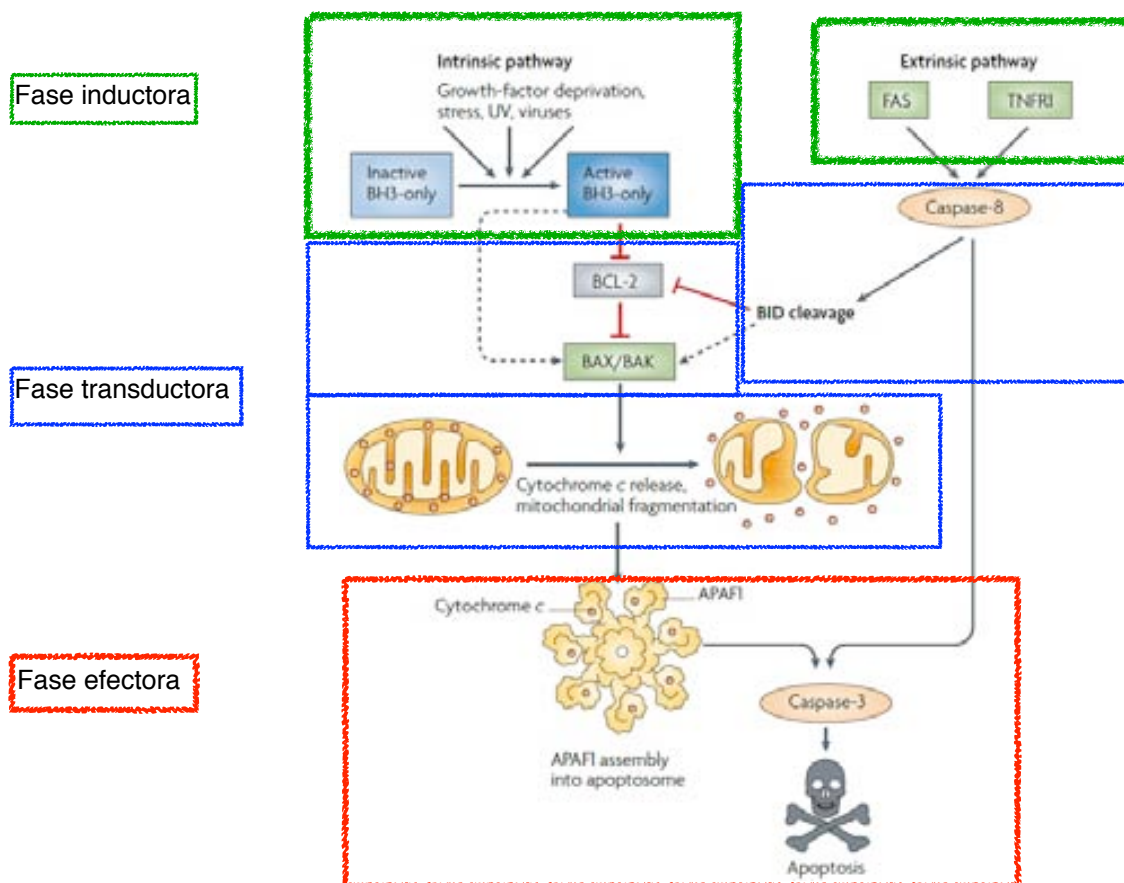
L'expressió "apoptosis" va ser adoptada per primer cop per Kerr al 1972 [36] per descriure una sèrie d'aspectes morfològics específics de la mort cel·lular. Les cèl·lules apoptòtiques formen petits cossos (cossos apoptòtics) que són embolcallats per membranes i contenen orgànuls citoplasmàtics intactes o parts del nucli. Aquests cossos resulten de la progressiva condensació cel·lular i de la lobul·lació de la cèl·lula, i *in vivo* poden ser fagocitats. L'apoptosi és un procés genèticament predeterminat que desemboca en una reducció del volum cel·lular (pyknosis), en la condensació de la cromatina, la fragmentació nuclear (karyorrhexis) que genera fragments de DNA múltiples de 180 pb que corresponen a l'espai internucleosomal [37], l'exposició de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica com a senyal per la

fagocitació i la lobul·lació de la membrana plasmàtica (amb manteniment de la seva integritat fins als estadis finals del procés) [38]. La diferència entre les cèl·lules en les que es desencadena l'apoptosi i aquelles que moren per necrosi és que aquestes últimes són reconegudes pel sistema immunitari com una senyal de perill i per tant, es genera una inflamació. Per contra, la mort per apoptosi és silenciosa i ordenada.

Es creu que un alt percentatge de la mort cel·lular en metazous és deguda a l'apoptosi, essent un procés crucial en la formació d'òrgans, extremitats i altres estructures, i en el manteniment de la funció de la majoria de sistemes en el cos adult [39]. Per tant, la desregulació dels processos de senyalització apoptòtics, sovint desencadenen serioses conseqüències com per exemple càncer [40] o malalties autoimmunes [41].

Hi ha dues rutes principals que condueixen cap a la mort per apoptosi de la cèl·lula en mamífers: 1) La ruta extrínseca iniciada per receptors de mort i 2) la ruta intrínseca que té el mitocondri com a eix central. La ruta extrínseca depèn de la unió dels lligands apropiats als receptors de mort a la superfície de la cèl·lula. En canvi, la ruta intrínseca respon a senyals interns de la cèl·lula, com danys al DNA, agents quimioterapèutics, infeccions virals o manca de factors de creixement, que indueixen la senyalització apoptòtica via l'alliberament de factors mitocondrials.

Tant una ruta com l'altra es poden dividir en tres etapes generals. Una etapa inicial d'inducció a la mort per apoptosi, que és un procés heterogeni i depèn del tipus d'estímul inicial que rebí la cèl·lula, de forma extrínseca o intrínseca, en la que es generen els senyals necessaris per indicar que la cèl·lula ha de començar el procés apoptòtic. Posteriorment hi ha l'etapa de transducció/integració/decisió. En aquesta fase es traspasa el punt de no retorn, i és on es transmeten i s'amplifiquen els senyals generats en la fase d'inducció, en una complexa interacció bioquímica, per tal de generar la resposta en una última etapa efectora. És en aquest moment on es produeixen els canvis intracel·lulars típics que defineixen la mort per apoptosi [42]. La figura 10 és una representació de les dues vies de mort per apoptosi i les diferents fases que conformen la mort cel·lular programada.



**Fig. 10.- Esquema mostrant les rutes intrínseca i extrínseca de l'apoptosi.** L'apoptosi pot ser induïda a través de receptors a la superfície cel·lular (ruta extrínseca), o bé per senyals d'estrès metabòlic (ruta intrínseca), aquests senyals comprenen la fase inductora de l'apoptosi. Un cop s'ha iniciat l'apoptosi, es dona la fase de transducció en la que intervien molècules que amplifiquen el senyal inicial, segons la ruta iniciada aquesta fase hi intervindran components diferents. Finalment es produeix la fase efectora comuna on es duen a terme els passos de desmantellament cel·lular [43].

### 2.3.1. Rutes extrínseques de senyalització de l'apoptosi

La ruta extrínseca de senyalització de l'apoptosi s'inicia quan els receptors de mort de la superfície de la cèl·lula interaccionen amb els seus lligands específics, induint un canvi conformacional que es transmet a través de la membrana plasmàtica. Aquests receptors poden activar caspases (principals molècules responsables de la fase final d'execució de l'apoptosi, com es descriu a l'apartat 2.3.7), al cap de pocs segons d'haver-se produït la interacció entre el receptor i el lligand, provocant la mort cel·lular per apoptosi al cap de poques hores. S'han descrit principalment tres parelles receptor/ligand, totes elles membres de la superfamília *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily* (TNFRSF):

1. Fas (també anomenat CD95) i *Fas ligand* (FasL, també anomenat CD95L).

2. Receptors de mort (DR4 i DR5) i *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL, també anomenat Apo2L o TNFSF10).
3. TNF $\alpha$  i el receptor TNF (TNF-R1).

Tots aquests receptors estan integrats a la membrana plasmàtica amb un domini extracel·lular conservat, contenen una única regió transmembrana i un domini de mort intracel·lular conservat o *Death Domain* (DD), que interacciona amb proteïnes adaptadores [44].

La unió amb el lligand condueix a l'apoptosi de la cèl·lula a través d'una ruta independent de transcripció i traducció; la unió del receptor i el lligand comporta la formació del Complex inductor i de senyalització de mort (DISC), que talla i activa les caspases iniciadores (caspasa 8 i 10). Aquestes activen un segon grup de caspases per proteòlisi, anomenades efectores que culminen el procés apoptòtic degradant substrats intracel·lulars clau.

#### 2.3.1.1. La ruta Fas-FasL

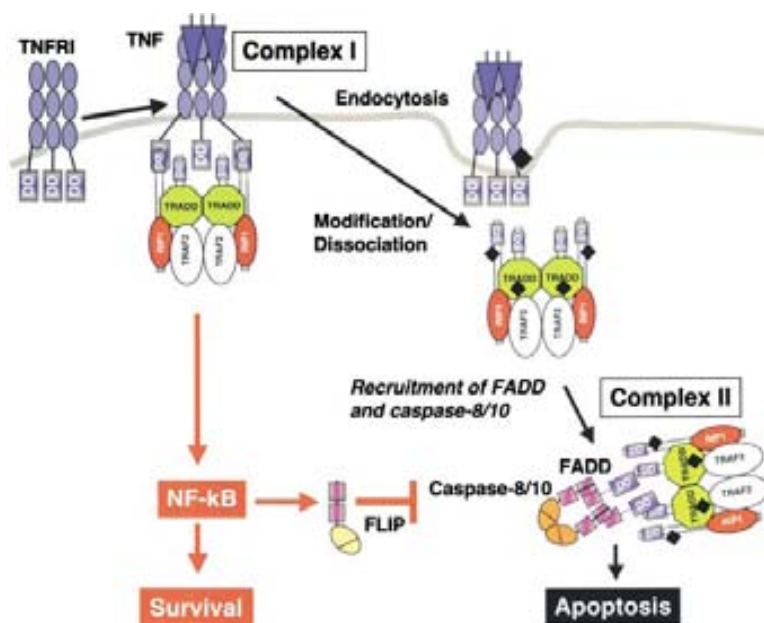
D'entre tots els receptors de mort cel·lular, Fas és el més estudiat. La unió amb el seu lligand (FasL), desencadena l'agregació de Fas en trímers. Això permet als dominis de mort, que es troben a la cua citoplasmàtica de Fas, reclutar immediatament el Complex inductor i de senyalització de mort [45]. Aquest complex està format pel receptor Fas, una proteïna accessòria anomenada *Fas-associated Death Domain* (FADD) [46] i per la procaspasa 8. Quan es produeix un estímul apoptòtic, FADD ancora la seva regió C-terminal a la regió C-terminal del Domini de mort. Això permet que la regió N-terminal (*Death Effector Domain*, DED) de FADD quedi exposada, fent que la procaspasa 8 s'hi pugui unir [47, 48]. La formació del DISC permet l'auto proteòlisi de la procaspasa 8 generant la seva forma activa, la qual activa les procaspases 3, 6 i 7 o bé pot produir el trencament de proteïnes proapoptòtiques com Bid, generant tBid, que passa al mitocondri. La forma activa de la caspasa 3 proteolitza una gran varietat de substrats, com enzims reparadors de DNA, proteïnes estructurals cel·lulars i nuclears, inhibidors d'endonucleases i també és capaç d'activar les caspases 6 i 7 que es troben en forma de zimògens, amplificant d'aquesta manera la destrucció cel·lular iniciada pel receptor Fas (figura 11).







La proteïna RIP és crucial en l'activació funcional del factor de transcripció NF- $\kappa$ B (figura 13).



**Fig. 13.- Model per l'activació de l'apoptosi per TNFR1** on un cop s'ha produït la unió entre el lligand i el receptor, es genera el complex I (TRADD, RIP1, TRAF2) que activa a NF- $\kappa$ B, posteriorment les proteïnes d'aquest complex es modifiquen i es dissocien del complex. El domini DD de TRADD s'uneix a FADD, activant la caspasa 8 formant el complex II. Si s'ha activat NF- $\kappa$ B, els nivells cel·lulars de FLIP seran prou elevats per impedir el procés apoptòtic que desencadena l'activació de la caspasa 8 [52].

Segons els nivells de FLIP de la cèl·lula es formarà aquest complex o no. Quan NF- $\kappa$ B s'activa correctament pel complex I, els nivells de FLIP són suficientment elevats per inhibir la formació del complex II i bloquejar l'apoptosi. Si el senyal inicial del complex I no activa el factor de transcripció NF- $\kappa$ B, el complex II fa el seu efecte provocant l'apoptosi de la cèl·lula [52].

L'efecte biològic de TNF $\alpha$  ve determinat pel balanç entre la senyalització exercida per NF- $\kappa$ B i JNK. Mentre NF- $\kappa$ B promou la supervivència cel·lular, JNK incrementa la mort cel·lular accelerant la pèrdua de la proteïna antiapoptòtica c-FLIP, que és induïda per NF- $\kappa$ B.

### 2.3.2. Rutes intrínseques de senyalització de l'apoptosi

La via més comú de mort cel·lular en vertebrats transcorre a través de la ruta mitocondrial de l'apoptosi [27]. Aquesta ruta en mamífers es centra en un fet clau: la Permeabilització de la Membrana Mitocondrial Externa (MOMP), que es podria considerar

com el punt de no retorn en la inducció de l'apoptosi. L'alliberament de certes proteïnes des de l'espai intermembrana del mitocondri degut a la permeabilització de la membrana externa mitocondrial, indueix l'activació de caspases que provoquen danys irreparables i culminen en el procés apoptòtic. La permeabilització de la membrana externa del mitocondri normalment s'evita per membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, com es descriu més endavant en aquesta memòria.

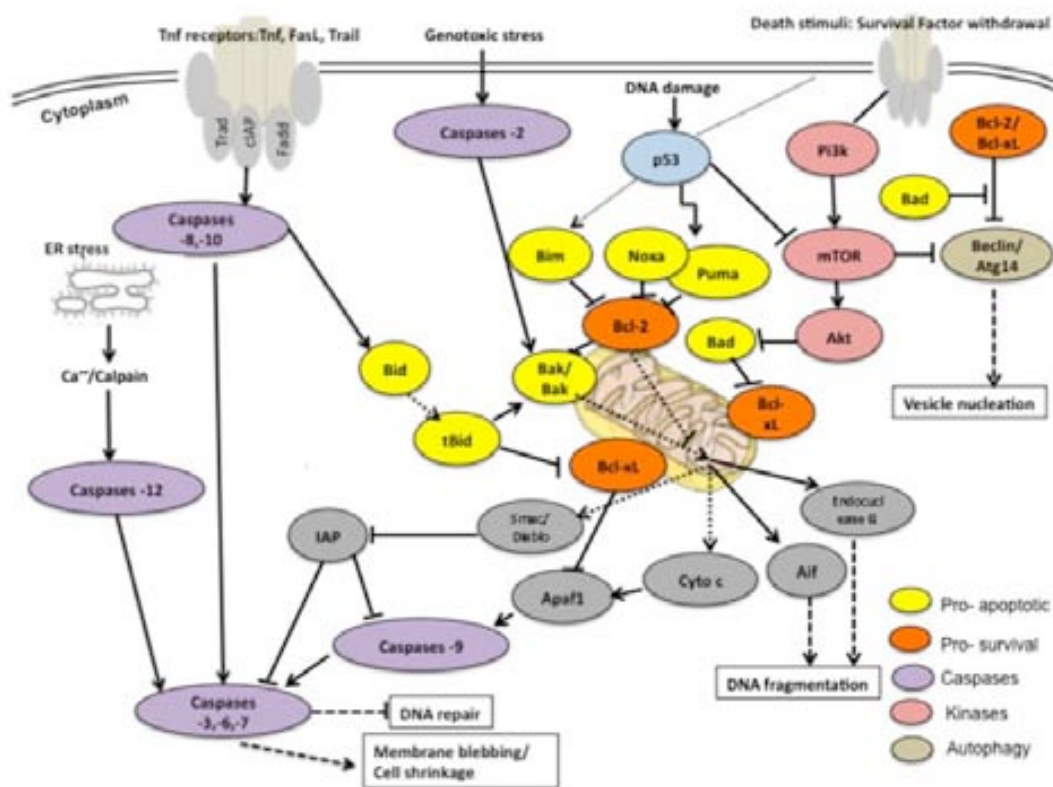
En el cas de la ruta intrínseca, la caspasa 9 és la iniciadora del procés apoptòtic. Aquesta és activada per una unió al *Apoptotic Protease Activating Factor-1* (Apaf-1), el qual forma part d'un complex multiproteïc anomenat Apoptosoma. Apaf-1 es troba al citosol en forma de monòmer, i la seva activació depèn de la presència de citocrom *c* i ATP [53]. L'alliberament del citocrom *c*, que es troba a l'espai intermembrana del mitocondri formant part de la cadena transportadora d'electrons [54], és limitant per la generació de l'Apoptosoma. Per tant, la permeabilització de la membrana mitocondrial (MMP) és essencial per l'activació de les caspases en la via intrínseca. La permeabilització de la membrana pot condemnar a la cèl·lula a morir inclús sense les caspases actives. Aquesta mort independent de caspases [55] pot donar-se degut a una pèrdua irreversible de la funció mitocondrial o també per l'alliberació d'efectors de mort independents de les caspases, incloent el factor inductor de l'apoptosi (AIF) [56] o l'endonucleasa G (Endo G) [57].

Donat que l'apoptosi està involucrada en el manteniment de l'homeostàssia tissular, es troba estrictament regulada en nombrosos punts [27]. El mitocondri representa un punt central en el control de l'apoptosi, ja que integra diferents senyals, incloent factors endògens, com la concentració d'ions al citosol i als orgànuls cel·lulars, de metabòlits com ATP, ADP, NAD(P), dels missatgers lipídics secundaris, i de múltiples proteïnes, incloent cinases i fosfatases, així com factors exògens (com per exemple proteïnes víriques). Els mitocondris recullen la suma de factors que indueixen la mort cel·lular i els senyals de conservació. Quan els primers predominen sobre els segons, els mitocondris inicien la permeabilització mitocondrial, que es caracteritza per diversos punts:

1. L'alliberament de citocrom *c* i Smac/DIABLO (que s'uneixen directament a IAP) a través de la membrana externa i la conseqüent activació de les caspases efectores.

2. L'alliberament d'efectors apoptogènics independents de caspases, com AIF i EndoG.
3. L'alteració del potencial de membrana interna ( $\Delta\Psi_m$ ).
4. L'aturada de la fosforilació oxidativa i l'acumulació d'espècies d'oxigen reactives.

La ruta extrínseca i la intrínseca poden confluir a través de l'acció de la caspasa 8, ja que influeix en l'activació de la proteïna proapoptòtica de domini BH3 únic, Bid. Aquesta és una proteïna de la família de Bcl-2 i la seva disrupció en el seu extrem C-terminal genera un Bid truncat (tBid), que transloca al mitocondri i promou l'activació d'altres caspases, com la caspasa 9 i les efectores (caspases 3, 6 i 7), a través de la ruta intrínseca [58, 59]. A la figura 14 es mostren de forma simplificada alguns dels elements més importants en l'activació i regulació de la via mitocondrial de l'apoptosi.



**Fig. 14.- Esquema de la ruta mitocondrial de l'apoptosi.** La permeabilització de la membrana mitocondrial genera l'alliberament del citocrom *c* i la generació de l'Apoptosoma que condueix a l'activació de les caspases activadores i efectores de l'apoptosi. La permeabilització de la membrana mitocondrial està afavorida per proteïnes proapoptòtiques que es veuen regulades per d'altres antiapoptòtiques. El mitocondri és un punt d'integració de nombrosos senyals provinents de diverses rutes cel·lulars [60].

### 2.3.3. La família de Bcl-2

El gen *bcl-2* (*B-cell lymphoma-2*) va ser descobert pel punt de translocació que es produeix entre els cromosomes 14 i 18 als limfomes fol·liculars de les cèl·lules B. Una evidència que va introduir un nou paradigma en la carcinogènesi fou observar que la sobreexpressió de *bcl-2* no promou la proliferació cel·lular, com ho fan la majoria dels oncogens descrits amb anterioritat, sinó que inhibeix la mort cel·lular [61].

El procés apoptòtic és essencial en el mecanisme de supressió de tumors. Les mutacions en certs oncogens, que resulten en l'activació de la proliferació cel·lular, com és el cas de l'expressió desregulada de *myc*, requereix una segona mutació per inhibir l'apoptosi i que el tumor pugui desenvolupar-se d'una manera eficient [62]. Per tant, la sobreexpressió combinada de *myc* i *bcl-2* provoca el desenvolupament de limfomes i altres tipus de càncers [63].

En mamífers, hi ha com a mínim 12 proteïnes principals de la família de Bcl-2, incloent la mateixa Bcl-2 i proteïnes que tenen una similitud en l'estructura tri-dimensional o en l'estructura secundària, és a dir, que aquests membres tenen com a mínim una regió d'homologia amb Bcl-2 (BH), com es pot observar a la figura 15.

Els membres d'aquesta família s'han agrupat en tres classes. Una classe està formada pels membres antiapoptòtics multidomini (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl1, Bcl-b o Bcl2l10 i A1 o Bcl-2a1) que contenen quatre dominis BH (BH1, 2, 3, 4). Una segona classe multidomini que promou l'apoptosi (Bax, Bak, Bok o Mtd), que típicament conté tres dominis BH (BH1, 2, 3). Una tercera classe de proteïnes proapoptòtiques amb tant sols un domini BH són les BH3 úniques (Bad, Bik o Blk o Nbk, Bid, Hrk o Dp5, Bim o Bod, Bmf, Noxa i Puma o Bbc3), que tenen un domini BH3 conservat que es pot unir a les proteïnes antiapoptòtiques de Bcl-2 i regular-les per promoure l'apoptosi. Alguns membres de tots els subgrups comparteixen un domini transmembrana a la regió terminal -COOH, que ajuda a la seva inserció a la membrana externa del mitocondri i a altres membranes intracel·lulars (com per exemple a la del reticle endoplasmàtic).

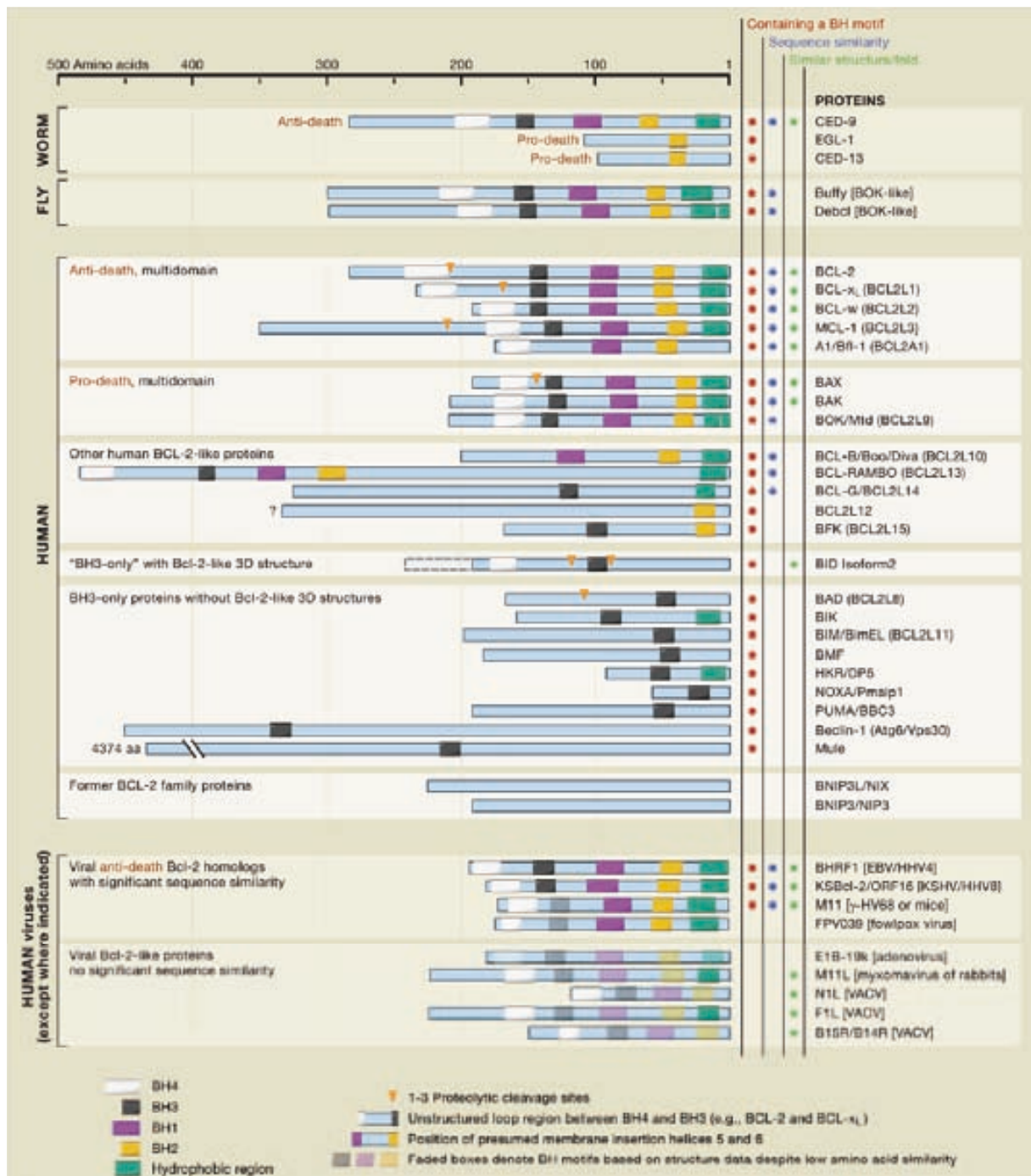
Els components principals de la família Bcl-2 amb múltiples dominis BH i la proteïna amb motiu únic BH3, Bid, tenen regions conservades amb homologia en la seqüència i una estructura secundària similar. Les estructures de set d'aquestes proteïnes

(Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2, Bcl-w, Mcl1, Bax, Bak i Bid) mostren una similitud remarcable, tot i que unes siguin proapoptòtiques i altres antiapoptòtiques. Alguns virus presenten proteïnes homòlogues a Bcl-2, com Ks-Bcl-2 [64] i BHRF1 [65], així com M11L [66] i N1L, que tot i no tenir una similitud total en la seqüència amb les proteïnes de la família de Bcl-2, mostren un plegament que és similar al d'aquestes, i inhibeixen l'apoptosi, cosa que indica que alguns virus utilitzen membres de la família de Bcl-2 per contrarestar les defenses de l'hoste.

L'estructura tridimensional de les set proteïnes de la família de Bcl-2 esmentades anteriorment no revela cap diferència entre els membres pro (com Bax i Bid) dels antiapoptòtics (com Bcl-X<sub>L</sub> i Mcl1). Totes set proteïnes presenten una hèlix hidrofòbica flanquejada per hèlixs amfipàtiques. Els homòlegs de Bcl-2 sembla que poden tenir al seu extrem C-terminal dominis d'ancoratge a membrana.

En tres proteïnes, Bax, Bcl-w i Mcl1, l'estructura d'ancoratge de la regió C-terminal encaixa a la butxaca hidrofòbica formada per les regions BH1, 2, i 3. La mateixa butxaca que segresta aquesta regió d'ancoratge a membrana pot unir també seqüències peptídiques del domini BH3 de Bak, Bad i Bim, cosa que suggereix que també fa funcions en la dimerització de proteïnes amb domini únic BH3 i/o membres de la família de Bcl-2 que continguin dominis BH múltiples.

Els membres proapoptòtics de la família Bax i Bak són claus per induir la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i, consegüentment, l'alliberació de molècules apoptogèniques com citocrom *c* i Smac/DIABLO, que condueixen a l'activació de caspases. El grup amb funcions antiapoptòtiques de la família, com Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>, inhibeixen Bax i Bak mentre que les proteïnes de motiu BH3 únic activen Bax i Bak i inhibeixen els membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 [67, 68].



**Fig. 15.- Classificació dels membres de la família de Bcl-2 en humans i els seus homòlegs en altres espècies i virus humans.** Es pot observar aquells homòlegs amb una estructura similar, homologia en la seqüència o amb presència de motius BH 1, 2, 3 i/o 4 [69].

Les proteïnes amb motiu únic BH3 han estat definides com a homòlogues als membres de la família de Bcl-2 tant sols en el domini BH3. Estudis recents indiquen que excepte Bid, les proteïnes BH3 tenen estructures secundàries o estructures tridimensionals que no estan relacionades amb els membres principals de la família de Bcl-2 i que, han adquirit els motius BH3 probablement per evolució convergent [70]. Així, les proteïnes BH3 inclouen varies proteïnes que comparteixen un únic motiu que els



permeten unir-se i regular els membres principals de la família Bcl-2. Bid, per contra, és l'única proteïna BH3 amb una determinada estructura que es situa encaixada directament amb els principals membres de la família de Bcl-2, fet que podria explicar perquè Bid comparteix certes propietats amb membres multidomini de la família de Bcl-2, com la capacitat d'oligomeritzar [71] i permeabilitzar membranes [72]. Els estudis filogenètics indiquen que moltes d'aquestes proteïnes pertanyents a la família de Bcl-2 podrien tenir altres funcions biològiques més enllà de la regulació de la mort cel·lular [29, 70, 73].

Les proteïnes BH3 són proapoptòtiques i funcionen com a sensors dels senyals apoptòtics que emanen de diferents processos cel·lulars. La seva expressió pot ser induïda per factors de transcripció. Per exemple, Noxa i Puma estan induïdes pel supresor tumoral p53 en resposta a danys en el DNA [74, 75]. Bim és induït pel factor de transcripció Foxo3A en resposta a l'esgotament o manca de factors de creixement [76] així com pels factors de transcripció CEBP $\alpha$  o CHOP en resposta a l'estrès del Reticle Endoplasmàtic [77]. Les proteïnes BH3 també poden ser activades de forma post-traducciona, com pot ser el cas de Bad, el qual és activat per la pèrdua de fosforilació per la manca de factors de creixement [78]. Bid s'activa per l'acció proteolítica de la caspasa 8 [79, 80]. Bim és activada per l'alliberament des del complex motor de dineïnes o per la pèrdua de fosforilació mediada per Erk [81, 82], i Bik és activada per un mecanisme desconegut en resposta a la inhibició de la síntesi de proteïnes [83].

La regulació dels nivells d'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2 és un altra mecanisme pel qual les cèl·lules poden intervenir sobre l'apoptosi. Per exemple Bcl-X<sub>L</sub> pot ser induït transcripcionalment per factors de creixement a través de la ruta Jak-Stat per promoure la supervivència cel·lular.

En el cas de les proteïnes proapoptòtiques Bax i Bak, la regulació dels seus nivells d'expressió és menys aparent i les proteïnes semblen estar expressades de forma constitutiva a uns nivells més o menys constants. Bax i Bak estan regulades de forma post-traducciona per altres membres de la família de Bcl-2. Quan les proteïnes BH3 s'activen, interaccionen amb les proteïnes de la família de Bcl-2 per generar l'apoptosi. S'ha constatat que es produeix una unió entre les proteïnes BH3 a membres específics pro- i antiapoptòtics de la família de Bcl-2. Per exemple, Bim i Puma s'uneixen a tots el membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, mentre que Bad i Noxa s'uneixen a tant sols a alguns tipus dels membres antiapoptòtics. Algunes proteïnes BH3, com Bid o Bim,

poden interaccionar directament i activar Bax i Bak [84, 85]. De totes maneres la unió de Bid, tBid o Bim a Bax o Bak és difícil de detectar. Existeixen altres models alternatius en que es posa en dubte que la unió directa de proteïnes BH3 per activar Bax i Bak sigui necessària [67].

Per tant, les proteïnes BH3 indueixen l'apoptosi inhibint els membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, de tal manera que Bax i Bak queden lliures per generar la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i l'activació de la ruta de les caspases. El mecanisme bioquímic precís que genera l'activació de Bax i Bak és encara una incògnita i és un dels principals punts en la recerca en el camp de l'apoptosi.

### **2.3.4. Mecanismes de permeabilització de la membrana mitocondrial**

Tal i com s'ha esmentat abans, el mitocondri és l'òrganul on conflueixen els estímuls iniciadors de l'apoptosi, aquest esdevé doncs un regulador de la mort cel·lular al generar senyals que amplifiquen aquest procés.

#### **2.3.4.1. Permeabilització mediada per Bax/Bak**

El principal lloc d'acció de les proteïnes similars a Bcl-2 és probablement la membrana mitocondrial [86]. Les proteïnes amb quatre motius BH es troben principalment a la membrana externa del mitocondri, on protegeixen aquest òrganul de la permeabilització de la membrana mitocondrial.

En les cèl·lules sanes, Bak, es troba a la membrana externa del mitocondri, mentre que Bax, de la mateixa subfamília, es troba al citosol. Per la permeabilització de la membrana mitocondrial cal l'expressió de com a mínim d'una de les dues proteïnes (Bax o Bak) [87]. En el moment que es genera la inducció apoptòtica, Bax s'insereix a la membrana mitocondrial externa [88], on es pensa que forma obertures supramoleculares, sol o en associació amb altres membres proapoptòtics com Bak o tBid [89]. Aquestes obertures poden ser degudes a la generació de porus formats per homo-oligòmers de Bax o per la desestabilització de la bicapa lipídica. La relocalització de Bax és necessària per la seva acció proapoptòtica, de fet si és retinguda al citosol es prevé el dany mitocondrial i l'apoptosi [90]. Encara que punts del procés que condueix a la permeabilització de la membrana mitocondrial està sota debat [91] es coneix que, la permeabilització mitocondrial resulta d'un canvi conformacional de Bax o Bak (amb l'exposició del seu

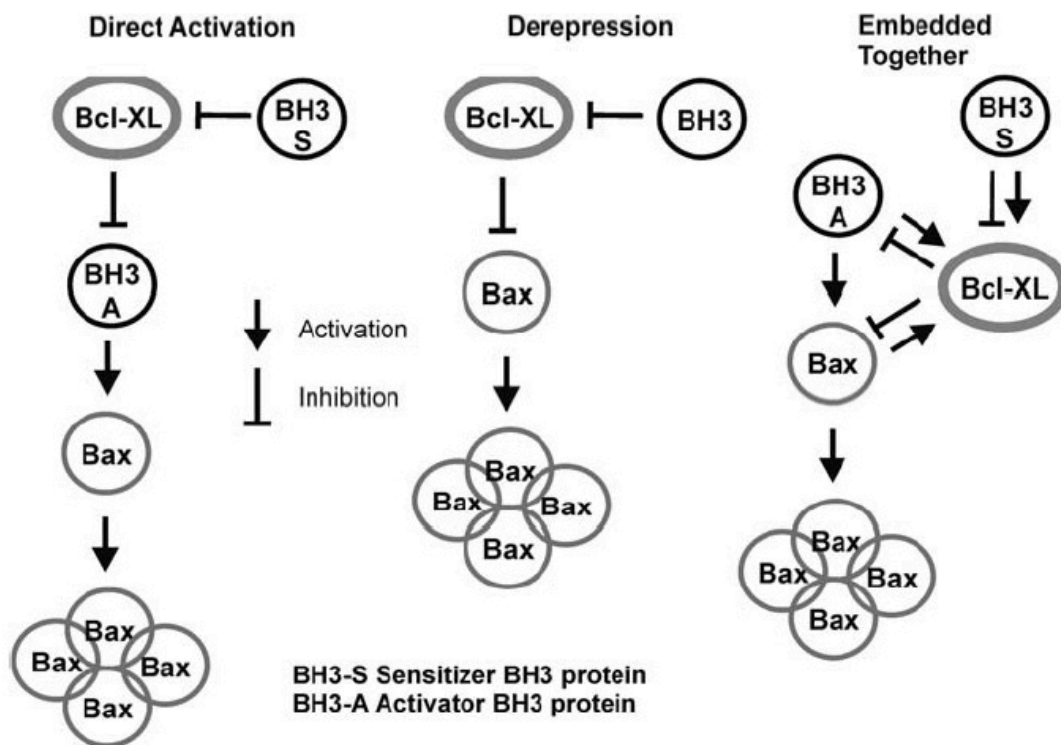
extrem NH<sub>2</sub>), de la seva completa inserció a la membrana mitocondrial, formant homooligomèrs i la formació de porus permeables a proteïnes de la llum mitocondrial [89]. Per translocar al mitocondri, Bax ha de ser activat per mecanismes específics durant la senyalització de l'apoptosi. S'han proposat diferents models per l'activació de Bax i Bak (figura 16).

Un dels models proposats estableix una activació directa de Bax/Bak per part d'un subgrup de les proteïnes BH3, anomenades activadores, com Bid, Bim, o Puma, a no ser que quedin segrestades per proteïnes antiapoptòtiques. Les proteïnes BH3 activadores es poden escapar de la inhibició exercida per part de les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2 a través de la unió de proteïnes BH3 sensibilitzadores (per exemple Bad o Noxa), les quals desplacen les activadores que al seu torn activen Bax i Bak [92]. La unió de proteïnes BH3 potencialment al canal hidrofòbic de Bax, de forma similar a la unió que es produeix amb proteïnes antiapoptòtiques, pot comportar un canvi de localització de Bax, passant del citosol al mitocondri, ja que el domini transmembrana (una hèlix alfa al C-terminal), normalment acomodat al canal hidrofòbic, quedaria al descobert (figura 17). Així com s'ha demostrat la interacció entre proteïnes BH3 amb membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2 [93], no ha estat així amb la unió a Bax/Bak. Sembla però, que Bim pot ocupar la regió hidrofòbica de Bax i podria generar els canvis conformationals necessaris per activar-lo [94].

Un altre model indirecte o de repressió postula que Bax, constitutivament actiu, es troba segrestat per part dels membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2 (activació indirecta), de tal manera que s'impediria la formació dels oligòmers de Bax [95]. Els dubtes que es generen sobre aquest model indirecte o de repressió és que no hi ha evidències d'una interacció directa entre Bax o Bak amb proteïnes antiapoptòtiques. Seria possible, però, que la interacció entre Bax i Bcl-2 (o familiars) es donés sempre i quan Bax o Bak haguessin patit un canvi conformational previ generat per tBid, per exemple [96].

Un tercer model proposa que les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 no només tenen les dues funcions indicades en cadascun dels dos models anteriors, sinó que a més tindrien dues noves funcions, on les proteïnes BH3 úniques tant podrien activar com inhibir les proteïnes antiapoptòtiques, i que moltes de les interaccions funcionals entre les proteïnes tenen lloc només en membranes ja que la unió a membrana indueixen els canvis conformationals necessaris per les interaccions.

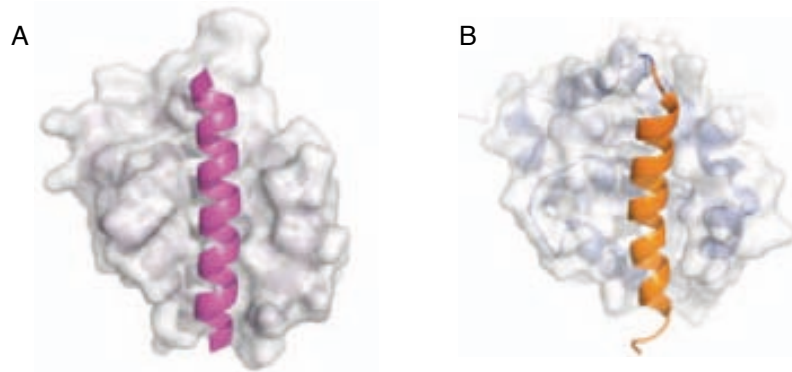
El procés pel que Bax i Bak troben el camí cap a al mitocondri és una incògnita. S'ha especulat amb que una possible diana seria el fosfolípid cardiolipina, ja que és l'únic element que diferencia la membrana lipídica entre el mitocondri i el reticle endoplasmàtic. Altres candidats podrien ser VDAC, o el complex TOM (*Translocase Outer Membrane complex*). S'ha vist que aquest complex també té un paper important en la inserció de proteïnes amb un sol segment transmembrana, com és el cas de Bax, a la cara externa de la membrana mitocondrial [97].



**Fig. 16.- Esquemes dels tres models proposats de regulació de l'apoptosi mitocondrial.** En el model directe les proteïnes multidomini proapoptòtiques inactives (per exemple Bax i Bak), són activades per les proteïnes proapoptòtiques de domini únic BH3. En el model de repressió, Bax i Bak es troben constitutivament actius i poden ser reprimits per proteïnes antiapoptòtiques multidomini. El tercer model reconeix aquestes dues interaccions. Les proteïnes proapoptòtiques de domini únic BH3 sensibilitzadores, interaccionen amb les proteïnes antiapoptòtiques de manera que alliberen els membres de domini únic BH3 activadors, que actuaran sobre les proteïnes proapoptòtiques multidomini activant-les, o bé sobre les proteïnes antiapoptòtiques que tenen units proteïnes antiapoptòtiques actives [98].

El mecanisme d'obertura per l'alliberació de citocrom c, per part de Bax/Bak, és un aspecte controvertit. Una opció és que aquestes proteïnes proapoptòtiques desestabilitzin la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial [99]. Altres evidències indiquen que Bax s'uneix estretament amb proteïnes que formen el Complex de Permeabilitat Transitori (*Permeability Transition Pore Complex, PTPC*), com ANT o VDAC per induir la

permeabilització mitocondrial [27]. Per altra banda també s'ha vist que Bax pot permeabilitzar la membrana externa i alliberar el citocrom *c* sense necessitat d'interaccionar amb cap dels components del Complex de permeabilitat transitori i, per tant, independentment de l'estat de la membrana interna [89].



**Fig. 17.- Plegaments de membres multidomini de la família de Bcl-2.** (A) Plegament de la proteïna Bcl-2, on es destaca la regió hidrofòbica que és el lloc d'integració dels dominis BH3 (en lila). (B) Estructura de Bax, on el seu canal hidrofòbic és ocupat pel domini d'ancoratge a membrana (en groc) [94].

Per resumir, en condicions fisiològiques el mitocondri exhibeix un alt potencial transmembrana ( $\Delta\psi_m$ ), les proteïnes de l'espai intramembrana es troben retingudes, els membres proapoptòtics de la família de Bcl-2 es troben inactius (ja sigui al citoplasma o ancorats a la membrana externa) i el complex de permeabilitat transitori assegura l'intercanvi de metabòlits entre els citosol i la matriu mitocondrial. Sota aquestes condicions, les interaccions de proteïnes mitocondrials com les hexocinases (HK) amb el complex de permeabilitat transitori es donen per inhibir la permeabilització de la membrana mitocondrial. La permeabilització de la membrana externa que permet la sortida al citosol de proteïnes de l'espai intern pot donar-se per diferents mecanismes: 1) els senyals proapoptòtics poden promoure directament la desestabilització dels lípids mitocondrials afavorint la formació de porus a través dels quals s'alliberen proteïnes de l'espai intern mitocondrial. 2) L'obertura del Complex de Permeabilitat Transitori (PTPC) durant llargs períodes, associat amb la pèrdua de les interaccions antiapoptòtiques amb les hexocinases, pot comportar la pèrdua del potencial de membrana seguit d'un canvi osmòtic que generi augment de grandària de la matriu mitocondrial provocant la ruptura de la membrana externa. 3) Un cop activades, els membres proapoptòtics de la família Bcl-2 poden translocar-se del citosol a la membrana externa, patir canvis conformacionals i interaccionar amb els components del complex de permeabilitat. Aquests heterooligòmers poden formar una ruta de sortida per les proteïnes de l'espai intern mitocondrial.

4) Alternativament, les proteïnes proapoptòtiques activades poden associar-se en multímers, permetent la sortida de proteïnes de l'espai intern.

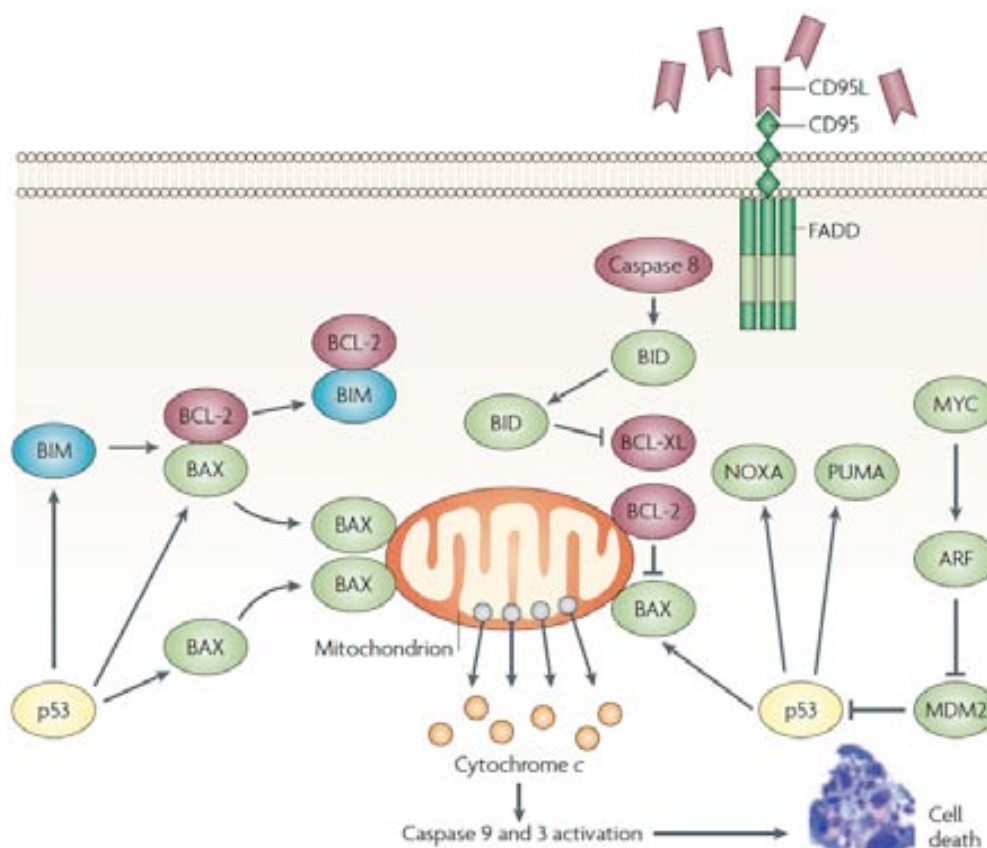
### **2.3.5. Senyals aferents d'altres orgànuls**

La comunicació entre orgànuls pot tenir un paper important en definir el destí de la cèl·lula, afavorint rutes de supervivència o de mort.

#### **2.3.5.1. Danys al DNA nuclear**

Les cèl·lules que pateixen danys al DNA que no poden ser reparats entren en apoptosi. El producte del gen supressor de tumors p53 intervé en part de la resposta a aquest dany en les cèl·lules de mamífer, ja sigui estimulants la reparació del DNA o iniciant l'apoptosi si aquest és un dany irreparable. p53 que entre altres té funcions de factor de transcripció, activa proteïnes proapoptòtiques com Bax, Bid, Puma, Noxa, que condueix a la permeabilització mitocondrial. p53, afavoreix l'activació de Bax i la seva integració a la membrana mitocondrial, així com nombroses proteïnes que localitzen al mitocondri on ajuden a permeabilitzar la membrana externa (com per exemple ferredoxina reductasa, prolina oxidasa). p53 a la vegada pot reprimir proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2 [100]. .

p53 també pot induir l'apoptosi per mitjà de mecanismes independents a la seva activitat de factor de transcripció. Pot unir-se a la membrana externa del mitocondri i antagonitzar la funció antiapoptòtica de Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> i pot activar Bax i Bak [101]. La interacció entre Bcl-X<sub>L</sub>, p53 citoplasmàtic i Puma, defineixen el paper de p53. Bcl-X<sub>L</sub> pot unir-se a p53 impedit que actuï ja sigui com a factor de transcripció o no. Puma és un proteïna BH3 proapoptòtica que és regulada per l'acció de p53 com a factor de transcripció. Quan s'expressa Puma, pot desplaçar Bcl-X<sub>L</sub> de la seva unió amb p53 i incrementa els efectes proapoptòtics d'aquest [102]. p53 també té efectes en el cicle cel·lular, gràcies a la seva activitat de factor de transcripció, actua sobre p21 afavorint l'aturada del cicle. L'activitat proapoptòtica i reguladora de cicle de p53 semblen estar relacionades amb el seu estat de fosforilació, ja que si es troba fosforilada a la serina 46 augmenta el seu potencial apoptòtic [103]. La figura 18 mostra algunes de les funcions de p53, en aquest cas el seu paper en la regulació de l'apoptosi.



**Fig. 18.- Ruta d'actuació de p53 en l'apoptosi.** p53 estableix interaccions amb proteïnes de la família de Bcl-2 afavorint l'alliberament del citocrom c. p53 es veu regulada negativament per Mdm2. Aquesta figura no contempla l'acció de p53 com a regulador del cicle cel·lular i com a factor de transcripció [24].

### 2.3.5.2. Citosol

La majoria de reaccions metabòliques de la cèl·lula tenen lloc al citosol o a la interfase entre el citosol i el mitocondri. Entre aquestes tenim la glicòlisi, la gluconeogènesis, la lipogènesis, la ruta de les pentoses fosfat, el cicle de la urea, així com reaccions que estan destinades a mantenir l'equilibri redox intracel·lular.

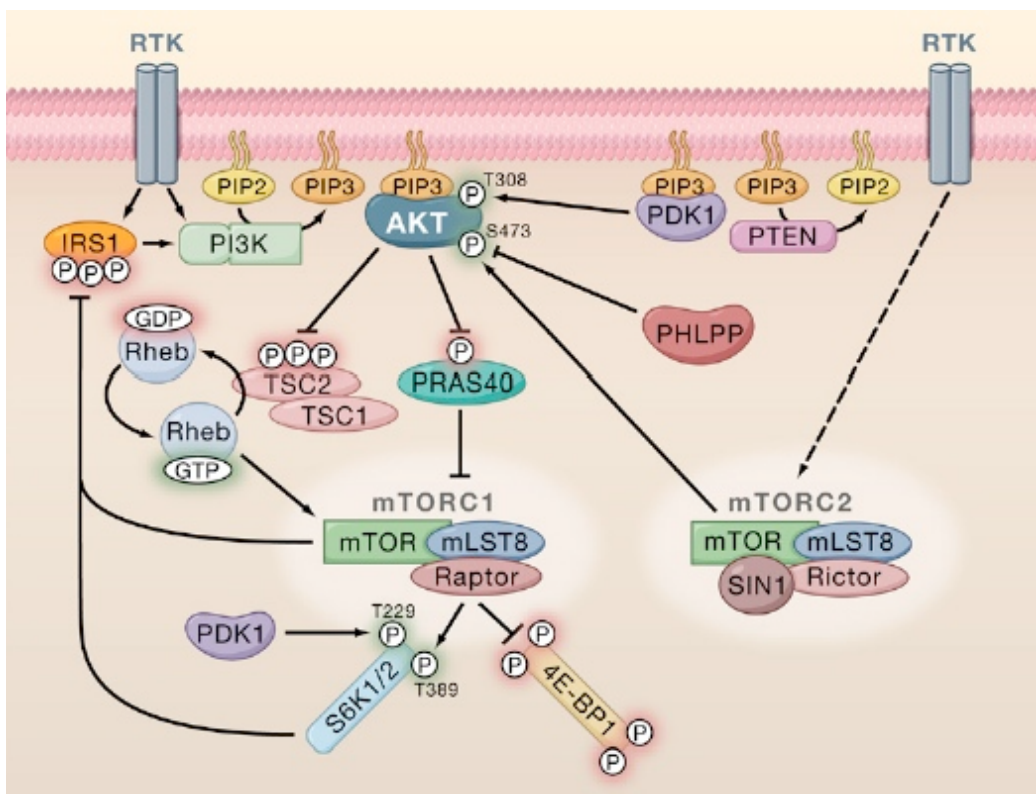
Els metabòlits que tenen efectes antiapoptòtics són: 1) ADP i ATP, que actuen inhibint a ANT. 2) la glucosa, que afavoreix la interacció antiapoptòtica entre la Hexocinasa II (HKII) i VDAC. 3) NADH i NADPH, que ajuden a reduir la càrrega oxidativa de les cèl·lules i tenen efectes directes sobre VDAC i ANT.

Per altra banda, la glucosa-6-fosfat promou l'obertura de VDAC a través del mecanisme dependent de la Hexocinasa I (HKI) [104]. També la glucosa pot ser proapoptòtica quan es troba en altes concentracions, ja que promou la formació d'espècies

reactives d'oxigen (ROS), les quals indueixen a la permeabilització de la membrana mitocondrial.

Hi ha diverses rutes de senyalització executades al citosol tenen influència al mitocondri i regulen l'apoptosi. Això inclou el sistema d'ubiquitinació així com diferents rutes dependents de cinases.

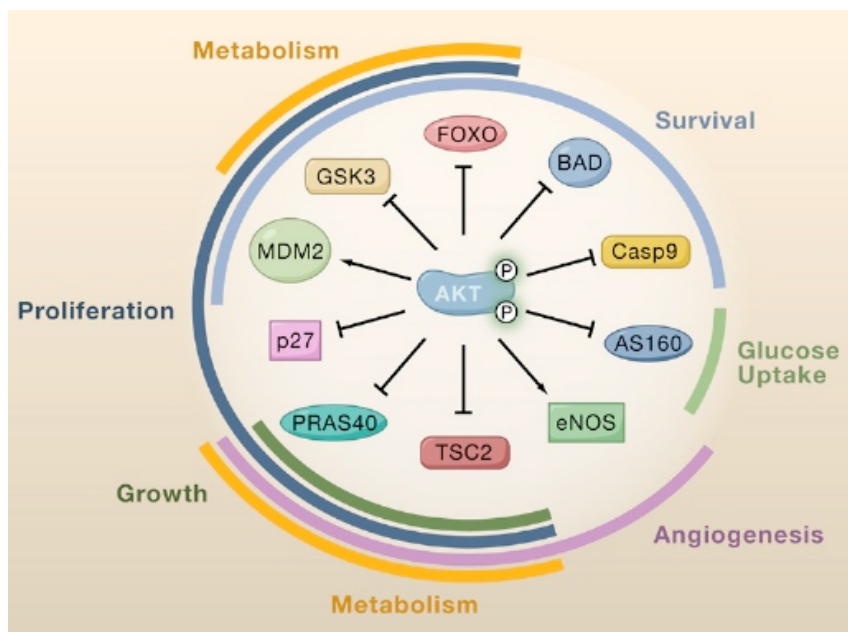
El complex ubiquitina/proteosoma és el responsable de la degradació de la majoria de proteïnes intracel·lulars i indirectament contribueix al control de l'apoptosi. Diversos membres de la família de Bcl-2 són substrat del complex d'ubiquitinació i són degradats, per tant, pel proteosoma. La inducció de l'apoptosi per part d'inhibidors d'aquest complex resulta en l'acumulació d'una gran varietat de proteïnes com p53, p27, Bad, Bax o Noxa que condueixen a l'alliberació del citocrom *c* i l'activació de l'apoptosi mitocondrial.



**Fig. 19.- Model per l'activació de Akt per factors de creixement.** Els receptors tirosina cinasa (RTK) quan s'activen fan que la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) fosforili el fosfatidilinositol-4, 5 bifosfat (PIP2) per generar el fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat (PIP3), en una reacció que pot ser reversible gràcies a PIP3 fosfatasa (PTEN). PIP3 s'uneix a PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase1*) que fosforila Akt. Les rutes entre Akt i mTOR es troben lligades ja que Akt fosforila TSC2, que queda bloquejat, permetent que Rheb-GTP s'alliberi i fosforili mTOR, activant-lo. mTOR fosforila 4E-BP1 que queda inhibida i S6 cinasa (S6K) que s'activa, promovent la proliferació cel·lular [108].



Els senyals des dels receptors de la superfície cel·lular han de ser transmesos cap a l'interior de la cèl·lula a través de la producció de missatgers lipídics secundaris com el fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat (PIP<sub>3</sub>). Aquest activa la cinasa Akt/proteïna cinasa B. Aquesta cinasa fosforila diferents proteïnes involucrades en la proliferació i en la inhibició de la mort cel·lular (figura 19). Una d'aquestes proteïnes fosforilades per Akt és la subunitat inhibidora del factor de transcripció NF<sub>κ</sub>B (I<sub>κ</sub>B) que condueix a l'activació de la ruta de supervivència de NF<sub>κ</sub>B [105], a més Akt fosforila la caspasa-9 inhibint la inducció de l'apoptosi. Una altre proteïna afectada per la fosforilació d'Akt és Bad, la qual, segons el seu estat de fosforilació, transloca del citosol al mitocondri unint-se a Bcl-X<sub>L</sub>. Així si Bad es troba fosforilat a la serina-112 o -136 és segrestat per proteïnes de la família 14-3-3 i es manté inactiu [106]. L'activació d'Akt també inhibeix la permeabilització de la membrana mitocondrial per altres mecanismes, com pot ser a través de la inhibició de GSK-3 $\beta$ , el qual en el seu estat actiu (defosforilat) és capaç de fosforilar la proteïna antiapoptòtica Mcl-1. A més, Akt pot inhibir l'apoptosi promovent la unió de la Hexocinasa II al mitocondri, que al seu torn impedeix la unió de Bax amb VDAC [107]. Algunes de les funcions de Akt queden representades a la figura 20.



**Fig. 20.- Funcions cel·lulars de Akt.** La fosforilació mediada per Akt comporta la seva activació (fletxes) o bé la seva inactivació (fletxa tancada). La regulació d'aquestes molècules contribueix a l'activació de diversos processos cel·lulars, com la proliferació, el creixement, la supervivència, el metabolisme o la captació de glucosa. Es dona una gran versatilitat funcional per part de Akt i un solapament entre els seus substrats [108].

Entre les nombroses proteïnes que transloquen a la membrana externa, les cinases que pertanyen a les *Apoptosis Signal-regulating Kinases (ASK)/Mitogen-Activated Protein*

*Kinase* (MAPK) tenen un rol important en la regulació de la permeabilització de la membrana. És el cas de les JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases*), una sub-família de les MAPK. Aquestes, sota senyals d'estrès cel·lular s'associen al mitocondri. Les JNK s'ha vist que inactiven les proteïnes antiapoptòtiques i activen les proapoptòtiques de la família de Bcl-2 [109, 110] i, per tant, influencien a la permeabilització de la membrana mitocondrial.

### **2.3.6. Inductors de la mort cel·lular alliberats des del mitocondri**

Com s'ha mencionat anteriorment el mitocondri allibera les proteïnes solubles contingudes a l'espai intermembrana quan es permeabilitza la membrana externa. Moltes d'aquestes molècules tenen un paper rellevant com a elements proapoptòtics.

#### **2.3.6.1. Citocrom *c***

L'alliberament citosòlic del citocrom *c* és un dels elements clau en la ruta mitocondrial d'apoptosi [111].

El citocrom *c* es troba majoritàriament unit a lípids mitocondrials com la cardiolipina, una altra part es troba de forma lliure i difon a través de l'espai intern mitocondrial. El citocrom *c* unit a la cardiolipina queda lliure degut al trencament de la unió del complex a causa de l'acció d'elements oxidatius en arribar l'estímul apoptòtic al mitocondri. El citocrom *c* després de ser alliberat té com a destí la membrana del Reticle Endoplasmàtic, de tal manera que s'allibera el calci de forma continuada, aquest s'acumula al mitocondri, generant més espècies reactives d'oxigen i obrint els complexos de permeabilització transitoris [112, 113].

Un cop al citoplasma, el citocrom *c* promou també la formació de l'Apoptosoma, una plataforma per l'activació de la procaspasa 9, i que inclou, a més del citocrom *c*, Apaf-1 i ATP/dATP. Un cop format aquest complex, la caspasa-9 és capaç d'activar la cascada de les caspases efectores. Les caspases contribueixen a desmantellar nombroses estructures, entre elles el mitocondri, ja que la caspasa-3 activa pot entrar a l'espai intern mitocondrial i processar el complex I de la cadena respiratòria, aturant el flux d'electrons i generant encara més espècies reactives d'oxigen que afavoreixen la permeabilització de la membrana mitocondrial, ja que interactuen amb el complex de permeabilització transitori.

### 2.3.6.2. Smac/DIABLO

Smac/DIABLO és una proteïna mitocondrial codificada pel genoma nuclear, però porta a l'extrem NH<sub>2</sub> una seqüència de localització mitocondrial que es proteolitza al ser importada a l'espai intern mitocondrial. Un cop es dona la permeabilització de la membrana mitocondrial, Smac/DIABLO s'allibera del mitocondri i neutralitza inhibidors endògens de caspases, les IAP.

### 2.3.6.3. AIF

La proteïna AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) és un enzim mitocondrial que mostra activitat proapoptòtica. En les cèl·lules sanes, AIF es troba confinat a l'espai intern del mitocondri, trobant-se en forma soluble o ancorat a la membrana interna i és important pel tractament de l'oxigen reactiu i el manteniment del complex I de la cadena respiratòria. El seu alliberament al citosol per la permeabilització mitocondrial fa que es transloqui al nucli, on provoca la condensació de la cromatina i la fragmentació del DNA. Bcl-2 i membres de les *heat shock protein* (HSP) actuen sobre AIF retardant la seva acció. Bcl-2 impedeix que AIF s'alliberi del mitocondri, mentre que HSP70 evita la translocació de AIF al nucli.

### 2.3.6.4. Endonucleasa G

La fragmentació del DNA nuclear és un dels elements més reconeguts de l'apoptosi. És un procés que involucra l'activació de nombroses nucleases, entre elles la endonucleasa G (EndoG), un enzim específic de mitocondri, que transloca al nucli durant l'apoptosi. La seva activació és una qüestió que no s'ha resolt, ja que podria implicar la participació de les caspases.

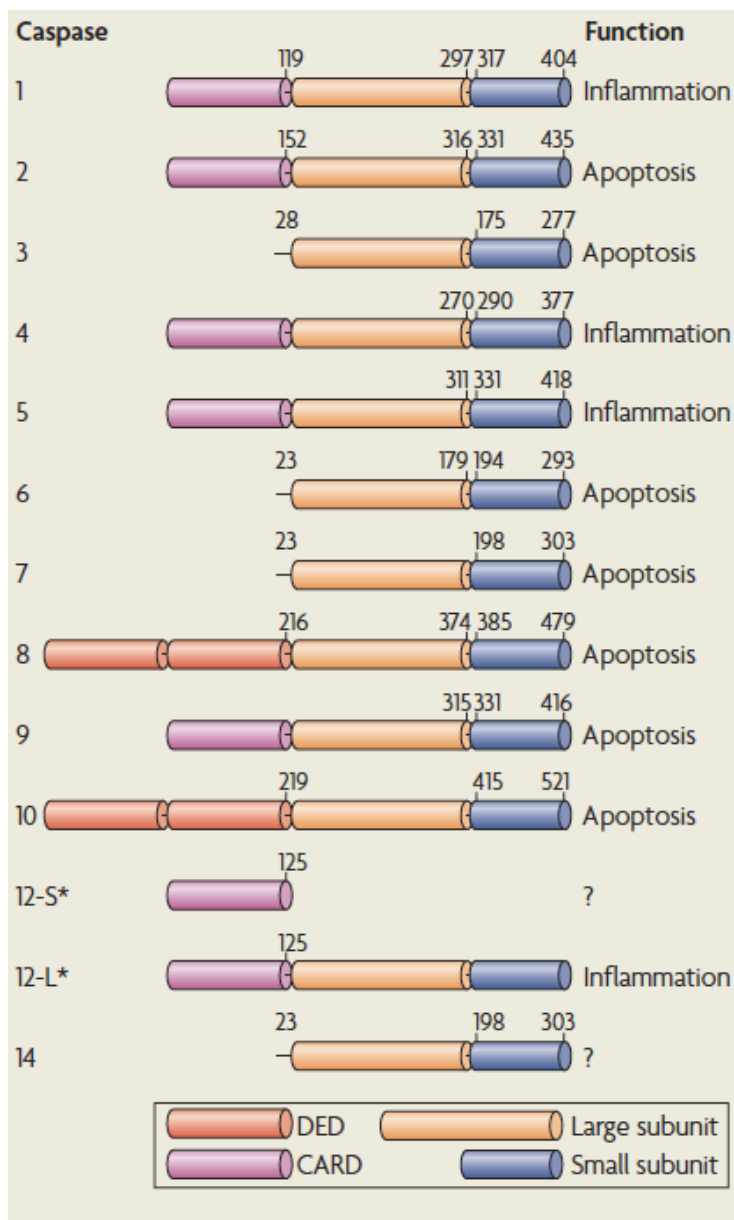
## 2.3.7. Les caspases

Com s'ha esmentat en diferents apartats anteriorment, les caspases són l'element essencial en la transmissió i execució del senyal apoptòtic a les cèl·lules. Les caspases (*cystein aspartic acid-specific protease*) són proteases altament específiques que tallen els seus substrats després de la seqüència de tetrapèptids (P4-P3-P2-P1) on P1 és un residu d'Asp. La família de les caspases es pot subdividir en les iniciadores, que són capaces d'autoactivar-se, ja que es troben en forma inactiva en la cèl·lula sana, i iniciar el procés proteolític d'altres caspases i les efectores, que són activades per altres caspases. Aquestes últimes tallen la majoria dels substrats durant l'apoptosi.

Totes les caspases tenen una estructura similar formada per un propèptid, d'una longitud variable, seguit per una subunitat gran i una de petita. S'han identificat dos tipus diferents de propèptids, el *Caspase Recruitment Domain* (CARD) i el *Death Effector Domain* (DED) (figura 21). Aquests dominis permeten la interacció amb altres proteïnes que també contenen aquests mateixos dominis. L'activació de les caspases s'inicia normalment amb la proteòlisi de la procaspasa, entre les subunitats gran i petita, formant un heterodímer. En general, les caspases funcionen com a heterotetràmers, que es formen a partir de la dimerització de dos heterodímers. Les caspases iniciadores es troben en forma de monòmers en les cèl·lules sanes, mentre que les efectores es troben formant dímers pre-formats. No totes les caspases intervenen en el procés d'apoptosi, per exemple les caspases 1, 4, 5 i 12 s'activen durant la resposta innata del sistema immunitari i estan involucrades en el procés inflamatori (figura 22).

Com s'ha vist en els punts anteriors, tant si s'activa la ruta extrínseca com la ruta intrínseca d'apoptosi, la successió d'esdeveniments porta a l'activació de les caspases efectores (caspases 3, 6 i 7), les quals duren a terme la major part del trencament proteolític que és característic d'aquest procés. Les caspases degraden nombroses proteïnes durant l'apoptosi, havent-se identificat uns 400 substrats de caspases en mamífers [114].

El desmantellament de les diferents estructures cel·lulars per part de les caspases inclou components del citoesquelet, com filaments d'actina, miosina i tubulina. Altres elements com keratines o laminines nuclears també són substrats de les caspases. La proteòlisi d'aquestes proteïnes contribueix al canvi de morfologia de la cèl·lula, arrodoniment, retracció del citoplasma i lobul·lació de la membrana plasmàtica durant les etapes inicials de l'apoptosi.

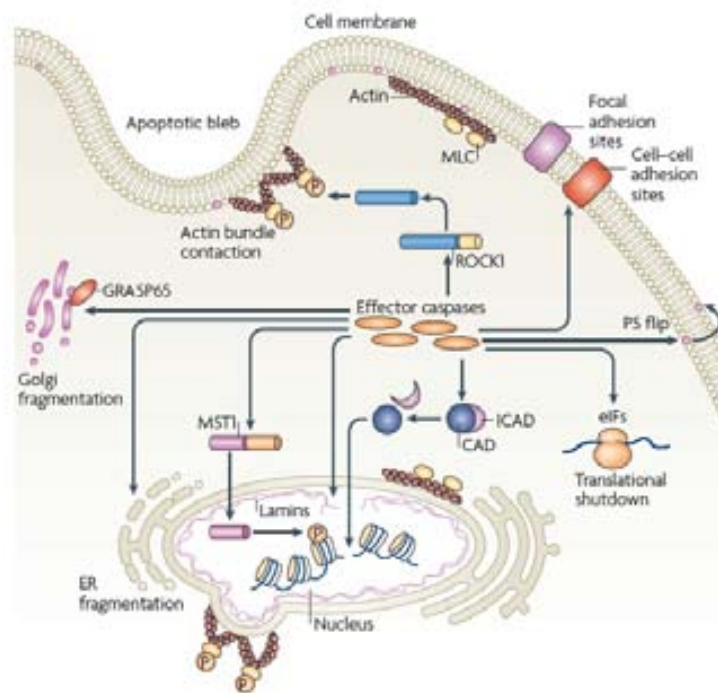


**Fig. 21.- Esquema dels dominis que es troben en les diferents caspases.** Hi podem veure el *death effector domain* (DED) i el *caspase recruitment domain* (CARD). El lloc de proteòlisi per passar de la forma inactiva a l'activa es troba entre la subunitat llarga (20 KDa i la subunitat curta de la proteïna (10 KDa) [38].

La fragmentació del nucli és el principal procés de la mort cel·lular, la seva desintegració és deguda a la fragmentació de la làmina nuclear i al col·lapse de l'embolcall nuclear per la proteòlisi de les laminines A, B i C per l'acció de les caspases.

Altres objectius de les caspases són aquelles proteïnes essencials pel manteniment de la cèl·lula, com ara factors de transcripció (per exemple NFAT, NFκB) i factors de traducció (per exemple, eIF2a, eIF3, eIF4), així com el RNA ribosomal. El DNA genòmic també es veu sotmès a degradació donant una fragmentació en escala [115].

Aquest patró de fragmentació és el resultat del trencament de la cromatina en regions intranucleosomals per l'acció de les endonucleases activades per caspases (CAD). Un exemple d'aquesta fragmentació s'ha mostrat anteriorment a la figura 9. En les cèl·lules sanes, CAD es troba unida al seu inhibidor (ICAD), però a l'activar-se les caspases, aquestes degraden el repressor i alliberen l'endonucleasa activa. A més a més, la degradació ve acompanyada per la condensació de la cromatina. D'aquesta manera s'impedeix la divisió cel·lular i facilita la seva fagocitació. La degradació del DNA també permet evitar la seva alliberació a l'espai extracel·lular ja que podria provocar una resposta autoimmune [116], com seria el cas del lupus sistèmic on es troben anticossos anti-DNA que generen deposicions als ronyons donant una pèrdua de les funcions renals.



**Fig. 22.- Les caspases coordinen el desmantellament** d'estructures cel·lulars clau, com és la fragmentació del DNA, de l'aparell de Golgi, de proteïnes del citoesquelet entre altres [38].

L'aparell de Golgi i el reticle endoplasmàtic són òrgans que pateixen la fragmentació i l'empaquetament durant l'apoptosi degut a l'acció de les caspases. El mitocondri també es fragmenta durant el procés apoptòtic, però en aquest cas les caspases no tenen el paper principal. A la figura 21 també es llisten les diferents accions que exerceixen les caspases.

L'etapa final del procés de degradació de la cèl·lula és la fagocitació dels cossos apoptòtics. La generació de punts d'unió pels fagòcits és l'últim procés de la cèl·lula al morir. El mecanisme mitjançant el que les cèl·lules apoptòtiques coordinen el seu reconeixement amb els fagòcits no està clar. El lligand més conegut és la fosfatidilserina, fosfolípid de membrana que transloca de la cara interna de la membrana plasmàtica cap a l'externa com a senyal de fagocitació [117, 118]. Aquesta translocació és dependent de caspasa, però no es coneix com es promou aquesta externalització.

### 3. CICLE CEL·LULAR

El cicle cel·lular és el procés universal mitjançant el qual les cèl·lules es reproduïxen, pas imprescindible pel creixement i el desenvolupament de tots els organismes vius [119]. Els esdeveniments més importants del cicle cel·lular són aquells relacionats amb la còpia i la divisió del material hereditari, i això comprèn la replicació del DNA cromosòmic i la separació dels cromosomes replicats durant la mitosi. Les bases moleculars del control del cicle cel·lular estan altament conservades des dels eucariotes unicel·lulars simples fins als metazous complexos. La precisió amb la qual s'executen els processos del cicle cel·lular, assegura la supervivència dels organismes vius, mentre que la pèrdua d'aquesta precisió incrementa la inestabilitat genòmica, factor important en el desenvolupament del càncer.

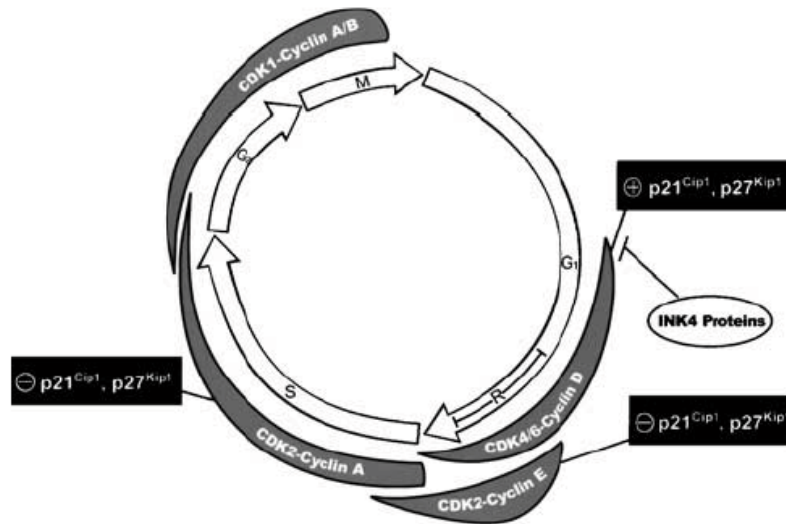
El cicle cel·lular eucariota es pot dividir entre la fase S o de síntesi, durant la qual es replica el DNA, i la fase M o mitosi, en la que es separen els cromosomes replicats. Aquestes dues fases estan separades per dos intervals o *gaps* anomenats  $G_1$  (entre M i S) i  $G_2$  (entre S i M) (figura 23).

El control del cicle cel·lular regula el començament de la fase S i la fase M, i assegura que aquestes es reproduïxin en el moment adequat, coordinades amb el creixement cel·lular. També corregeix els errors que es puguin ocasionar durant la divisió cel·lular. En diferents punts del cicle cel·lular la cèl·lula revisa si una fase en concret s'ha executat correctament abans de procedir a la següent, concepte anomenat *checkpoint* o punt de control [120]. Aquest mecanisme permet el bloqueig de la mitosi per a reparar un DNA danyat, per exemple, i ajuda a assegurar l'èxit de la transmissió genètica.

El primer punt de control en el cicle cel·lular es troba al final de la fase  $G_1$  i és conegut com a punt de restricció (R). Un cop les cèl·lules han passat aquest punt estan compromeses a completar el cicle cel·lular. Altres punts de control es troben a la fase S, per activar els mecanismes de reparació si fos necessari i a la transició entre les fases  $G_2$  i M, per assegurar que les cèl·lules tenen replicat completament el DNA i que no es troba danyat abans que entrin a la mitosi. Hi ha també punts de control en la pròpia mitosi per assegurar que les condicions es mantenen adients pel tal de completar la divisió cel·lular.



La durada de la progressió del cycle cel·lular en les cèl·lules de mamífer varia segons el tipus cel·lular, però té una durada de 24 hores de mitja. El temps requerit per superar la fase S i entrar a la fase M és molt constant entre les cèl·lules, al voltant de les 6 h per la fase S, 4 h per la  $G_2$  i entre 1 i 2 h per la mitosi [121].



**Fig. 23.- Esquema del cycle cel·lular.** El cycle cel·lular es divideix en les etapes  $G_1$  (gap 1), S (síntesi de DNA),  $G_2$  (gap 2) i M (mitosi). El punt després del qual la divisió cel·lular té lloc es coneix com el punt de restricció (R) i es troba a l'etapa tardana de  $G_1$ . La progressió per les etapes del cycle està regulada per la formació dels complexos Cdk/ciclina. L'activitat relativa de cada complex ve representat pel gruix dels arcs en gris. Els reguladors dels complexos Cdk/ciclina es mostren enquadrats en negre [122].

La progressió a través de cada fase del cycle està estrictament controlada per diferents proteïnes, com les ciclins, les cinases ciclina-dependents (*cyclin-dependent kinases*, CDK) i inhibidors de Cdk (CDKI), els quals són regulats per processos de fosforilació i desfosforilació. Les Cdk juguen un paper clau en la regulació del cycle cel·lular, formen part de complexos amb les ciclins que actuen com a subunitats reguladores. Els nivells de ciclina varien al llarg del cycle com a conseqüència de canvis en la transcripció i degradació per ubiquitinació. L'activitat de les Cdk es veu regulada negativament per les CDKI. Complexes específics ciclina-Cdk esdevenen activats i modulats en diferents fases del cycle. Per exemple, el complex ciclina D/Cdk4 (Cdk6) inicia la progressió a través de  $G_1$  fosforilant diversos substrats, entre ells membres de la família del retinoblastoma (Rb), que condueix a un activació de la transcripció de gens necessaris per la síntesi del DNA i la consegüent progressió pel cycle cel·lular. El complex ciclina E/Cdk2 és important per la transició  $G_1$ /S, el complex ciclina A/Cdk2 és important durant la fase S, el complex ciclina A/Cdk2 (també conegut com Cdk1) i la ciclina B/Cdk2 són importants per la transició entre la fase  $G_2$  i la M. La unió entre la ciclina com a subunitat

reguladora i les Cdk com a subunitat catalítica amb activitat cinasa és específica, és a dir, l'activitat serina/treonina de les Cdk no es dona sinó estan unides a la seva ciclina específica.

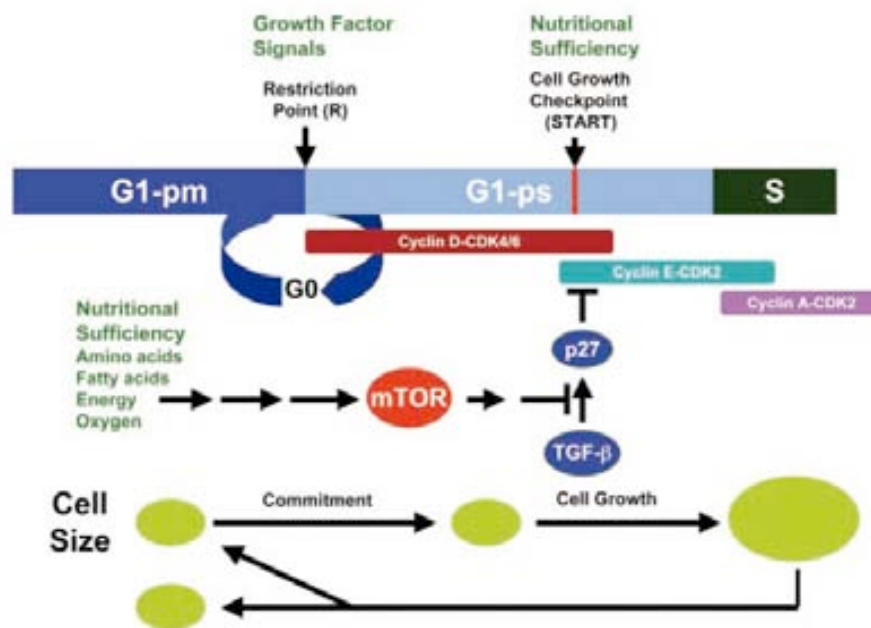
Les ciclines i Cdk al seu torn es troben regulades de forma negativa per CDKI. S'han descrit dues famílies d'inhibidors de Cdk, els INK4 (*Inhibitor of Cdk4*) i els CIP (*Cdk-interacting protein*)/KIP (*Kinase inhibitor protein*). Entre els membres de la família dels INK4 trobem p14, p15, p16, p18 i p19. La família de les CIP/KIP inclou p21, p27 i p57. Mentre els INK4 bloquegen la interacció entre ciclina i Cdk de forma indirecta induint canvis alostèrics a les Cdk, els membres de la família CIP/KIP interaccionen de forma directa amb el complex ciclina/Cdk inhibint la seva activitat. Les Cdk també es poden regular per canvis en la fosforilació del lloc catalític controlats per Cdc25 i Wee1 [123].

El punt de restricció entre la fase G<sub>1</sub> i S és sensible a la presència de factors de creixement, però s'ha vist que en realitat aquest punt de restricció també és sensible a nutrients, és a dir, en una fase primerenca de la fase G<sub>1</sub> es troba el punt de restricció sensible als factors de creixement, mentre que en una etapa tardana de la fase G<sub>1</sub> (unes 3,5 hores posteriors a la mitosi) trobem el punt de restricció sensible a l'estat nutricional (figura 24). Aquest punt de restricció es trobaria regulat per senyals governades per la ruta de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), mentre que el punt de restricció inicial ho seria per Ras.

mTOR és una ruta de senyalització complexa (figura 25) on hi ha nombrosos factors que hi intervenen. mTOR és una Ser/Thr cinasa conservada que regula el creixement cel·lular i el metabolisme en resposta a senyals ambientals. El senyal de PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) implica la formació de PIP3 (*phosphatidylinositol-3, 4, 5-phosphate*) a partir de PIP2 (*phosphatidylinositol-4, 5-phosphate*), que capta PDK1 (*phosphatidylinositol dependant kinase 1*) que fosforila a Akt (*Protein kinase B*). Akt pot fosforilar i suprimir l'activitat GAP (*GTPase activating protein*) de TSC 1/2 (*tuberous sclerosis complex*). La supressió de TSC 1/2 resulta en un increment de l'activitat GTPasa de Rheb, que s'uneix al domini cinasa de mTOR i l'activa. mTOR estimula la subunitat ribosomal S6 cinasa (S6K), que a la vegada estimula la traducció de molts transcripts, incloent aquells per a Myc. mTOR també suprimeix els senyals de TGF- $\beta$  que porten a un increment de l'activitat ciclina E-Cdk2. Aquesta ruta es troba influenciada per AMPK (*AMP-*

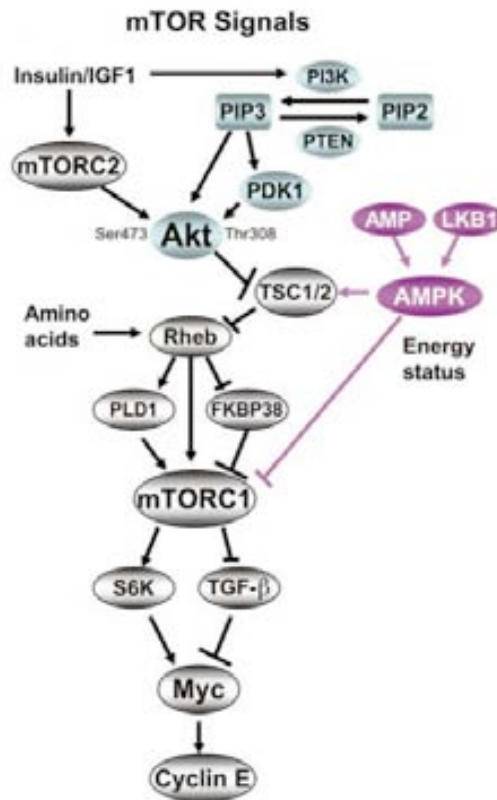
activated protein kinase) que activa TSC 1/2 i suprimeix mTOR, quan els nivells de ATP són baixos respecte els nivells de AMP. AMPK també fosforila Raptor, una proteïna associada a mTOR, que comporta la seva inactivació.

Els aminoàcids s'han proposat com a elements activadors de mTOR, ja que inactiven el TSC 1/2 o per l'estimulació de Rheb. L'absència d'aminoàcids essencials resulta en una aturada de G<sub>1</sub>, de la mateixa manera que ocorre amb la inactivació de mTOR per l'acció de la rapamicina.



**Fig. 24.- Punts de restricció al llarg de la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular.** Progressió a través de la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular on es representen els dos punts de restricció que s'han de superar per entrar a la fase S, així com els factors que governen aquesta transició [124].

Per tant, la superació de la fase G<sub>1</sub> comporta el pas a través de dos grans obstacles, el primer és el pas del punt de restricció (R), depenent de factors de creixement. Després de passar R, el següent obstacle implica l'activació de senyals que indiquin si hi ha suficients nutrients perquè la cèl·lula dupliqui la seva massa, és el punt de creixement cel·lular. L'eix central en aquest punt és mTOR, que suprimeix la senyalització de TGF-β. La supressió de TGF-β fa que no s'activi p27<sup>KIP1</sup>, que evita l'activitat del complex ciclina E-Cdk2, ja que la superació d'aquest punt ve marcada pels nivells de ciclina E-Cdk2.



**Fig. 25.- Representació de la ruta mTOR.** La ruta mTOR té nombrosos factors, un d'ells és la generació, a partir de PIP2, de PIP3, que recluta i activa PDK1, el qual fosforila Akt a la Thr308. Akt pot fosforilar i suprimir l'activitat de TSC1/2, fet que suposa l'activació de Rheb el qual activa a mTORC1. mTOR estimula S6K que afavoreix l'activitat de traducció d'elements com Myc. A la vegada, hi ha una inhibició dels senyals de TGF- $\beta$ , que comporta una activitat elevada de ciclina E-Cdk2. En condicions de nivells baixos d'ATP es suprimeix l'activitat de mTOR i s'activa TSC1/2 a través de AMPK. Aquesta ruta és altament sensible a la presència de nutrients necessaris pel creixement cel·lular [124].

Val a dir que el cycle cel·lular i la mort per apoptosi es troben estretament lligats, ja que condicions externes de falta d'elements mitogènics, ja siguin manca de factors de creixement, nutrients, citocines, hormones, etc, o factors interns per exemple danys en el DNA, condueixen a l'aturada de la divisió cel·lular, fet que activa l'apoptosi. El balanç entre senyals positius i negatius determina la decisió entre la vida i la mort i un perfecte equilibri entre la proliferació cel·lular i la mort cel·lular és essencial. El lligam entre ambdós és molt estret i diferents components participen en l'apoptosi i el cycle cel·lular. Molècules com per exemple c-myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF- $\kappa$ B, Cdk, ciclins i CDKI tenen un paper dual, segons l'estimul, poden induir la divisió cel·lular o bé l'apoptosi [125].

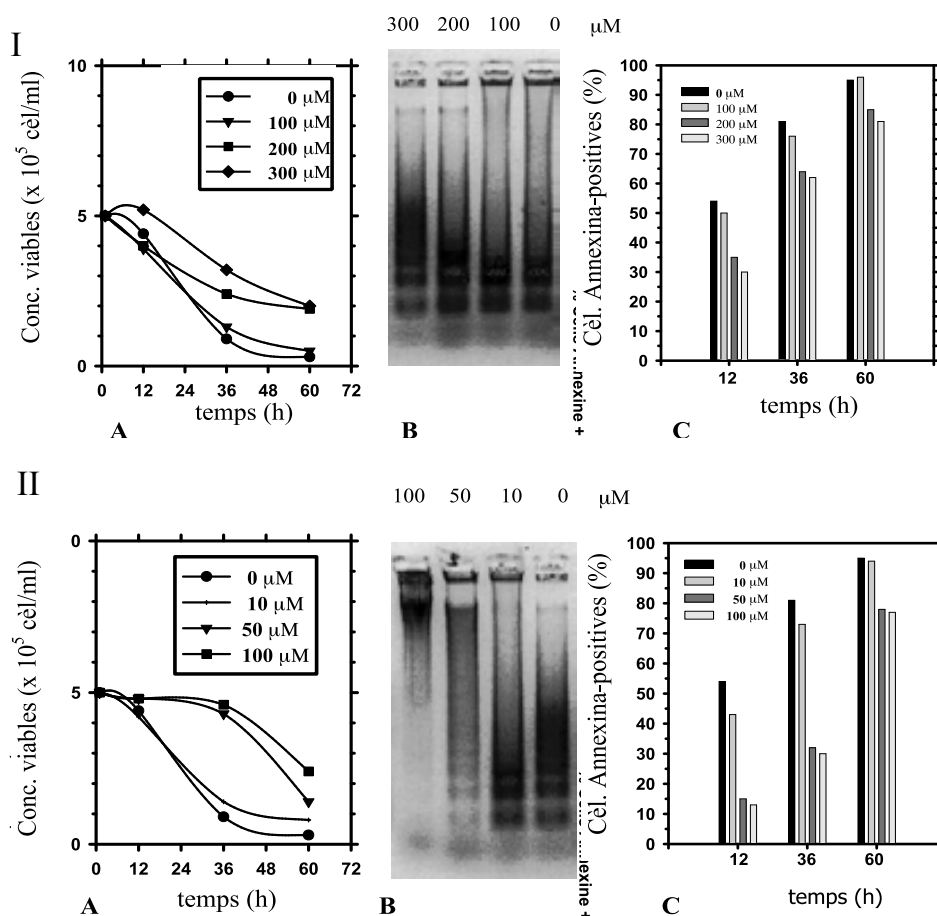
## 4. ESTRATÈGIES PER INHIBIR L' APOPTOSI EN CULTIUS EN BIOREACTORS

El cultiu *in vitro* de cèl·lules animals representa la manera més adequada per produir grans quantitats de proteïnes d'interès en el camp del diagnòstic i terapèutic. El que hom busca en els cultius en bioreactors és l'optimització de la producció, i per tant, arribar a obtenir una màxima productivitat específica i a una màxima concentració cel·lular. Una manera de millorar la producció en els cultius cel·lulars és augmentar la productivitat específica per cèl·lula, però també es pot incrementar la concentració cel·lular i la durada del temps de cultiu ja que hi ha una relació directe entre la concentració cel·lular i el producte obtingut. La mort cel·lular per apoptosi representa un greu inconvenient a nivell del cultiu *in vitro*, ja que disminueix dràsticament la viabilitat del cultiu. Així, tots els sistemes, incloent els més sofisticats com la perfusió en continu, acaben generant alguna condició limitant que desencadena el procés d'apoptosi, que esdevé irreversible i general. Per aquest motiu, s'intenten desenvolupar diferents estratègies que permetin inhibir o retardar l'aparició de l'apoptosi i que, per tant, ajudin a allargar la durada dels cultius i millorin la productivitat del procés.

Una possibilitat per inhibir la mort per apoptosi en els cultius cel·lulars és la utilització de determinades substàncies químiques, com els inhibidors peptídics de caspases. En la mort cel·lular programada dels cultius *in vitro* de l'hibridoma KB26.5, la importància tant del citocrom *c* com de la caspasa 9 en el procés de transducció i amplificació dels senyals que condueixen a la mort de la cèl·lula d'hibridoma KB26.5 s'ha constatat inhibint de forma química tant caspases iniciadores com efectores utilitzant el z-VAD-fmk (N-benzioxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona) per la caspasa 9 i el DEVD-cmk (Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehid) per la caspasa 3 [126]. Els resultats obtinguts amb l'ús d'aquests inhibidors químics semblen suggerir un paper principal de les caspases 9 i 3 en el procés de mort per apoptosi de l'hibridoma KB26.5, ja que s'ha observat una inhibició de l'apoptosi del 70% i del 35% si s'actua contra la caspasa 9 i 3 respectivament (figura 26). Aquests diferents percentatges d'inhibició reflecteixen que la caspasa 9 és la proteasa iniciadora de la via de les caspases. El fet que en el cas de la caspasa 3 la inhibició de l'apoptosi hagi estat només del 35% indica que, efectivament, aquesta caspasa és la responsable d'algunes de les alteracions que es donen en l'hibridoma, però com que es troba situada més avall que la caspasa 9 en la jerarquia de les caspases,

només pot retardar l'aparició de l'apoptosi en períodes molt inicials del cultiu, ja que paral·lelament es dona l'activació d'altres caspases.

Aquests experiments han demostrat que és possible aturar el procés de mort cel·lular i que la caspasa 9 activa directament la caspasa 3. No obstant, l'ús d'aquests inhibidors peptídics a nivell de bioreactor no és factible com a conseqüència del seu elevat cost [126]. Cal destacar el fet que, mitjançant l'ús d'inhibidors peptídics, sigui possible retardar l'aparició de l'apoptosi i revertir el procés de mort un cop aquest està activat. Aquesta evidència permet avançar en el disseny d'estratègies genètiques dirigides a inhibir l'apoptosi.



**Fig. 26.- Efecte de l'inhibidor z-VAD-fmk (I) i l'inhibidor DEVD-cmk (II) en el cultiu en discontinu de l'hibridoma KB 26.5 en condicions de manca de glutamina.** A) Evolució de la concentració de cèl·lules viables B) Patró de degradació del DNA a les 60 h des de l'inici del cultiu. C) Percentatge de cèl·lules que presenten la translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica obtinguts per citometria de flux. En el cas del z-VAD-fmk (inhibidor caspasa 9) es pot observar com els cultius amb concentracions de z-VAD-fmk de 50 i 100 μM mantenen el nombre de cèl·lules viables fins a les 36 hores des de l'inici del cultiu (I A) i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques en aquest temps és del 32% a 50 μM i 30% a 100 μM (I C). Per tant, hi ha una inhibició de l'apoptosi del 70% aproximadament. En el cas del DEVD-cmk (inhibidor caspasa 3) a concentracions de 300 i 200 μM a les 36 hores s'observa un 60 % i 65% respectivament de cèl·lules apoptòtiques, i una inhibició de l'apoptosi del 35% aproximadament (II C) [126].

Una vegada s'ha fet la determinació amb inhibidors de que la inhibició és possible, s'ha efectuat l'expressió de proteïnes clau en la regulació del procés. La estratègia per actuar sobre la mort cel·lular programada és la introducció de modificacions genètiques a la cèl·lula. Les estratègies genètiques d'inhibició de l'apoptosi tenen com a objectiu aturar el procés apoptòtic abans de l'activació de les caspases transductores, és a dir, es centren al nivell mitocodrial. Com s'ha vist, el mitocondri té un paper essencial en la integració de senyals i la modulació de les decisions de vida o mort a través de membres de la família de Bcl-2. Cal fer notar que la introducció d'algun mecanisme genètic de protecció de la cèl·lula respecte el procés d'inducció, podria desenvolupar cèl·lules més robustes que tindrien la capacitat de mantenir la seva viabilitat i no desencadenar la mort cel·lular programada, inclús en condicions adverses provocades en algun moment del bioprocés.

**Taula 2.-** Resum dels mètodes més representatius utilitzats en diferents tipus cel·lulars<sup>a</sup> per la protecció de l'apoptosi [127].

Cell line	Method of protection
NS0, CHO, HEK-293, BHK, Hybridoma	Bcl-2
CHO, HEK-293	Bcl-2Δ mutant
CHO, BHK, Hybridoma	Bcl-x <sub>L</sub>
CHO	Bcl-x <sub>L</sub> Δ mutant
NS0	E1B-19K
Hybridoma	Bhfr-1, kbcl-2
CHO, HEK-293	XIAP/XIAP mutant
CHO, HEK-293	CrmaA/CrmaA mutant
CHO, HEK-293	Caspase inhibitors: Z-IETD-fmk, Z-LEHD-fmk, Z-VAD-fmk
Hybridoma	Caspase inhibitors: Ac-DEVD-cho, Z-VAD-fmk
Human epidermal keratinocytes	Dominant negative caspase-9
Jurkat cells	Dominant negative FADD
CSM14.1 neuron cells, SF268 glioblastoma cells, HCT116 colon cancer cells, PC-3 prostate cancer cells	Humanin
CHO	Transferrin and insulin-like growth factor-I receptor
NS0	Hsp70
Hybridoma	High mitochondrial membrane potential selection
CHO	Suramin
HeLa	Silkworm hemolymph
Hybridoma	Rapamycin
Hybridoma	Serum growth factors
NS0, Hybridoma	Glutamine
VERO	Galactose, glutamine
CHO	Glutamine, asparagine, glucose feeding
CHO, Hybridoma	Glycine betaine, glycine, asparagines, threonine

<sup>a</sup>Abreviatures: Ac-DEVD-cho, *N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd*; BHK, *baby hamster kidney*; CHO, *Chinese hamster ovary*, CSM, *crude synaptic membrane*; HEK-293, *human embryonic kidney 293*; NS0, *NS0 mouse myeloma cells*; VERO, *African green monkey cells*; z-IETD-fmk, *benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethylketone*; z-LEHD-fmk, *benzyloxycarbonyl-Leu-Glu-His-Asp-fluoromethylketone*; z-VAD-fmk, *benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone*.

La utilització d'estratègies moleculars per retardar o aturar la mort cel·lular programada ha conduït a l'ús de gens de la família de Bcl-2 [14, 128, 129], però cal tenir en compte que aquestes proteïnes poden ser susceptibles a ser degradades per les

caspases, i que els productes de la proteòlisi generin fragments proapoptòtics, fent que sigui necessari buscar alternatives a aquests gens antiapoptòtics [130, 131]. Estratègies més recents han intentat modificacions duals destinades a aturar diversos nivells simultàniament de la ruta apoptòtica. Aquests intents de combinar diferents gens per inhibir l'apoptosi pretenen generar soques més robustes, ja que les cèl·lules podrien sobreviure durant períodes llargs de temps en situacions adverses [132, 133]. Altres estratègies passen per expressar proteïnes víriques inhibidores de l'apoptosi com la proteïna CrmA del poxvirus [134] entre altres. La taula 2 mostra una recopilació de diferents mètodes usats per impedir l'apoptosi en diversos tipus cel·lulars. S'hi mostren elements utilitzats seguint dues estratègies, per una banda la modificació de l'entorn exterior a través de la suplementació de medi i, per l'altra, l'alteració de la bioquímica intracel·lular utilitzant aproximacions d'enginyeria genètica.

#### 4.1. BHRF1

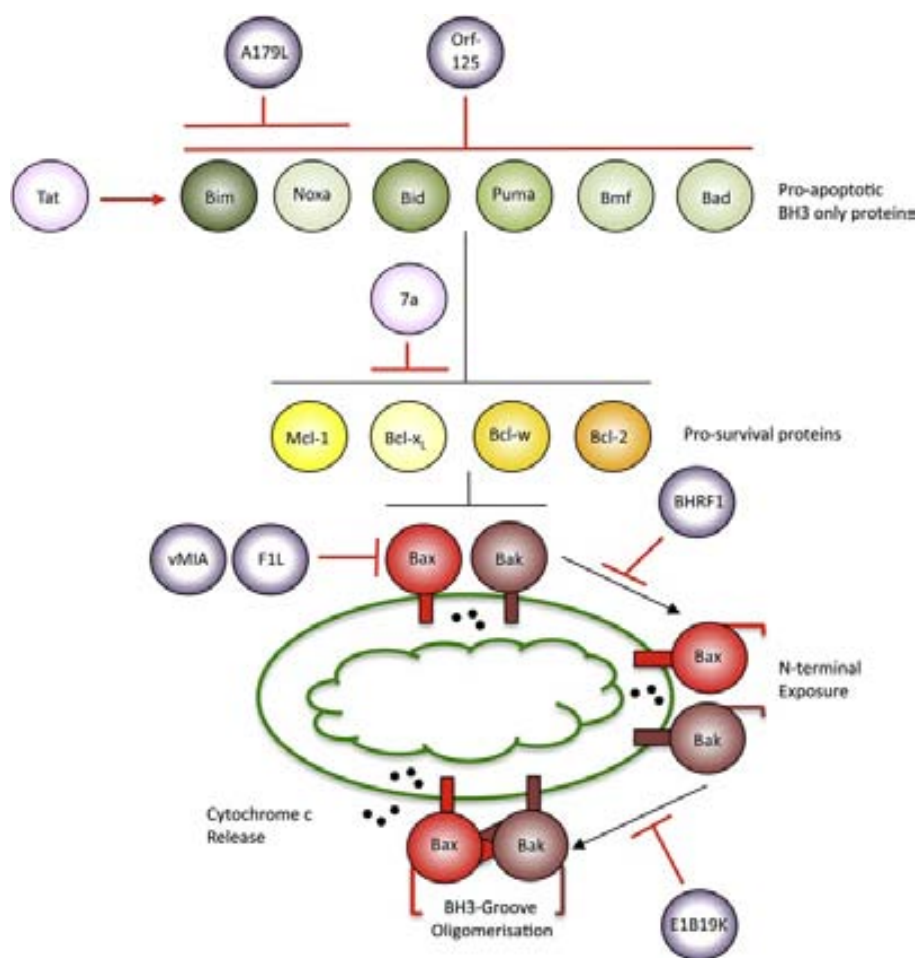
Els virus són paràsits intracel·lulars que requereixen infectar cèl·lules per sobreviure durant un determinat temps per propagar-se i assegurar-se la transmissió cap al següent hoste. L'estudi de les diferents famílies víriques ha posat de manifest que en moltes d'elles evitar la mort de la cèl·lula que infecten és primordial, mentre que en d'altres induir la mort cel·lular és essencial per facilitar l'alliberament de les partícules víriques. Els genomes vírics reflecteixen la dependència en la inducció o inhibició de la mort cel·lular, amb moltes proteïnes actuant sobre passos clau en la progressió de la mort de la cèl·lula. En resposta a l'estrès generat per la infecció vírica, tots els metazous tenen la capacitat de restringir la replicació viral i la seva expansió. S'han descobert nombrosos inhibidors d'aquesta resposta innata, fet que ha permès conèixer les rutes clau de l'hoste.

Els virus utilitzen estratègies per regular l'apoptosi a nivell mitocondrial, ja que aquest és un procés altament conservat en els organismes multicel·lulars. Aquestes estratègies es basen en alterar l'equilibri entre proteïnes anti- i proapoptòtiques, tant expressant homòlegs virals de *bcl-2* per mantenir la supervivència cel·lular com produint inhibidors de factors de supervivència per induir la mort cel·lular [135].

Els virus de diferents famílies inhibeixen també la ruta extrínseca a diferents nivells, ja sigui mimetitzant els receptors TNF i actuant com a reclam (com CrmB del virus de la verola) o inhibint l'activitat proteolítica de la caspasa-8 (com CrmA del virus de la verola).



En el cas de la ruta intrínseca, els virus han mimetitzat elements d'aquesta ruta ja sigui per mantenir la integritat del mitocondri com per a generar la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (figura 27). Aquest últim cas és el que predomina en els virus RNA, on produeixen proteïnes que interfereixen amb membres antiapoptòtics, com la proteïna Vpr del HIV-1, que indueix la permeabilització del mitocondri, o en el cas de la proteïna 7a del coronavirus causant del SARS, en que s'inhibeix l'activitat antiapoptòtica de Bcl-X<sub>L</sub>. La proteïna Tat del HIV-1 és capaç d'induir l'apoptosi alliberant la proteïna proapoptòtica Bim del citoesquelet on es troba retinguda.



**Fig. 27.- Diances de les proteïnes virals en la ruta mitocondrial de l'apoptosi.** Al generar-se l'estímul apoptòtic i el donar-se el segrest de les proteïnes antiapoptòtiques per part de les proteïnes BH, els membres proapoptòtics Bax i Bak pateixen canvis al seu extrem N-terminal, oligomeritzant. Els activadors virals (rosa) i els inhibidors (porpra) de l'apoptosi, segresten molècules de la família de Bcl-2 específiques en aquesta ruta. Les línies negres indiquen la ruta cel·lular d'apoptosi, les línies vermelles indiquen inhibició viral i les fletxes vermelles indiquen activació [135].

Les estratègies per mantenir la integritat mitocondrial es troben predominantment en virus DNA, ja que contenen homòlegs Bcl-2, anomenats genèricament vBcl-2 (taula 3). Alguns vBcl-2 tenen una seqüència homòloga a proteïnes cel·lulars similars a Bcl-2, altres tenen molt poca homologia en la seva estructura primària, però sí que mantenen una

estructura terciària conservada amb els homòlegs cel·lulars. Els mecanismes pels quals aquestes proteïnes actuen com a factors de supervivència varien segons l'etapa de la ruta d'apoptosi on desenvolupin la seva activitat. vMIA inhibeix exclusivament Bax al mitocondri per interaccions electrostàtiques, altres membres de vBcl-2 segresten proteïnes amb domini BH3, com la proteïna A179L, que uneix tant Bim com Noxa, o Orf-125 que s'uneix totes les proteïnes amb domini únic BH3. Altres proteïnes virals homòlogues a Bcl-2 eviten l'apoptosi al unir-se a Bak i Bax, ja sigui pel seu domini BH3 o bé per la regió N-terminal, impeding la seva oligomerització.

**Taula 3.-** Alguns exemples de proteïnes víriques homòlogues de Bcl-2 que mantenen la integritat de la membrana mitocondrial externa i la família a la qual pertanyen.

Virus	Proteïnes víriques antiapoptòtiques que mantenen la integritat mitocondrial
<i>Poxviridae</i>	F1, N1, M11L, A179L, ORFV125
<i>Herpesviridae</i>	BHRF1, BALF1, vMIA, LMP1
<i>Adenoviridae</i>	E1B19K
<i>Birnaviridae</i>	VP5

En aquest treball s'ha utilitzat la proteïna BHRF1 (*Bam*HI *Rightward Reading Frame 1*), provinent del virus Epstein-Barr que infecta cèl·lules com els limfòcits B (provocant infeccions com la mononucleosis) i del teixit epitelial. És un virus amb potencial oncogènic i, de fet, ha estat identificat com a causant d'alguns tumors malignes de teixit epitelial i limfoide, com és el cas del carcinoma nasofaringi, el limfoma de Burkitt o el limfoma de Hodgkin [136-138].

L'estratègia del virus d'Epstein-Barr per evitar que la cèl·lula infectada activi els programes de suïcidi, és expressar dues proteïnes homòlogues al Bcl-2 cel·lular, BHRF1 i BALF1. El motiu pel qual EBV necessita dos homòlegs virals al Bcl-2 es desconeix, pot ser que actuïn en estadis diferents del cicle del virus o tinguin rols complementaris [139].

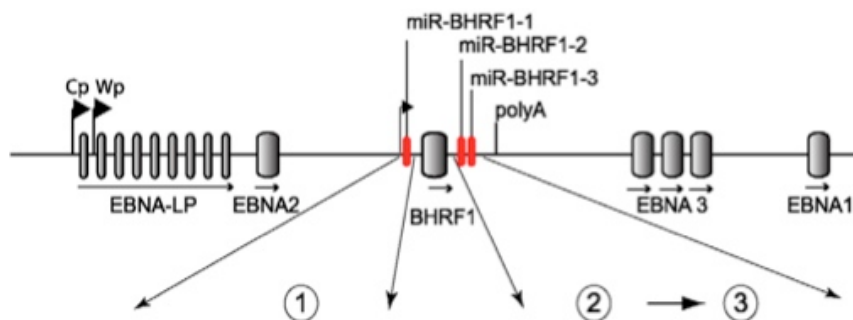


Fig. 28.- Localització del *cluster* dels miRNAs de BHRF1 en el genoma de EBV [145].

L'homòleg víric de Bcl-2, BHRF1, s'expressa de forma primerenca durant el cicle lític del virus. El gen *bhrf1* es troba altament conservat en els virus aïllats i s'ha vist que suprimeix l'apoptosi [140, 141]. El genoma del virus EBV porta adjacent al gen *bhrf1* tres microRNAs (miRNAs) agrupats en dos *clusters*, un immediatament a 5' de *bhrf1* i l'altre a 3' [142], com es pot veure a la figura 28. L'expressió d'aquests BHRF1 miRNA no es coexpressa amb el gen *bhrf1*, ja que aquests tenen un paper important durant el cicle latent del virus i *bhrf1* és expressat durant el cicle lític. A més, el precursor per miR-BHRF1 sembla estar localitzat 5' del promotor que condueix a l'expressió del mRNA de *bhrf1* [143]. Els miR-BHRF1-1-2 i -3 formen un RNA estable que difereix respecte el mRNA de *bhrf1* [144].

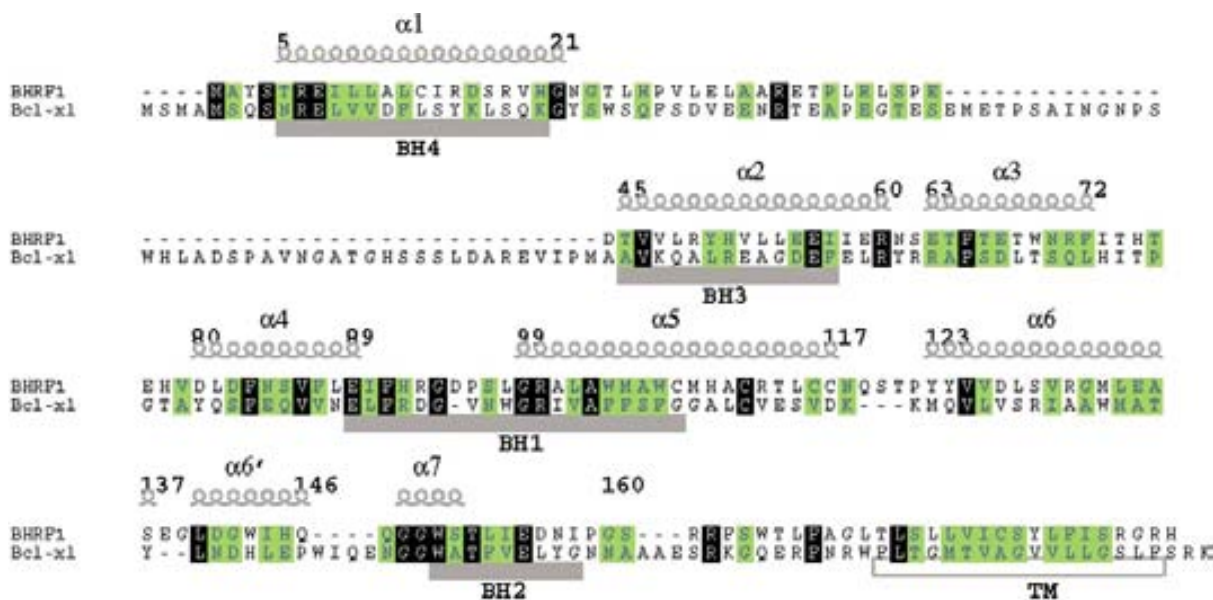
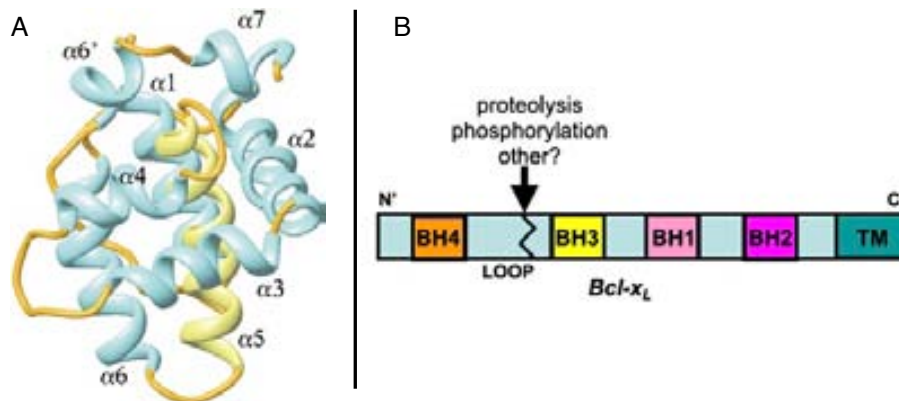


Fig. 29.- Alineament de la seqüència aminoacídica de BHRF1 i de Bcl-XL. Les regions BH1-4 de Bcl-XL es troben indicades, així com l'estructura secundària de BHRF1. Es pot comprovar com l'homòleg víric presenta una alta homologia estructural al mantenir les quatre regions BH [139].

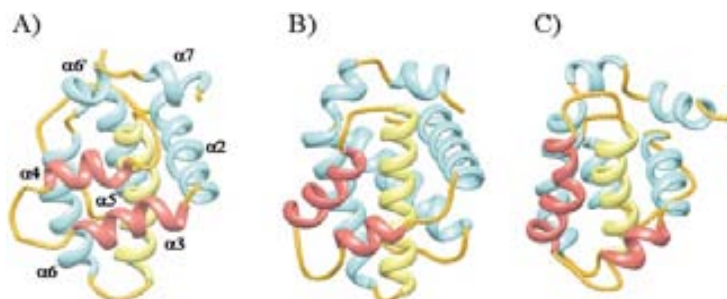
La proteïna BHRF1 té una mida de 17 kDa, comparteix el 38% d'homologia en l'estructura primària amb Bcl-2 humà. La seqüència de la proteïna també evidencia la presència de tres dominis d'homologia a Bcl-2 (BH) conservats, BH1-BH3, que són característics de les proteïnes de la família de Bcl-2. De forma similar a Bcl-2, BHRF1 té una regió hidrofòbica a l'extrem C-terminal que el localitza a membranes intracel·lulars en les cèl·lules infectades (figura 29).

L'estructura tridimensional de BHRF1 és similar a altres membres de les proteïnes tipus Bcl-2 (figura 30A i 31). El nucli de la proteïna es troba format per una hèlix- $\alpha$ ,  $\alpha$ 5, hidrofòbica central i una hèlix parcialment enterrada,  $\alpha$ 6. Aquestes dues hèlix- $\alpha$  es troben envoltades per diverses hèlix amfipàtiques. La primera hèlix- $\alpha$  de la proteïna correspon a la regió BH4 de Bcl-X<sub>L</sub>. BHRF1 té una homologia limitada en la seqüència d'aquesta regió respecte Bcl-2. Estructuralment però, aquesta regió cobreix part de la hèlix hidrofòbica central, i per tant té el mateix paper que la mateixa regió BH4 en Bcl-X<sub>L</sub> i els altres membres de la família de Bcl-2. La segona hèlix es troba paral·lela amb la part N-terminal de la hèlix hidrofòbica central,  $\alpha$ 5. La tercera hèlix cobreix part de la regió C-terminal de  $\alpha$ 5. La quarta hèlix es troba anti-paral·lela amb la tercera hèlix. Les hèlix 5 i 6 també es troben anti-paral·leles, seguides de la setena i última hèlix de la proteïna. Aquesta estructura mostra gran similitud amb altres membres de Bcl-2, ja que contenen el mateix nombre d'hèlix- $\alpha$ , però una diferència significant entre les estructures és la posició de les hèlix que formen la butxaca hidrofòbica, que correspondria al lloc d'unió per pèptids de domini BH3 en altres proteïnes Bcl-2. Al Bcl-2, aquest nucli hidrofòbic es troba més exposat i és de major longitud mentre que en BHRF1 les hèlix 4 i 3 estan paral·leles, fet que redueix l'exposició dels residus hidrofòbics de la butxaca. Una altra diferència és que al BHRF1 el llaç que connecta  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 és molt més curt que no en Bcl-2. Aquest llaç, tant en Bcl-2 com en Bcl-X<sub>L</sub>, conté un domini de regulació a caspases que no es troba en BHRF1 [146] (figura 30B).



**Fig. 30.-** A) Estructura tri-dimensional de la proteïna vírica BHRF1, homòloga a Bcl-2. El centre hidrofòbic es distingeix pel color groc. B) Modificacions post-traduccionals que pateixen els membres cel·lulars de la família de Bcl-2 (com a exemple Bcl-X<sub>L</sub>) com proteòlisi i fosforilacions en el *loop* regulatori. Aquests punts de tall no es troben en l'homòleg de Bcl-2 de EBV, BHRF1 [147].

Finalment, la superfície de BHRF1 divergeix de les altres proteïnes de la família Bcl-2 pel fet que molts dels aminoàcids no polars que es troben en alguns membres de Bcl-2 estan substituïts al BHRF1 per aminoàcids polars, fent de la superfície de la proteïna menys hidrofòbica que la dels seus parents. Aquests canvis poden ser rellevants ja que es troben en la zona exposada de la butxaca hidrofòbica que interacciona amb proteïnes de domini BH3 (figura 31).



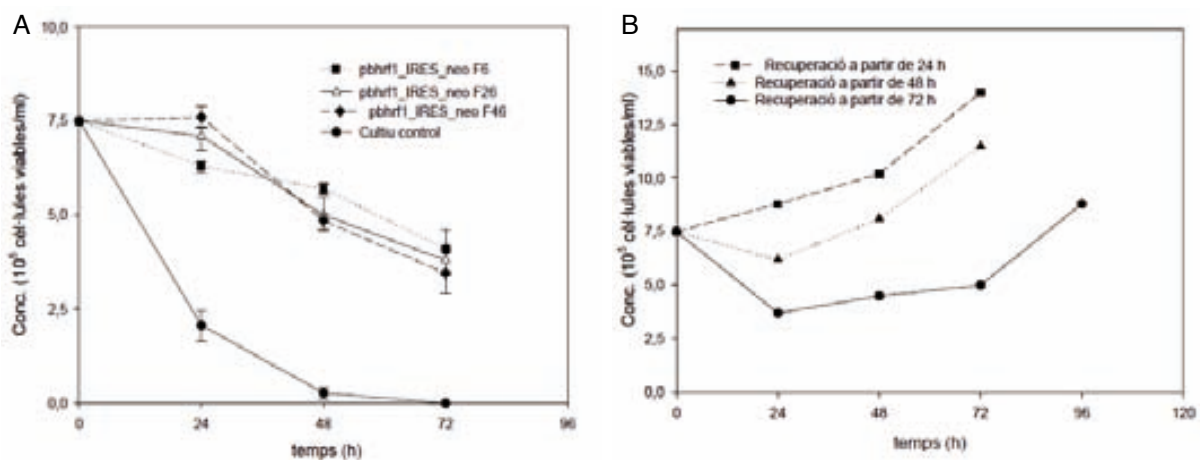
**Fig. 31.-** Comparació de l'estructura tri-dimensional de les a proteïna vírica BHRF1 (A) amb Bcl-X<sub>L</sub> (B) i amb la proteïna homòloga a Bcl-2 al virus del sarcoma de Kaposi (C). Es pot observar com en les dues últimes estructures el centre del canal hidrofòbic (groc) queda més exposat ja que les hèlix 3 i 4 (vermell) que es troben més obertes en aquestes proteïnes que no en el BHRF1 [139].

#### 4.1.1. Efecte de l'expressió de BHRF1 en l'hibridoma KB26.5

La transfecció estable de *bhrf1*, l'homòleg víric de Bcl-2, en les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 emprat com a model cel·lular pel grup de recerca on s'ha realitzat aquesta tesi doctoral, utilitzant plàsmids bicistrònics, ha permès generar una soca robusta capaç de resistir condicions de cultiu adverses, evitant que desemboquin en l'activació de la mort per apoptosi [148]. Aquestes cèl·lules no tant sols presenten una major resistència a la

mort cel·lular, sinó que són capaces de recuperar-se de les condicions externes adverses de forma més ràpida que les cèl·lules d'hibridoma no transfectades amb BHRF1. Això es pot observar en primer lloc a la figura 32A, on es veu que en un cultiu en discontinu les cèl·lules transfectades tenen una viabilitat major, tot i que en el medi de cultiu tingui esgotat el substrat limitant, que com s'ha esmentat en punts anteriors és la glutamina per aquest tipus de cultiu. Cal destacar però, que només és en aquestes condicions adverses del cultiu quan s'observaven diferències entre aquelles cèl·lules que expressen BHRF1 de les que no ho fan.

Quan s'afegeix medi complet a les cèl·lules d'hibridoma que han patit la falta de glutamina durant 24, 48 i 72 hores, s'observa com aquelles que es troben transfectades per BHRF1 recuperen la viabilitat fins a valors pròxims al 100% en un temps molt curt, fins i tot en les cèl·lules que es mantenen fins a 72 hores sense glutamina presenten una capacitat de recuperació en la seva viabilitat, encara que de forma més lenta, respecte aquelles que es mantenen 24 i 48 hores sense glutamina (figura 32B), mentre que les cèl·lules no transfectades no es recuperen.



**Fig. 32.- Perfil de mort (A) i recuperació cel·lular (B).** En el perfil de mort cel·lular es pot veure com aquelles cèl·lules que han incorporat el gen *bhfr1* resisteixen fins a 72 hores en un cultiu on al medi li manca glutamina com a medi d'inducció a l'apoptosi. A més aquestes cèl·lules transfectades amb *bhfr1* tenen la capacitat de recuperar la seva viabilitat al afegir medi complet, tot hi haver estat en condicions d'inducció de l'apoptosi durant 72 hores. [148]

Aquests dos efectes, de protecció i de recuperació de la viabilitat, queden també molt patents en cultius en continu (figura 33), on es practica una aturada en la bomba d'adició de medi, generant condicions iniciadores de l'apoptosi al cultiu degut a l'esgotament dels nutrients principals. L'aturada de la bomba d'adició es realitza en tres moments diferents (c, d i e a la figura 33), amb una duració respectiva de 24, 48 i 72 hores. Aquelles cèl·lules d'hibridoma que es troben sota els efectes protectors de BHRF1

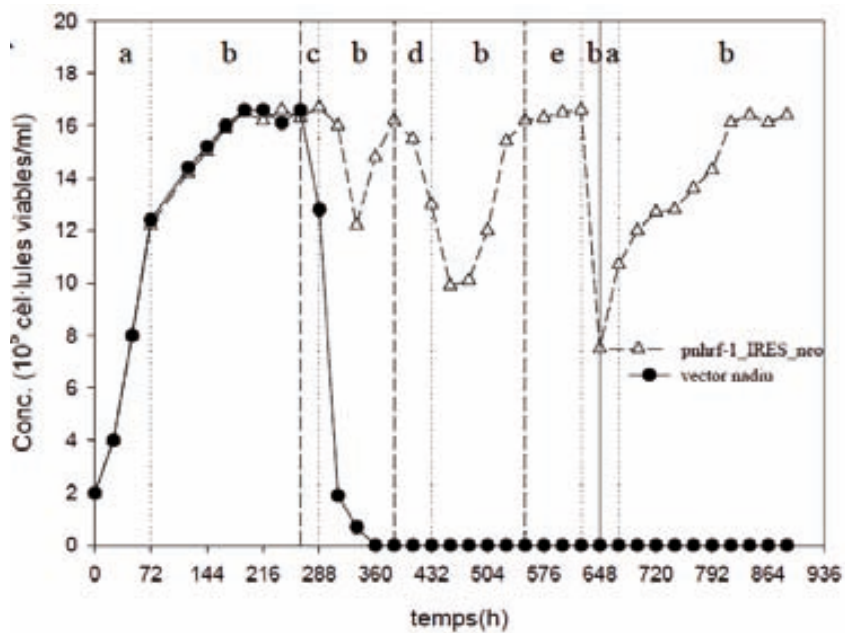
mantenen una alta viabilitat respecte les cèl·lules control, i recuperen la seva viabilitat un cop es restableix l'alimentació, de fet les cèl·lules control ja no es recuperen després de l'aturada en l'alimentació de 24 hores (c). Aquest comportament es veu inclús en parades de més llarga durada, on s'observa que encara que la disminució de la viabilitat és superior, la recuperació és bona.

A la taula 4 es mostren les dades obtingudes en treballs anteriors respecte a la producció d'anticòs monoclonal a diferents temps de cultiu, per part de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 transfectades amb el gen *bhrf1* i les no transfectades. Cal mencionar que, la transfecció amb *bhrf1* de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 no fa variar la producció d'anticòs monoclonal, obtenint concentracions de 24 µg/mL a les 64 hores de cultiu en discontinu, per de les dues línies cel·lulars.

**Taula 4.- Concnetració d'anticòs monoclonal (MAb) obtingut en les cèl·lules KB26.5 no transfectades i les transfectades amb *bhrf1* a les 57 i 95 hores d'un cultiu en discontinu. Es mostra també la concentració cel·lular i la productivitat específica (Pesp.) [148].**

	Temps (h)					
	57 hores			95 hores		
Cultius	Conc. MAb (µg/mL)	Conc. Cel (cel/mL) x10 <sup>5</sup>	Pesp. (µg/cel)	Conc. MAb (µg/mL)	Conc. Cel (cel/mL) x10 <sup>5</sup>	Pesp. (µg/cel)
Cèl·lules no transfectades	13,5	13	1,04	15,6	13	1,7
Cèl·lules transfectades <i>bhrf1</i>	13,1	13	1,06	13,6	8	1,2

Per tant, de tots els resultats de treballs anteriors que s'acaben de recollir, es pot concloure que els efectes que exerceix BHRF1 a les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 són evidents i converteixen aquest tipus d'estratègia en una alternativa per disminuir els efectes de l'apoptosi en sistemes de cultiu d'alta densitat. Però a més fa d'aquestes cèl·lules no només una soca robusta per la producció d'anticòs monoclonals, sinó un sistema model per tal de conèixer quins mecanismes utilitza BHRF1 per aturar el procés apoptòtic.



**Fig. 33.- Cultiu en continu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 transfectades amb pIRES:*bhrf1* (Δ) i sense transfectar (●).** Es poden apreciar les diferents fases del cultiu, (a) cultiu en fase de creixement en discontinu i en continu (b) on no es veuen les diferències entre les cèl·lules control i les transfectades. (c) primera aturada de l'alimentació del cultiu de 24 hores, on es veu que les cèl·lules control no recuperen la seva viabilitat al restablir-se el subministrament d'aliment. (d) segona aturada de 48 hores de durada, les cèl·lules transfectades suporten aquesta aturada i la tercera (e) de 72 hores recuperant la seva viabilitat en tots tres casos [148].

A partir d'aquests antecedents i del comportament tant marcadament diferenciat en el cultiu de cèl·lules de l'hibridoma KB26.5 que incorporen l'expressió de *bhrf1* (KB26.5-*bhrf1*) respecte a les cèl·lules control (KB26.5-∅), al present treball es va plantejar estudiar amb més detall quins són els mecanismes intracel·lulars associats a l'expressió de *bhrf1*. Cal tenir en compte des del principi l'elevada complexitat del procés d'apoptosi, com s'ha recollit en aquesta introducció, i que des de l'expressió del gen introduït a les cèl·lules fins als efectes a nivell fisiològic de la cèl·lula hi ha múltiples etapes. En tot cas, l'interès dels resultats obtinguts prèviament han motivat aquest treball, que busca conèixer més a fons els mecanismes involucrats en aquest efecte protector tant remarcable.



## OBJECTIUS

---



L'activació de l'apoptosi en els cultius *in vitro* d'hibridomes representa un greu inconvenient ja que disminueix dràsticament la viabilitat del cultiu i en conseqüència, la productivitat del bioreactor, conduint, en el cas dels processos continus, a la possible pèrdua de tot el cultiu. El nostre grup va determinar que, aquest tipus de mort en l'hibridoma KB26.5 es desenvolupa per una sèrie de vies bioquímiques que desencadenen la sortida del citocrom *c* de l'espai intermembrana mitocondrial al citoplasma, provocant l'activació de la cascada proteolítica de les caspases. Treballs previs realitzats al nostre laboratori en l'hibridoma KB26.5 amb inhibidors peptídics específics de caspases van mostrar que, era possible retardar l'apoptosi i revertir el procés de mort un cop aquest havia estat activat. No obstant, l'ús d'aquests inhibidors químics a nivell de bioreactor no és factible com a conseqüència del seu elevat cost. Per aquest motiu, el nostre grup optà per utilitzar estratègies d'inhibició genètica sobre els membres iniciadors de la ruta de les caspases, per retardar l'aparició de l'apoptosi. Concretament, es va sobreexpressar el gen víric *bhrf1*, homòleg de *bcl2*, obtenint d'aquesta manera una línia cel·lular que presentava una major resistència a l'apoptosi. Així doncs, partint de les dades existents, el projecte inicial d'aquesta tesi era el de conèixer els canvis fenotípics que *bhrf1* conferia a les cèl·lules KB26.5 i el d'iniciar l'estudi funcional i estructural de la proteïna BHRF1, per conèixer millor el seu paper a nivell cel·lular.

En una primera fase d'aquest treball, es va avaluar l'efecte del gen *bhrf1* sobre l'apoptosi i el cicle cel·lular. En una segona fase del treball es va determinar el mecanisme d'acció de *bhrf1*.

A tal efecte es proposa realitzar el següent pla de treball:

- Utilitzar cultius de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 transfectades amb el gen *bhrf1* (KB26.5-*bhrf1*) i sense transfectar (KB26.5- $\emptyset$ ), en discontinu i en perfusió, per tal d'analitzar el nivell de mort per apoptosi i el cicle cel·lular.
- Estudi dels canvis d'expressió gènica en cèl·lules d'hibridoma KB26.5, mitjançant *microarrays* i PCR en temps real.
- Anàlisi dels canvis d'expressió proteica deguts a l'efecte de BHRF1.
- Determinació de la localització cel·lular de BHRF1 en les cèl·lules d'hibridoma KB26.5.

---

*Objectius i pla de treball*

---

- Estudi de possibles interaccions de la proteïna BHRF1 amb altres proteïnes del seu entorn.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

---



# 1. EXPRESSIÓ DE BHRF1, APOPTOSI I CICLE CEL·LULAR EN CULTIUS D'HIBRIDOMA

A la introducció d'aquesta memòria, s'han detallat els principals factors inductors de la mort per apoptosi dels hibridomes cultivats en bioreactors. Així, s'ha vist que l'exhauriment dels nutrients essencials al medi provoca la interrupció de les principals vies metabòliques de la cèl·lula, ja que tant la glucosa com la glutamina són fonamentals per al correcte desenvolupament dels processos catabòlics i anabòlics cel·lulars. S'ha esmentat també que concentracions massa baixes d'oxigen dissolt al medi provoquen una forta inducció a l'apoptosi, per tant, molt probablement, la interrupció de les vies de síntesi energètica cel·lulars és una altra causa principal d'activació de la mort cel·lular programada, tot i que l'aturada en la formació de nucleòtids, proteïnes i altres biomolècules pot actuar de manera conjunta. Un segon aspecte que està intrínsecament relacionat amb l'apoptosi és el cicle cel·lular. Molts factors de creixement promouen l'avenç del cicle cel·lular induint la transició de la fase G<sub>1</sub> cap a la fase S [149].

Idealment, un bioprocés es podria optimitzar si es pogués, en primer lloc, obtenir una quantitat important de cèl·lules i, a continuació, es pogués aturar el cicle cel·lular, mantenint la viabilitat cel·lular, evitant doncs l'apoptosi, i per tal de poder concentrar tota l'activitat cel·lular en la producció de la proteïna d'interès [150].

Per tal d'avaluar els efectes del gen *bhrf1* sobre la viabilitat i el procés de mort cel·lular, es va plantejar un experiment de cultiu cel·lular en discontinu utilitzant cèl·lules d'hibridoma KB26.5 transfectades amb el plasmidi pIRES:*bhrf1*, KB26.5-*bhrf1*, comparant-les amb les cèl·lules transfectades amb un vector pcDNA3 buit, KB26.5-∅, utilitzades com a cultiu control. Aquesta anàlisi es va efectuar tant per a un cultiu en discontinu convencional, com per un en el que s'indueix l'apoptosi mitjançant l'absència de glutamina al medi de cultiu.

Es va observar com el cultiu en discontinu en el cas de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* presentava una acumulació molt menor de cèl·lules mortes comparada amb les cèl·lules KB26.5-∅, on es produïa un augment de les cèl·lules mortes, així com el nombre de cèl·lules totals (figura 34A i B). En el cas de les cèl·lules KB26.5 transfectades amb *bhrf1* (figura 34B), el perfil de creixement mostrava com el nombre de cèl·lules viables i el

nombre de cèl·lules totals era molt similar, indicant una clara reducció de la generació de cèl·lules mortes, mantenint la viabilitat cel·lular entorn al 90% durant tot el cultiu. Les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  presentaven un augment molt important de les cèl·lules mortes a partir de les 72 hores, que passaven de  $5 \cdot 10^5$  cel/mL a  $1,7 \cdot 10^6$  cel/mL en 24 hores, fent caure la viabilitat fins al 73%, que s'havia mantingut al voltant del 95% fins aquest moment. Aquest increment de la mortalitat condiona el nombre màxim de cèl·lules viables que pot aconseguir el cultiu, ja que no va superar les  $1,7 \cdot 10^6$  cèl·lules viables/mL, tot i que en el recompte de cèl·lules totals es varen obtenir valors de  $4,4 \cdot 10^6$  cel/mL. El cultiu de cèl·lules KB26.5-*bhrf1* va arribar a  $3,1 \cdot 10^6$  cèl·lules viables/mL, valors superior als del cultiu KB26.5- $\emptyset$ , degut a la gran quantitat de cèl·lules mortes en el cultiu no transfectat. Fins a les 96 hores de cultiu, els dos tipus cel·lulars varen créixer seguint la mateixa tendència. En ambdós casos a partir de les 120 hores de cultiu es va observar una davallada del recompte cel·lular que es pot explicar perquè la mort que es dona en aquest cultiu és per apoptosi i això causa una destrucció de la cèl·lula.

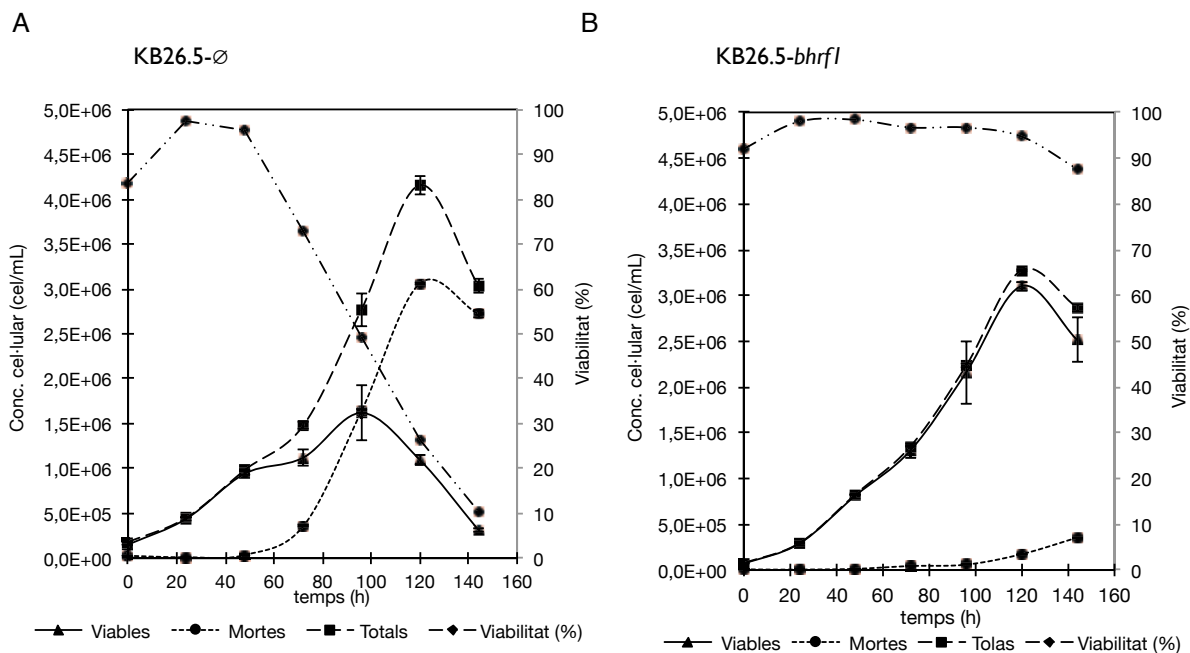
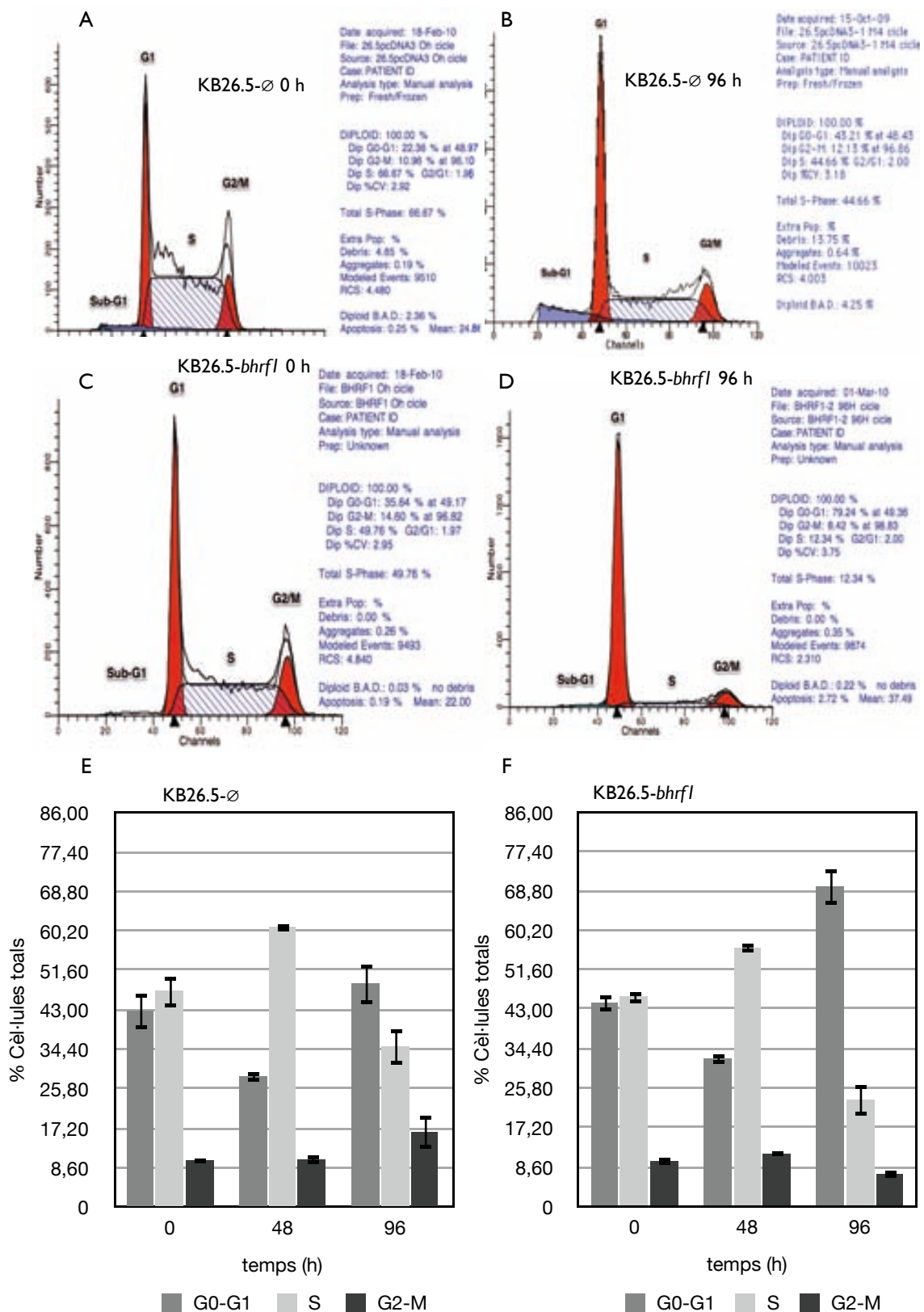


Fig. 34.- Creixement cel·lular en un cultiu en discontinu de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 sense transfectar (KB26.5- $\emptyset$ ) (A) i transfectades amb el gen viric *bhrf1* (KB26.5-*bhrf1*) (B). (n=3)

Per tal d'observar si aquestes diferències en el perfil de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* es traduïen en un canvi en el patró del cicle cel·lular, es va determinar l'estadi cel·lular a diferents temps de cultiu mitjançant citometria de flux a partir de quantificar el DNA. A la figura 35 es presenta el perfil de cicle cel·lular que es va obtenir pel cultiu en discontinu de





**Fig. 35.- Anàlisi del cicle cel·lular mitjançant FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*), en un cultiu en discontinu de les cèl·lules KB26.5 sobreexpressant BHRF1 respecte les control no transfectades. Exemple del perfil de cicle cel·lular on es pot observar les cèl·lules control a l'inici del cultiu en discontinu (A) i a les 96 hores (B), així com en les mateixes condicions de la línia KB26.5-*bhrf1* (C i D). Es poden observar els pics corresponents a la fase G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M i de l'etapa S, així com la fragmentació del DNA en el pic sub G<sub>1</sub>. El perfil global de la distribució del cicle expressat en tant per cent es mostra al diagrama per les cèl·lules control (E) i transfectades (F) amb una n=3.**

les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i KB26.5-*bhrf1*. Es va determinar un augment de la proporció de cèl·lules en la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ , passant del 28,6% a les 48 hores de cultiu al 48,7% de les 96 hores. Aquest canvi en la proporció de cèl·lules en la fase G<sub>1</sub> es va fer més evident en el cas de les cèl·lules transfectades, ja que augmentava fins a un 69,7% a les 96 hores. També es va poder apreciar una reducció de la fase S a mesura que avançava el cultiu en els dos tipus cel·lulars. A partir d'aquests resultats de distribució del cicle cel·lular es pot conèixer la relació entre la fase de síntesi (S) i la fase G<sub>1</sub>, índex que permet determinar si hi ha una aturada en el cicle cel·lular. El grau d'aturada en G<sub>1</sub> es representa a la figura 36A, on es pot observar com a mesura que el cultiu avançava, la relació G<sub>1</sub>/S en el cas de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* augmentava notablement, passant d'una relació de 0,6 fins a 3 al cap de 24 hores. En les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ , l'increment de la relació G<sub>1</sub>/S és més discret, passant de 0,5 a 1,4, que, tot i ser un valor superior a 1, és un 46% inferior al valor que varen presentar les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*. Aquest fet permet dir que la incorporació de BHRF1 fa que les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* alenteixin el seu cicle en 2,1 vegades.

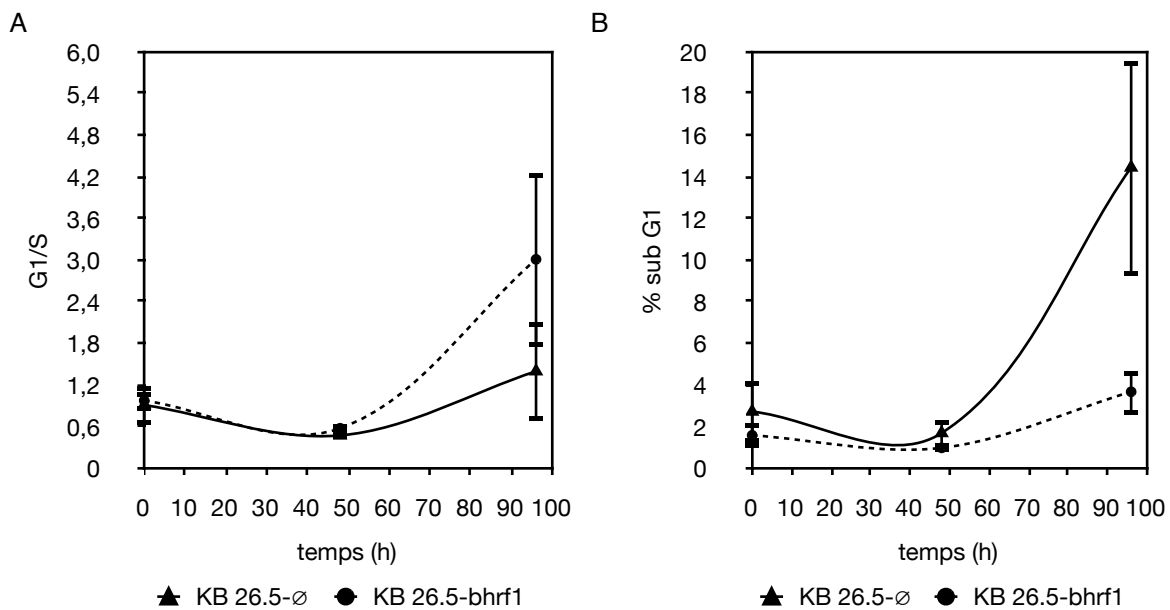
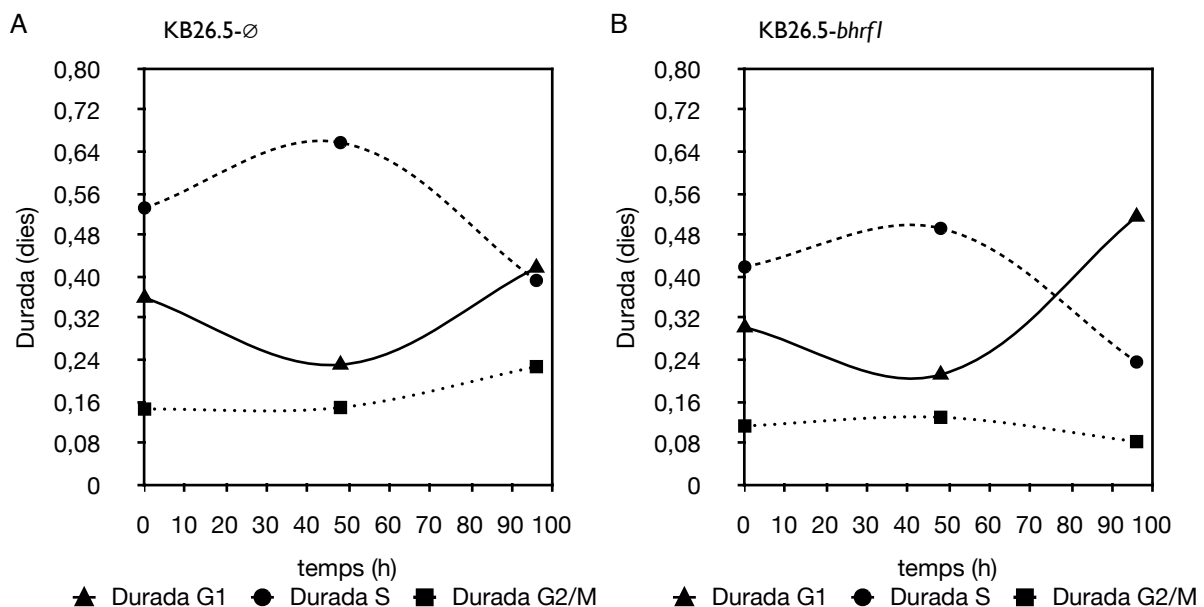


Fig. 36.- Relació entre les fases G<sub>1</sub>/S (A) i de la proporció de cèl·lules amb fragmentació del DNA (B) per les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i les KB25.5-*bhrf1* en un cultiu en discontinuu.

Els resultats que es varen obtenir per citometria de flux de l'estudi del cicle cel·lular van permetre observar també que hi havia DNA amb una intensitat menor a la intensitat que mostraven les cèl·lules a l'estadi G<sub>1</sub>. Tota aquella senyal amb una intensitat inferior indica que hi ha fragmentació del DNA, fet que ocorre en estadis avançats d'apoptosi

(figura 35 i figura 36B). Quan s'analitzen els resultats per la línia KB26.5- $\emptyset$  i la línia KB26.5-*bhrf1*, es pot observar clarament un alt grau de fragmentació del DNA i, per tant, d'apoptosi en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ , especialment a les 96 hores de cultiu, mentre que en les cèl·lules que expressen BHRF1, la fragmentació del DNA és un 25% inferior.

A partir de la velocitat de creixement de les dues línies cel·lulars i la distribució del cicle cel·lular, es va poder determinar el temps que la cèl·lula destinava a cadascuna de les fases que conformen el cicle cel·lular. Els resultats es presenten a la figura 37A i B, i es pot observar com el temps que les cèl·lules destinen a cada fase del cicle varia al avançar el cultiu, amb una tendència semblant a la distribució del cicle en el cas d'aquelles que incorporen el gen *bhrf1*, ja que va augmentant el temps que es destina a superar la fase G<sub>1</sub>, fet que es correspon amb una major proporció de cèl·lules en aquesta etapa (com es pot observar a la figura 35B). La fase de síntesi és l'etapa més llarga del cicle i la que triga més temps en superar-se en condicions òptimes, però quan el cultiu envellaix, la fase més llarga esdevé la G<sub>1</sub>. Així, s'observa com la durada de la fase S passa de 0,4 dies a les 48 hores de cultiu en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, a 0,2 dies a les 96 hores, mentre que la fase G<sub>1</sub> té un important augment i passa de 0,3 dies a les 48 hores a durar 0,5 dies a les 96 hores. La fase G<sub>2</sub>/M es veu poc alterada al llarg del cultiu en les dues línies cel·lulars, indicant un temps de durada d'aquesta fase força constant.



**Fig. 37.- Durada de les diferents etapes del cicle cel·lular durant el cultiu en discontinu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5- $\emptyset$  (A) i KB26.5-*bhrf1* (B).** Es pot observar com en les cèl·lules control sense transfectar augmenta la durada de la fase G<sub>1</sub>(▲) a les 96 hores de cultiu, així com la disminució de la durada de la fase S (●) i el lleuger guany de la fase G<sub>2</sub>/M (■). L'augment en la durada de l'etapa G<sub>1</sub> del cicle es fa encara més evident en el cas de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*.

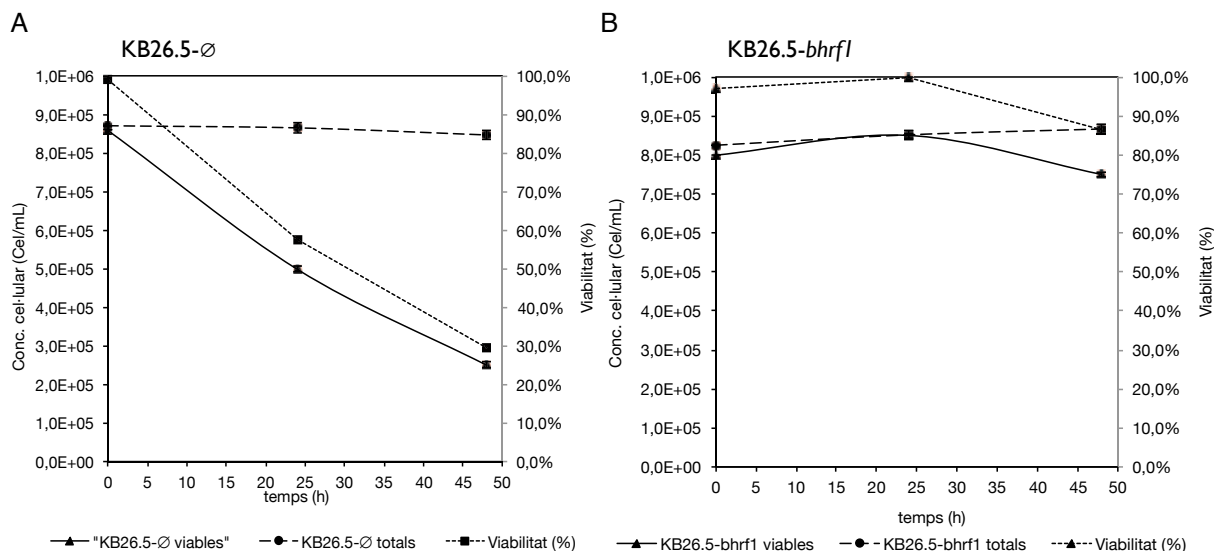
En el cas del cultiu KB26.5- $\emptyset$ , la durada de la fase G<sub>1</sub> passa de 0,36 dies a les 48 hores a augmentar fins a 0,4 dies, i la durada de la fase S és de 0,5 dies a les 48 hores i disminueix fins a 0,4 dies a les 96 hores. Per tant el temps que trigaven les cèl·lules en superar ambdues fases era molt similar, fet que no concorda exactament amb la distribució del cicle, en la qual es veia incrementada la proporció de cèl·lules en fase G<sub>1</sub>. De totes maneres, sí que la relació entre G<sub>1</sub> respecte S (G<sub>1</sub>/S) era marcadament més alta en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* que en les KB26.5- $\emptyset$ , i això sí que és consistent amb que la durada de G<sub>1</sub> en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* es vegi clarament augmentada i que en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  quedi a nivells similars als inicials.

Cal dir que la velocitat de creixement de les dues línies és molt similar, les cèl·lules control presenten una velocitat de creixement màxima de 0,028 h<sup>-1</sup> mentre que les transfectades tenen un creixement de 0,035 h<sup>-1</sup>, al que correspon a un temps de duplicació de 25 hores i 20 hores respectivament.

Per tal de continuar analitzant l'efecte sobre el comportament cel·lular de l'expressió de *bhrf1*, es van plantejar experiments en condicions d'inducció de l'apoptosi, el que es feia mitjançant el cultiu cel·lular en medis amb absència de glutamina. Aquestes són condicions ben conegudes com a inductors de l'apoptosi [126]. Per aquest motiu es varen cultivar tant les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  com les KB26.5-*bhrf1* en medi complet durant 48 hores, en aquest moment es va fer un recanvi de medi, emprant medi sense glutamina. A partir d'aquest moment s'observa que el nombre de cèl·lules viables en el cas de les KB26.5- $\emptyset$  disminueix pronunciadament al llarg del temps, de la mateixa manera ho fa la viabilitat cel·lular, mentre que les que havien incorporat el gen *bhrf1* mantenen la seva viabilitat durant 48 hores (figura 38A i B).

Quan es va analitzar el cicle cel·lular en aquestes condicions, es va observar com tant la línia KB26.5- $\emptyset$  com la KB26.5-*bhrf1* augmentaven la proporció de cèl·lules en G<sub>1</sub> respecte les que es troben en fase de síntesi (S) al llarg del cultiu, però en aquest cas no es varen apreciar diferències importants entre les dues línies (figura 39 i 40A). Els perfils de distribució de cicle en els dos casos mostraven com s'incrementava de forma important la fase G<sub>1</sub> fins a un 63% en les dues línies al cap de 48 hores de cultiu en condicions de manca de glutamina. Aquest augment en la fase G<sub>1</sub> s'iniciava ja a les 24 hores de cultiu i era lleugerament superior en les cèl·lules transfectades (55%) que en les control (51%).

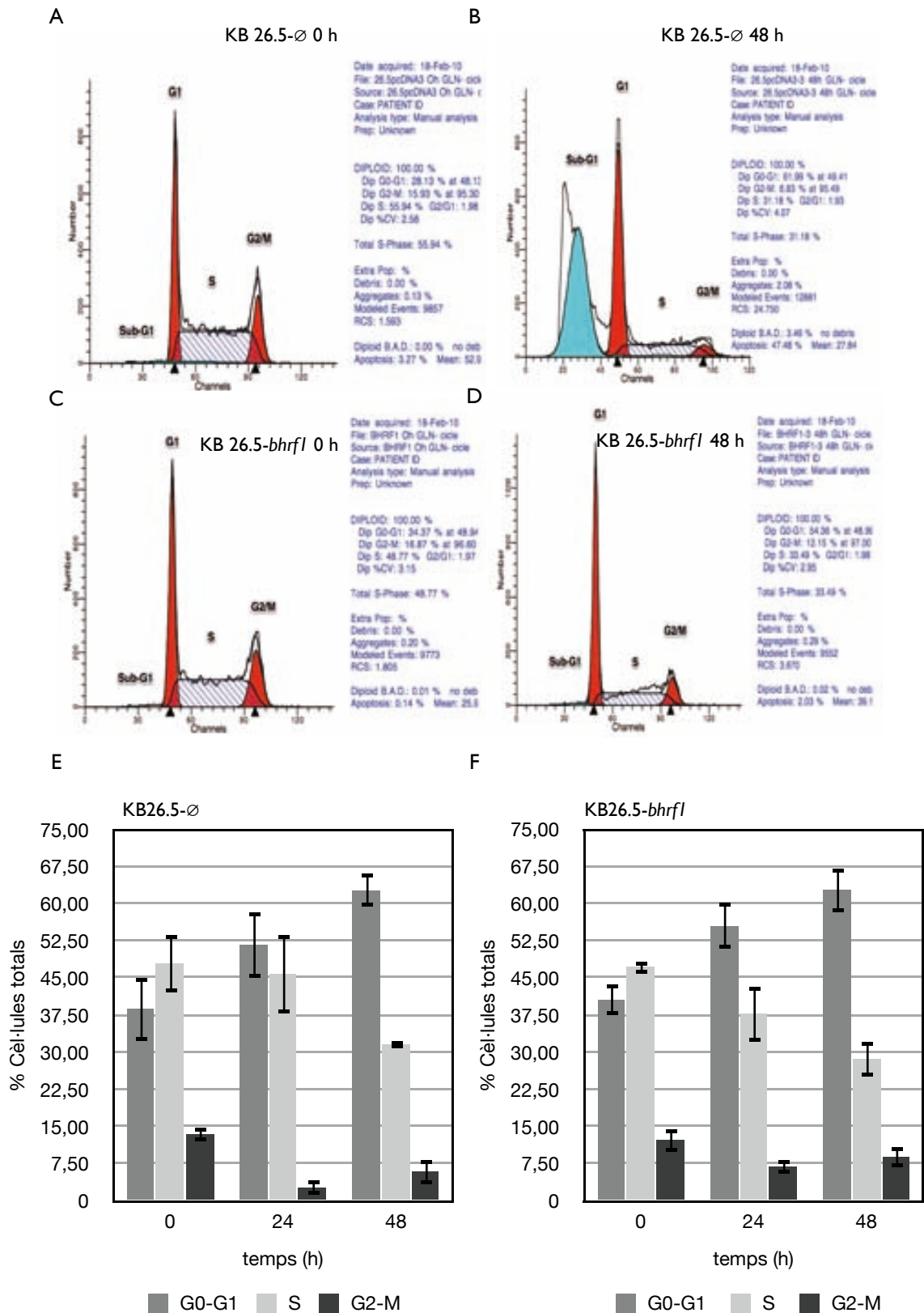
En les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  la fase S disminuïa menys pronunciadament en les primeres 24 hores, passant del 48% inicial al 46%, però arribant al 31% a les 48 hores. En les cèl·lules transfectades, la fase de síntesi (S) passava del 47% al 38% en les primeres 24 hores i es quedava al 28%.



**Fig. 38.- Perfil de concentració cel·lular viables de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i de les KB26.5-*bhrf1* en un cultiu amb medi sense glutamina.** El nombre de cèl·lules viables en la població KB26.5- $\emptyset$  disminueix al llarg del temps ja que el medi sense glutamina induïx la mort cel·lular programada en les cèl·lules d'hibridoma KB26.5. En el cas de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* el nombre de cèl·lules viables es manté constant al llarg del cultiu amb una petita davallada a les 48 hores. El nombre de cèl·lules totals es manté estable per les KB26.5- $\emptyset$  i per les KB26.5-*bhrf1*. (n=3)

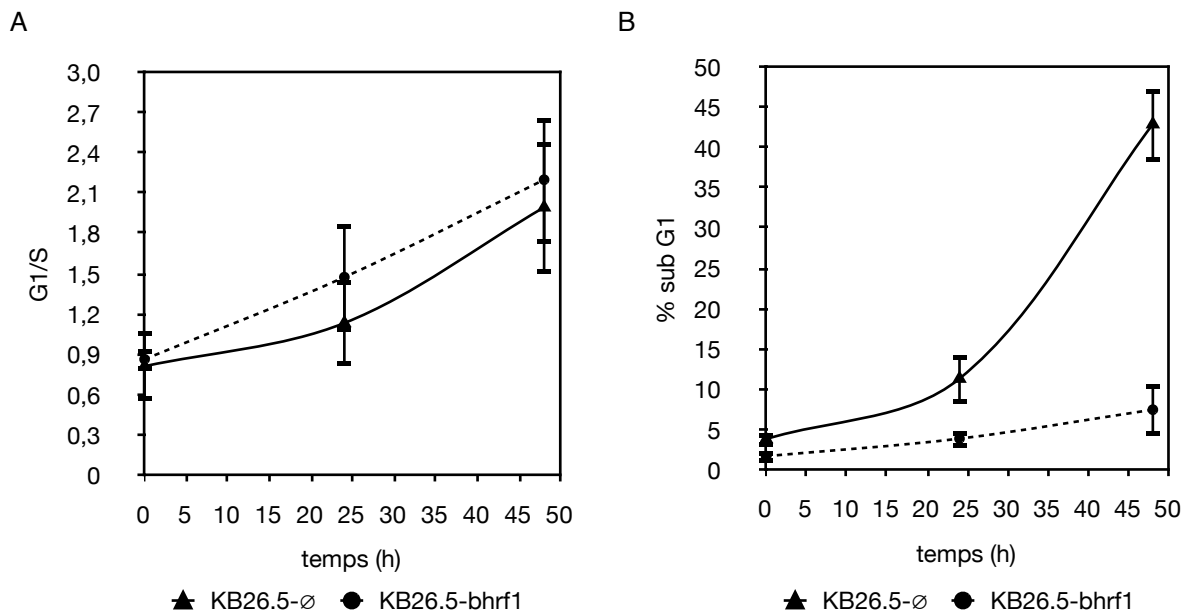
En aquest cas, la fase G<sub>2</sub>/M en la línia KB26.5- $\emptyset$  i la línia KB26.5-*bhrf1* es veu disminuïda per l'increment en la fase G<sub>1</sub>, passant d'un valor inicial del 13% i 12% respectivament fins a un valor final de 6% i 9%.

La similitud en el perfil de distribució del cicle queda reforçat al observar la relació entre la fase G<sub>1</sub> i S (figura 40A), ja que es pot veure com tant les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  com les KB26.5-*bhrf1* presentaven un augment en la relació entre les dues etapes (G<sub>1</sub>/S), indicant un increment en el percentatge de cèl·lules en G<sub>1</sub>. Els valors inicials d'aquest índex es trobaven per sota de 1 (0,81 per les KB26.5- $\emptyset$  i 0,86 per les KB26.5-*bhrf1*) fet que indica una major proporció de la fase S en el moment d'introduir el medi sense glutamina. Aquesta tendència es va veure invertida a mesura que el cultiu avançava en les condicions de manca de glutamina, fins a arribar a una proporció de 2 en les KB26.5- $\emptyset$  i de 2,2 en les KB26.5-*bhrf1*.



**Fig. 39.- Anàlisi del cicle cel·lular mitjançant FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*), en un cultiu en discontinu de les cèl·lules KB26.5 sobreexpressant BHRF1 respecte les control no transfectades en medi inductor de l'apoptosi.** Exemple del perfil de cicle cel·lular on es pot observar les cèl·lules control a l'inici del cultiu en discontinu (A) i a les 96 hores (B), així com en les mateixes condicions de la línia KB26.5-*bhrf1* (C i D). Es poden veure els pics corresponents a la fase G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M i l'etapa S, així com el pic sub G<sub>1</sub>. El perfil global de la distribució del cicle expressat en tant per cent es mostra en el diagrama per les cèl·lules control (E) i transfectades (F) amb una n=3.

Pel que fa al contingut de subG<sub>1</sub> (figura 40B) en aquest tipus de cultiu, es va observar clarament com les cèl·lules transfectades amb *bhrf1* reduïen la fragmentació del DNA respecte a les control, ja a les 24 hores de cultiu es varen apreciar uns valors del 11% que augmentaven fins al 45% a les 48 hores de cultiu. Mentre que en el cas de les cèl·lules transfectades la fragmentació del DNA no va anar més enllà del 7% a les 48 hores de cultiu sense glutamina.



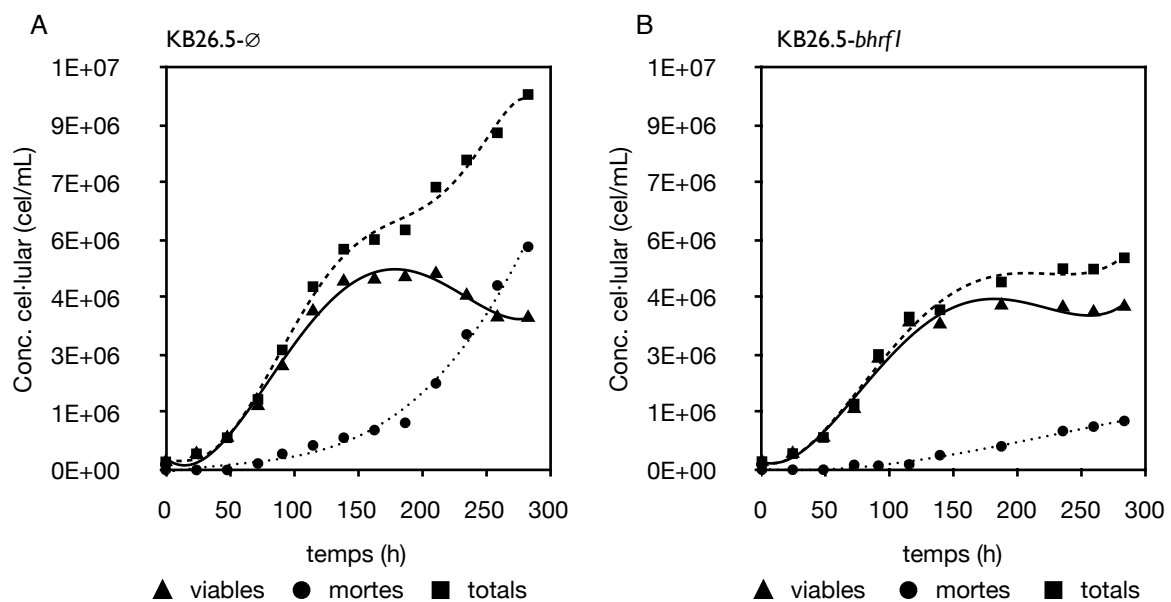
**Fig. 40.-** Relació entre les fases G<sub>1</sub>/S (A) i de la proporció de cèl·lules amb fragmentació del DNA (B) per les cèl·lules KB26.5-∅ i KB26.5-*bhrf1* en condicions d'inducció a l'apoptosi.

Segons mostra el percentatge de distribució del cicle cel·lular, així com la relació entre les fases G<sub>1</sub> i S, les dues línies aturen el seu cicle en fase G<sub>1</sub> durant les 24 hores posteriors a la substitució del medi complet pel medi sense glutamina.

Finalment, es planteja estudiar l'efecte de l'expressió de *bhrf1* en el cas d'un cultiu en perfusió. L'estratègia de cultiu en perfusió intenta garantir de forma continuada concentracions adequades de tots els nutrients essencials per a la cèl·lula, i al mateix temps evitar l'acumulació de cèl·lules mortes en els bioreactors. Aquesta estratègia de cultiu és la més adient en aquest sentit, ja que reproduïx més fidelment les condicions en què es troben les cèl·lules en els organismes pluricel·lulars, és a dir, asseguren el manteniment de concentracions de precursors i el subministrament constant de nutrients i l'eliminació de subproductes. De totes maneres, fins i tot en cultius en perfusió, es sol arribar a situacions de limitació d'algun dels nutrients essencials per a la cèl·lula, degut a que s'assoleixen densitats molt elevades, i això provoca l'inici del procés de mort cel·lular.

En cultius en perfusió de cèl·lules d'hibridoma s'ha observat que el paràmetre que limita la prolongació del procés és l'increment de la concentració de cèl·lules no viables dins els bioreactors [151]. És a dir, tot i que es manté una determinada concentració cel·lular, al no disposar de tots els recursos necessaris per a la correcta proliferació, augmenta el nombre de cèl·lules mortes i s'arriba a un punt a partir del qual no és possible operar durant més temps.

Tenint en compte aquestes condicions, es va plantejar la realització d'un experiment de cultiu en perfusió, per estudiar quin és l'efecte protector de l'apoptosi per part de BHRF1, i analitzar també quina és l'evolució del cicle cel·lular.

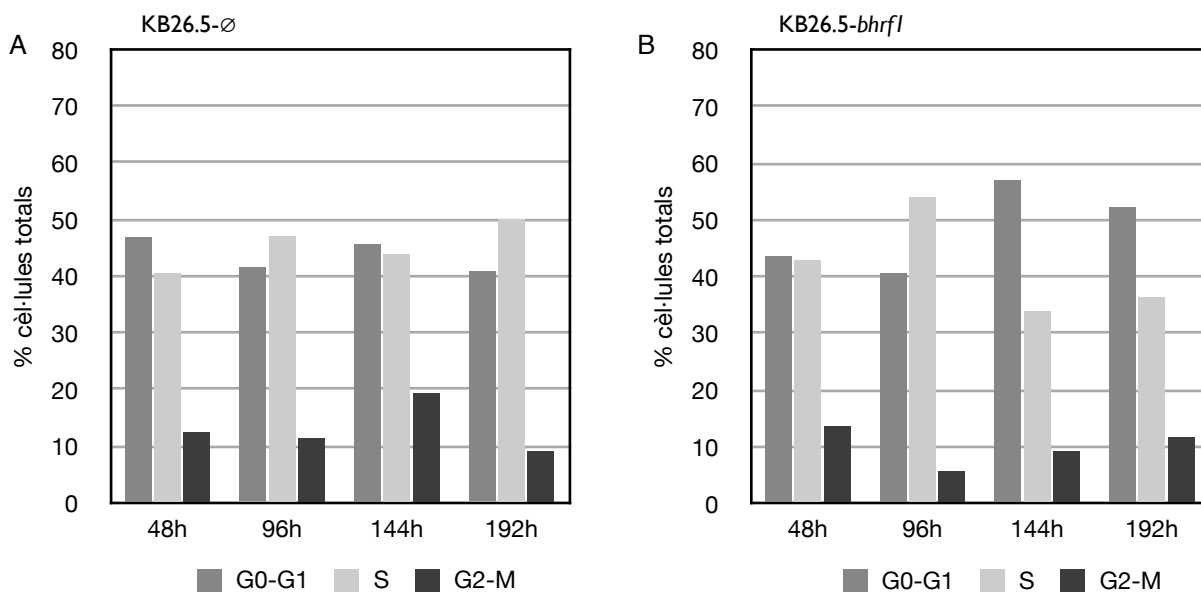


**Fig. 41.- Cultiu en perfusió de cèl·lules d'hibridoma KB26.5-∅ (A) i KB26.5-bhrf1 (B).** Es pot observar com en el cas de les cèl·lules control no transfectades augmenta el nombre de cèl·lules totals (■) degut a l'augment de cèl·lules mortes (●), i en canvi disminueix el nombre de cèl·lules viables (▲). Per contra, en el cas de les cèl·lules KB26.5-bhrf1 es manté estable el nombre de cèl·lules viables i augmenta molt lleugerament el nombre de cèl·lules mortes i per tant el nombre de cèl·lules totals.

A la figura 41, es mostra l'evolució del nombre de cèl·lules viables, mortes i totals del cultiu KB26.5-∅ i del cultiu que expressa el gen *bhrf1* respectivament en perfusió. Es pot observar que, tot i que en ambdós cultius es manté una concentració de cèl·lules viables constant, al voltant de  $4 \cdot 10^6$  cel·lules/mL, al cultiu KB26.5-∅, a diferència del que succeïx al cultiu KB26.5-bhrf1, a partir de les 72 hores comença a augmentar dràsticament el nombre de cèl·lules mortes, assolint  $5,8 \cdot 10^6$  cel·lules/mL a les 283 hores. Per contra, el cultiu que du el gen *bhrf1* acumulen al final del cultiu només  $12,1 \cdot 10^5$  cèl·lules mortes per mL. Aquest resultat significa que l'expressió del gen *bhrf1* evita l'acumulació de cèl·lules mortes en el bioreactor al operar en perfusió i per tant el fa més robust i eficient.



Igual que en els cassos anteriors, en el cultiu en perfusió també es va efectuar l'anàlisi del cicle cel·lular. A la figura 42, es mostren els resultats obtinguts a les 48, 96, 144 i 192 hores del cultiu en perfusió de cèl·lules d'hibridoma KB26.5- $\emptyset$  i del cultiu KB26.5-*bhrf1*. A les 48 i 96 hores de cultiu, les cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf1* i el cultiu KB26.5- $\emptyset$  es comporten de manera similar i el percentatge de cèl·lules que es troben en les diferents fases del cicle cel·lular és similar en ambdós cultius. En canvi, a partir de les 144 hores, les cèl·lules que expressen el gen *bhrf1* presenten un percentatge de cèl·lules en estat G<sub>1</sub> més elevat que el cultiu KB26.5- $\emptyset$ . Concretament, a les 144 i a les 192 hores les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* mostren un 57% i un 52% de cèl·lules en fase G<sub>1</sub> respectivament, a diferència del cultiu KB26.5- $\emptyset$  que mostra un 46% i un 41%. A més, en aquest mateix període de temps el percentatge de cèl·lules que es troben en la fase S, el cultiu KB26.5- $\emptyset$  presenta un 44% i un 50% de cèl·lules que estan duplicant el seu material genètic, en canvi, el cultiu transfectat amb el gen *bhrf1* té un 34% i un 36%.



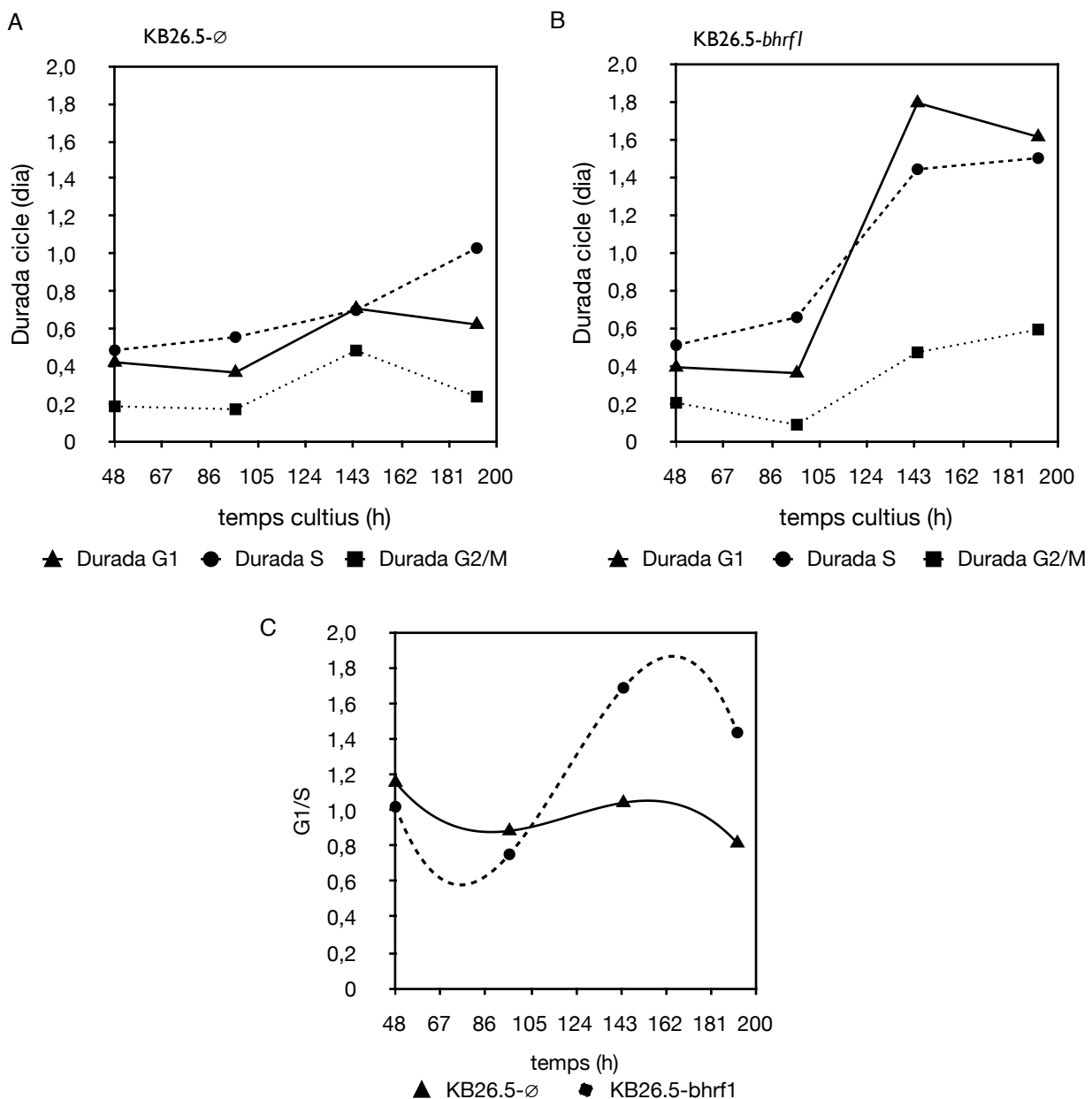
**Fig. 42.- Distribució de les fases del cicle cel·lular en el cultiu en perfusió de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5- $\emptyset$  (A) i KB26.5-*bhrf1* (B).** Es pot observar com en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* augmenta la proporció d'aquestes que es troben en fase G<sub>1</sub> i disminueix la proporció de cèl·lules en fase S.

A partir d'aquests resultats es pot determinar el temps que les cèl·lules trigaven en completar cadascuna de les fases del cicle cel·lular, anàlogament al que s'ha realitzat en el cultiu en discontinu. Tal i com es mostra a la figura 43A les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  mantenen un temps de duplicació d'aproximadament 24 hores mentre el cultiu es trobava en fase de creixement, és a dir, entre les 0 i 115 hores. El mateix passa en les cèl·lules transfectades amb *bhrf1* (figura 43B), ja que el seu temps de duplicació és pràcticament el mateix del de les KB26.5- $\emptyset$ . En el moment en que el cultiu entra en fase estacionària a

partir de les 115 hores, el temps de duplicació augmenta i per tant el temps que la cèl·lula triga en superar cada fase del cicle és més elevat. En el cas de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  aquest temps de duplicació s'incrementa lleument passant a ser de 1,8 dies, la fase G<sub>1</sub> passa de durar 10 hores a pràcticament 17 hores, el mateix succeïx en la fase S del cicle, on en estadis inicials i de creixement del cultiu dura 12 hores, però augmenta fins a pràcticament als 16 hores a les 144 hores de cultiu i fins a una durada de 1 dia passades les 196 hores de cultiu. La fase més curta del cicle, la G<sub>2</sub>/M, passa de durar 4 hores a pràcticament 6 hores variant molt poc la seva durada.

En les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* també s'observa un augment del temps de duplicació superior, de 3 dies. La durada de la fase G<sub>1</sub> passant de 9 hores als 1,8 dies, la fase S passa d'aproximadament 12 hores fins a tenir una durada de 1,5 dia quan les cèl·lules es troben a les 144 hores de cultiu. Finalment la fase G<sub>2</sub>/M passa de durar 5 hores a 11,5 hores. Cal destacar que en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  la fase S passa a ser la fase que presenta una durada superior quan el cultiu es troba limitat, mentre que el cultiu que es realitza amb cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, és la fase G<sub>1</sub> la que té una durada superior a la resta en la fase estacionària, i és 3,7 vegades superior a la durada de la fase G<sub>1</sub> en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ . Aquest augment en la durada de les tres fases del cicle cel·lular està directament relacionat amb la disminució de la velocitat de creixement ( $\mu$ ) en les dues fases del cultiu, en el moment de màxim creixement i en l'etapa estacionària. Això es tradueix en un increment en la relació G<sub>1</sub>/S a mesura que avança el cultiu en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*.

En el cas de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  la velocitat de creixement era de 0,0265 h<sup>-1</sup> en la fase exponencial i passava a ser de 0,0015 h<sup>-1</sup> en la fase estacionària. En el cas de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* la velocitat de creixement era de 0,0262 h<sup>-1</sup> en la fase exponencial, un valor pràcticament idèntic al de les cèl·lules no transfectades, mentre que en la fase estacionària del cultiu es va obtenir un valor de velocitat de creixement de 0,008 h<sup>-1</sup>, el que vol dir que es va produir una reducció de la velocitat de creixement de 1,7 vegades en el cas de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i de 3,5 vegades en el cas de les cèl·lules transfectades.

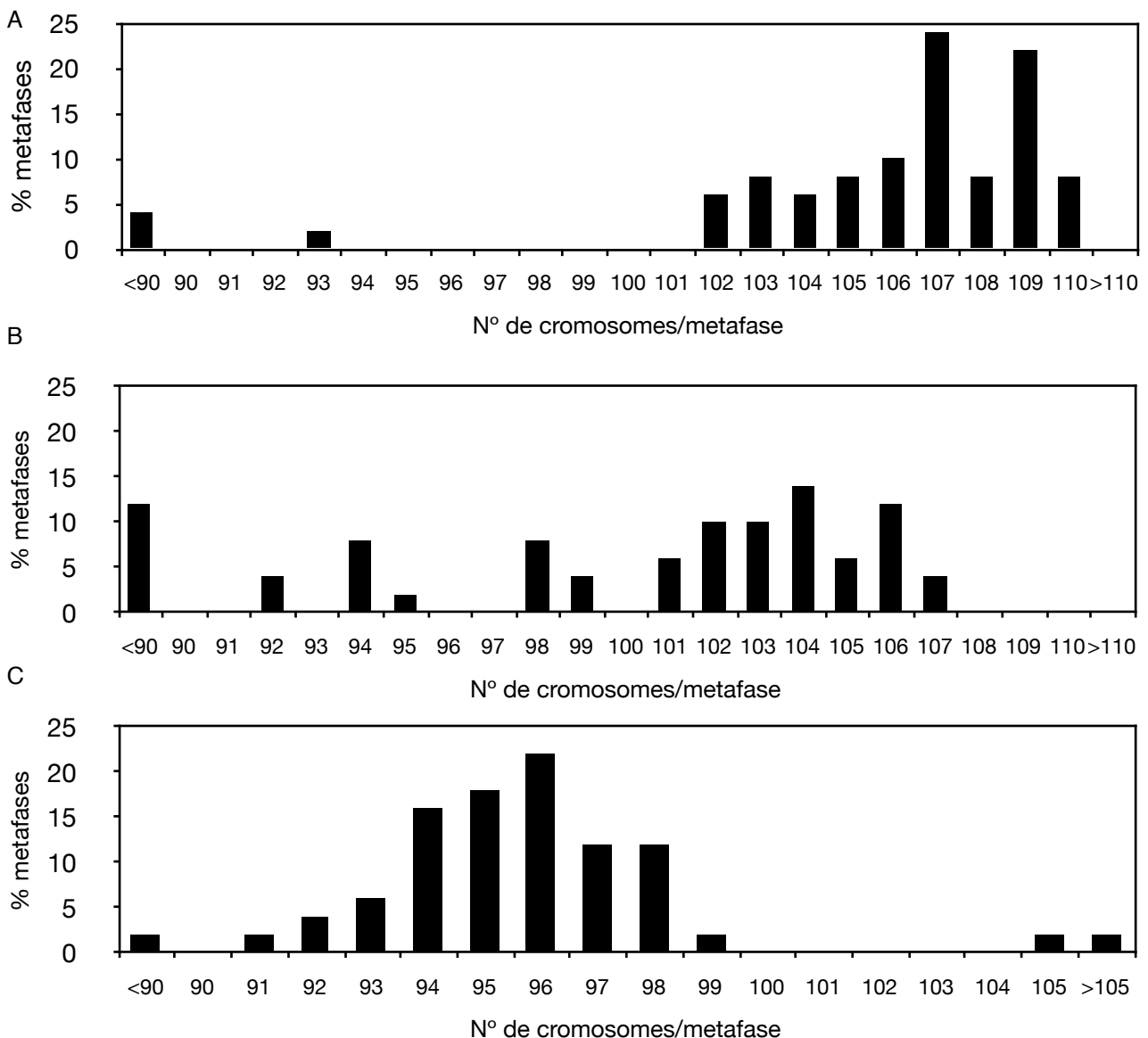


**Fig. 43.- Durada de les diferents etapes del cicle cel·lular durant un cultiu en perfusió de cèl·lules d'hibridoma KB26.5-∅ (A) i KB26.5-bhrf1 (B), així com la relació entre les fases G<sub>1</sub>/S per a les dues línies cel·lulars.** Es pot veure com en les cèl·lules KB26.5-∅ augmenta la durada de la fase G<sub>1</sub> (▲) a mesura que avança el cultiu, així com la durada de la fase S (●) i G<sub>2</sub>/M (■). L'increment en la durada de cada fase del cicle es fa encara més evident en el cas de les cèl·lules KB26.5-bhrf1, això es tradueix en un augment de l'índex G<sub>1</sub>/S.

La reorganització cromosòmica en cèl·lules d'hibridoma és un fenomen observat des de la primera fusió cel·lular generada per Köhler *et al* 1973. La cèl·lula d'hibridoma generada reorganitza la seva dotació cromosòmica, ja que redueix el seu nombre de cromosomes per sota de la suma de cromosomes aportats per cada línia fusionada [3].

Un altre avantatge que es va observar que confereix BHRF1 a les cèl·lules KB26.5 era el de l'estabilitat cromosòmica. A l'analitzar el cariotip de les cèl·lules KB26.5-∅ i el de les KB26.5-bhrf1 al cap de 64 subcultius es va observar com les cèl·lules amb *bhrf1* tenien

una distribució normal del nombre de cromosomes, amb un valor modal de 96 cromosomes, mentre que les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  presentaven una distribució aleatòria del nombre de cromosomes. Aquests cariotips es varen comparar amb el cariotip de les cèl·lules KB26.5 primigènies, les quals no havien patit processos de subcultius i formaven part del *master stock*. El cariotip de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i les primigènies era molt similar, mentre que canviava amb el BHRF1. Aquest sembla fomentar una reorganització cromosòmica, afavorint cèl·lules amb una menor càrrega cromosòmica, fet que no s'observava a les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  (figura 44).



**Fig 44.- Distribució del cariotip modal** per les cèl·lules KB26.5 primigènies (A), per les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  amb 13 subcultius (B) i per les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* amb 64 subcultius (C).

Els resultats obtinguts al transfectar el gen *bhrf1* a cèl·lules d'hibridoma KB26.5, indiquen que aquest gen confereix a aquestes cèl·lules un important efecte protector, evitant la mort cel·lular en diferents sistemes de cultiu *in vitro*, com són el cultiu en discontinu i en perfusió, i també quan aquestes es troben en condicions de cultiu inductores de la mort cel·lular, com amb el cultiu en un medi sense glutamina. La resistència que confereix aquest gen a les cèl·lules d'hibridoma ha estat confirmada per altres autors en cèl·lules epitelials [152,153], i en cèl·lules HEK 293 [154] on s'ha determinat aquesta mateixa capacitat de reduir l'efecte apoptòtic.

El creixement cel·lular no es veu alterat per la presència del gen *bhrf1*, ambdues línies cel·lulars presenten velocitats de creixement en condicions òptimes molt similars, ja sigui en un cultiu en discontinu com en perfusió. L'efecte de protecció per part de *bhrf1* només es fa evident quan el cultiu entra en fases limitants o bé quan s'indueix directament la mort cel·lular. En el cultiu en discontinu les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* presenten una menor mortalitat a partir de les 96 hores de cultiu respecte les KB26.5- $\emptyset$ . En aquest moment es pot apreciar un canvi en la distribució del cicle cel·lular, el qual incrementa la proporció de cèl·lules en G<sub>1</sub>, de forma molt més pronunciada en aquelles cèl·lules que han incorporat el gen *bhrf1*.

Es coneix que les cèl·lules animals són sensibles als nutrients dels que disposen al seu entorn i que aquest és un factor clau per la decisió de progressar en el cicle cel·lular i més concretament l'estat nutricional de la cèl·lula i el seu entorn és vital per superar la fase G<sub>1</sub> [124]. Una aturada en la fase tardana de l'etapa G<sub>1</sub> pot comportar l'entrada en apoptosi [149]. La relació G<sub>1</sub>/S indica que les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* queden aturades en la fase G<sub>1</sub> del cicle amb major proporció que no les KB26.5- $\emptyset$ . Aquest increment en la durada de la fase G<sub>1</sub> es podria atribuir o bé a la major supervivència de les cèl·lules aturades en G<sub>1</sub> per la falta de nutrients, degut a l'efecte antiapoptòtic de *bhrf1*, o bé que *bhrf1* podria tenir un efecte sobre el cicle cel·lular de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 per tal d'aturar l'entrada en apoptosi.

En el cas del cultiu en discontinu en condicions d'inducció a l'apoptosi, la falta total de glutamina va conduir a l'aturada del cicle cel·lular en G<sub>1</sub> per part de les dues línies cel·lulars, tot i que amb major mesura en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, ja que l'ús d'aquest aminoàcid és vital per la transició de la fase G<sub>1</sub> a la S, tal i com es pot veure a la figura 45

[155]. L'acció de *bhrf1* fa que la cèl·lula no avanci en la mort cel·lular programada, fet que no passa en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ .

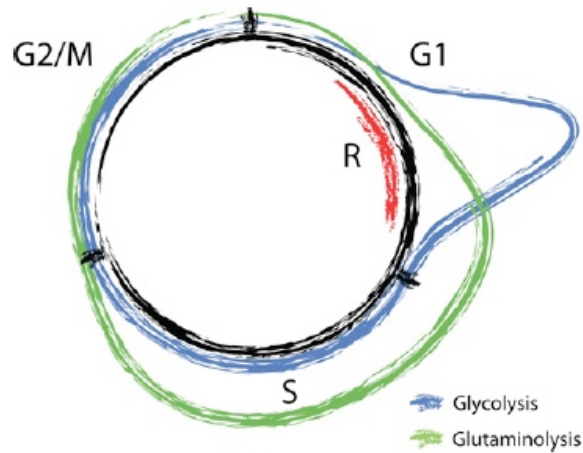


Fig. 45.- Diagrama on es representa els major requeriments de glucosa i glutamina durant el cicle cel·lular [155].

El canvi de perfil en  $G_1$  en les cèl·lules d'hibridoma cultivades en medi sense de glutamina, també s'ha observat en altres línies cel·lulars com en el cas de les cèl·lules CHO [156]. No obstant, cal també esmentar que altres grups han observat un efecte contrari en cèl·lules transfectades amb BHRF1 respecte al cicle cel·lular, afavorint-se l'entrada a la fase S. Aquestes observacions van ser realitzades en cèl·lules epitelials cultivades sense sèrum i posteriorment transferides a un medi complet [152].

En el cultiu en perfusió s'observa clarament com el cultiu no transfectat augmenta el nombre total de cèl·lules a partir de les 120 hores de cultiu, moment en que aquest entra en condicions de limitació, indicant que hi ha divisió de les cèl·lules ja que també el nombre de cèl·lules mortes augmenta pronunciadament. El cultiu transfectat manté estable el nombre total de cèl·lules mantenint també la viabilitat de les mateixes. Aquest fet, juntament amb els resultats de distribució de cicle i de la durada de les diferents fases del cicle cel·lular, indica que les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 amb presència de *bhrf1* deixen de dividir-se, aturant el seu cicle cel·lular en la fase  $G_1$ . L'única diferència entre ambdues és la presència de *bhrf1* en les cèl·lules d'hibridoma KB26.5, que sembla exercir una acció sobre el cicle cel·lular d'aquestes cèl·lules com un element de la seva acció antiapoptòtica. L'efecte sobre el cicle cel·lular per part de BHRF1 es manifesta en moments on el cultiu es troba limitat per la falta de nutrients, per tant l'aturada del cicle cel·lular en la fase  $G_1$  podria explicar el fet que en el cas del cultiu transfectat apareixien poques cèl·lules mortes en comparació amb el cultiu control en la perfusió.

Es podria argumentar també en aquest tipus de cultiu que les diferències en la durada de  $G_1$  entre les dues línies cel·lulars és el reflex de la supervivència mediada per BHRF1 de les cèl·lules aturades a la fase  $G_1$  degut a la limitació de nutrients. La sobreexpressió de BHRF1 pot simplement haver protegit les cèl·lules d'hibridoma de l'apoptosi induïda per la reducció de la velocitat de creixement degut a la prolongació de la fase  $G_1$ . Però això no explica perquè la línia KB26.5-*bhrf1* i la KB26.5- $\emptyset$  no mantenen les mateixes velocitats de creixement sota condicions de limitació del cultiu. Malgrat la similitud general en l'ambient del cultiu, les cèl·lules transfectades amb *bhrf1* exhibien una major reducció en la transició de la fase  $G_1$  a S en dues condicions de cultiu com són el discontinu i la perfusió, així com una més gran relació entre la fase  $G_1/S$ . En les condicions en que les cèl·lules es troben en el cultiu discontinu en condicions d'inducció a l'apoptosi, hi ha una gran diferència pel que fa a la mort cel·lular, sent molt inferior en les cèl·lules amb presència del gen *bhrf1*, però això no es tradueix en un canvi exclusiu en el patró del cicle cel·lular. Les dues línies aturen de forma similar el seu cicle en fase  $G_1$ , això es pot veure pel fet que no hi ha increment en el nombre de cèl·lules totals indicant que no es produeix divisió cel·lular. Aquests resultats s'han de separar de la resta de condicions ja que en el cultiu d'inducció a la mort cel·lular es retira deliberadament un nutrient clau per la progressió de la cèl·lula de la fase  $G_1$  cap a la fase S.

Els canvis que es produeixen en els cultiu *in vitro* de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 als que s'ha transfectat el gen *bhrf1* permeten establir hipòtesis sobre dues accions de *bhrf1*. D'una banda, BHRF1 és capaç de bloquejar la senyalització de la ruta mitocondrial de l'apoptosi, que es desencadena per la manca de glutamina, fet que indueix l'aturada del cicle cel·lular. D'altra banda, que a més d'exercir com a modulador de l'apoptosi, BHRF1 és capaç d'aturar la progressió del cicle cel·lular en un estadi primerenc de l'etapa  $G_1$ , ja que és en aquest moment quan l'aturada del cicle no comporta el desencadenament de l'apoptosi. Fussenegger [149] va indicar que perquè l'aturada del cicle comporti també un bloqueig de l'apoptosi cal que l'aturada del cicle cel·lular es produeixi en etapes inicials de la fase  $G_1$ . Segons Moncada [155] es pot determinar que la utilització de la glutamina per part de la cèl·lula durant les fases del cicle cel·lular es concentra al final de la fase  $G_1$  i en la transició entre  $G_1$  i S. Aquest fet concorda amb que la cèl·lula presenta un punt de restricció entre la fase  $G_1$  i S sensible no només a factors de creixement, sinó també a nutrients [124]. L'absència total d'un nutrient essencial per la progressió del cicle cel·lular pot desencadenar l'aturada de la cèl·lula en  $G_1$  per l'acció

d'aquest punt de restricció, que impedeix el pas cap a la fase S donades les condicions nutricionals de la cèl·lula. El motiu pel qual en cultius discontinus i en perfusió les cèl·lules no transfectades no presenten l'aturada en  $G_1$ , tot i donar-se limitacions de nutrients pot ser perquè en la perfusió hi ha aport constant de medi fresc i per tant la falta completa de glutamina no es dona, i en el cas del discontinu la relació  $G_1/S$  queda lleument incrementada, fet que pot ser suficient per desencadenar l'impuls apoptòtic. Es pot suposar que si bé hi ha un canvi de tendència en el patró de cicle cel·lular en les dues línies cel·lulars, degut a factors comuns del cultiu com la falta de glutamina, ja sigui en el cultiu discontinu o el discontinu sense glutamina, BHRF1 actuaria en un punt del cicle anterior al punt de restricció sensible a nutrients, evitant que l'aturada del cicle cel·lular en la fase tardana de  $G_1$ , per l'acció d'aquest punt de restricció, faci entrar les cèl·lules en apoptosi. Aquest fet podria explicar la diferència en la distribució del cicle cel·lular entre les dues línies en el cultiu en discontinu i la similitud en qüestió del cicle en el discontinu en condicions inductores, i al mateix temps la gran diferència respecte la presència de cèl·lules no viables.

L'efecte observat de BHRF1 sobre el cicle cel·lular, i en especial a l'aturada sobre la fase  $G_1$  del cicle en les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 sota condicions de limitació de nutrients, concorda amb les observacions fetes per Al-Rubeai utilitzant *bcl2* com a gen transfectat en cèl·lules d'hibridoma [11]. No és d'estranyar, doncs, que un gen amb funcions antiapoptòtiques i de la mateixa família, sigui capaç d'alterar la transició entre les fases del cicle cel·lular i incrementar la població cel·lular aturada en una fase en concret.

L'increment del temps a la transició cap a la fase S des de la fase  $G_1$  per part de la línia KB26.5-*bhrf1* que es va observar és consistent amb observacions realitzades per Theodorakis [157], així com amb observacions obtingudes utilitzant membres de la família de Bcl-2 [158, 159].

Es pot dir, doncs, que la presència del gen *bhrf1* en cèl·lules d'hibridoma KB26.5 confereix una major resistència a la mort cel·lular en sistemes de cultiu discontinu, en perfusió i en condicions de cultiu sense glutamina. La presència de *bhrf1* altera el cicle cel·lular d'aquelles cèl·lules que l'han incorporat, tant sols quan la cèl·lula entra en una situació limitant, això pot ser degut o bé per l'acció de BHRF1 o bé com a conseqüència de l'aturada del cicle en  $G_1$  degut a la falta de nutrients en aquelles cèl·lules que resisteixen la mort cel·lular per acció de BHRF1.



A partir d'aquests resultats, es va plantejar estudiar el perfil transcripcional i proteòmic d'aquestes cèl·lules, per tal de veure si hi ha canvis que ajudin a entendre les diferències fenotípiques observades.

## 2. EXPRESSIÓ GÈNICA I PROTEICA ASSOCIADA A BHRF1

Un cop es varen evidenciar les propietats antiapoptòtiques de BHRF1 sobre les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 cultivades en cultius en discontinu, en discontinu inductor de l'apoptosi i en perfusió; la capacitat de regular el cicle cel·lular en aquests sistemes de cultiu, així com la capacitat de mantenir l'estabilitat cromosòmica de les cèl·lules, es va voler conèixer-ne les causes. Per tal de determinar quins efectes exercia a nivell molecular l'expressió de *bhrf1* en aquesta línia cel·lular es va enfocar el treball cap a l'estudi dels gens expressats per la cèl·lula en un moment determinat. Aquesta expressió dóna una idea d'aquells gens amb major o menor activitat en un moment concret. El nivell d'expressió dels gens es pot estudiar a través d'aquells que s'estan transcrivint generant el mRNA. Utilitzant *arrays* de DNA (veure el punt 2.5 dels materials i mètodes), es pot quantificar quant mRNA s'està generant i, per tant, identificar el gen que s'expressa.

Un vegada un gen s'ha transcrit per generar el mRNA, posteriorment s'ha de traduir a una proteïna. Conèixer les proteïnes que s'expressen en un instant determinat pot ajudar a determinar els efectes de BHRF1 sobre les cèl·lules d'hibridoma. Les proteïnes, a través de les seves accions individuals o per la seva interacció amb d'altres proteïnes, modularan la resposta a estímuls. Aquesta activitat proteica haurà de presentar diferències per les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* ja que s'ha vist que el seu comportament és diferent.

L'estudi d'expressió gènica i proteica es va dur a terme en diferents condicions de cultiu en discontinu, utilitzant cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i KB26.5-*bhrf1*. Es varen utilitzar cultius en discontinu prenent mostra a les 48 hores i a les 96 hores de cultiu, així com a les 24 hores de cultiu en discontinu en condicions inductores de l'apoptosi per manca de glutamina. Cal recordar que per a realitzar el cultiu en condicions inductores de l'apoptosi, es fa créixer les cèl·lules durant 48 hores en medi complet abans de fer el canvi a medi sense glutamina. Aquestes condicions es llisten a la taula 5.

Taula 5.- Resum de les condicions utilitzades per als experiments de genòmica i proteòmica.

Nom	Condicions
A	48 hores cultiu en discontinu de cèl·lules KB26.5- $\emptyset$
A'	48 hores cultiu en discontinu de cèl·lules KB26.5- <i>bhrf1</i>
B	96 hores cultiu en discontinu de cèl·lules KB26.5- $\emptyset$
B'	96 hores cultiu en discontinu de cèl·lules KB26.5- <i>bhrf1</i>
C	24 hores cultiu en discontinu en condicions inductores de l'apoptosi de cèl·lules KB26.5- $\emptyset$
C'	24 hores cultiu en discontinu en condicions inductores de l'apoptosi de cèl·lules KB26.5- <i>bhrf1</i>

## 2.1. EXPRESSIÓ GÈNICA

Es va analitzar l'expressió diferencial de 36000 gens murins i dels efectes provocats en la línia cel·lular KB26.5 transfectada amb el vector pIRES:*bhrf1* mitjançant un *array* de DNA. Per tal de realitzar aquest assaig es varen prendre mostres de cultiu per extreure el mRNA tant de la línia KB26.5- $\emptyset$  com KB26.5-*bhrf1* en dues condicions de cultiu diferents.

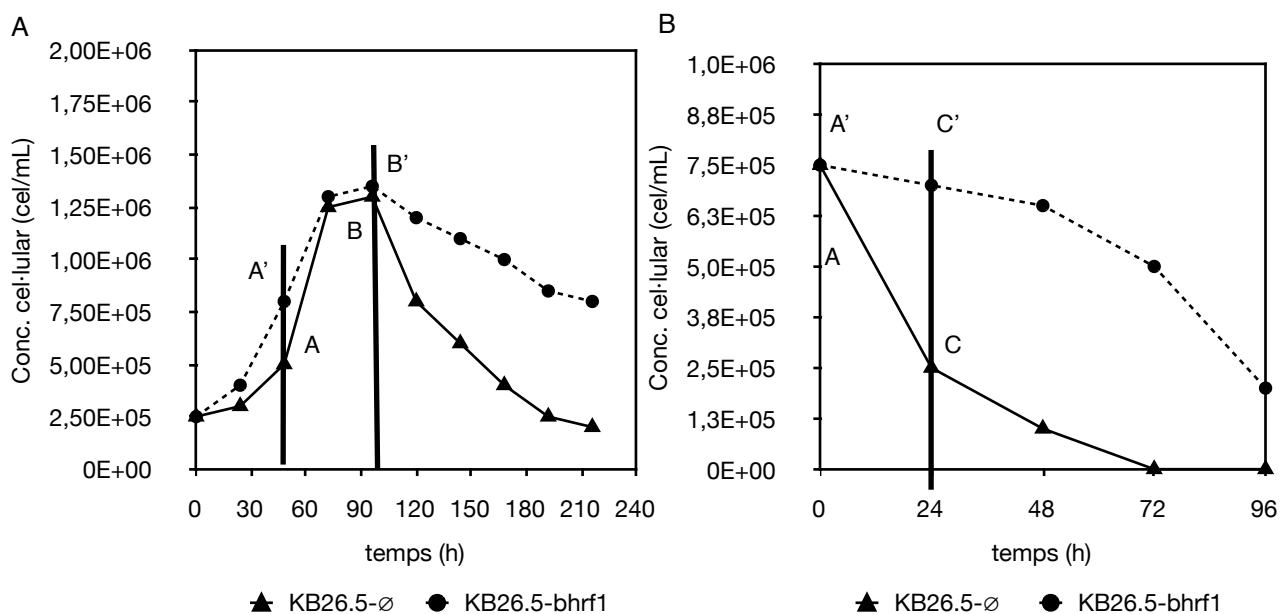


Fig. 46.- Perfil de creixement de les cèl·lules viables d'hibridoma KB26.5- $\emptyset$  i KB26.5-*bhrf1* en un sistema de cultiu *in vitro* en discontinu i en discontinu induint l'apoptosi. Es varen prendre mostres a les 48 i 96 hores del cultiu discontinu de les dues línies i a les 0 i 24 hores del cultiu en inducció a l'apoptosi.

Es va realitzar un cultiu en discontinu (figura 46A) al que es va prendre una mostra a dos moments diferents, a les 48 (A i A') i a les 96 hores (B i B'), representant el creixement exponencial i l'entrada en la limitació del cultiu, moment on ja s'apreciaven

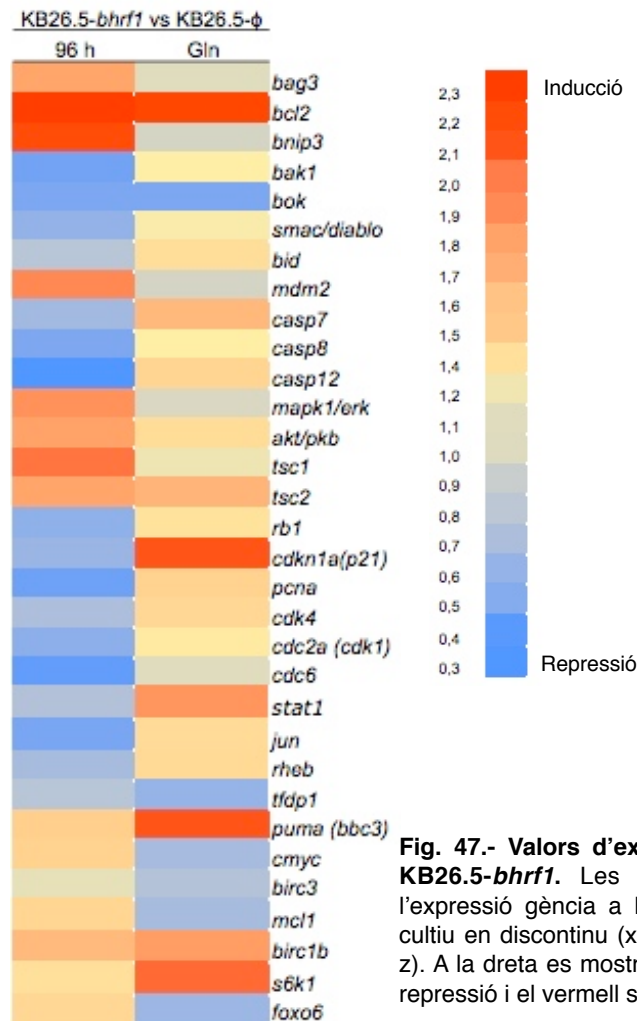
diferències de comportament entre la línia KB26.5-*bhrf1* i KB26.5- $\emptyset$ . Per altra banda, també es va realitzar un cultiu discontinu amb inducció de la mort cel·lular (figura 46B), on es va prendre mostra a l'inici del cultiu (A i A') i al cap de 24 hores (C i C').

Per tal d'establir si es podia utilitzar el nivell d'expressió a les 48 hores en la línia KB26.5- $\emptyset$  com a referència i per a les dues línies cel·lulars, es va voler veure si hi havia canvis d'expressió gènica entre les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i KB26.5-*bhrf1* en el mateix moment de cultiu en discontinu, a les 48 hores, moment corresponent a la meitat de la fase exponencial. Utilitzant, doncs, els valors d'expressió gènica obtinguts per cada un d'aquests punts, es va obtenir el quocient entre A i C. Aquest quocient va permetre observar quin Nivell de Canvi (N.C) en l'expressió gènica de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 era degut a la transfecció del plàsmid pIRES:*bhrf1*. El 5% dels gens es varen veure alterats pel sol fet de transfectar les cèl·lules d'hibridoma, això va permetre establir que la condició control havia de ser les 48 hores de cultiu en discontinu, però que calia normalitzar l'expressió gènica en cada línia per l'expressió obtinguda a les 48 hores abans de ser comparades entre elles. Per fer-ho es varen determinar inicialment els quocients B/A (x), B'/A' (y), C'/A' (w) i C/A (z). Un cop normalitzats els valors d'expressió en cada una de les condicions experimentals amb el valor de referència per a cada línia cel·lular, es va comparar l'expressió de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* respecte les KB26.5- $\emptyset$ , per tal d'analitzar l'efecte molecular de la sobreexpressió de *bhrf1* en cada situació experimental estudiada, obtenint el nivell de canvi entre x/y i w/z (figura 47). Aquesta relació entre les dades obtingudes per l'expressió gènica per a comparar els efectes de la transfecció en cèl·lules de cultiu *in vitro* es basa en l'anàlisi realitzada en estudis previs en cultius cel·lulars de NS0 per altres autors [160].

A partir de l'estudi complet de l'expressió gènica diferencial, es va centrar l'anàlisi en aquells gens directament relacionats amb l'apoptosi i el cicle cel·lular, que són els processos en que *bhrf1* sembla tenir una major implicació directa o indirecta, segons les alteracions fisiològiques que pateixen les cèl·lules un cop han incorporat el gen, i que s'han descrit anteriorment.

Els canvis en el nivell d'expressió entre les dues línies observats en les dues condicions experimentals (96 hores de cultiu discontinu i 24 hores de cultiu en condicions d'inducció d'apoptosi) es mostren a la figura 45 i a les taules 6 i 7. Es va marcar un criteri

de N.C >1,5 per gens induïts i N.C < 0,6 per a gens reprimits. S'observa com les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 96 hores d'un cultiu en discontinu mostren nivells d'expressió elevats de gens antiapoptòtics com *bcl2*, *bag3* i *mdm2*, així com nivells baixos de gens proapoptòtics com *bak*, *bok*, *bid*, *smac/diablo* o de les *caspases* 7, 8 i 12. S'observa també inducció de gens com *tsc1* i 2, *akt* i *erk*, mentre que gens relacionats amb la divisió cel·lular com *p21*, *cdk4*, *cdc6*, *rb1*, *cdk1*, *pcna* o *tfdp1* estan reprimits juntament amb factors de transcripció com *Jun* i *Rheb*.



**Fig. 47.- Valors d'expressió gènica en cèl·lules d'hibridoma KB26.5-*bhrf1*.** Les columnes corresponen a la relació de l'expressió gènica a les condicions experimentals: 96 hores de cultiu en discontinu (x/y) i 24 hores de cultiu sense glutamina (w/z). A la dreta es mostra el rang d'expressió relativa, el blau indica repressió i el vermell sobreexpressió

L'expressió diferencial de gens en condicions d'inducció a l'apoptosi mostra com quedaven induïts gens que codifiquen per proteïnes que exerceixen una activitat antiapoptòtica, com és el cas de *bcl2* i *birc1b*, si bé també quedaven sobreexpressats gens amb activitat proapoptòtica com *puma*, mentre que *bok*, *mcl1*, *birc3* i *myc* es trobaven reprimits en aquestes condicions de cultiu. Es va observar com *p21* en condicions d'inducció a l'apoptosi es sobreexpressava, al contrari que en el cultiu en discontinu. Altres gens relacionats amb el cicle cel·lular com *tfdp1*, *cdc25c* es trobaven

reprimits, així com el factor de transcripció *foxo6*. Els factors de transcripció *s6k1* i *stat1* quedaven induïts en aquesta situació de cultiu.

**Taula 6.- Resum dels gens amb una expressió diferencial més rellevant.** El Nivell de Canvi (N.C) és la relació de la intensitat normalitzada dels gens expressats a les 96 hores de cultiu en discontinu de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, respecte a la intensitat normalitzada dels gens expressats a les 96 hores de cultiu en discontinu de les cèl·lules KB26.5-∅.

Expressió diferencial a les 96 hores d'un cultiu en discontinu			
simbol gen	descripció del gen	número	N.C
<b>Apoptosis</b>			
Bag3	Bcl2-associated athanogene 3 (Bag3)	NM_013863.3	1,5
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)	NM_177410.1	2,3
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3 (Bnip3)	NM_009760.2	2,1
Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2 (Mdm2)	NM_010786.2	1,8
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1 (Bak1)	NM_007523.1	0,4
Bok	Bcl-2-related ovarian killer protein (Bok)	NM_016778.1	0,4
Smac/Diablo	diablo homolog (Drosophila) (Diablo)	NM_023232.2	0,5
Bid	BH3 interacting domain death agonist (Bid)	NM_007544.2	0,6
Casp7	caspase 7 (Casp7)	NM_007611.1	0,5
Casp8	caspase 8 (Casp8)	NM_009812.1	0,4
Casp12	caspase 12 (Casp12)	NM_009808.2	0,3
<b>Factors de transcripció</b>			
Mapk1/erk	mitogen activated protein kinase 1 (Mapk1)	NM_011949.2	1,7
Akt/pkb	thymoma viral proto-oncogene 1 (Akt1)	NM_009652.1	1,6
Tsc1	tuberous sclerosis 1 (Tsc1)	NM_022887.1	1,9
Tsc2	tuberous sclerosis 2 (Tsc2)	NM_011647.1	1,5
Rb1	retinoblastoma 1 (Rb1)	NM_009029.1	0,5
Cdkn1a (p21)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a)	NM_007669.2	0,5
Pcna	proliferating cell nuclear antigen associat a fase S	NM_011045.1	0,4
Cdk4	cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4)	NM_009870.2	0,6
Cdc2a (cdk1)	cell division cycle 2 homolog A (S pombe) (Cdc2a)	NM_007659.2	0,5
Cdc6	cell division cycle 6 homolog (S cerevisiae) (Cdc6)	NM_011799.1	0,4
Jun	Jun oncogene (Jun)	NM_010591.1	0,4
Rheb	RAS-homolog enriched in brain (Rheb)	NM_053075.2	0,6
Tfdp1	transcription factor Dp 1 (Tfdp1)	NM_009361.1	0,6

**Taula 7.- Resum dels gens amb una expressió diferencial més rellevant.** El Nivell de Canvi (N.C) és la relació de la intensitat normalitzada dels gens expressats a les 24 hores de cultiu en discontinu, en condicions d'inducció de l'apoptosi de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, respecte a la intensitat normalitzada dels gens expressats en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi de les cèl·lules KB26.5-∅.

Expressió diferencial a les 24 hores en cultiu en discontinu en absència de glutamina			
simbol gen	descripció del gen	número	N.C
<b>Apoptosis</b>			
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)	NM_177410.1	2,2
Birc1b	baculoviral IAP repeat-containing 1b (Birc1b)	NM_010872.1	1,6
Puma (Bbc3)	Bcl-2 binding component 3 (Bbc3)	NM_133234.1	2,1
Bok	Bcl-2-related ovarian killer protein (Bok)	NM_016778.1	0,4
Mcl1	myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl1)	NM_008562.2	0,6
Birc3	baculoviral IAP repeat-containing 3 (Birc3)	NM_007464.1	0,6
cmyc	myelocytomatosis oncogene (Myc)	NM_010849.2	0,6
<b>Factors de transcripció</b>			
Cdkn1a (p21)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a)	NM_007669.2	2,1
Stat1	signal transducer and activator of transcription (Stat1) mRNA	U06924.1	1,7
s6k1	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 2 (Rps6kb2)	NM_021485.1	2,0
Foxo6	forkhead box O6 (Foxo6)	NM_194060.1	0,5
Tfdp1	transcription factor Dp 1 (Tfdp1)	NM_009361.1	0,5

Es pot observar com les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* en les dues situacions de cultiu, discontinu i discontinu en condicions inductores de l'apoptosi, incrementaven gens relacionats amb funcions antiapoptòtiques com *birc1b*, *bag3*, induïts 1,6 i 1,5 vegades respecte les cèl·lules control. La proteïna codificada per *birc1b* pertany a la família de proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP), les quals regulen l'activació de les caspases. En

el cas de Birc1b inhibeix la caspasa 3 i 7 [161], mentre que la proteïna Bag3 codificada pel gen *bag3*, és membre de les proteïnes BAG (*Bcl2 associated athanogene*) que són de la família de les coxaperones que interaccionen amb el domini ATPasa de les *Heat Shock Proteins 70* (Hsp 70). Bag3 sembla intervenir en la resposta adaptativa de la cèl·lula a l'estrès. Les proteïnes Bag tenen influència en nombrosos aspectes cel·lulars com la motilitat, l'adhesió cel·lular, el desenvolupament i l'apoptosi. Bag3 sembla tenir relació amb la supervivència cel·lular, interaccionant amb diverses parelles moleculars activant, per tant, múltiples rutes. Protegeix IKK- $\gamma$  de ser degradada pel proteosoma fent que NF- $\kappa$ B tingui una activació sostinguda i com a conseqüència hi hagi una major supervivència cel·lular. Bag3 reté Bax al citosol evitant així la seva translocació al mitocondri. A més, a través de Hsp70 pot regular l'expressió de nombroses proteïnes incloent Bim [162]. Segons la presència de citocines, Bag3 formarà complexos amb Hsp70, evitant d'aquesta manera l'estabilització del mRNA de Bim, mentre que en absència de citocines, la proteïna Ras no es veu activada i no indueix la unió de Bag amb Hsp70, de tal manera que Hsp70, que té una alta afinitat pel mRNA de Bim, pot unir-s'hi, estabilitzant-lo i protegint-lo de l'acció de les ribonucleases [163]. Bag3 respon a senyals d'estrès i està implicat en preservar la vida de NF- $\kappa$ B tot evitant la ubiquitinació de IKK, al estar induït pot afavorir aquest efecte sobre IKK i de retruc sobre *bcl-2* [164].

Cal destacar que el gen *bcl2* es va veure expressat de forma diferencial 2,2 vegades en les dues condicions de cultiu estudiades en l'*array* en les cèl·lules d'hibridoma KB26.5-*bhrf1* respecte a les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ . Aquest és el membre antiapoptòtic principal de la família que porta el seu nom. La seva sobreexpressió en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* pot ser una indicació dels efectes de *bhrf1* a la cèl·lula i de les capacitats antiapoptòtiques que mostren. Es coneix que hi ha una interacció entre factors de transcripció involucrats en la supervivència cel·lular, oncogènesis i apoptosi, com és el cas de NF- $\kappa$ B, i l'expressió de *bcl2*. Malgrat que no es va observar una inducció dels gens *rel*, els quals codifiquen pel factor de transcripció NF- $\kappa$ B, sí que es va determinar un increment en l'expressió de *akt*, que com s'ha vist és un regulador positiu del factor de transcripció NF- $\kappa$ B, el qual indueix l'expressió de Bcl-2 [165, 166]. Per altra banda, el mateix Bcl-2 pot actuar sobre diversos factors de transcripció, com el propi NF- $\kappa$ B, Ap-1 i CREB [60].

En les dues condicions estudiades també s'observava un increment de gens relacionats amb l'apoptosi, com en el cas de *bnip3* que es sobreexpressa 2,1 vegades a les 96 hores de cultiu. La proteïna Bnip3 pertany a un subgrup proapoptòtic de la família de Bcl-2, ja que ambdues tenen un domini BH3. Els mecanismes proapoptòtics de les proteïnes Bnip probablement ocorren a través d'interaccions amb proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> a través del seu domini BH3. Bnip3 es localitza a la membrana mitocondrial i causa la mort cel·lular per la disrupció de la mateixa. La mort induïda per Bnip depèn de les condicions d'activació, però es desconeix la regulació de la mort cel·lular per aquestes proteïnes [167].

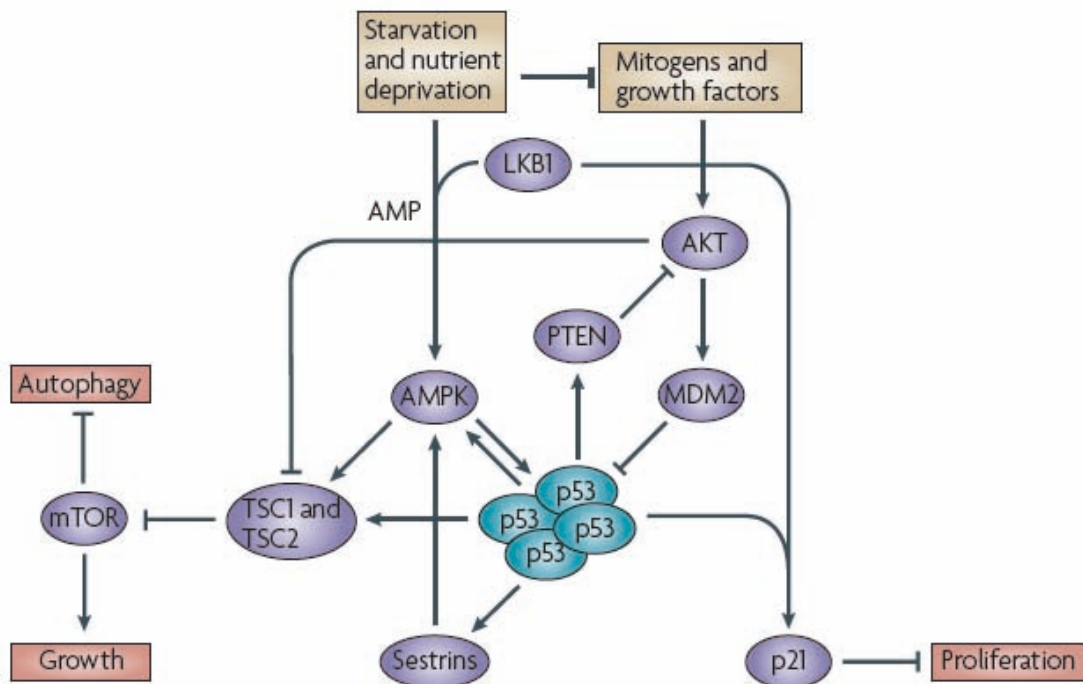
Un altre gen relacionat amb l'apoptosi del que s'observa un increment d'expressió és *puma*, en el cultiu en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi. La proteïna codificada per *puma* es troba exclusivament al mitocondri i s'uneix a Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> a través del seu domini BH3, essent doncs una proteïna proapoptòtica de domini únic BH3 [75]. Puma, com altres activadors BH3, interacciona sobre Bax per tal que aquesta s'activi passant d'una posició citosòlica al mitocondri. També activa Bak, permetent la seva oligomerització [168]. Puma es troba regulada per p53, ja que aquesta actua com a factor de transcripció de diferents gens involucrats en la inducció de l'apoptosi, entre ells *puma*, que indueix ràpidament la mort cel·lular programada a través de l'alliberació de citocrom *c* [169]. És conegut que p53 té funcions al nucli per regular gens proapoptòtics, però també té funcions al citosol on activa directament proteïnes proapoptòtiques per permeabilitzar la membrana mitocondrial i iniciar l'apoptosi. Proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-X<sub>L</sub> segresten la p53 citosòlica, però després de rebre senyals d'estrès, la p53 nuclear expressa Puma, que desplaça la p53 retinguda per Bcl-X<sub>L</sub> permetent a la p53 citosòlica induir la permeabilització mitocondrial actuant com una molècula BH3 única, activant Bax/Bak i alliberant també aquests de la unió amb membres antiapoptòtics de Bcl-2 [102, 170].

El fet de trobar *puma* induït pot ser degut a que l'expressió de p53 -i per tant la de *puma*- estiguin regulades per l'absència al medi de glucosa o de factors de creixement. La falta d'aquests factors porta a la pèrdua de la captació de glucosa i a la inducció de *puma*. A més de *puma*, la falta de factors de creixement també indueix altres membres proapoptòtics de la família de Bcl-2, com és *bim*, *bax* o *nox*. L'activitat transcripcional de p53 augmenta un cop hi ha manca de factors de creixement o altres factors d'estrès com la manca de glucosa, fent augmentar Puma i això és necessari i suficient per iniciar l'apoptosi. La manera en que el metabolisme de la glucosa regula l'activitat de p53 no és



coneguda, però l'activació de p53 en aquestes condicions pot ser deguda a modificacions post-traduccionals de p53 o alteracions en l'associació de proteïnes amb p53, ja que els nivells de mRNA de p53 no es veuen alterats com s'ha vist en limfòcits T activats [171] i tampoc en el cas de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 utilitzades es varen observar alteracions a aquest nivell en l'*array*.

La falta de nutrients, energia o O<sub>2</sub> pot activar p53. En el cas de la falta de nutrients o nivells d'energia, el mecanisme passa per la fallada en l'activació de Akt i resulta en l'activació de *AMP-activated protein kinase* (AMPK) que provoca la disminució de la relació entre ATP/AMP i que pot estimular l'activació de p53, ja sigui per l'acció sobre la transcripció de *Tp53* (el gen codificant per p53) o per la fosforilació i estabilització de p53 (figura 48).



**Fig. 48.- Senyalització de p53 per manca de nutrients.** Activació de p53 en resposta a les senyals emeses per la falta de nutrients a través de l'activació de AMPK i la inhibició de Akt. p53 indueix a més AMPK i activa l'expressió de Tsc2, resultant en la inhibició de mTOR. Això porta a una disminució del creixement cel·lular i la proliferació [173].

El gen *mdm2* està induït 1,8 vegades en el cas del cultiu en discontinu a 96 hores. La proteïna Mdm2 promou la degradació de p53 a través de la ubiquitinació [172]. La seva inducció en aquestes condicions de cultiu pot significar una reducció en l'activitat de p53, el que implica una reducció en l'activitat apoptòtica, així com una teòrica inhibició de les

proteïnes inhibidores del cicle cel·lular. Tot i que no s'observa fenotípicament un increment en la progressió del cicle cel·lular en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, l'increment en l'expressió de *mdm2* pot implicar una major estabilització de p53.

En les dues condicions de cultiu, es varen trobar gens proapoptòtics de la família de Bcl-2 reprimits, com és el cas de *bok*, *bid* i *bak1*. També es van trobar gens antiapoptòtics reprimits, com *mcl1* i *birc3*. Els gens *bak1* i *bok* codifiquen per les proteïnes Bak i Bok que tenen quatre dominis BH i tenen una funció proapoptòtica. Bok canvia de localització des del citosol al mitocondri durant l'apoptosi, Bak es troba al mitocondri i promou l'activació de les caspases a través de la formació de porus a la membrana mitocondrial, conduint a l'alliberació de factors activadors de les caspases com el citocrom c [43]. El gen *bid* codifica per la proteïna Bid, que també pertany a la família Bcl-2, amb funcions proapoptòtiques però amb un únic domini BH (BH3). La seva funció consisteix en activar directa o indirectament Bax i/o Bak, ja sigui per una acció directa o per una acció inhibidora sobre els membres antiapoptòtics de la família Bcl-2, com Bcl-XL o el propi Bcl-2 [159]. La repressió d'aquests gens pot indicar una major resistència a l'apoptosi degut a la falta d'elements que transmetin la senyal apoptòtica.

El gen *mcl1* codifica per una proteïna antiapoptòtica (Mcl-1) que pertany a la família de Bcl-2, el qual pot unir-se a la proteïna proapoptòtica multidomini Bak, pertanyent també a la família de Bcl-2, aturant la dimerització de Bak i evitant la seva activitat proapoptòtica, que es produeix per la permeabilització de la membrana mitocondrial [174]. Quan les cèl·lules es troben sense els factors de creixement, s'ha documentat que GSK-3 es veu activat i fosforila Mcl-1 que és sigui degradat pel proteosoma [175, 176].

El gen *birc3/cIAP2* codifica per la proteïna Birc3/cIAP2 que pertany al grup de proteïnes antiapoptòtiques IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), que inhibeixen l'apoptosi a través de la seva unió a la caspasa 9, 3 i 7 i sembla que també pot promoure l'activació de NK- $\kappa$ B, el qual promou com a factor de transcripció nombrosos gens de supervivència, com Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> [177] a més de cIAP1-2 i XIAP [161]. Sembla que cIAP2 es situaria en un punt on convergeixen tant la via intrínseca com la extrínseca de la mort cel·lular [178]. Aquestes funcions quedarien reprimides en condicions d'inducció de l'apoptosi en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*.

Tenint en compte que Smac/DIABLO promou la ruta mitocondrial de l'apoptosi a través de l'activació de la caspasa 9 per la unió a les proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP), contrarestant d'aquesta manera la seva capacitat d'inhibició de les caspases [179], la repressió de 0,6 vegades d'aquest gen en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* pot comportar una menor activació de les caspases i, per tant, un retard en la transmissió dels senyals apoptòtics.

Els gens que codifiquen per la caspasa 7, 8 i 12 es troben reprimits en condicions de cultiu en discontinu a les 96 hores. La caspasa 7 pertany al grup de caspases efectores, juntament amb les caspases 3 i 6. Les caspases 3 i 7 són activades per la caspasa 9, mentre que la caspasa 8 és activada per les caspases efectores 3 i 7 en la ruta mitocondrial de l'activació de caspases, al igual que les caspases 2, 6 i 10 [180]. La caspasa 12 es troba relacionada amb la senyalització apoptòtica mediada pel Reticle Endoplasmàtic [181].

El gen *cmyp* es troba reprimat 0,6 vegades al cultiu a les 96 hores, codifica per una fosfoproteïna nuclear que actua com a factor de transcripció, estimulando tant la progressió del cicle cel·lular com l'apoptosi. c-myc respon a senyals mitogèniques per induir les cèl·lules a progressar a través de la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular. Aquesta activitat sobre el cicle la du a terme a través de la transcripció de gens amb un paper important en el control del cicle cel·lular, com *cdc25a*, *ciclina D1*, *ciclina D2*, *ciclina E*, *ciclina A*, *cdk1*, *cdk2*, *cdk4* i *e2f*. A més del seu paper en el cicle cel·lular, c-myc també intervé en la regulació de l'apoptosi. La inducció de l'apoptosi per part de c-myc en situacions limitants de nutrients pot ser dependent o independent de p53. c-myc pot activar el promotor del gen *p53* i incrementar el temps de vida de la proteïna p53. Bcl-2 i Mcl-1 inhibeixen c-myc, aquest però regula la transcripció de *bax* [125, 182]. La seva activitat quedaria, doncs, reduïda en aquelles cèl·lules d'hibridoma KB26.5 amb la incorporació de *bhrf1*, de tal manera que la inducció de l'apoptosi i la progressió a través del cicle es veurien reprimides, fet que concorda amb la major resistència a les senyals apoptòtiques i l'alentiment del cicle cel·lular.

Pel que fa a gens relacionats amb factors de transcripció i cicle cel·lular s'observa com *cdkn1a* (*p21*) en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* es troba reprimat a les 96 hores de cultiu en discontinu, mentre que a les 24 hores de cultiu sense glutamina, l'expressió de *cdkn1a* quedava induïda 2,1 vegades. La inducció del gen *p21* en condicions de falta de



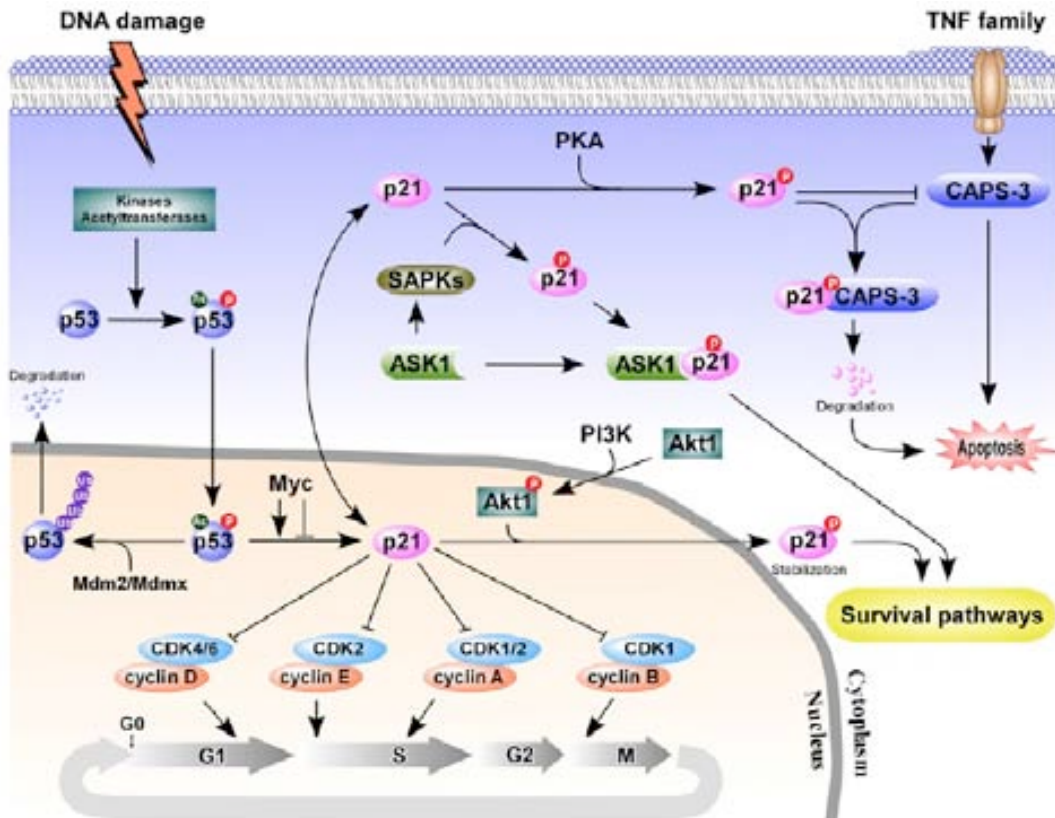
inhibició del cicle per part de p21 també depèn de la seva capacitat en intervenir en la repressió gènica dependent de p53 [183].

p21 és induït per p53, ja que aquest té una seqüència central específica d'unió al DNA i un domini activador transcripcional, que en resposta a danys al DNA pot induir la transcripció [123], [149]. Es coneix, però, que p21 és estimulat per nombroses rutes que són independents de p53 i que múltiples factors de transcripció, ubiquitina lligases i cinases, regulen la seva transcripció, estabilitat i localització cel·lular, regulant així la seva activitat. Per exemple, Ras afavoreix la transcripció de p21 tant dependent com independent de p53. Factors de transcripció com SP1, SP3 i STATs o KLF4/6 afavoreixen la transcripció de p21 [183]. D'aquests, l'array ha mostrat que en condicions proapoptòtiques hi ha una inducció de *stat6*, fet que concorda amb l'augment d'expressió de *p21* [185] en cèl·lules KB26.5-*bhfr1* a les 24 hores d'inducció de l'apoptosi.

Tot i que una part important del control de p21 és a nivell de transcripció, el control post-transcripcional juga un paper important en l'activitat de p21. La proteïna p21 acabada de sintetitzar és protegida de la degradació proteosomal gràcies a Fkbp1. p21, si no es troba unida a PCNA o CDK1, és degradada independentment d'ubiquitinació [169]. Diversos factors afecten l'estabilitat de p21. En resposta a l'estrès oxidatiu JNK s'activa i promou l'aturada del creixement inhibint la ubiquitinació de p21. A més, un gran nombre de virus regulen l'estabilitat de p21 i afecten la progressió del cicle cel·lular i l'apoptosi. La fosforilació de p21 també causa canvis en la seva estabilitat i en la seva localització. La localització nuclear de p21 té efectes sobre l'aturada del cicle cel·lular, mentre que al citosol exerceix una funció antiapoptòtica. Nombroses cinases fosforilen p21 i regulen la seva funció. Per exemple, Akt/PKB fosforila p21 a la Thr145 trencant la unió amb PCNA i induint la seva acumulació al citoplasma. Aquesta acumulació promou la supervivència cel·lular [183].

Una altra funció coneguda de p21 és la inhibició de l'apoptosi. A través de la seva capacitat de promoure l'aturada del cicle cel·lular. p21 pot protegir davant danys genotòxics o a microtúbuls, ja que és necessari un cicle actiu per sentir aquests agents i conduir l'apoptosi. També pot actuar sobre l'apoptosi en resposta a estímuls com la falta de factors de creixement. Sota aquestes condicions l'apoptosi no depèn de la progressió del cicle cel·lular, per tant, l'activitat antiapoptòtica de p21 no pot ser atribuïda als seus efectes citostàtics. En canvi, pot ser deguda a l'habilitat de p21 a regular la transcripció

gènica a través de múltiples interaccions proteïna-proteïna o a través del seu rol en la reparació del DNA. p21 al citoplasma s'uneix i inhibeix l'activitat de proteïnes directament involucrades en la inducció de l'apoptosi incloent la procaspasa 3, caspasa 8, caspasa 10, *Stress-Activated Protein Kinases* (Sapk) i *Apoptosis Signal-regulating kinase 1* (Ask1/Mapk3ks) [183, 186, 187]. Les diferents funcions de p21 es resumeixen a la figura 50. Aquesta capacitat antiproliferativa i antiapoptòtica de p21 ha estat utilitzada en cultius *in vitro* de CHO per tal d'incrementar la productivitat d'anticossos monoclonals [188, 189].



**Fig. 50.- Esquema del paper de p21 en el cicle i mort cel·lular.** Sota condicions no estressants, p21 es troba expressada a baixos nivells i promou la progressió del cicle cel·lular. En condicions d'estrès, l'expressió de p21 es veu incrementada a través de vies dependents i independents de p53. p21 interacciona amb ciclines/Cdks inactivant-les. Akt fosforila i estabiliza p21 ajudant a la supervivència cel·lular. p21 inhibeix l'apoptosi interaccionant amb molècules proapoptòtiques com la caspasa 3 o ASK1 [192].

En les dues condicions analitzades, les cèl·lules d'hibridoma KB26.5-*bhrf1* veien el seu cicle cel·lular alterat, de tal manera que la divisió cel·lular quedava aturada. El fet que *p21* en una situació incrementi la seva expressió mentre que en una altra la disminueixi es podria interpretar com que el mecanisme d'aturada del cicle cel·lular en G<sub>1</sub> en que es veuen involucrades les cèl·lules en el cultiu en discontinu i en condicions inductores de l'apoptosi fos diferent. En condicions d'inducció de l'apoptosi per falta de glutamina la proteïna codificada per *p21* aturaria la transició entre la fase G<sub>1</sub> i S, mentre que en el

cultiu en discontinu la transició entre  $G_1$  i S es veuria afavorida per la repressió d'altres gens involucrats en el cicle cel·lular. En aquest sentit, el gen *cdc6* es veia reprimint 0,4 cops a l'*array*. La proteïna Cdc6 és un regulador de la replicació del DNA en mamífers i la seva repressió bloqueja l'entrada a la fase S del cicle [190, 191]. La repressió de *rb1* i de *tfdp1* també pot explicar els canvis experimentats en el cicle cel·lular, ja que la proteïna retinoblastoma (Rb) és un dels principals substrats de les ciclines/Cdk. L'estat de fosforilació de Rb juga un paper essencial en el control de l'activitat transcripcional de E2f i la conseqüent entrada en la fase S, modulant el pas a través del punt de restricció en els estadis finals de la fase  $G_1$ . Durant l'etapa  $G_1$  el retinoblastoma es troba hipofosforilat unit a E2f. A mesura que les cèl·lules avancen per aquesta etapa queda hiperfosforilat per acció dels complexos ciclina D/Cdk4 i ciclina E/Cdk2, de tal manera que E2f s'allibera i actua com a factor de transcripció d'elements necessaris per la progressió cap a la fase S, com *ciclina E* i *ciclina A*. Per dur a terme la seva funció, E2f s'ha d'unir al factor Dp1 (codificat pel gen *tfdp1*) que permet unir-se al DNA [123, 184]. La repressió de *tfdp1* també es va observar en les 24 hores de cultiu en discontinu amb falta de glutamina, indicant que, a més de *p21*, altres elements implicats en el cicle cel·lular, i més concretament en la transició de la fase  $G_1$  a S, es veien alterats.

El gen *pcna* es trobava reprimint també a les 96 hores de cultiu en discontinu. La proteïna PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) interacciona amb proteïnes essencials del cicle cel·lular com ciclina D/Cdk4,6, ciclina E/Cdk, ciclina A/Cdk2 i, per tant, és important pel control del cicle cel·lular, així com per la replicació i reparació del DNA. p21 és capaç d'interaccionar a través del seu extrem C-terminal impedint que PCNA interaccioni i activi la DNA polimerasa  $\delta$  [193, 194], per tant la repressió de *pcna* tindria conseqüències en la transició de la cèl·lula a través de les fases del cicle cel·lular.

La repressió del gen *cdk4* 0,5 cops pot explicar també el canvi en el perfil de cicle observat en les 96 hores del cultiu en discontinu, ja que la proteïna Cdk4 és una cinasa dependent de ciclina essencial per la progressió del cicle en la fase  $G_1$  al formar el complex ciclina D/Cdk4 i tenir com a substrat per la fosforilació el complex Rb/E2f. També va aparèixer en aquestes condicions la repressió del gen codificant per la cinasa dependent de ciclina 1 (*cdk1*). La proteïna Cdk1 forma complexos amb la ciclina A i B i és responsable de la progressió de la fase  $G_2$  i de la mitosi [184].

Es va observar que la ruta Raf-Mek-Erk es veia alterada, ja que el gen *mapk1/erk* es trobava induït 1,7 cops. Aquesta ruta està involucrada en nombrosos processos cel·lulars, com en el cicle cel·lular a través de l'activació de la ciclina D/Cdk4, 6, en la supervivència cel·lular per la inhibició de Par-4 (el qual és un repressor de la transcripció de *bcl2*). A més, Raf-Mek-Erk pot activar la ruta PI3K/Akt que, entre altres accions, promou la supervivència cel·lular a través de la repressió de Bad i Bim i induint l'activació de NF-κB, així com en la regulació de la ciclina D i p21 [122, 195-198]. Erk 1/2 també té com a diana de la seva fosforilació a Tsc1 i Tsc2 de la ruta mTOR, causant la seva inactivació, permetent d'aquesta manera que mTORC1 incrementi la seva activitat [199].

La resposta de la cèl·lula als canvis ambientals és induïda, en part, per diversos grups de rutes de senyalització intracel·lulars. Les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) es troben en aquesta família de senyalització de proteïnes. Les senyals de proliferació són principalment transmiseses per les proteïnes Raf-Mek-Erk, mentre que les senyals d'estrès estan canalitzades per JNK. La ruta c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) representa un subgrup de MAP cinases que és activada principalment per citocines i per exposició a estrès ambiental. Estímuls específics com l'oxigen reactiu desencadenen l'activació de JNK. El paper de JNK en l'apoptosi es situa a cavall entre la ruta extrínseca i intrínseca. L'activació de JNK es tradueix en la translocació al nucli, on fosforila c-Jun, que porta a la formació de AP-1, factor involucrat en la transcripció de diferents gens relacionats amb l'apoptosi com *bim*. JNK també té un paper important en la modulació de les funcions de proteïnes pro i antiapoptòtiques localitzades al mitocondri. JNK activat passa al mitocondri i intervé mitjançant un mecanisme encara no elucidat, en l'alliberació del citocrom *c*. JNK es pot veure inhibida per Erk i per Akt [200, 201]. També intervé en l'activació de Bid independentment de la caspasa 8, formant jBid, que al mitocondri allibera Smac/Diablo, que és una proteïna proapoptòtica. També modula l'activitat d'altres proteïnes proapoptòtiques amb dominis BH3 únics com Bim. Bim és fosforilada i s'allibera del complex motor de les dineïnes, de tal manera que pot activar Bax/Bak i neutralitzar l'activitat antiapoptòtica de Bcl-2 [202, 203]. Bad també és fosforilada per JNK afavorint el seu efecte proapoptòtic. Cal recordar que Bad fosforilada per Akt/PKB es troba segrestada per proteïnes 14-3-3, però al ser fosforilada per JNK s'allibera. Bcl-2 també és substrat de JNK sent fosforilat a la Ser70, inhibint el seu efecte antiapoptòtic [204]. JNK ajuda a activar a Bax, fosforilant les proteïnes 14-3-3. La fosforilació d'aquests grups de proteïnes també comporta l'alliberació d'altres proteïnes proapoptòtiques, com els factors de transcripció FoxO, que estimulen la transcripció de *bim* [201]. El fet de trobar el gen *jun*

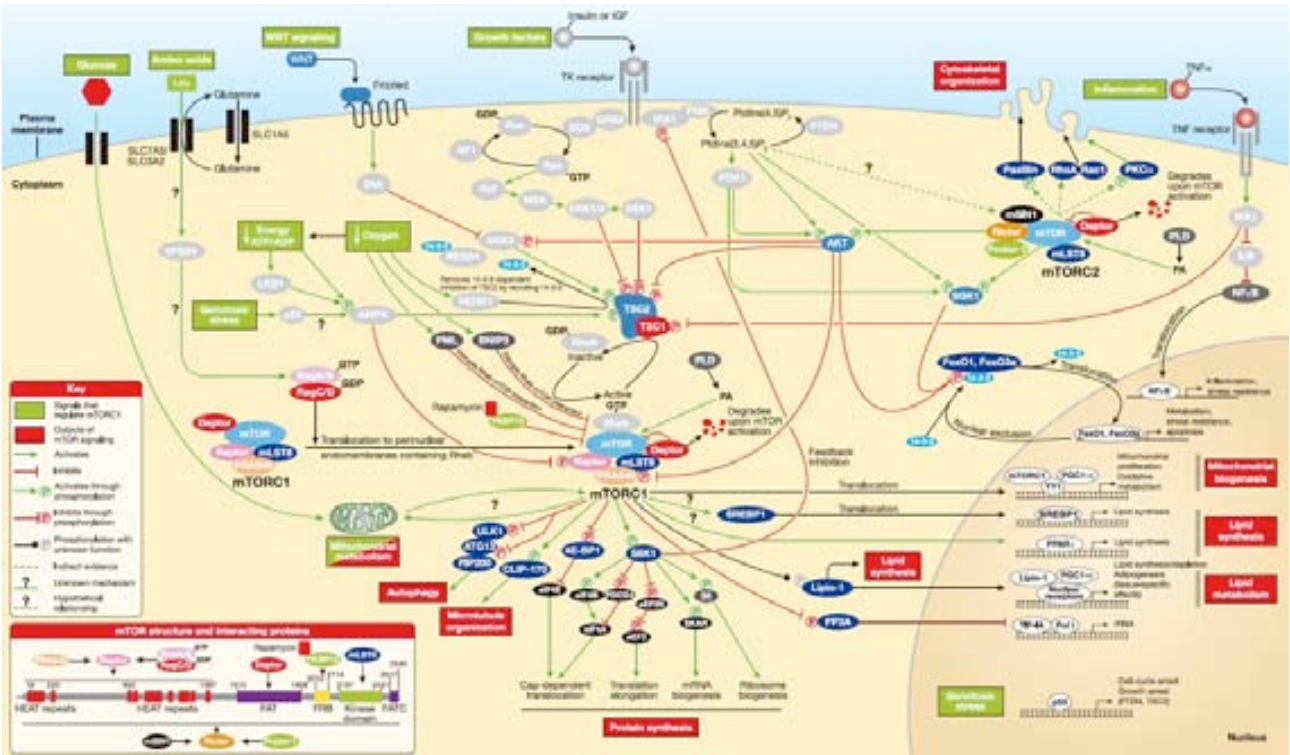


reprimint a les 96 hores de cultiu en discontinu pot indicar que JNK tindria menys efecte sobre l'activació de gens proapoptòtics, a l'igual que sobre la repressió de gens antiapoptòtics.

Pel que fa a les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi, es va observar repressió de *foxo6*. FoxO és un grup de factors de transcripció que intervenen en nombrosos mecanismes cel·lulars com la divisió cel·lular, la mort cel·lular, el metabolisme de glucosa, la reparació del DNA i la diferenciació cel·lular. Quan hi ha presència de factors de creixement, FoxO es troben al citosol segrestats per 14-3-3 gràcies a la fosforilació a través de la ruta PI3K/Akt, mentre que en absència de factors de creixement, els factors de transcripció FoxO estan actius. Aquests també responen a estímuls d'estrès per la fosforilació de JNK [205]. Com s'ha esmentat anteriorment, una de les dianes importants de les proteïnes FoxO és el membre proapoptòtic Bim, de la família de Bcl-2 [206].

Tant a les 96 hores de cultiu en discontinu com a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi, es va observar una expressió diferencial de gens relacionats amb la ruta Akt i mTOR per la inducció dels gens *akt*, *tsc1*, *tsc2* i *s6k1* i la repressió de *rheb*. Aquestes rutes es troben interrelacionades (figura 51), i formen un nus central en la senyalització intracel·lular de factors de creixement, citocines, nutrients i altres estímuls. Akt s'activa per l'acció de PDK1 unida a PIP3. Un cop Akt és fosforilada i activa es veu involucrada en reaccions relacionades amb la supervivència cel·lular, el creixement cel·lular, el metabolisme i la proliferació cel·lular entre altres. Akt inhibeix a Bad, també impedeix que els factors de transcripció FoxO transcrivin per Bim i inhibeixen la p53 a través de l'activació de Mdm2. També fa que proteïnes implicades en el cicle com p21 i p27 quedin inhibides. Akt inhibeix a Gsk3, que és un inhibidor del membre antiapoptòtic Mcl-1, inhibint, per tant, el processament de la procaspasa 9, però també és capaç de fosforilar la caspasa 9, disminuint la seva activitat. Pel que fa a la seva activitat relacionada amb la proliferació cel·lular, a més d'inhibir p21, Akt inhibeix Gsk3, fent que aquelles proteïnes inhibides per aquest factor com c-myc o la ciclina D s'alliberin [108, 122, 207]. Akt es veu implicada en la regulació del factor de transcripció NF-κB, el qual és un important modulador de gens antiapoptòtics i de supervivència, com *bcl2* o *bclxl* [208]. La regulació de NF-κB es dona per la regulació de la molècula inhibidora IκB associada al factor de transcripció. IκB es veu fosforilada per la cinasa IKK, fet que promou la

degradació de I $\kappa$ B, alliberant NF- $\kappa$ B. La IKK pot ser activada per diferents cinases, entre elles Akt [177].



**Fig. 51.- Esquema de la ruta Akt/mTOR.** Senyals que regulen la ruta Akt, així com mTOR i les implicacions en l'expressió gènica, la síntesi de proteïnes i la viabilitat cel·lular [209].

Una de les funcions més importants d'Akt és la de promoure el creixement cel·lular. Aquest paper el du a terme a través de l'activació del complex 1 mTOR (mTORC1). mTOR es veu regulat negativament per les proteïnes Tsc1 i Tsc2, les quals són inactivades per la fosforilació de Akt, permetent que la proteïna Rheb, que es veia inhibida per Tsc1 i Tsc2, quedi activa i pugui fosforilar i activar mTOR. Un cop mTOR és actiu pot fosforilar s6k1 i 4eBP1, gràcies a la proteïna Raptor que permet que mTOR accedeixi a aquests substrats. D'aquesta manera s6k1 queda activada i 4eBP1 es veu inactivada promovent la síntesi proteica, el creixement cel·lular i la divisió cel·lular. En absència d'aminoàcids, el complex mTOR-Raptor evita que mTOR s'uneixi als seus substrats. En presència d'aminoàcids, un canvi conformacional promou la interacció entre Raptor i els substrats de mTOR i la seva accessibilitat. Cal dir que, tot i que l'inhibidor de mTOR, rapamicina, indueix la dissociació entre Raptor-mTOR, la falta d'aminoàcids no altera aquesta associació [210, 211]. La inhibició de mTOR per rapamicina indueix a una forta aturada de les cèl·lules B i T en la fase G<sub>1</sub> [212]. L'increment d'expressió de *tsc1* i *tsc2*, els quals són els inhibidors de mTOR, pot estar exercint un mecanisme similar al de la rapamicina. mTOR es veu regulada a més de per Akt, per nutrients, especialment

aminoàcids i factors de creixement. La falta d'aminoàcids resulta en una defosforilació de s6k1 i 4eBP1. La presència d'aminoàcids activa mTOR a través de l'acció de les proteïnes Rag interaccionant amb Raptor [213]. La inactivació de Tsc1-Tsc2 confereix resistència a la cèl·lula davant la falta d'aminoàcids. L'estat energètic de la cèl·lula a través de l'activació de AMPK també regula mTOR, ja que AMPK s'activa en resposta a un estat energètic baix, és a dir, quan hi ha una relació AMP/ATP elevada. L'activació de AMPK redueix els processos cel·lulars amb elevada demanda energètica, com és el cas de la síntesi proteïca, mTOR queda doncs inhibida per AMPK [211].

L'estudi de mTOR en diferents línies cel·lulars ha conduït a l'observació de que és una ruta destacada en el manteniment de la viabilitat del cultiu cel·lular. La sobreexpressió de mTOR en cèl·lules CHO redueix el procés de mort cel·lular en cultius d'alta densitat i condueix a la millora de la productivitat específica [214].

En els resultats obtinguts de l'expressió gènica diferencial en aquest treball, pel cas de les 96 h del cultiu en discontinu s'observa que *akt* es troba induït de tal manera que gens relacionats amb aquesta ruta queden també induïts com és el cas de *tsc1* i *tsc2*, afavorint una major resistència a la falta d'aminoàcids. També *mdm2* es troba sobreexpressat, mentre que gens implicats en la proliferació cel·lular, que es podria esperar que estiguessin també induïts, com la ciclina D, no estan alterats. És més, queden reprimits gens implicats en la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular contràriament a l'efecte proliferatiu de Akt. Sembla doncs, que en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 96 hores de cultiu en discontinu, Akt ofereix un important efecte impedit la mort cel·lular programada

Estudis d'expressió de gens implicats en l'apoptosi realitzats al laboratori de la Dra. Yap [215, 216], utilitzant microarrays en cultius en discontinu i discontinu alimentat utilitzant cèl·lules CHO, varen mostrar un perfil similar als resultats obtinguts en aquest treball de tesi, pel que fa a l'expressió diferencial de gens que codifiquen per proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP i NAIP). També varen determinar que es donava una inducció de *bim* i *bad* en condicions de manca de citocines i en fase estacionària del cultiu en discontinu. En aquest treball s'aprecia tant un increment en l'expressió de NIAPs com *birc1b* i es veuen augmentats els nivells de *bak*, mentre que en el cas del gen *bad* no es veuen alteracions en la seva expressió. Un altre punt en comú és l'increment dels nivells d'expressió de la *caspasa* 8 i 12 en el moment de limitació de nutrients.

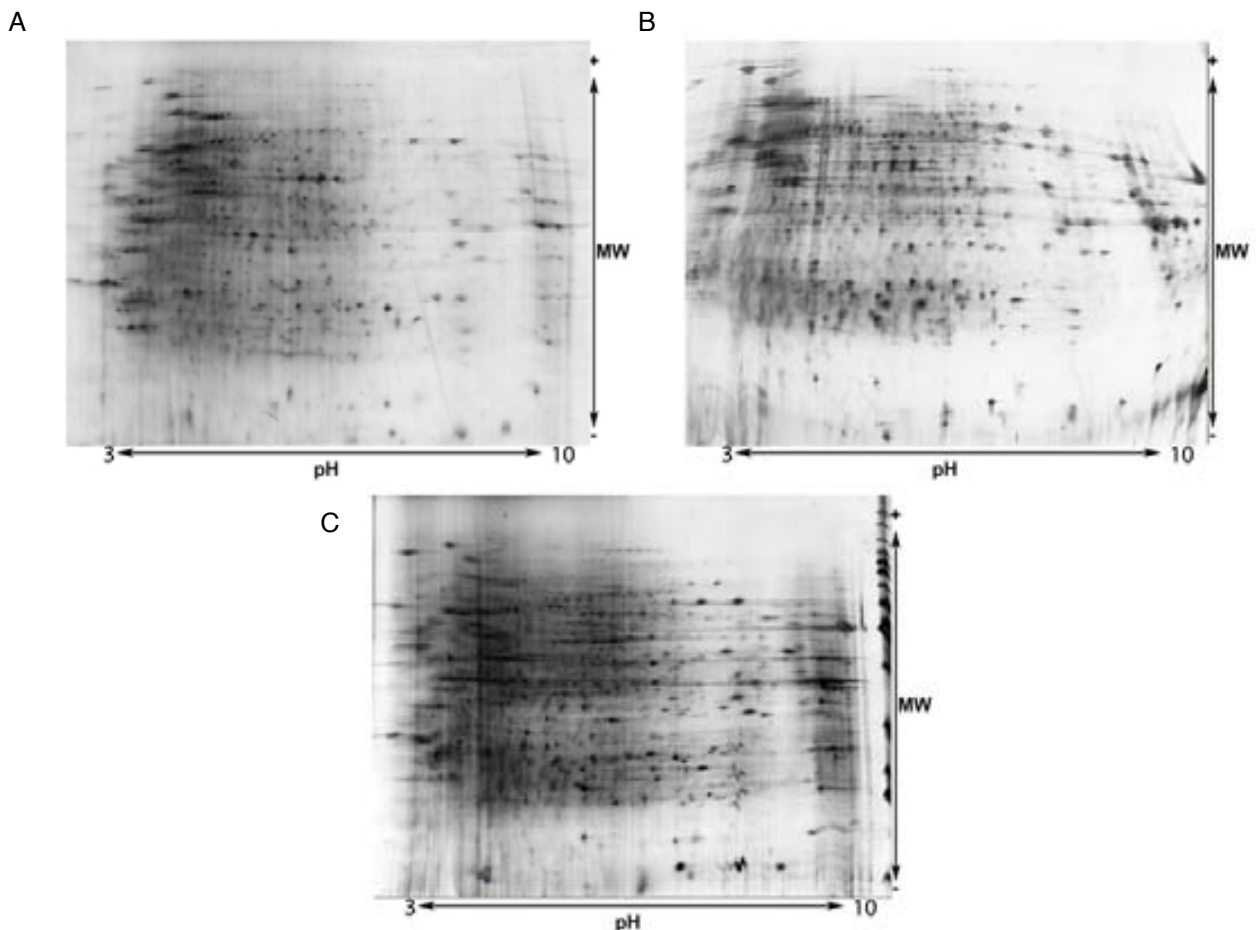
Més recentment s'ha fet un estudi d'expressió diferencial en cèl·lules NS0 transfectades amb *bcl2* en un cultiu en continu per part de Krampe [160]. En aquestes condicions també es varen observar alteracions en la família dels factors de transcripció Stat, en concret la repressió de *stat1*. Els gens proapoptòtics *bak*, *bim* i *puma* es veien induïts com també s'ha observat en aquest treball amb excepció de *bim*. També s'observen coincidències en les alteracions en la ruta PIP3K/Akt/mTOR i en factors que indueixen en una aturada del cicle en la fase G<sub>1</sub>.

## 2.2. EXPRESSIÓ PROTEICA

Per tal d'avaluar de forma més complerta la funció de *bhrf1*, es va fer un estudi del proteoma de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* en dues condicions diferents com són en cultiu en discontinu i en cultiu en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi. Es va analitzar el proteoma de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5 mitjançant gels 2D de proteïna total corresponents a cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf1* a les 96 hores del cultiu en discontinu (B') i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi (C'). Com a control, es van utilitzar amb les mostres obtingudes a les 48 hores d'un cultiu en discontinu (A') (veure la figura 46, pàgina 89). A la figura 52, es presenten tres exemples dels gels en 2D obtinguts per les condicions en que s'ha treballat. Es pot apreciar com hi ha un gran nombre de *spots* diferencials entre les condicions de final de cultiu en discontinu i amb inducció de l'apoptosi respecte les condicions control.

L'anàlisi dels resultats va mostrar una gran varietat de canvis en la intensitat del senyal, corresponent a una major o menor expressió proteica en les condicions estudiades. A la figura 53, es pot observar una representació del senyal obtingut a les 48 hores de cultiu en discontinu, a les 96 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en condicions d'inducció de l'apoptosi. Es veu com en el cas 53A, una determinada proteïna apareix amb gran intensitat en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 96 hores de cultiu en discontinu, respecte a les condicions de 48 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores d'inducció a l'apoptosi. A la figura 53B, s'evidencia una alta expressió d'una determinada proteïna en les condicions d'inducció de l'apoptosi i a les 96 hores de cultiu en discontinu, i una nul·la expressió en les condicions control, és a dir, a les 48 hores de cultiu en discontinu. La figura 53C mostra un senyal inexistent en condicions de cultiu en discontinu a les 48 hores i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi, però una alta presència en les 96 hores de cultiu en discontinu. La figura 53D mostra una

situació inversa a la 53C, on la presència d'una determinada proteïna es fa patent a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi. Finalment, la figura 53E mostra una nul·la presència de senyal per una proteïna a les 96 hores de cultiu en discontinu i un senyal elevat a les 48 hores de cultiu, però la màxima intensitat apareix a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi. La gran variació de resultats va dificultar enormement l'estudi del proteoma per les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*.

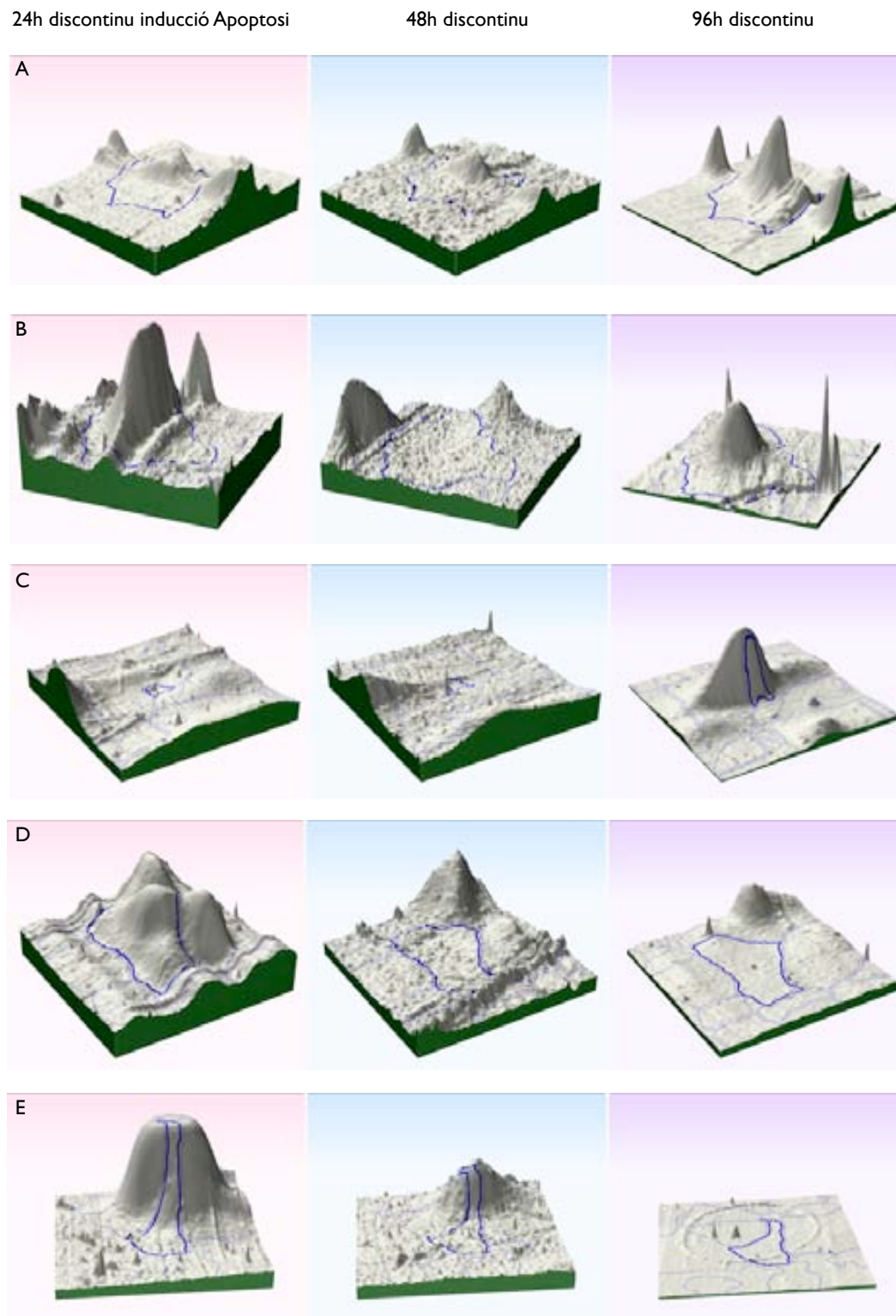


**Fig. 52.- Gel 2D tenyit on es mostren els *spots* diferencials expressats entre mostres de cèl·lules d'hibridoma KB26.5-*bhrf1* extretes a diferents temps de cultiu. A) Cultiu KB26.5-*bhrf1* obtingut a les 48 hores en discontinu (condició control), B) cultiu KB26.5-*bhrf1* a les 96 hores del cultiu en discontinu i C) a 24 hores en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi. Cada gel es realitza per triplicat.**

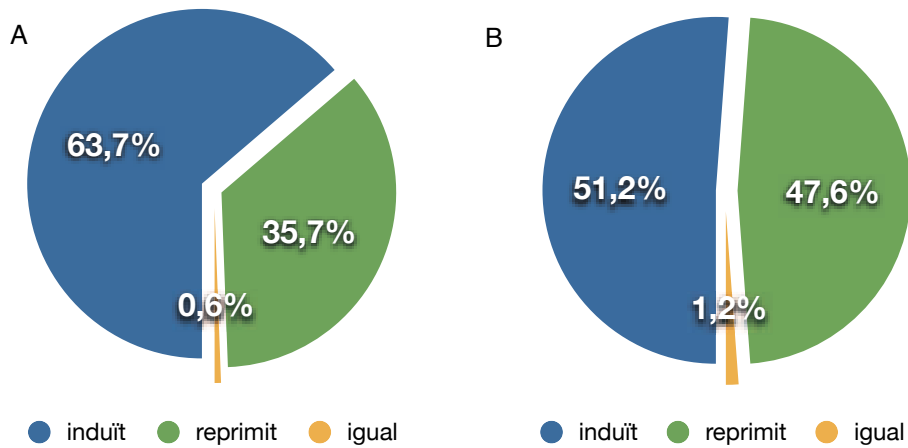
Dels 3764 *spots* diferencials obtinguts, les cèl·lules transfectades presenten un 63,7% de *spots* sobreexpressats respecte el control i un 35,7% de proteïnes reprimides, quan es trobaven a 96 hores d'iniciar el cultiu en discontinu, amb tan sols un 0,6% de proteïnes amb un mateix nivell d'intensitat. El cultiu en condicions d'inducció de l'apoptosi presentava un 51,2% de proteïnes sobreexpressades respecte la condició control i un 47,6% de proteïnes reprimides, presentant també un nivell de només un 1,2% de

proteïnes amb el mateix nivell d'expressió entre la condició control i la induïda a l'apoptosi (figura 54).

Es varen comparar les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, ja que la influència del gen víric és més notable tan sols en moments on les condicions són adverses i suposen un estrès per la cèl·lula, conferint la resistència a l'apoptosi, és aquí que es va voler conèixer quines alteracions proteiques provocava. Es varen observar una gran quantitat d'alteracions diferencials entre els diferents estadis d'un mateix cultiu en discontinu i del cultiu en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi, probablement perquè es veuen canvis en proteïnes responsables de metabolisme, de cicle, apoptòtiques i estructurals. Cal, doncs, aprofundir més en aquesta estratègia per tal d'acotar aquells *spots* representatius i que aportin informació valuosa respecte les alteracions en el proteoma exercides per BHRF1. L'objectiu d'aquest experiment era el d'obtenir un perfil d'expressió d'aquelles proteïnes que es veiessin alterades degut a l'acció de BHRF1. Idealment, el canvi en les proteïnes que incrementessin o disminuïssin el seu nivell d'expressió hagués hagut de ser d'un nombre reduït. Malauradament, els resultats obtinguts mostren una gran quantitat de *spots* diferents entre les dues condicions assajades respecte la condició control. Aquesta situació no permet extreure cap conclusió directa, més enllà de constatar que en les dues condicions de cultiu estudiades hi ha tendència a incrementar la presència de proteïnes, ja sigui perquè no estaven expressades en les condicions control o perquè hi ha hagut un increment en la seva expressió, indicant la gran variabilitat i alteracions ocasionades pel temps de cultiu i per les condicions adverses que influeixen en la senyalització de l'apoptosi.



**Fig. 53.- Intensitat del senyal corresponent a proteïnes que s'expressen de forma diferencial a les 48 hores de cultiu en discontinu, a les 96 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu amb inducció a l'apoptosi.** A) Proteïna expressada a les 48 hores, però es veu incrementat el seu senyal a les 96 hores de cultiu B) Proteïna induïda en condicions de limitació de cultiu, amb major senyal a les 24 hores de cultiu en medi sense glutamina C) Proteïna amb senyal a les a les 96 hores de cultiu D) Proteïna amb senyal únicament a les 24 hores de cultiu en discontinu en condicions inductores de l'apoptosi E) Proteïna amb senyal a les 48 hores de cultiu en discontinu i que incrementa el seu senyal a les 24 hores de cultiu en discontinu en condicions inductores de l'apoptosi.



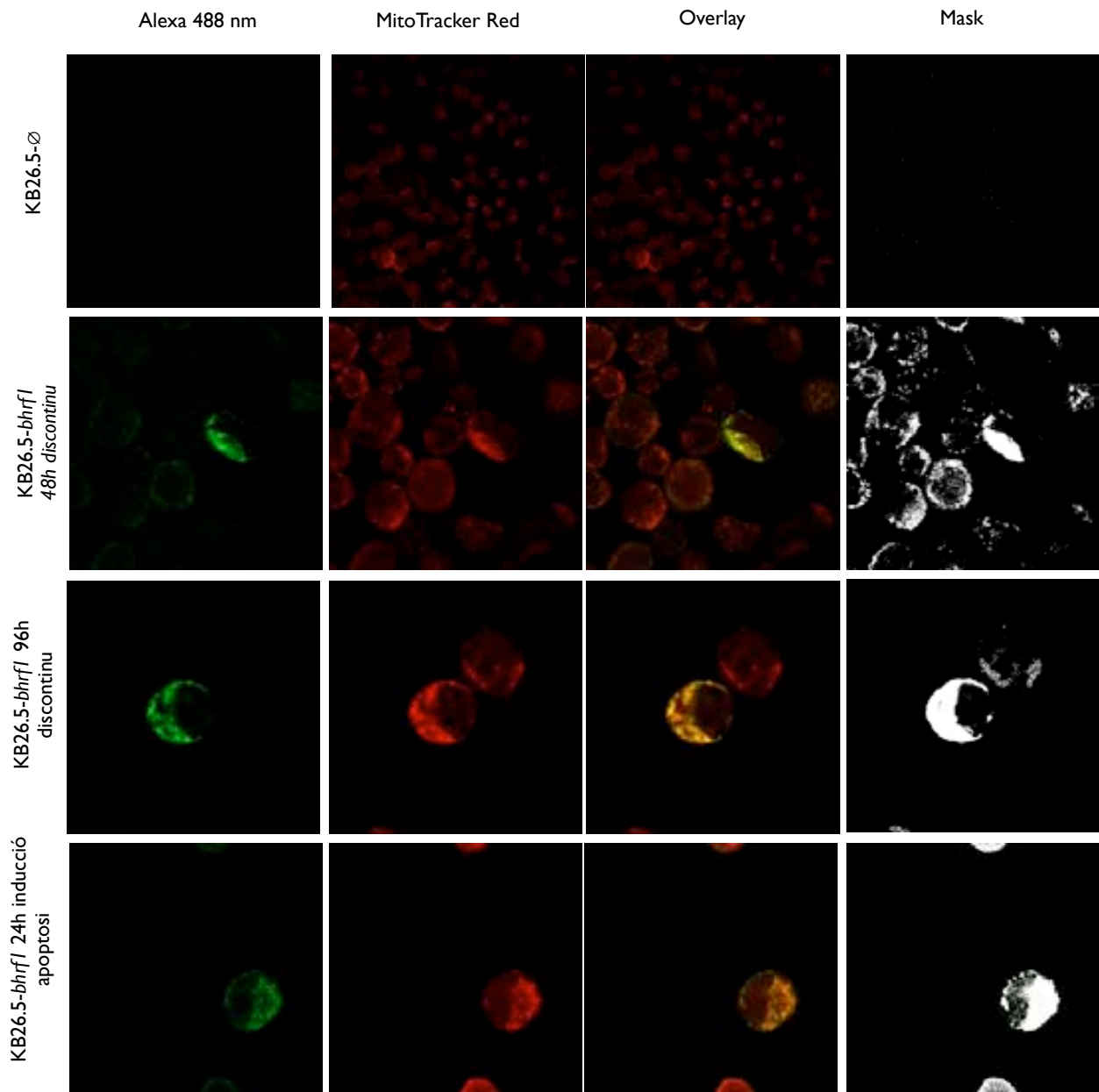
**Fig. 54.- Distribució dels spots obtinguts a partir del bidimensional un cop analitzats els canvis entre les condicions de cultiu respecte el control.** A) 96 hores de cultiu en discontinuu, B) 24 hores de cultiu en medi sense glutamina. S'han utilitzat 500 spots diferencials amb una  $p < 0,05$ .

D'aquest estudi no es varen aconseguir resultats rellevants a l'analitzar el proteoma de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*. Per aquests motius es va optar per fer estudis més específics per tal de conèixer els efectes i les accions de BHRF1 a la cèl·lula. Aquesta reflexió va portar a l'estudi de la localització intracel·lular de BHRF1, ja que aquesta proteïna es preveu que es trobi situada al mitocondri per la seva estructura, i la seva localització intracel·lular guarda una relació directa amb la seva funció. Pot ser, però, que la seva posició variï segons el moment que es trobi en el cultiu cel·lular.



### 3. LOCALITZACIÓ DE BHRF1

La localització de BHRF1 a les cèl·lules es va estudiar per microscòpia confocal. Es va realitzar una tinció de les cèl·lules transfectades amb pIRES:*bhrf1* utilitzant l'anticòs monoclonal primari contra la proteïna BHRF1 específic per la regió BH2 de la proteïna [217], el qual havia estat conjugat covalentment amb el fluorocrom Alexa® 488. Es va utilitzar el làser d'excitació a 488 nm i una finestra d'emissió de 497-530 nm. La tinció de les mateixes cèl·lules es va completar amb la tinció dels mitocondris amb Mitotracker® CMXRos RED utilitzant el làser d'excitació a 579 nm i la finestra d'emissió d'entre 601-635 nm. També es va fer una tinció de nucli mitjançant el fluorocrom Hoescht 33342 amb el làser d'excitació a 350 nm i una finestra d'emissió de 455-500 nm (donant senyal a la zona del blau). El programa utilitzat per a realitzar el tractament de les imatges va ser el Leica Confocal Software (LCS). Es varen analitzar imatges tant per les cèl·lules no transfectades amb *bhrf1* com per les transfectades a diferents condicions de cultiu, a les 48 hores de cultiu en discontinu, a les 96 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores d'un cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi, per l'absència de glutamina al medi (figura 55). Com era d'esperar, les cèl·lules KB26.5-∅ no es va apreciar senyal per l'anticòs contra BHRF1 emetent a la zona del verd, mentre que en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, el senyal que dona el fluorocrom conjugat a l'anticòs es solapa amb el senyal que emet la tinció per mitocondris (senyal vermell), indicant que la proteïna es troba al mitocondri. També s'observa que la localització no varia segons l'estat del cultiu i que a les 24 hores d'inducció de l'apoptosi la proteïna es manté a la membrana mitocondrial. Els nivells alts del coeficient de Pearson en els estudis de col·localització indicaven un alt grau de col·localització entre la proteïna BHRF1 i el mitocondri en totes les condicions esmentades.

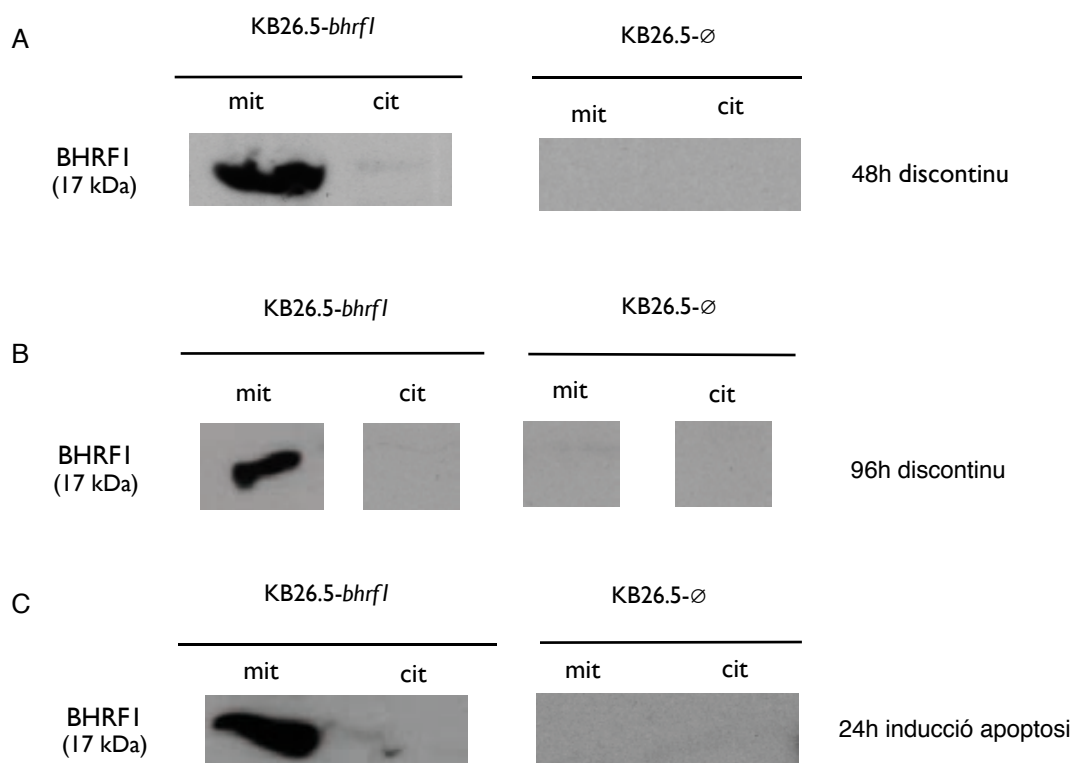


**Fig. 55.- Localització subcel·lular de la proteïna BHRF1 mitjançant microscòpia confocal.** Imatges obtingudes utilitzant immunofluorescència (IF) amb l'anticòs mAB anti-BHRF1 (1/500) marcat amb Alexa 488 nm que emet senyal a la regió de l'espectre del verd, la tinció dels mitocondris es realitza amb MitoTracker Red (1/2000). La localització es detecta al creuar els dos canals (*overlay*) i en passar la imatge a blanc i negre (*mask*).

En les cèl·lules KB26.5-∅, la col·localització és d'un 0,14%, amb un coeficient de Pearson de 0,13. En canvi, en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* es va obtenir un 95% de col·localització amb un coeficient del 0,63 a les 48 hores de cultiu. A les 96 hores, la col·localització era del 97,5% (coeficient de Pearson de 0,81) i en condicions de cultiu inductor de l'apoptosi el valor de col·localització va ser del 94% (coeficient de Pearson de 0,72). Aquests resultats són consistents amb anteriors estudis sobre la localització de BHRF1 [152] i amb el fet de que estructuralment BHRF1 presenta una regió composta per

aminoàcids hidrofòbics anàloga a la regió transmembrana de Bcl-2 [139], el qual també es troba principalment a la membrana mitocondrial externa [218-221].

Per confirmar aquests resultats, es va realitzar una separació de les fraccions citosòlica i mitocondrial, tant de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  com de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, i es va realitzar un estudi per Western Blot. Els resultats permeten comprovar que BHRF1, efectivament, no es troba en cap altre fracció que no sigui la mitocondrial en condicions de cultiu en discontinu i en discontinu inductor de l'apoptosi (figura 56).



**Fig. 56.- Localització subcel·lular de la proteïna BHRF1** utilitzant Western Blot (WB) amb l'anticòs mAB anti-BHRF1 (1/200) i utilitzant un anticòs secundari *rabbit anti mouse IgG2a* (1/1000) per les fraccions cel·lulars mitocondrial i citosòlica prèviament separades mitjançant el sistema *Mitochondria Isolation Kit* (Pierce). Resultats obtinguts de mostres a les A) 48 hores de cultiu en discontinu, a les B) 96 hores de cultiu en discontinu i a les C) 24 hores d'un cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi per la retirada de glutamina del medi de cultiu.

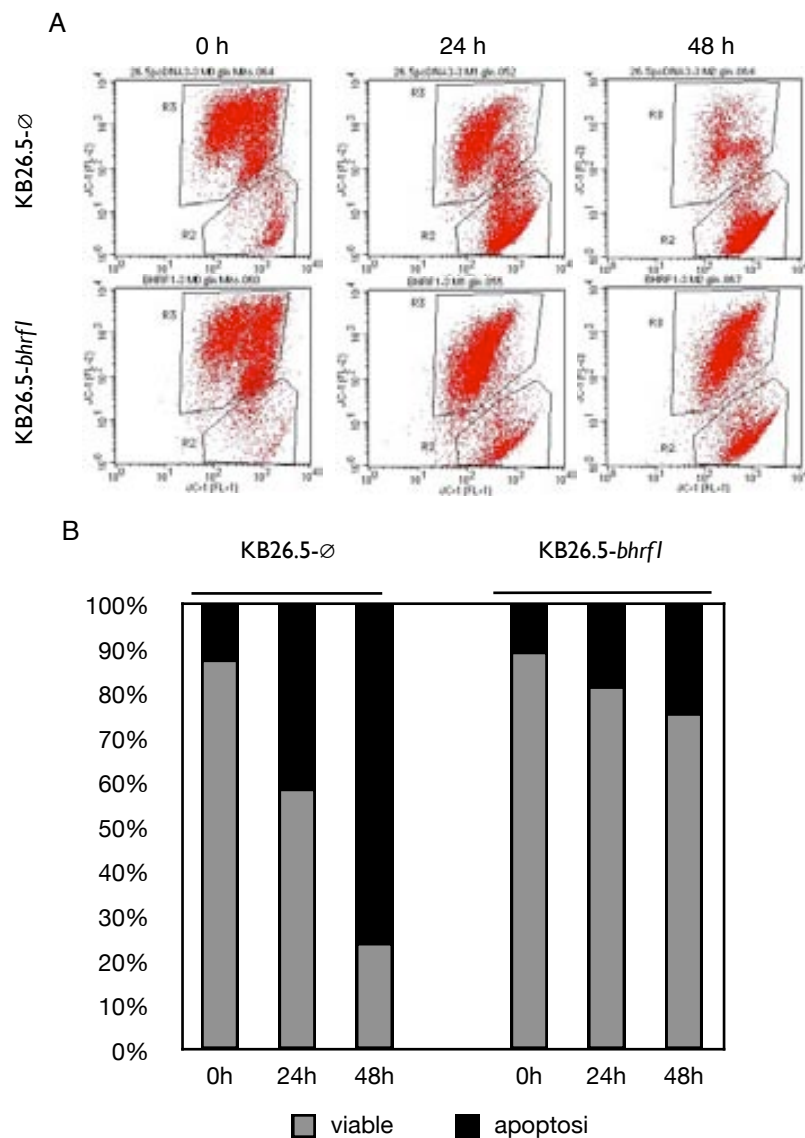
La integració de BHRF1 a la membrana mitocondrial és completa, ja que al fer la separació de la fracció mitocondrial i citosòlica la proteïna apareix tant sols en la fracció mitocondrial, indicant que la integració a la membrana mitocondrial externa és forta, com pot ser la de Bcl-2, i no feble com altres membres de la mateixa família, com pot ser el cas de Bcl-w, que es desancora de la membrana mitocondrial amb facilitat [222]. A més, la localització no varia un cop s'ha induït l'apoptosi, es manté a la membrana mitocondrial i

no migra cap al citosol o des d'aquest cap al mitocondri, com pot fer Bcl-w [222]. Queda clar, doncs, que la funció o funcions que pugui tenir BHRF1 per reduir l'apoptosi les desenvolupa des de la membrana mitocondrial.

Aquesta observació es va corroborar fent un seguiment de la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i KB26.5-*bhrf1* al llarg d'un cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi. Es varen marcar les cèl·lules amb el compost JC-1, ja que aquesta molècula permet distingir les cèl·lules que presenten mitocondris actius de les que han iniciat la permeabilització de la membrana mitocondrial externa. Es pot observar a la figura 57 com les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  perdien la integritat mitocondrial a l'iniciar-se el procés apoptòtic, assolint valors del 74% de cèl·lules apoptòtiques a les 48 hores d'inducció, mentre que les cèl·lules d'hibridoma amb BHRF1 suporten molt més bé les condicions inductores a l'apoptosi i a les 48 hores mantenen encara valors de viabilitat del 73%, proporció que les cèl·lules control no mantenen ni a les 24 hores (on presenten un 56% de viabilitat).

Agafant com a base que l'acció de BHRF1 està delimitada en el context mitocondrial, es va procedir a estudiar algunes de les proteïnes de la família de Bcl-2 més importants que intervenen en el procés apoptòtic, i que, a més, conflueixen al mitocondri.

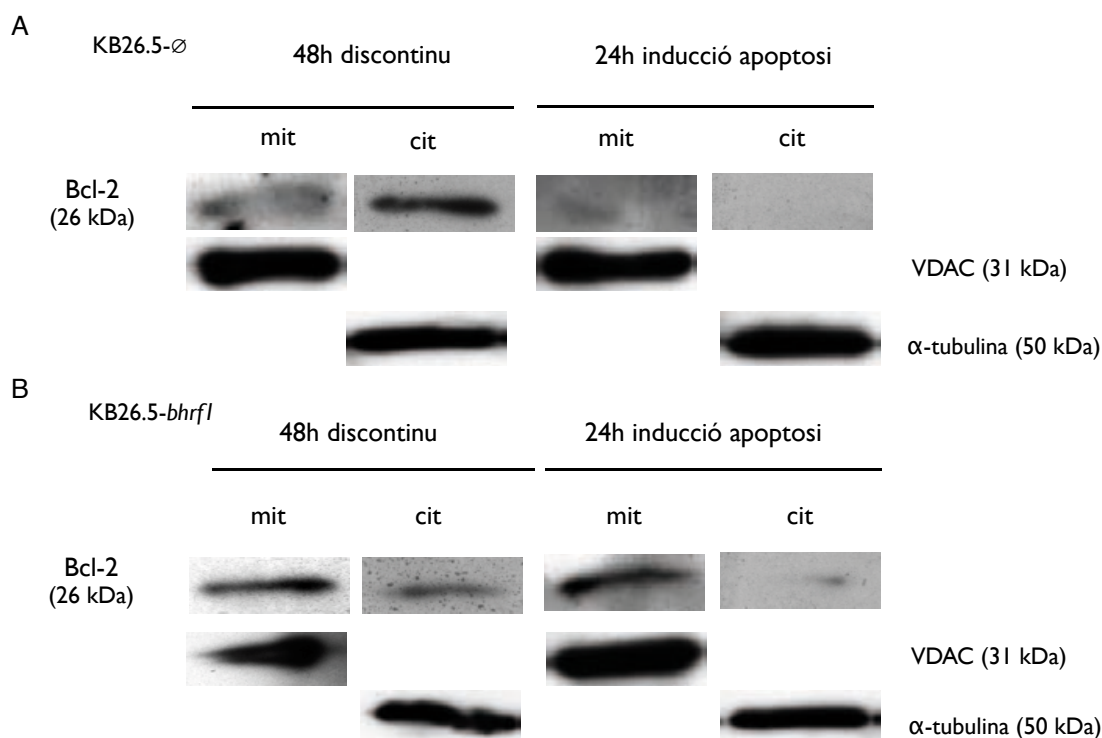
Es va estudiar la presència de Bcl-2 (figura 58) i es va observar com aquest era present majoritàriament a la fracció mitocondrial de totes les condicions amb que es va treballar, tal i com era d'esperar. En el cas de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ , s'observa una intensitat menor de proteïna en les condicions d'inducció a l'apoptosi respecte les cèl·lules que havien estat transfectades amb *bhrf1*, indicant una major conservació de la proteïna, ja que aquesta és substrat de caspases. També es podria donar el fet que a l'induir l'apoptosi, l'expressió de *bcl2* estigui augmentada tal i com s'ha esmentat en capítols anteriors i que, tot i que bona part de l'estructura mitocondrial en aquestes cèl·lules es conservi, hi hagi alguna activació residual de caspases activadores i efectores que actuïn sobre Bcl-2 i en degradin una petita part, però que a l'estar en una relació molt superior respecte les proteïnes proapoptòtiques, el seu efecte protector es mantingui. La presència de Bcl-2 observada a la fracció citosòlica pot ser deguda a una contaminació de la mostra amb fracció mitocondrial, encara que s'ha descrit presència de Bcl-2 a la membrana del reticle endoplasmàtic i a regions perinuclears [218, 219].



**Fig. 57.- Estabilitat mitocondrial** seguida per A) citometria de flux en cèl·lules KB26.5-∅ i transfectades amb BHRF1 en condicions d'inducció de l'apoptosi. Als histogrames trobem les cèl·lules viables (R3) i les apoptòtiques (R2). B) Gràfic dels resultats obtinguts per citometria de flux mesurant l'estabilitat mitocondrial al llarg d'un cultiu en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi.

Entre els principals responsables d'activar el procés de mort per apoptosi, es troben Bax i Bak, com ja s'ha explicat prèviament a la introducció d'aquest treball. Quan aquests es troben a nivell mitocondrial i són activats formen homooligòmers, de tal manera que contribueixen a la permeabilització de la membrana mitocondrial i a l'alliberació del citocrom *c* a l'espai citosòlic. Estudiant la localització de Bax, s'observa com aquest es troba tant a la fracció citosòlica com a la mitocondrial en condicions òptimes de cultiu, ja sigui en les cèl·lules KB26.5-∅ com en les transfectades amb el plasmidi pIRES:*bhrf1* (figura 59). Cal destacar, però, que en condicions inductores de l'apoptosi, en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* s'observa presència de Bax en ambdues fraccions cel·lulars, mentre que en les cèl·lules KB26.5-∅, la presència de Bax està restringida a la

fracció mitocondrial, indicant que BHRF1 no permet que Bax es fixi a la membrana mitocondrial per a dur a terme els passos que condueixen a la seva desestabilització.

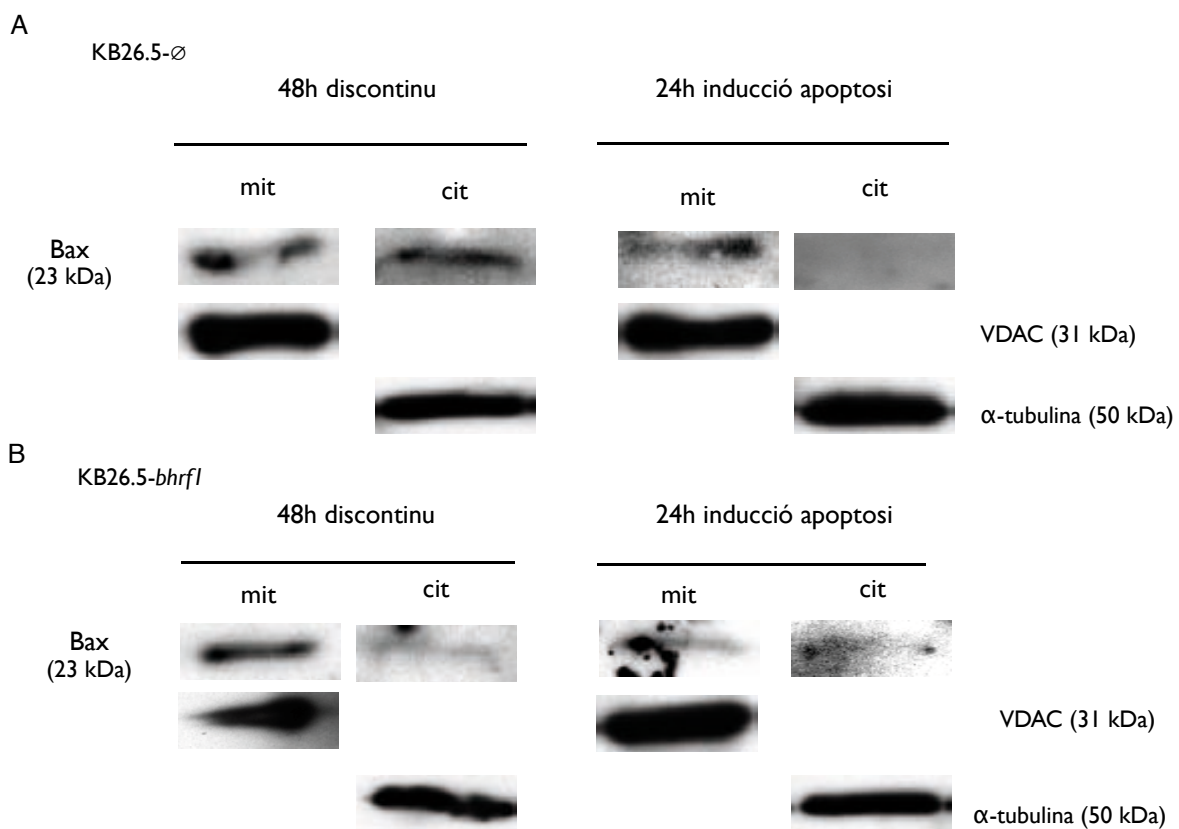


**Fig. 58.- Localització subcel·lular de la proteïna Bcl-2** mitjançant Western Blot (WB) en les cèl·lules KB26.5-∅ i en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 48 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi.

Pel que fa a Bak, no s'observa la presència d'aquesta proteïna en les fraccions citosòliques en cap de les línies ni condicions amb que es varen obtenir els extractes, tal i com es pot observar a la figura 60. Aquest resultat era d'esperar, ja que Bak és una proteïna completament mitocondrial.

Bim és una de les principals proteïnes amb un únic motiu BH3 activadores de les proteïnes proapoptòtiques amb motius BH1-BH4, com són Bax i Bak. Per aquest motiu, es va analitzar la presència de Bim tant en la seva forma Bim<sub>EL</sub> com Bim<sub>L</sub> en les fraccions mitocondrials i citosòliques de les cèl·lules KB26.5-∅ i KB26.5-*bhrf1* en condicions òptimes de cultiu. També en cada fracció cel·lular en les condicions d'inducció a l'apoptosi per cada línia com es mostra a la figura 61. Semblaria, però, que les cèl·lules KB26.5-∅ perdrien expressió de la fracció Bim<sub>L</sub> a l'induir-les a l'apoptosi.

Per confirmar que BHRF1 evitava la desestructuració del mitocondri, es va analitzar l'activació de la caspasa 3 i l'alliberament de citocrom *c* al citosol. Com es pot observar a la figura 62, la forma de procaspasa 3 és l'única present en condicions no apoptòtiques per a les cèl·lules no transfectades, mentre que aquesta sembla activar-se a caspasa 3 quan es produeix la inducció a l'apoptosi del cultiu. En canvi, les cèl·lules transfectades amb *bhrf1* presenten la forma de procaspasa 3 en les dues condicions de cultiu, i el que és rellevant és que en les condicions d'inducció d'apoptosi no sembla activar-se la caspasa 3.

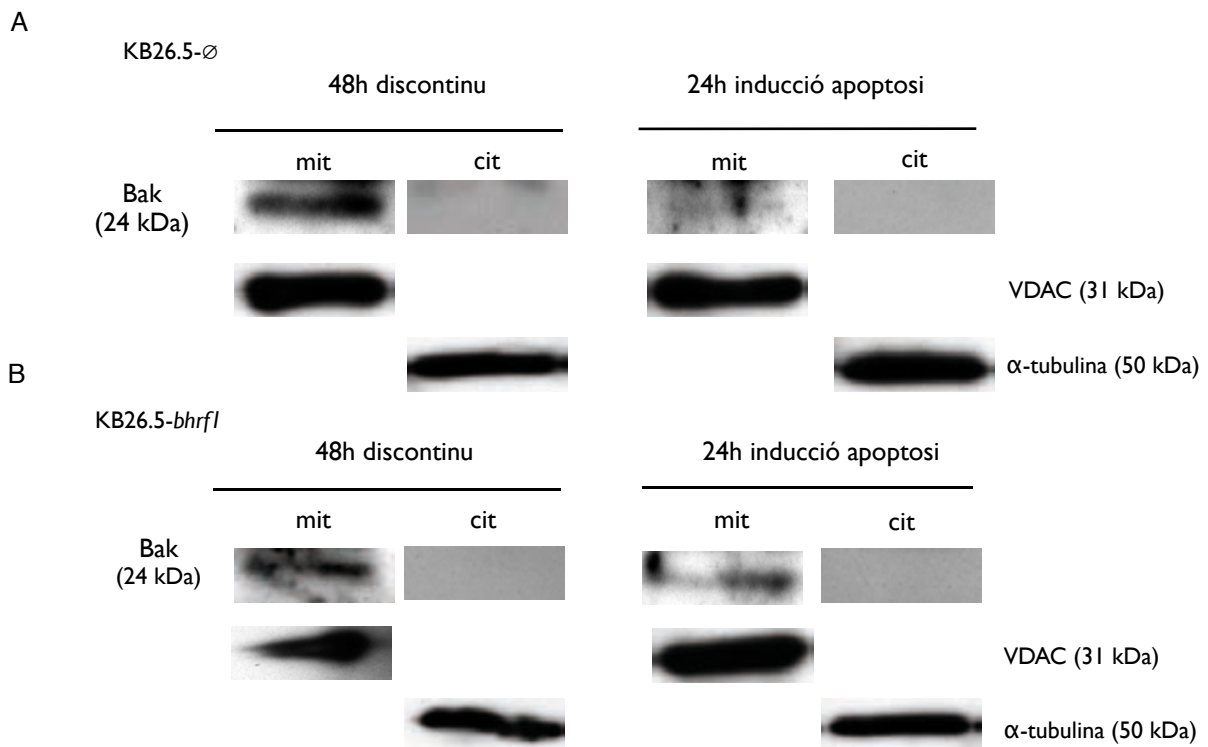


**Fig. 59.- Localització subcel·lular de la proteïna Bax** mitjançant Western Blot (WB) en les cèl·lules KB26.5-∅ i en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 48 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi.

La presència de citocrom *c* al citosol és evident en les cèl·lules no transfectades (figura 63) i s'observa clarament l'alliberament de citocrom *c* en condicions d'inducció de l'apoptosi. Al contrari, en les cèl·lules transfectades amb *bhrf1* no s'observa l'alliberament de citocrom *c*, en les d'inducció de l'apoptosi.

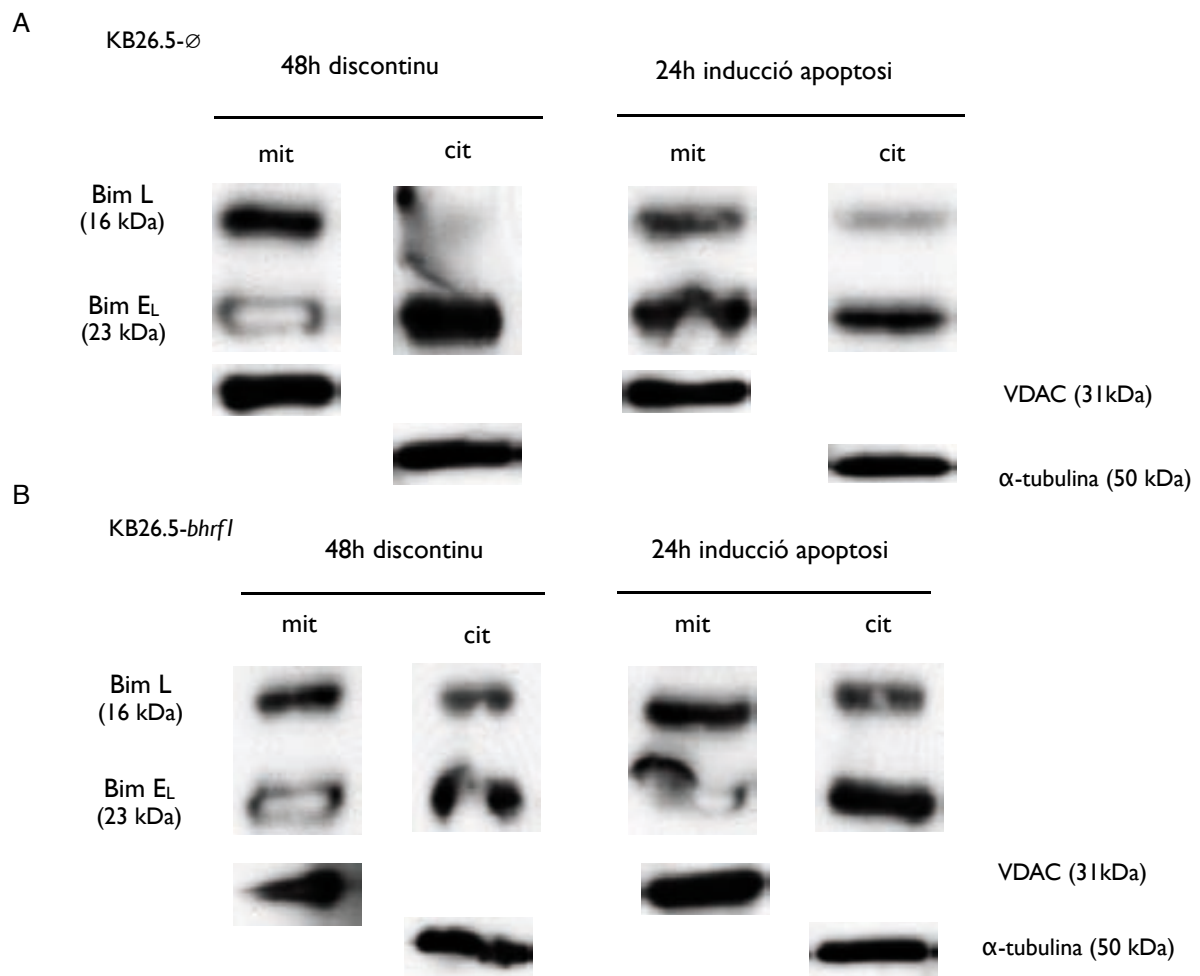
Considerant que l'apoptosi mitocondrial sembla iniciar-se quan les proteïnes BH3 úniques són alliberades per diferents senyals i s'uneixen a membres antiapoptòtics, de tal

manera que inhibeixen les seves funcions de retenir les proteïnes proapoptòtiques de múltiples dominis, així com alguns membres de domini únic BH3, els quals s'uniràn a determinats membres multidomini proapoptòtics, activant-los [173, 223, 224], es va voler estudiar com es desenvolupa aquest aspecte en les cèl·lules transfectades amb *bhrf1*. En les cèl·lules sanes, Bax tenia una presència tant al citosol com al mitocondri, mentre que en aquelles condicions on l'apoptosi es veia induïda, Bax majoritàriament canviava la localització per situar-se a nivell mitocondrial, ja que es veia activada. Aquest procés es va observar només en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ , ja que en les cèl·lules d'hibridoma que expressen BHRF1 la presència de Bax en la fracció mitocondrial no era apreciable. Cal tenir en compte que Bax passa de ser una molècula citosòlica a integrar-se al mitocondri quan s'activa [88], tot i que recentment s'ha vist que la proteïna antiapoptòtica Bcl-X<sub>L</sub> és capaç d'unir-s'hi i evitar que Bax s'integri a la membrana mitocondrial de forma permanent. És a dir, en condicions normals, Bax retrotransloca des del mitocondri al citosol i viceversa, sense unir-s'hi de forma estable gràcies a Bcl-X<sub>L</sub> que retorna Bax al citosol [225].

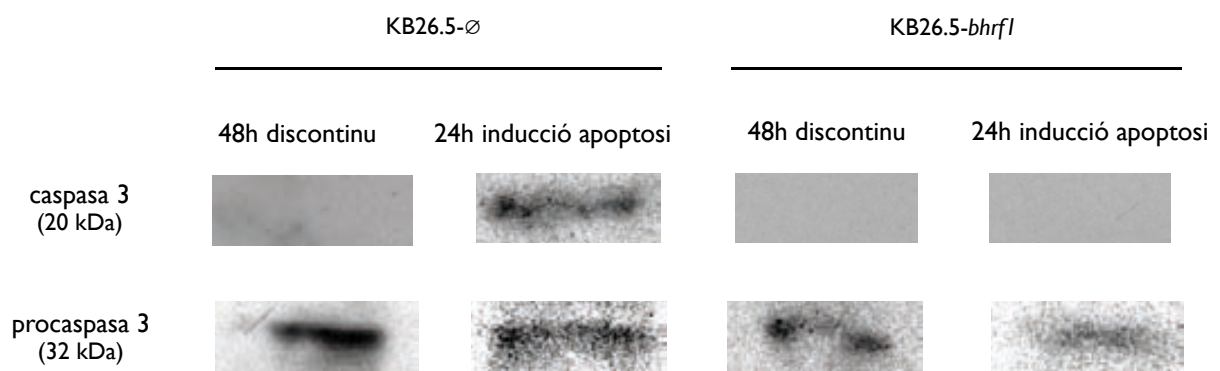


**Fig. 60.- Localització subcel·lular de la proteïna Bak** mitjançant Western Blot (WB) en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 48 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi.

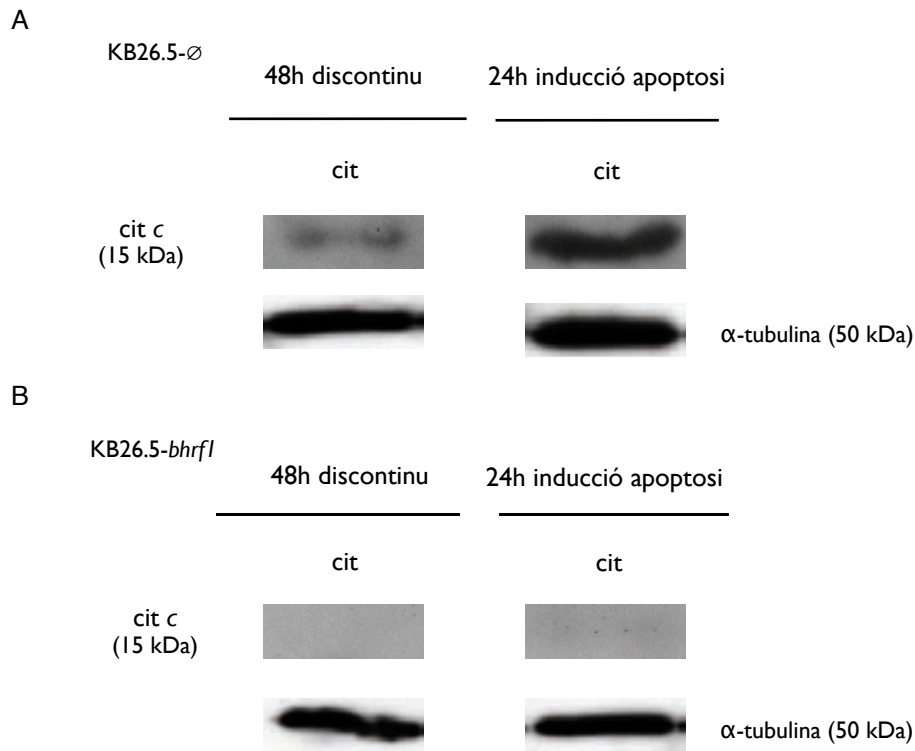




**Fig. 61.- Localització subcel·lular de la proteïna Bim** mitjançant Western Blot (WB) en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les 48 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi.

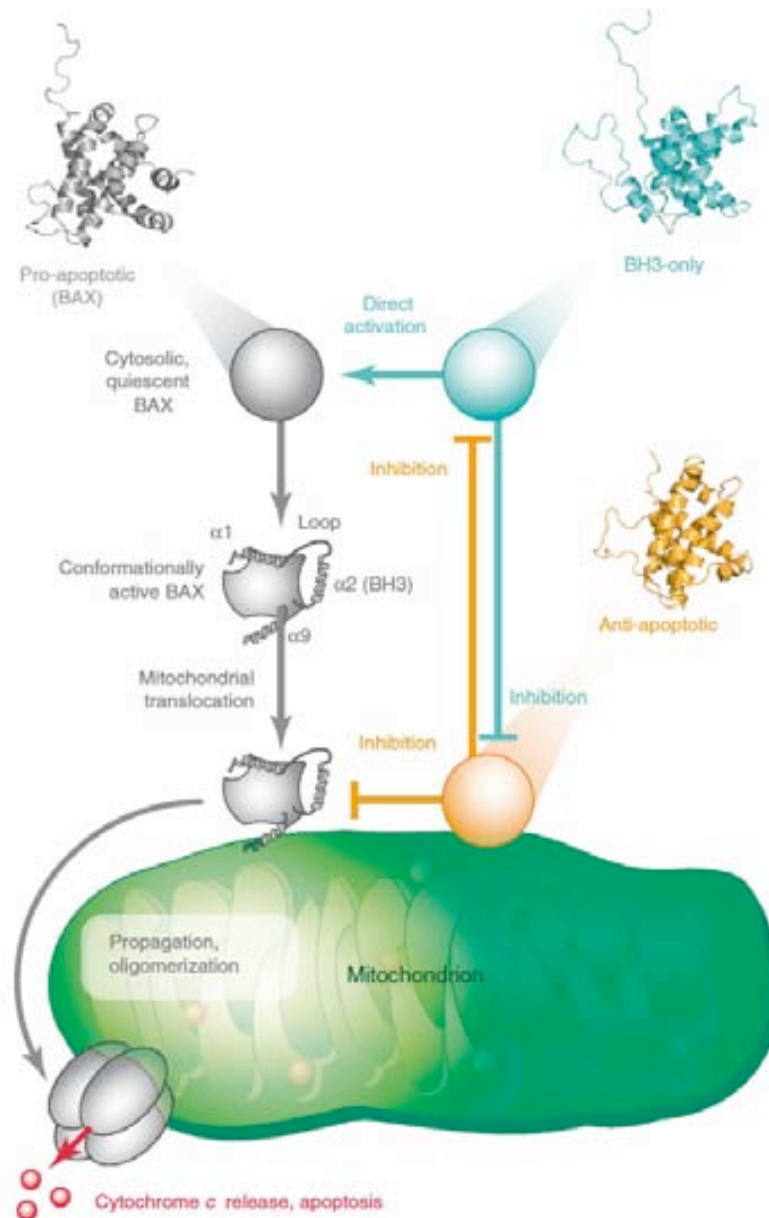


**Fig. 62.- L'activació de la caspasa 3 es produeix en les cèl·lules que no expressen BHRF1.** Expressió de la procaspasa 3 i caspasa 3 activada en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  i KB26.5-*bhrf1* en cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi.



**Fig. 63.- La presència de ciotrocrom c al medi intracel·lular és indicatiu de la pèrdua d'estabilitat mitocondrial.** Resultats de l'assaig per WB de la fracció citosòlica de les cèl·lules KB26.5-∅ i les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* en mostres recollides a les 48 hores de cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi.

El mecanisme d'activació de Bax encara no està completament definit, i és objecte d'estudi. En tot cas, es considera que, ja sigui per una activació directa o indirecta mitjançant proteïnes BH3 úniques activadores, el Bax citosòlic actiu canvia de conformació de tal manera que la seva regió transmembrana ( $\alpha 9$ ) queda exposada, alliberant el nucli hidrofòbic, a més d'exposar el seu domini BH3. Aquest canvi conformacional fa que s'integri a la membrana mitocondrial de forma estable i que Bcl-X<sub>L</sub> o Bcl-2 no s'hi puguin unir. Així, Bax actiu s'unirà amb altres Bax actius a la membrana mitocondrial formant homo-oligòmers. La forma amb que es formen aquestes supraestructures també és objecte de debat i de fet no es coneix el mecanisme exacte d'unió entre elles. S'ha observat unió a través del domini BH3 ( $\alpha 2$ ) amb el solc hidrofòbic així com per la regió hidrofòbica formada per les hèlixs  $\alpha 1$  i  $\alpha 6$ . En tot cas la conseqüència de l'homo-oligomerització és l'obertura d'un porus a la membrana mitocondrial alliberant part del contingut de l'interior, com ara el ciotrocrom c [98, 226-228] (Figura 64). També s'ha vist que Bax és objecte de fosforilacions per part de Akt/PKB impeding la seva integració al mitocondri, però també pot ser fosforilada per GSK-3 promovent la seva integració [177].



**Fig. 64.- Dinàmica de senyalització de la família de Bcl-2.** L'apoptosi mitocondrial està regulada per les interaccions a través dels dominis BH3 de les proteïnes apoptòtiques. Les proteïnes BH3 promouen l'activació de Bax a través de mecanismes directes i indirectes. Determinades proteïnes BH3 úniques s'uneixen directament a Bax i en desencadenen el canvi conformational, activant-se, translocant-se al mitocondri, permeabilitzant la membrana mitocondrial externa. Les proteïnes BH3 úniques també promouen l'oligomerització de Bax indirectament per la unió a la regió d'unió a BH3 de les proteïnes antiapoptòtiques, alliberant activadors BH3 únics així com formes conformationalment actives de Bax segrestades en un complex heterodimèric. Les proteïnes antiapoptòtiques eviten, doncs, l'apoptosi mitocondrial confiscant els dominis BH3 de les proteïnes BH3 úniques i de Bax actiu en el seu sot hidrofòbic, suprimint l'activació de Bax per BH3 i la seva oligomerització [228].

BHRF1 evita, doncs, la permeabilització de la membrana, impeding la integració de Bax. Aquesta propietat és compartida amb altres molècules antiapoptòtiques de la família Bcl-2, com Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w i Mcl-1 [229]. Respecte l'altra molècula de la família de Bcl-2 proapoptòtiques com és Bak, aquesta es troba de forma permanent a la membrana mitocondrial externa, de tal manera que al ser activada per molècules BH3 úniques forma també homo-oligòmers, sense variar la seva localització [87].

Per altra banda, Bcl-2 és degradat degut a que té regions susceptibles a ser diana per la caspasa 3 [230], fent que les seves funcions com a molècules antiapoptòtica es vegin alterades. En aquest treball s'ha observat que Bcl-2 es veu conservat en aquelles cèl·lules transfectades amb BHRF1, de tal manera que les funcions antiapoptòtiques de Bcl-2 es mantenen. L'absència de Bcl-2 en condicions apoptòtiques en el cas de les cèl·lules control és, possiblement, deguda a l'acció de la caspasa 3 activa sobre la regió amino-terminal, generant un fragment de 3-5 kDa i un altre de 23-21 kDa. L'anticòs utilitzat per detectar la proteïna presenta afinitat per la regió entre els aminoàcids 4-21, el que significa que per la fracció digerida per caspases reconeixeria el fragment d'entre 3-5 kDa que es perd degut al tipus de gel utilitzat, i el fragment gran generat no és visible ja que l'anticòs no hi té afinitat.

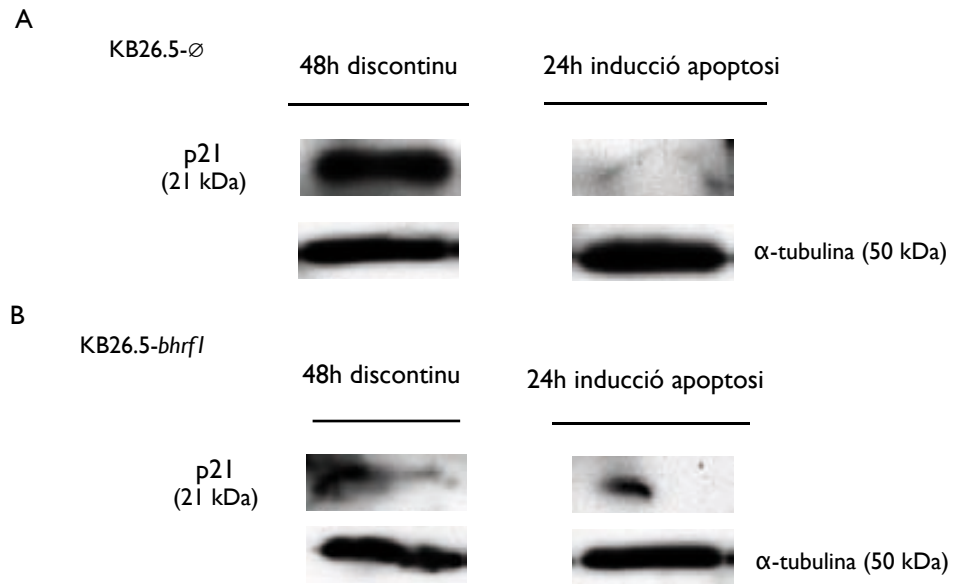
S'ha pogut determinar que la caspasa 3 es troba en una conformació no activa en aquelles cèl·lules transfectades per BHRF1 en condicions d'inducció de l'apoptosi, evitant d'aquesta manera que les caspases efectores, on la caspasa 3 es pot incloure, generi la proteòlisi de les seves dianes. Això es veu reforçat pel fet que s'ha observat que l'alliberació de citocrom *c* al citosol, necessària per la formació de APAF-1 i l'activació de la caspasa 9 i conseqüentment l'activació de la caspasa 3, només és visible en aquelles cèl·lules sense presència de BHRF1.

S'ha observat la falta de translocació de proteïnes proapoptòtiques com és Bax a la membrana mitocondrial externa, en condicions d'inducció de l'apoptosi, evitant així la formació de porus a la membrana mitocondrial, de tal manera que no s'allibera citocrom *c* al citosol. Aquest fet és visible en aquelles cèl·lules on BHRF1 exerceix el seu efecte, evitant que Bax s'incorpori de forma estable a la membrana mitocondrial i el citocrom *c* no és alliberat a l'espai extra mitocondrial, fenomen que sí té lloc en aquelles cèl·lules que no expressen BHRF1. La no incorporació de molècules com Bax a la membrana mitocondrial externa també fa que l'estructura mitocondrial romangui estable [153], evitant la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i l'alliberació d'espècies d'oxigen reactives.

Bim es troba retinguda al citosol al complex motor de la dineïna i al mitocondri [231, 232] i transloca al mitocondri al rebre l'estímul apoptòtic. Les observacions efectuades en aquest treball són consistents amb aquest mecanisme, ja que s'observa la presència de Bim amb les isoformes Bim<sub>EL</sub> i Bim<sub>L</sub> a la fracció mitocondrial i citosòlica i, en condicions

apoptòtiques, les cèl·lules control presenten un menor senyal de Bim<sub>EL</sub> al mitocondri, mentre que per les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* es manté.

Un dels gens que es veia alterat en l'*array* de DNA era aquell que codifica per p21. Aquesta proteïna és de gran importància en la regulació del cicle cel·lular, aspecte que es veu modificat en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*. Es va realitzar un assaig per Western Blot (figura 65), per tal de veure la seva presència en condicions apoptòtiques i determinar si podria tenir una relació amb un possible control del cicle cel·lular. Es pot observar com tant les cèl·lules KB26.5-∅ com les KB26.5-*bhrf1* expressen aquesta proteïna, però en condicions apoptòtiques, en aquelles cèl·lules que no es troben sota la protecció de BHRF1, la proteïna p21 es veu degradada respecte aquelles cèl·lules transfectades amb pIRES:*bhrf1*. Es coneix que p21<sup>Cip1</sup> es veu degradada per la caspasa 3 a la regió DHVD<sup>112</sup>L, que es troba al seu extrem C-terminal, generant un fragment de 15 kDa que no és funcional, ja que és incapaç d'inhibir l'activitat de les ciclines D i E ni de PCNA [233]. Això es tradueix en una menor capacitat d'aturada del cicle cel·lular, com s'ha vist en les cèl·lules KB26.5-∅ a les 24 hores de cultiu en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi. Aquestes mostraven una relació G<sub>1</sub>/S d'aproximadament 1, mentre que les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* presentaven una relació de 1,5. Cal dir que el Western Blot és el resultat del *pool* proteic general, sense discriminar entre cèl·lules vives o mortes, per tant, el fet de trobar una proteòlisi pronunciada és coherent amb l'estat de viabilitat cel·lular a les 24 hores de cultiu en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi. Les cèl·lules KB26.5-∅ presenten una major degradació de p21, indicant una activació de la caspasa 3 i, per tant, de l'apoptosi. En les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* això no es veu, ja que majoritàriament les cèl·lules mantenen p21 intacte perquè no s'activa la caspasa 3 i, per tant, l'apoptosi es veu reprimida. La integritat de p21 sembla un factor important per la supervivència cel·lular. En les cèl·lules KB26.5-∅ es produeix un increment en la relació G<sub>1</sub>/S a les 48 hores del cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi, que tot i ser inferior al observat en les cèl·lules transfectades amb el gen *bhrf1* és prou indicatiu d'un increment en la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular. Aquesta observació sembla contradictòria amb el fet de trobar p21 degradada. La regulació del cicle cel·lular és enormement complexe i en aquest treball no s'ha aprofundit suficientment en aquest aspecte. Caldria, doncs, estudiar amb més atenció l'activitat d'aquelles proteïnes implicades en el cicle cel·lular.

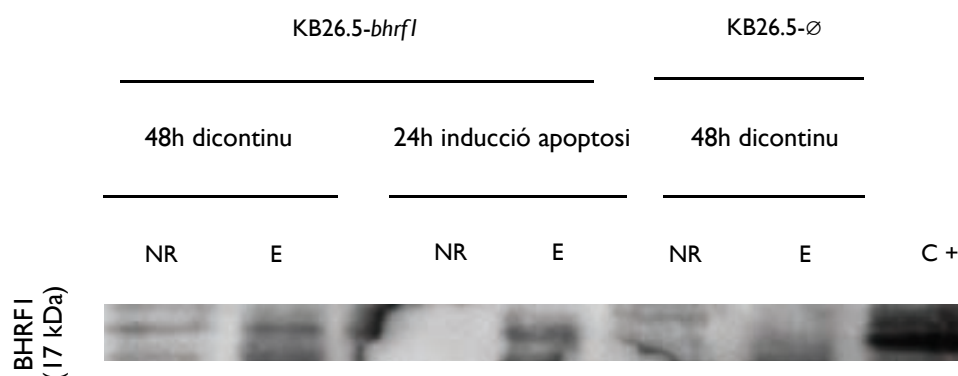


**Fig. 65.- Western Blot de la proteïna p21 en la fracció citosòlica** en mostres preses en un cultiu en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi, utilitzant cèl·lules KB26.5-∅ i KB26.5-bhrf1. p21 és proteolitzat per la caspasa 3 al seu extrem C-terminal, generant un fragment de 15 kDa i un de 6 kDa. L'anticòs primari utilitzat reconeix els 50 últims aminoàcids de la regió C-terminal per aquest motiu no es veu el fragment de 15 kDa, i tampoc el fragment menor que s'escapa del gel.

## 4. ACTUACIÓ DE BHRF1

### 4.1. INTERACCIONS PROTEIQUES DE BHRF1

Per conèixer com una proteïna mitocondrial com és BHRF1 prevenia la pèrdua de la funció mitocondrial en el cas d'estar induïda l'apoptosi i com afectava al cicle cel·lular, es va procedir a realitzar una co-immunoprecipitació utilitzant columnes comercials (Pierce). Es va incubar l'anticòs monoclonal contra BHRF1 amb l'extracte cel·lular total de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, tant per la mostra obtinguda a les 48 hores de cultiu en discontinu, com per la mostra obtinguda a les 24 hores de cultiu en discontinu en condicions induccitors de l'apoptosi, utilitzant les cèl·lules KB26.5 transfectades amb un vector pcDNA3 buit com a control (KB26.5- $\emptyset$ ). Posteriorment es va eluir la mostra amb la proteïna d'interès, juntament amb totes aquelles proteïnes que porti acomplexades i que per tant hi tinguin interacció. Per saber si la co-immunoprecipitació va donar resultat es va haver de comprovar que en la fracció eluïda hi apareixia la proteïna contra la que s'havia utilitzat l'anticòs primari. En aquest cas es va fer un Western Blot per BHRF1 (figura 66). Al comprovar que en la condició control (48 hores de cultiu en discontinu) i en la condició d'inducció a l'apoptosi (24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi) s'apreciava una banda que es corresponia al BHRF1, mentre que en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  no hi havia presència de BHRF1, es va determinar que es podia utilitzar aquest eluït per estudiar les interaccions proteiques de BHRF1.



**Fig. 66.- Anàlisi per Western Blot de la co-immunoprecipitació de BHRF1** en columna d'afinitat. Es fa un WB per la fracció no retinuda (NR) a la columna així com la fracció que ha estat eluïda (E) de les cèl·lules transfectades en condicions de creixement (viables) i de mort cel·lular (apoptosi), i de les les control en condicions de creixement. Utilitzem extracte cel·lular total de KB 26.5 transfectat amb pIRES:*bhrf1* com a control positiu (C+).

Per estudiar-ho es van realitzar Western Blot d'aquest eluït contra les proteïnes de la taula 8. El panell de proteïnes estudiades es va triar per la seva importància en la regulació de l'apoptosi així com per referències bibliogràfiques.

**Taula 8.- Resum de les interaccions observades mitjançant Western Blot de la proteïna BHRF1 en condicions inductores de l'apoptosi.**

	Interacció amb BHRF1
Bim	✓
Bak	✗
Bax	✗
Bcl-2	✗
VRK2	✓

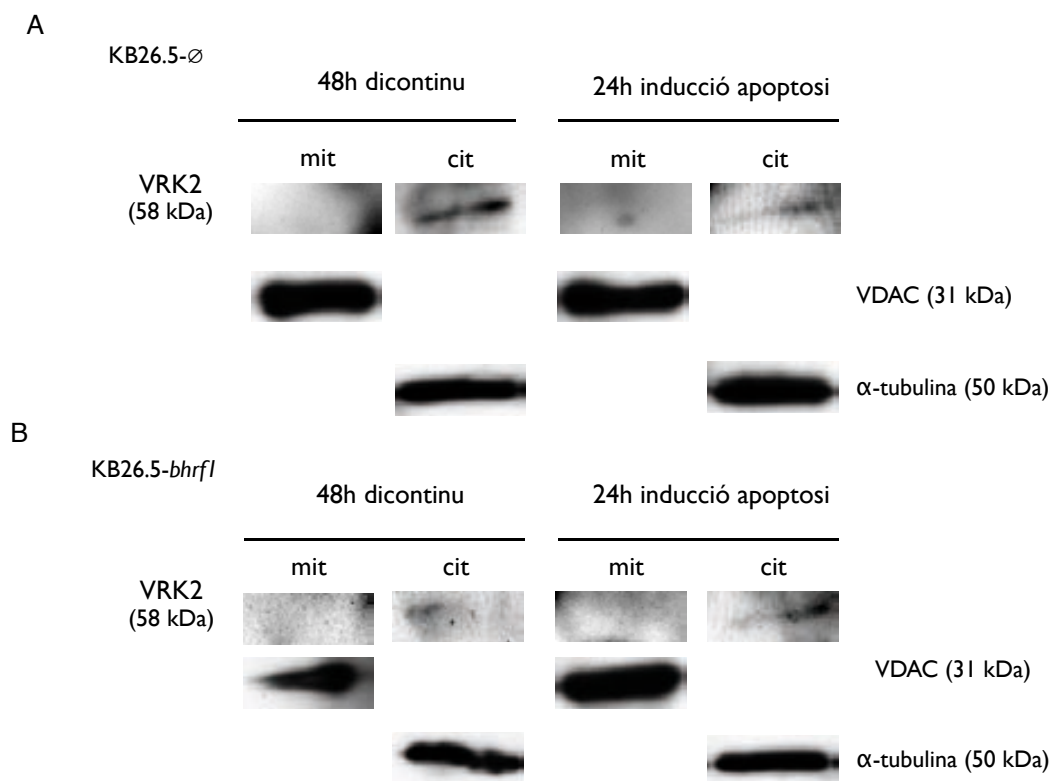
Dels resultats d'aquest experiment, es va observar que BHRF1 interaccionava amb Bim, la proteïna activadora de Bax/Bak amb un únic motiu BH3. També es va observar interacció amb VRK2, una proteïna que s'ha relacionat amb la regulació de p53.

Es va realitzar un Western Blot de la proteïna VRK2 (figura 67) de les fraccions mitocondrial i citosòlica, i es va poder comprovar com la proteïna no es troba al mitocondri, sinó a la fracció citosòlica, ja sigui en les cèl·lules KB26.5-Ø com les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* tant en condicions no inductores com en condicions inductores de l'apoptosi. Aquestes dades són consistents amb el fet que s'ha observat que VRK2 pot estar present en dues formes, unida a membrana -ja que s'ha detectat al reticle endoplasmàtic i al mitocondri- o lliure al citosol i al nucli [234].

Comparant les seqüències de les regions que integren els dominis BH1 i BH3 per alguns dels membres més importants de la família de Bcl-2 (figura 63) es pot observar com els residus hidrofòbics de Bim I145, L149, I152 i F156 interaccionen en el sot hidrofòbic de BHRF1, tal i com passa amb Bcl-X<sub>L</sub>. A més, es forma un pont salí entre la R100 de BHRF1 i la D154 de Bim. Aquesta interacció electrostàtica s'ha descrit en altres complexes, com el format entre Bcl-X<sub>L</sub> i Bim [235]. Per tant la R100 de BHRF1 és



important per tal de que es puguin formar els complexos amb els motius BH3 de les proteïnes proapoptòtiques [236]. Es pot veure, a més a més, que es troba altament conservat per tots els membres de Bcl-2, tant pro- com antiapoptòtics, en la seva regió hidrofòbica BH1. Bak forma a partir de la D83 el pont d'hidrogen amb la R139 de Bcl-X<sub>L</sub> per estabilitzar l'estructura [237]. En el domini BH3, l'hèlix  $\alpha$ 2 que forma aquesta regió també conserva quatre residus hidrofòbics (h1-4) que s'acomoden al solc hidrofòbic de Bcl-2 [238].



**Fig. 67.- Western Blot de la proteïna VRK2 en la fracció mitocondrial i citosòlica** en mostres preses en condicions de cultiu en dicontinu i a les 24 hore de cultiu en dicontinu inductor de l'apoptosi tant per cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  com per transfectades amb pIRES:*bhrf1*.

**BH1 (domini hidrofòbic)  $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$**

BHRF1	E <sup>89</sup>	I	F	H	R	G	D	P	S	L	G	R	A	L	A	W	M	A	W	C	M <sup>109</sup>
Bcl-X <sub>L</sub>	E <sup>129</sup>	L	F	R	D	G	-	V	N	W	G	R	I	V	A	F	F	S	F	G	G <sup>148</sup>
Bcl-2	E <sup>136</sup>	L	F	R	D	G	-	V	N	W	G	R	I	V	A	F	F	E	F	G	G <sup>155</sup>
Bak	S <sup>117</sup>	L	F	E	S	G	-	I	N	W	G	R	V	V	A	L	L	G	F	G	Y <sup>136</sup>
Bax	D <sup>98</sup>	M	F	S	D	G	N	F	N	W	G	R	V	V	A	L	F	Y	F	A	S <sup>118</sup>

**BH3 ( $\alpha 2$ )**

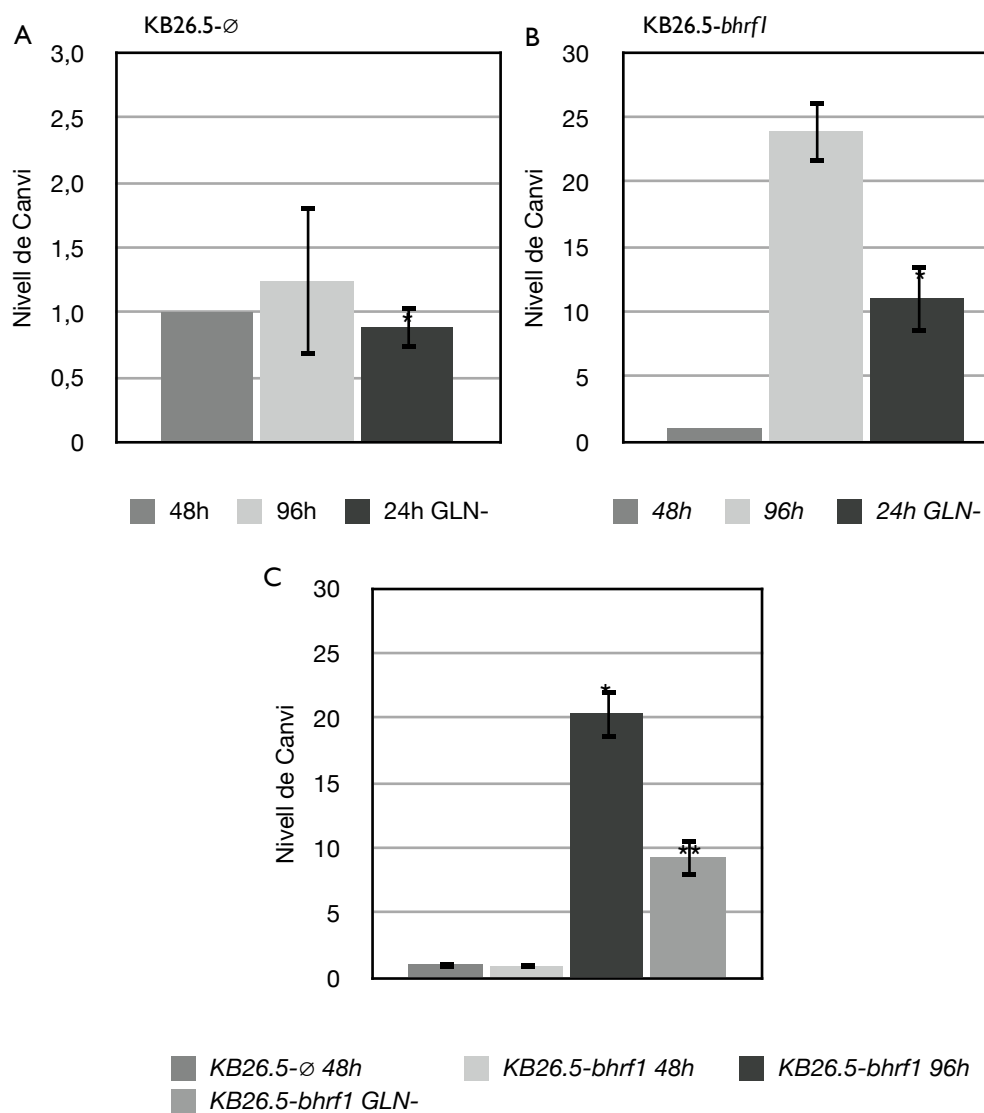
				h1				h2			h3				h4					
BHRF1	-	D <sup>43</sup>	T	V	V	L	R	Y	H	V	L	L	E	E	I	I	E	R		N <sup>61</sup>
Bcl-X <sub>L</sub>	M <sup>83</sup>	A	A	V	K	Q	A	L	R	E	A	G	D	E	F	E	L	R		Y <sup>101</sup>
Bcl-2	P <sup>90</sup>	P	V	V	H	L	T	L	R	Q	A	G	D	D	F	S	R	R		Y <sup>107</sup>
Bak	L <sup>71</sup>	G	Q	V	G	R	Q	L	A	I	I	G	D	D	I	N	R	R		Y <sup>89</sup>
Bax	T <sup>56</sup>	K	K	L	S	E	C	L	K	R	I	G	D	E	L	D	S	N		M <sup>74</sup>
Bim	E <sup>143</sup>	I	W	I	A	Q	E	L	R	R	I	G	D	E	F	N	A	Y		Y <sup>161</sup>

**Fig. 68.- Comparació de les seqüències d'aminoàcids que formen part dels dominis BH1 i BH3 de proteïnes de la família de Bcl-2.** Es pot distingir l'arginina (R) conservada al domini hidrofòbic format per les hèlixs  $\alpha 3, \alpha 4$  i  $\alpha 5$  i en el cas del domini BH3 els 4 residus hidrofòbics conservats (h1, h2, h3 i h4).

## 4.2. IMPLICACIÓ DE Bcl-2 EN EL MECANISME D'ACCIÓ DE BHRF1

Com s'ha vist anteriorment, *bcl2* es troba sobreexpressat en condicions de cultiu de 96 hores en discontinu i a les 24 hores de cultiu en discontinu inductor de l'apoptosi, en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*.

Per aquest motiu, es va decidir estudiar més en detall el nivell d'expressió del principal gen antiapoptòtic *bcl2*. Per fer-ho, es va realitzar un estudi d'expressió del gen mitjançant PCR en temps real. Com a gen control s'utilitzà la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (*GAPDH*). Els resultats obtinguts mostren que les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  a les 96 hores de cultiu sobreexpressaven lleugerament *bcl2* i en el cultiu sense glutamina al medi, el nivell d'expressió era lleugerament inferior al del cultiu en discontinu en fase exponencial. En canvi, en avaluar els nivells d'expressió en les cèl·lules KB26.5 que havien estat transfectades amb pIRES:*bhrf1* s'observa que a les 96 hores de cultiu en discontinu el nivell d'expressió de *bcl2* augmentava fins a valors d'aproximadament 25 vegades més que en les cèl·lules en cultiu en fase exponencial. Pel que fa a les condicions de cultiu amb inducció a l'apoptosi veiem que els valors de *bcl2* arriben a ser aproximadament 10 cops majors que en la condició control (figura 69A i 69B).



**Fig. 69.- Quantificació per PCR en temps real de *bcl2* en les cèl·lules KB26.5-∅ i en les KB26.5-bhrf1.** A) Quantificació dels nivells de mRNA de proteïna Bcl2 total en les cèl·lules control, la condició de referència és a les 48 hores de cultiu per aquest motiu té un valor de 1 (\*\**p*>0,05). B) Quantificació dels nivells de mRNA de proteïna Bcl2 total en les cèl·lules transfectades amb pIRES:*bhrf1*, la condició de referència és a les 48 hores de cultiu per aquest motiu té un valor de 1 (\*\**p*<0,05). C) Nivells de mRNA corresponents a Bcl2 en les cèl·lules amb BHRF1 utilitzant les cèl·lules control a 48 hores de cultiu com a referència (\* *p*<0,05, \*\* *p*<0,05).

Si s'utilitza la condició de cultiu en discontinu en fase exponencial de les cèl·lules KB26.5-∅ com a valor control i es comparen els nivells d'expressió de les altres condicions estudiades, tant de les cèl·lules KB26.5-∅ com de les transfectades, es pot observar com a les 96 hores de cultiu l'expressió de *bcl2* és 20 vegades superior a les 48 hores de cultiu en discontinu en les cèl·lules amb presència de *bhrf1*, mentre que a les 96 hores de cultiu de les cèl·lules KB26.5-∅, l'expressió és molt menor, de 1,24 vegades. L'expressió de les cèl·lules KB26.5-∅ i les KB26.5-bhrf1 a les 48 hores de cultiu en discontinu, és pràcticament idèntica. Si s'analitza a les 24 hores de cultiu en discontinu en condicions d'inducció de l'apoptosi, utilitzant les cèl·lules KB26.5-∅ a 48 hores de cultiu en discontinu com a referència, s'observa com les cèl·lules que expressen *bhrf1* presenten

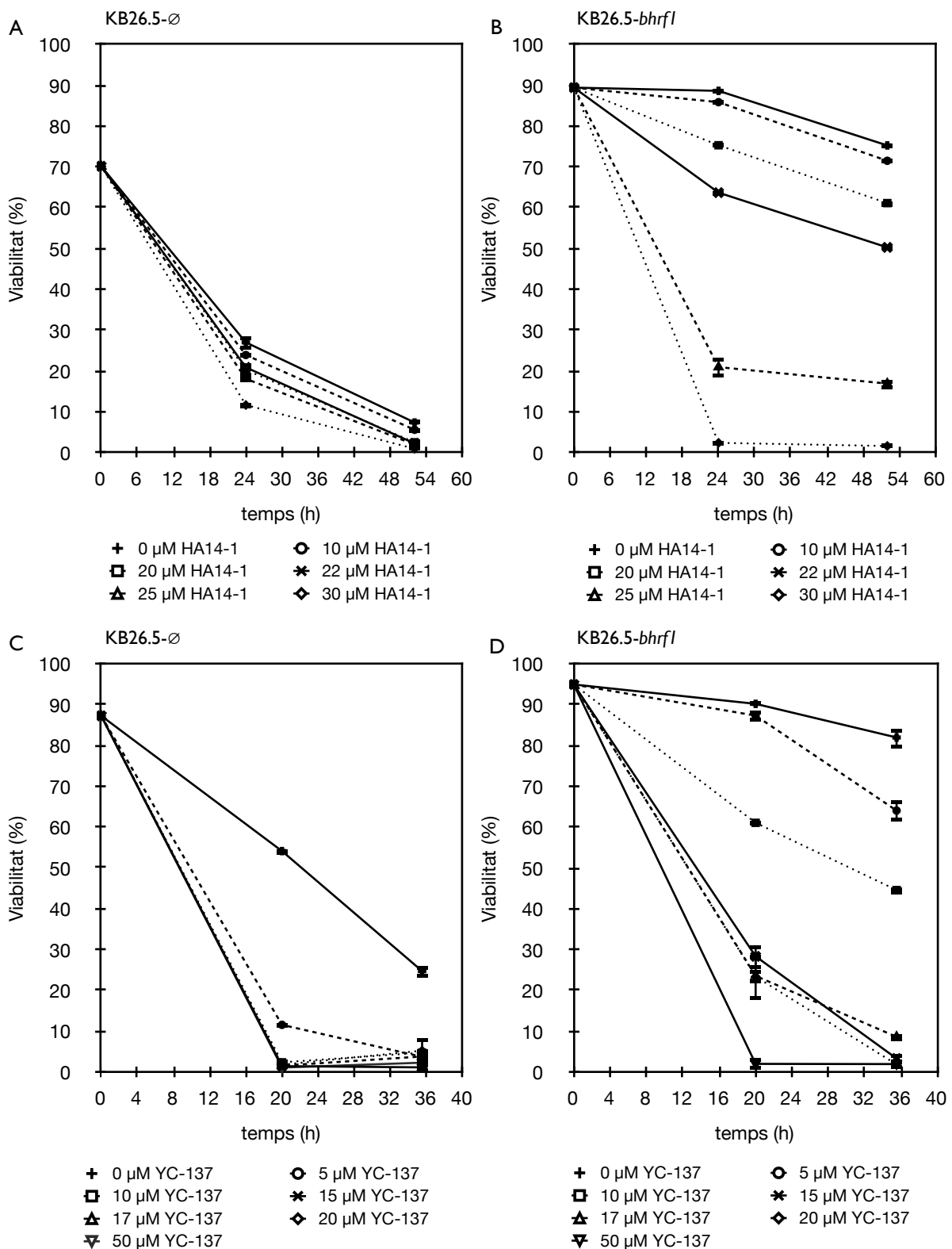
9,2 vegades major expressió de *bcl2* respecte les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  en el mateix tipus de cultiu, mentre que les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$  tenen nivells basals en l'expressió de *bcl2* (figura 69C).

Els resultats obtinguts en aquest treball respecte a la inducció de *bcl2*, així com en altres nivells d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi, concorden amb observacions fetes en individus afectats per limfoma de Hodgkin associat a la infecció pel virus Epstein-Barr, en que s'han observat increments en els nivells d'expressió de *bcl2* [239].

Tenint en consideració aquests resultats, es va proposar la utilització de dos inhibidors químics específics de Bcl-2 (veure apartat 1.3 de la secció de materials i mètodes), com són l'inhibidor HA14-1 i l'inhibidor YC-137, per comprovar si es podia retornar les cèl·lules amb expressió de BHRF1 a un fenotip com el de les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ . Si això succeís indicaria que una part essencial de l'efecte antiapoptòtic de BHRF1 es transmet per via de Bcl-2. Cal tenir en consideració que, tot i no observar-se interaccions entre les dues proteïnes, sí que s'ha observat una substancial inducció en l'expressió de *bcl2* en situacions activadores d'apoptosi en cultius de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*.

S'ha descrit que els dos inhibidors utilitzats s'uneixen de forma irreversible al centre actiu de Bcl-2, de tal manera que no pot dur a terme les seves funcions antiapoptòtiques [227, 228]. En afegir l'inhibidor HA14-1 a un cultiu de KB26.5-*bhrf1* en medi inductor de l'apoptosi, es va comprovar com la viabilitat disminuïa de forma proporcional a la concentració d'aquest compost (figura 70B). Afegint les mateixes concentracions d'inhibidor al el cultiu KB26.5- $\emptyset$ , no es va observar cap efecte sobre la viabilitat del cultiu depenent de la dosi (figura 70A). La viabilitat del cultiu KB26.5- $\emptyset$  tampoc es veia afectada per cap de les concentracions que es va utilitzar, l'inhibidor YC-137 (figura 70C), si bé la caiguda de la viabilitat és major per aquest compost (figura 70D). En el cultiu cel·lular de KB26.5-*bhrf1*, es va observar un efecte de la dosi en la viabilitat del cultiu per l'inhibidor YC-137, a major concentració del compost menor era el percentatge de cèl·lules viables en el cultiu, tal i com mostra la figura 70D.

Aquesta observació indica que la inhibició de Bcl-2 en cèl·lules transfectades amb pIRES:*bhrf1* reverteix els efectes antiapoptòtics activats pel seu l'homòleg víric.

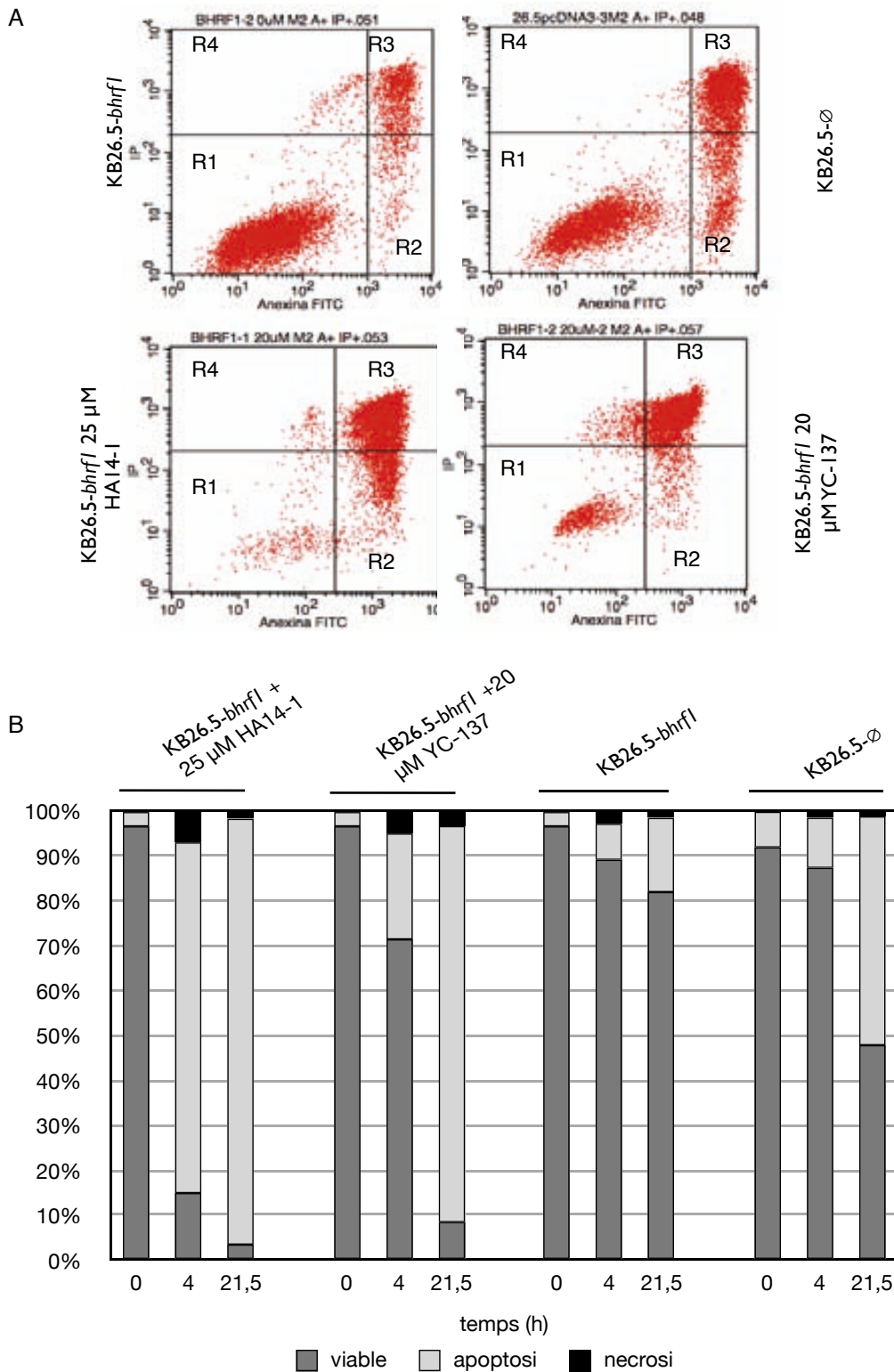


**Fig. 70.- Perfil de viabilitat cel·lular en medi d'inducció a l'apoptosi utilitzant dos inhibidors de Bcl-2.** A) Perfil de viabilitat de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, utilitzant diferents concentracions de l'inhibidor HA14-1 B) Perfil de viabilitat de les cèl·lules KB26.5-∅ utilitzant diferents concentracions de l'inhibidor HA14-1 C) Perfil de viabilitat de les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, utilitzant diferents concentracions de l'inhibidor YC-137 D) Perfil de viabilitat de les cèl·lules KB26.5-∅ utilitzant diferents concentracions de l'inhibidor YC-137. Per les concentracions d'inhibidor nul·les s'afegeix al medi el volum més alt de diluent, DMSO en aquest cas. Els creixements es fan sobre placa de 6 pous en 5 mL de DMEM 4% FBS.

Per comprovar-ho es varen realitzar estudis específics per detectar l'apoptosi en les cèl·lules transfectades amb BHRF1, que es varen comparar a les cèl·lules KB26.5-∅. Els resultats obtinguts a l'estudiar la presència de fosfatidilserina (PS) a la membrana externa de les cèl·lules utilitzant l'Anexina-V per assaig amb citometria de flux per tal de seguir l'apoptosi (figura 71). Les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* a les que s'indueix l'apoptosi no expressen fosfatidilserina a la cara externa de la membrana cel·lular, és a dir, són anexina negatives. Quan s'afegeix al medi inductor de l'apoptosi 25 µM de l'inhibidor HA14-1, es pot comprovar com el percentatge de cèl·lules transfectades que entren en apoptosi augmenta a mesura que avança el temps de cultiu. El mateix passa quan s'afegeixen 20 µM de l'inhibidor YC-137. En ambdós casos s'arriben a valors superiors al 80% de cèl·lules amb translocació de la fosfatidilserina, marcant com anexina positives, a les 21,5 hores d'inducció de l'apoptosi. En el cas de l'inhibidor YC-137, el seu efecte ja s'observa a les 4 hores d'inducció mentre que el HA14-1 tenia un efecte més lent.

És conegut que la pèrdua de potencial de membrana mitocondrial és un dels indicadors inicials de l'apoptosi, aquest fenomen es veu aturat per la presència de proteïnes Bcl-2 i membres antiapoptòtics de la mateixa família els quals retenen aquells elements proapoptòtics causants de la pèrdua de l'activitat mitocondrial [220, 240]. Per aquest motiu, es va optar per estudiar els efectes sobre el potencial de membrana quan s'inhibia Bcl-2 utilitzant els inhibidors específics, a les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* i KB26.5-∅ (figura 72). Quan es va realitzar aquest assaig en el cultiu inductor de l'apoptosi en les cèl·lules transfectades amb *bhrf1*, es va comprovar com la pèrdua del potencial de membrana era mínima, fins i tot passades 28 hores d'inducció. La pèrdua del potencial de membrana mitocondrial es va observar clarament en el cas de les cèl·lules KB26.5-∅, ja a les 5 hores d'inducció, amb una caiguda del 10% i, a les 28 hores, les cèl·lules KB26.5-∅ que mantenien el potencial de membrana mitocondrial era del 63% aproximadament, suposant una reducció de la integritat mitocondrial d'un 37%.

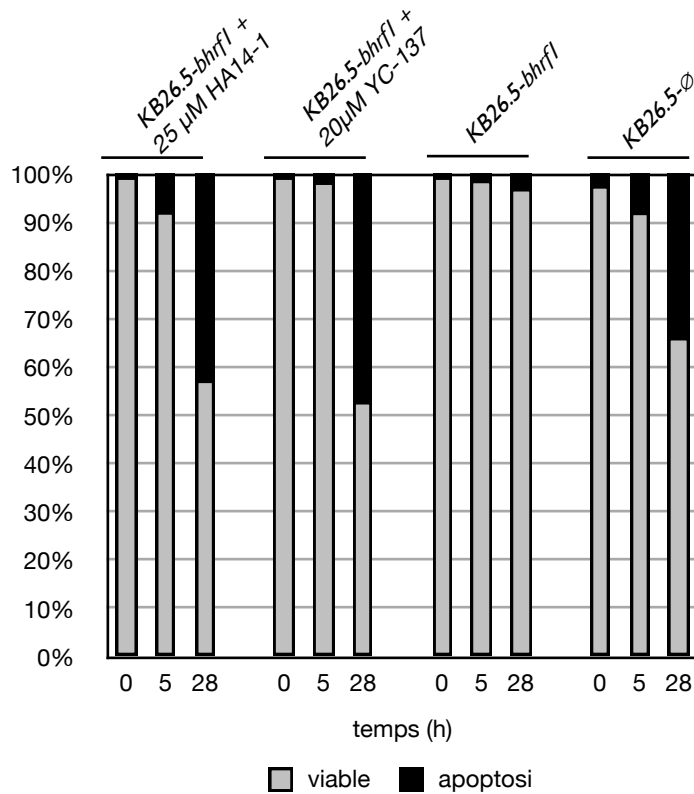
El potencial de membrana mitocondrial per a les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* que havien estat cultivades amb 25 µM de l'inhibidor HA14-1 disminueix ja en les primeres hores de cultiu i, en aquest cas, s'arriben a valors de 42% de pèrdua de potencial de membrana mitocondrial. En el cas de l'inhibidor YC-137, la pèrdua del potencial de membrana és més progressiva, ja que a les primeres 5 hores tan sols n'havia perdut un 1,7%, fins arribar a un 55% a les 28 hores com es mostra a la figura 72.



**Fig. 71.- La inhibició de Bcl-2 en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* fa que perdin la seva resistència a l'apoptosi. A)** Resultats de l'assaig Annexina V FITC i iodur de propidi analitzats mitjançant citometria de flux. Distingim en els histogrames les cèl·lules normals (R1), les cèl·lules apoptòtiques primerenques (R2), apoptòtiques (R3) i necròtiques (R4). Veiem que les cèl·lules control i les transfectades amb inhibidors presenten apoptosi, cosa que no fan les transfectades sense inhibidor. B) Al gràfic es pot veure els diferents estats en que es troben les cèl·lules respecte al total de cèl·lules analitzades.

Tots aquests resultats indiquen que la inhibició de Bcl-2 en les cèl·lules KB26.5 que han estat transfectades amb *bhrf1* fa que perdin la resistència a l'apoptosi i es comportin

de forma similar a les no transfectades amb el gen víric, les quals no s'alteren per la inhibició de Bcl-2. La inhibició de Bcl-2 en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* fa que la membrana mitocondrial perdi la seva integritat i alliberi elements que d'altra manera estarien confinats a l'interior del mitocondri, com pot ser citocrom *c*, fent que el potencial de membrana es perdi i les molècules alliberades al citosol amplifiquin el senyal apoptòtica.



**Fig. 72.- Anàlisi de la integritat mitocondrial a través de l'estudi del potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) d'un cultiu KB26.5-*bhrf1* en discontinu en condicions d'inducció a l'apoptosi, amb inhibidors de Bcl-2, respecte a un cultiu sense inhibidors. El cultiu de referència és KB26.5-∅ en condicions d'inducció a l'apoptosi sense inhibidors.**

La inhibició de la proteïna Bcl-2 utilitzant els inhibidors específics HA14-1 i YC-137, en condicions de falta de glutamina al medi cel·lular, ha permès confirmar que Bcl-2 és un element clau per les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* per conferir-los la seva gran capacitat de resistir els estímuls apoptòtics, ja que les cèl·lules que presenten BHRF1 mostren sensibilitat a les dues molècules i a més ho fan de manera dosi dependent. Les molècules utilitzades són orgàniques no peptídiques i permeables a la membrana cel·lular, competint específicament contra el domini hidrofòbic de Bcl-2 que és essencial per desenvolupar les tasques d'inhibició de les proteïnes proapoptòtiques [241, 242]. La unió de les molècules orgàniques a la regió hidrofòbica de Bcl-2 condueix a la inhibició funcional de la proteïna, com es mostra als gràfics de les figures 71 i 72 on hi ha una pèrdua total de la resistència



exhibida per part de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5-*bhrf1*. Cal dir que les concentracions a les quals s'ha observat un perfil de viabilitat similar al de les cèl·lules control és de 25  $\mu\text{M}$  per HA14-1 i de 20  $\mu\text{M}$  per YC137, que és una concentració superior als seus valors de constant d'afinitat ( $K_i$ ), que és de 9  $\mu\text{M}$  per HA14-1 i de 1,3  $\mu\text{M}$  en el cas de YC137.

Es va comprovar com, a l'utilitzar els inhibidors de Bcl-2 en les cèl·lules transfectades amb *bhrf1*, es desenvolupaven els mateixos esdeveniments indicatius del procés d'apoptosi que en les cèl·lules KB26.5- $\emptyset$ . És a dir, hi ha la mateixa pèrdua de potencial de membrana mitocondrial i nivells similars d'exposició de la fosfatidilserina que en les cèl·lules control i per tant tot efecte protector de BHRF1. La pèrdua de protecció es dona a l'inici de la inducció amb la pèrdua total de la integritat mitocondrial, factor clau perquè es desencadeni, la transmissió del senyal apoptòtic. S'ha pogut determinar, doncs, que *bhrf1* exerceix una important protecció a la cèl·lula d'hibridoma davant situacions d'estrès, com seria l'exhauriment de nutrients essencials per la seva proliferació i creixement, fent que *bcl2* es trobi sobreexpressat i atorgant-li un rol clau en l'aturada de l'apoptosi.

## 5. MODEL D'ACTUACIÓ DE BHRF1

Les interaccions proteïna-proteïna són elements clau per regular la funció d'una determinada proteïna. S'ha descrit fins ara com BHRF1 impedeix que s'activi el senyal apoptòtic a nivell mitocondrial, evitant la sortida del citocrom *c* i l'activació de les caspases efectores. Perquè es doni aquesta situació, BHRF1 ha d'impedir l'activació de les proteïnes proapoptòtiques efectores.

La immunoprecipitació de BHRF1 en les cèl·lules KB26.5-*bhrf1* que es troben en condicions inductores de l'apoptosi i a les 48 hores de cultiu en discontinu ha permès establir algunes interaccions directes entre proteïnes cel·lulars i BHRF1. Una d'aquestes interaccions directes es produeix amb Bim, però tan sols és observada en condicions de limitació de nutrients, és a dir, quan hi ha senyals proapoptòtics. Aquesta observació és coherent amb estudis previs realitzats per diversos grups [243, 244].

Segons la divisió establerta per Letai [245], hi ha molècules proapoptòtiques amb els 4 dominis BH 1-4 que es troben inactives, també hi ha molècules antiapoptòtiques amb els quatre dominis (BH 1-4), és a dir, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w i Mcl-1, les quals bloquegen proteïnes BH3 úniques proapoptòtiques com Bim o Bid. Per altra banda, molècules proapoptòtiques amb un sol domini BH3 sensibilitzadores (com Bad o Bik), alliberades com a resposta a estímuls apoptòtics, competixen pel centre actiu de les proteïnes antiapoptòtiques, fent que les molècules BH3 úniques segregades s'alliberin i activin les molècules proapoptòtiques de quatre dominis BH, generant porus a la membrana mitocondrial i amplificant el senyal apoptòtic.

Només en condicions apoptòtiques s'observa la interacció entre BHRF1 i Bim, fet que difereix lleugerament respecte a altres molècules com Bcl-X<sub>L</sub> o Mcl-1, les quals interaccionen amb molècules proapoptòtiques en condicions no apoptòtiques [93, 226, 228, 246]. Sembla que la interacció entre BHRF1 i BimBH3 té lloc a través de la regió hidrofòbica formada per les hèlixs  $\alpha 2:\alpha 5$  a través de quatre residus hidrofòbics de la cadena  $\alpha$  de Bim (I145, L149, I152 i F156). A més a més, es produeix una interacció electrostàtica entre R100 de BHRF1 i D154 de Bim. Aquesta interacció electrostàtica es pot observar entre els complexos formats per Bcl-X<sub>L</sub> i membres proapoptòtics amb dominis BH3 [236]. De fet, s'ha constatat que mutacions de R100A en BHRF1 redueixen la unió amb Bim i anul·len la interacció amb Bak [244].

Pel que fa a Bak, en aquest treball no s'ha observat que presenti interacció amb BHRF1, fet que concorda amb experiments previs [139, 243], però no amb resultats d'altres grups que han identificat aquesta interacció [153, 236, 244].

Tampoc s'observa interacció amb Bax l'altre membre de les molècules proapoptòtiques. Això pot ser degut a que tot i que Bim, Bax i Bak comparteixin una regió BH3 idèntica, en el cas de Bax i Bak cal un canvi conformacional important de tal manera que l'hèlix  $\alpha 2$  de la regió BH3 passi d'estar enterrada a estar exposada [227, 247, 248]. BHRF1 manté conservada l'estructura tant de la regió BH1 com la BH3 amb la resta de membres de la família de Bcl-2. Encara que Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 i el mateix Bcl-2 poden interaccionar amb Bak, així com amb Bax, això no vol dir que es donin aquestes unions, ja que no totes les molècules BH3 úniques tenen la mateixa afinitat per les molècules antiapoptòtiques. Hi ha diferents patrons d'associació, per exemple Bim s'uneix a totes les proteïnes antiapoptòtiques, però Bik només s'uneix a Bcl-X<sub>L</sub> i a Bcl-w i per tant els membres antiapoptòtics es poden diferenciar per l'afinitat selectiva als dominis BH3 [85, 174, 249]. Aquest fenomen pot passar amb BHRF1 i els altres membres com Bax o Bak amb els que no es va observar interacció en cap condició.

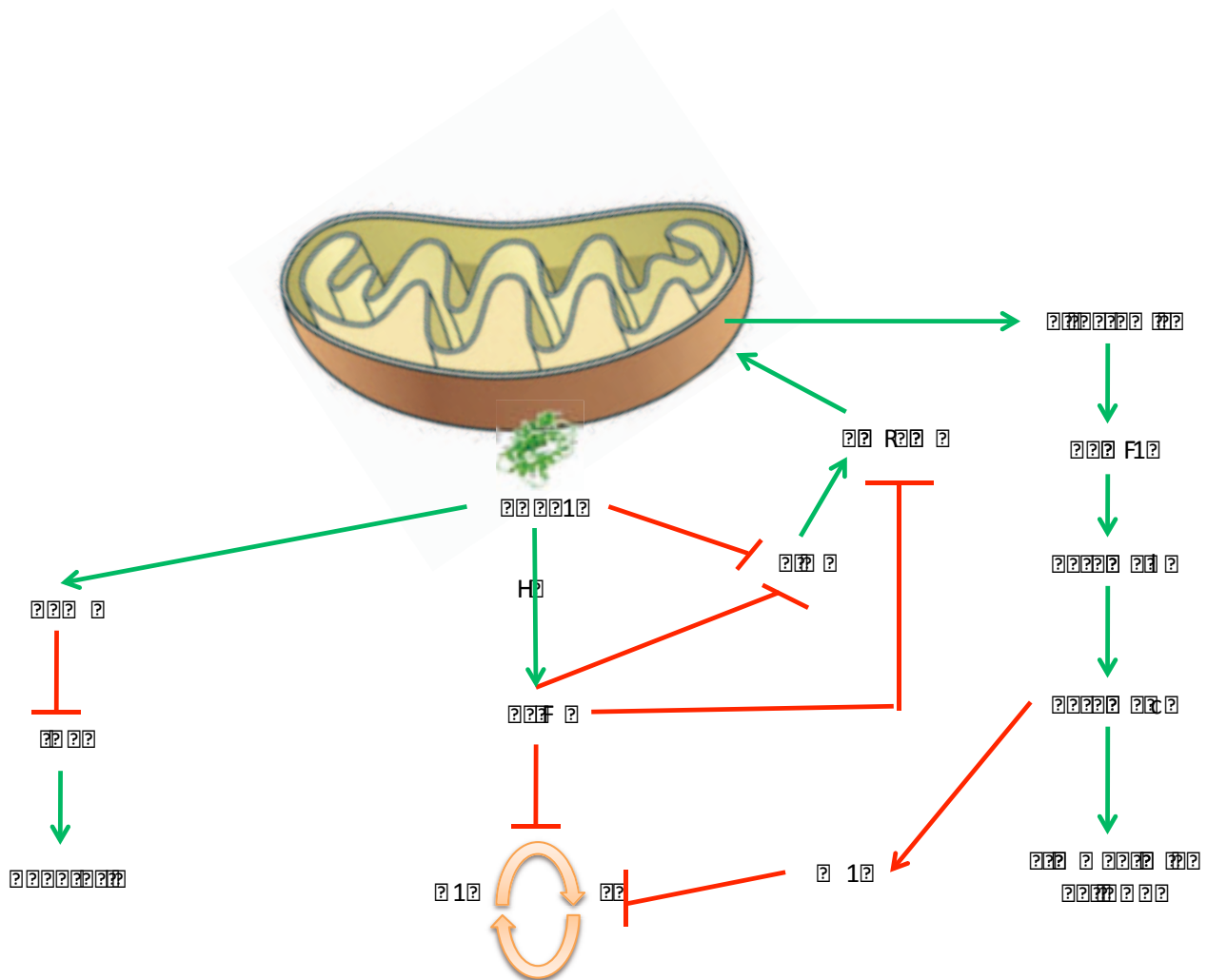
No s'ha observat cap interacció directa entre BHRF1 i Bcl-2, ja que estructuralment no són compatibles, degut a que Bcl-2, tot i tenir el domini hidrofòbic similar a BHRF1, l'utilitza per unir-se a proteïnes proapoptòtiques efectores BH3 úniques com Bax i Bak. La unió al centre hidrofòbic requereix una estructura BH3 ( $\alpha 2$ ) exposada. Perquè Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> s'uneixin a Bax i Bak cal que aquestes últimes exposin el seu domini BH3 i això no passa en les molècules antiapoptòtiques. Estudis anteriors han assenyalat que en el cas de Bcl-X<sub>L</sub> la unió a la regió hidrofòbica d'un pèptid basat en la regió BH3 de la mateixa molècula té molt poca afinitat, consistent amb la natura monomèrica de la proteïna [237]. A més, s'ha observat que la regió BH3 de BHRF1 no té afinitat per Bcl-X<sub>L</sub> [139].

Una altra interacció que s'ha observat en condicions d'inducció de l'apoptosi és amb VRK2 (*Vaccinia-Related Kinase*), que és un grup de tres cinases, VRK1, VRK2 i VRK3. VRK1 és predominantment nuclear i fosforila estabilitzant i activant p53, c-Jun, ATF2 CREB, BAF i histona H3, i es troba implicada en la regulació del cicle cel·lular. VRK2 té dues isoformes generades per *splicing* alternatiu, VRK2A és citosòlica i pot estar unida a membranes com el Reticle Endoplasmàtic i al mitocondri. Afecta a la senyalització cel·lular per la interacció amb proteïnes estructurals com JIP1. La unió de JIP1 amb

VRK2A bloqueja l'activació i per tant redueix la resposta a l'estrès. VRK2B té una localització citosòlica i nuclear i sembla tenir una funció redundat a VRK1 [250]. VRK2A té una longitud de 508 aminoàcids degut a la regió transmembrana que presenta, mentre que VRK2B té 397 aminoàcids [234]. L'anticòs utilitzat per determinar les interaccions amb BHRF1 en aquest treball reconeix la regió compresa entre els aminoàcids 197 al 213, fet pel qual no es pot determinar de forma directa si la isoforma que s'uneix amb BHRF1 és la A o B. S'ha descrit però que la unió de BHRF1 amb VRK2 s'estableix amb la isoforma VRK2A a través dels aminoàcids 401 al 508 de la regió C-terminal [251].

Els senyals d'estrès estan canalitzats pel complex TAK1-MKK4/7-JNK unit a proteïnes JIP. La interacció de VRK2 amb JIP sembla evitar l'activació de JNK ja que no és fosforilada per MKK7, i d'aquesta manera la fosforilació i l'activació de c-Jun no es transmet [250, 252]. La unió de BHRF1 amb VRK2A es dona doncs a la mateixa regió on es produeix la interacció amb TAK1 i MKK4/7 [250]. D'alguna manera la interacció de BHRF1 amb VRK2A potencia el seu efecte antiapoptòtic, ja que aquesta interacció sembla conferir una major supervivència cel·lular [154], i permet suggerir que si VRK2A té un efecte en la regulació de l'activitat de JNK impedit la seva activació, la unió de BHRF1 a VRK2A pot estabilitzar aquesta funció. Al evitar que JNK estigui activa s'evitaria que actués en la fosforilació de Bim, incrementant el seu potencial proapoptòtic així com en l'activació de factors de transcripció de gens proapoptòtics.

A la figura 73, es proposa un possible model de funció de BHRF1 en el que BHRF1 actua a nivell mitocondrial interaccionant de forma directa amb molècules proapoptòtiques com Bim, evitant que aquestes promoguin l'activació de Bax, fet que evita la permeabilització de la membrana mitocondrial i la conseqüent alliberació del citocrom *c*. Això evita l'activació de caspases efectores de l'apoptosi com la caspasa 3. El retard en l'activació de les caspases es tradueix també en un major temps de vida de proteïnes com p21, la qual exerceix la seva acció evitant la progressió del cicle cel·lular, aturant les cèl·lules en la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular.



**Fig. 73.- Vies d'actuació de BHRF1 proposades.** BHRF1 interacciona directament amb Bim de tal manera que aquest no pot activar Bax/Bak. D'alguna manera que està per determinar, BHRF1 incrementa el nivell de transcripció de *bcl-2*, el qual un cop traduït és capaç d'impedir l'acció de Bim i les altres proteïnes BH3 úniques, així com les proteïnes proapoptòtiques multidomini. A més a més, Bcl-2 és capaç d'aturar el cicle cel·lular en la fase G<sub>1</sub>. Aquest conjunt d'accions eviten la sortida del citocrom *c* i la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial, fet que evita l'activació de la caspasa 3 i la degradació de substrats com p21. Per altra banda, BHRF1 interacciona amb VRK2A de tal manera que incrementa la seva activitat antiapoptòtica.

L'acció de BHRF1, a més, es veu reforçada per Bcl-2, que es troba sobreexpressat en condicions d'inducció de l'apoptosi. La sobreexpressió de *bcl2* ha estat utilitzada com un sistema recurrent en cultius cel·lulars, no només per evitar la pèrdua del cultiu per apoptosi sinó per retenir les cèl·lules en fase G<sub>1</sub> [11, 253, 254]. La importància de Bcl-2 en el procés apoptòtic és vital com a membre principal de la família antiapoptòtica de proteïnes del mateix nom, però s'ha demostrat que, a més, pot estar involucrat en el control de la proliferació cel·lular, ja que alts nivells de *bcl-2* retarden la transició entre les fases G<sub>1</sub> i S [255]. És més, la funció antiapoptòtica de Bcl-2 no es pot separar del retard en el cicle cel·lular [158, 256]. El mecanisme amb que BHRF1 du a terme aquesta acció no s'ha pogut determinar, però sembla clar que ha de ser a través d'algun intermediari, ja que aquesta és estrictament una proteïna mitocondrial. És possible que un intermediari

sigui VRK2, amb el que s'ha trobat una interacció directa, o bé p23Ras, del qual altres grups han descrit una interacció amb BHRF1 [257], ja que Ras són proteïnes que estimulen a NF- $\kappa$ B i aquest és inductor de l'expressió de Bcl-2. Tot i que la forma a través de la qual BHRF1 i Bcl-2 connecten no s'ha determinat, aquesta s'ha de produir d'alguna manera, ja que l'efecte de Bcl-2 en la línia KB26.5-*bhrf1* s'ha revertit amb la presència d'inhibidors específics, generant una cèl·lula amb un comportament igual a una cèl·lula control.

A nivell de bioprocés, la transfecció de *bhrf1* ha generat una línia d'hibridoma robusta, que malgrat no incrementar substancialment la producció d'anticòs per cèl·lula, permet resistir l'apoptosi i allargar per tant el temps de cultiu sense perdre viabilitat.

El virus d'Epstein-Barr es troba relacionat amb diverses malalties, com el limfoma de Burkitt, el limfoma de Hodgkin i el carcinoma nasofaringi. D'entre els diferents gens codificats pel virus tant en el seu cicle lític com latent, BHRF1 és un gen que confereix a la cèl·lula infectada resistència a l'apoptosi per tal de que el virus es pugui replicar. El coneixement que BHRF1 interacciona amb diferents proteïnes del seu entorn i que Bcl-2 és un dels elements essencials a través del qual exerceix les seves accions pot generar noves aproximacions pel tractament de les malalties relacionades amb EBV. El desenvolupament d'inhibidors específics per BHRF1 pot ser una alternativa, així com utilitzar inhibidors específics per Bcl-2, com ja s'ha estudiat per altres processos tumorals on hi ha sobreexpressió de *bcl2* com és el cas de la leucèmia limfocítica crònica [258].

## CONCLUSIONS

---





Aquest treball ha permès extreure algunes conclusions sobre el mecanisme d'actuació de BHRF1 en cèl·lules de mamífer, amb respecte a la protecció de l'apoptosi.

- S'ha evidenciat que BHRF1 atura l'apoptosi en els sistemes de cultiu cel·lulars *in vitro* com és el discontinu i la perfusió, així com en cultius en discontinu on s'ha induït l'apoptosi per la retirada de glutamina del medi.
- A més de tenir un efecte antiapoptòtic, s'ha observat que BHRF1 provoca l'alentiment del cicle cel·lular. Aquests dos fenòmens s'han observat només quan les cèl·lules KB26.5 entren en condicions inductores de l'apoptosi.
- S'ha observat en la línia d'hibridoma KB26.5 que BHRF1 altera l'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi, el cicle cel·lular i de la ruta Akt/mTOR.
- S'ha determinat que BHRF1 provoca, en la línia cel·lular KB26.5, la sobreexpressió del gen *bcl2*, només en condicions inductores de l'apoptosi.
- BHRF1 es localitza al mitocondri i el protegeix de la permeabilització de la membrana externa, evitant l'activació de proteïnes proapoptòtiques com Bax, de tal manera que impedeix la sortida del citocrom *c* i l'activació de la caspasa 3.
- S'ha evidenciat la interacció directa de la proteïna BHRF1 amb les proteïnes Bim i VRK2A. En canvi, no s'han obtingut evidències de la interacció directa entre BHRF1 amb Bcl-2, Bax i Bak.
- BHRF1 utilitza Bcl-2 per realitzar part de les seves funcions, ja que al inhibir Bcl-2 mitjançant inhibidors químics específics es reverteix l'efecte de protecció sobre l'apoptosi en la línia cel·lular KB26.5.

- La inducció de Bcl-2 no només explica la major supervivència de les cèl·lules amb presència de BHRF1, més enllà de la pròpia acció de contenció de l'apoptosi per part del gen víric, també es pot relacionar amb l'aturada del cicle cel·lular en G<sub>1</sub>. El mecanisme pel qual Bcl-2 du a terme aquesta aturada no es coneix, però es creu que podria tenir relació amb p27 i el retinoblastoma pRB (p130), retardant l'activitat del factor de transcripció E2f [259].

Perspectives futures:

- Abordar de forma més precisa el mecanisme d'activació de Bcl-2 per part de BHRF1 permetria explicar no només l'efecte antiapoptòtic sinó la seva implicació indirecta en el cicle cel·lular. Això també permetria establir la seqüència de l'aturada del cicle i l'aturada de la mort cel·lular, és a dir, l'ordre amb que es produeixen aquests dos efectes.
- Realitzar assajos de doble híbrid per confirmar les interaccions observades per immunoprecipitació.

## MATERIALS i MÈTODES

---



# 1. MATERAILS

## 1.1. MATERIAL BIOLÒGIC

Per dur a terme aquest treball experimental s'han utilitzat les soques bacterianes i les cèl·lules animals següents:

### 1.1.1. Bacteris

S'ha emprat la soca d'*Escherichia coli* DH5α per al clonatge i obtenció de DNA plasmídic.

### 1.1.2. Cultiu cel·lular

La línia cel·lular d'hibridoma KB 26.5 prové de la fusió de cèl·lules de mieloma NS1 i limfòcits B de la soca de ratolí Balb C. Aquesta línia cel·lular produeix un anticòs monoclonal IgG<sub>3</sub> dirigit contra l'antigen A<sub>1</sub> d'eritròcits humans. Aquest anticòs és utilitzat en la determinació del grup sanguini del sistema ABO humà.

Aquesta línia cel·lular va ser desenvolupada pels Laboratoris Knickerbocker (Barcelona), i cedida a la Universitat Autònoma de Barcelona amb finalitats de recerca.

## 1.2. PLASMIDIS, CONSTRUCCIONS I OLIGONUCLEÒTIDS

### 1.2.1. Plasmidis i construccions

Els plasmidis són molècules de DNA extracromosòmic autoreplicatives que es transmeten i mantenen de forma estable d'una generació bacteriana a la següent. Els plasmidis es troben en moltes espècies bacterianes i sovint confereixen a la cèl·lula hoste característiques fenotípiques, com ara la resistència a antibiòtics i metalls pesats, o la capacitat per produir determinades proteïnes. L'aplicació dels plasmidis per tal de conferir noves activitats proteiques a les cèl·lules no es restringeix només a organismes procariotes sinó que també pot aplicar-se a cèl·lules eucariotes.

Una altra aplicació dels plasmidis és el seu ús per a l'obtenció de quantitats suficients d'una determinada seqüència de DNA. Després d'inserir en un plasmidi la seqüència d'interès, es transformen cèl·lules bacterianes competents amb el plasmidi. En multiplicar-se el nombre de cèl·lules, augmenta el nombre de còpies del plasmidi i, per tant, també la quantitat de seqüència inserida.

Per a la construcció dels vectors recombinants amb els gens antiapoptòtics es va partir dels plasmidis pcDNA3 (Invitrogen) i pIRESneo (Clontech).

#### 1.2.1.1. pIRESneo

El pIRESneo (figura 74 esquerra) és un vector d'expressió IRES bicistrònic d'unes 5.3 Kb. Aquest plasmidi conté l'IRES (Internal Ribosome Entry Site) del virus de l'encefalomiocarditis (ECMV), el qual permet la traducció de dos ORFs (Open Reading Frame) a partir d'un únic RNA missatger, un marcador de selecció eucariota que consisteix en un gen que proporciona resistència a la neomicina (pIRESneo) o puomicina (pIRESpuro2), un promotor de Citomegalovirus ( $P_{CMV\ IE}$ ) que presenta un elevat nivell d'expressió en un gran nombre de cèl·lules animals i un MCS (Multiple Cloning Site) on s'ha d'inserir la seqüència desitjada. El senyal de poliadenilació dels mRNA transcrits és de l'hormona bovina del creixement. Aquests plasmidis també es poden replicar dins d'*E. coli*, gràcies a la presència d'un origen de replicació ColE1. La selecció de les colònies que han incorporat el plasmidi en *E. coli* es fa gràcies a un marcador de selecció que confereix resistència a l'ampicilina.

#### 1.2.1.2. pcDNA3

El pcDNA3 (figura 74 dreta) és un vector comercial d'unes 5.4 Kb dissenyat per a l'expressió gènica en hostes eucariotes. Aquest plasmidi conté un marcador de selecció eucariota (neomicina), un promotor i una seqüència de poliadenilació eucariota, entre els quals s'ha d'inserir la seqüència desitjada. El marcador de selecció eucariota consisteix en un gen de resistència a la neomicina. Tant el promotor com la seqüència de poliadenilació provenen del virus SV40. Pel fragment de DNA inserit, el plasmidi presenta el promotor de citomegalovirus (CMV), que té un elevat nivell d'expressió en un gran nombre de cèl·lules animals, mentre que el senyal de poliadenilació dels mRNA transcrits és el de l'hormona bovina del creixement. El pcDNA3 també es pot replicar dins d'*E. coli* gràcies a la presència d'un origen de replicació ColE1 provinent del plasmidi pUC19. La selecció de les colònies que han incorporat el plasmidi en procarotes es fa gràcies a un marcador de selecció que confereix resistència a l'ampicilina.

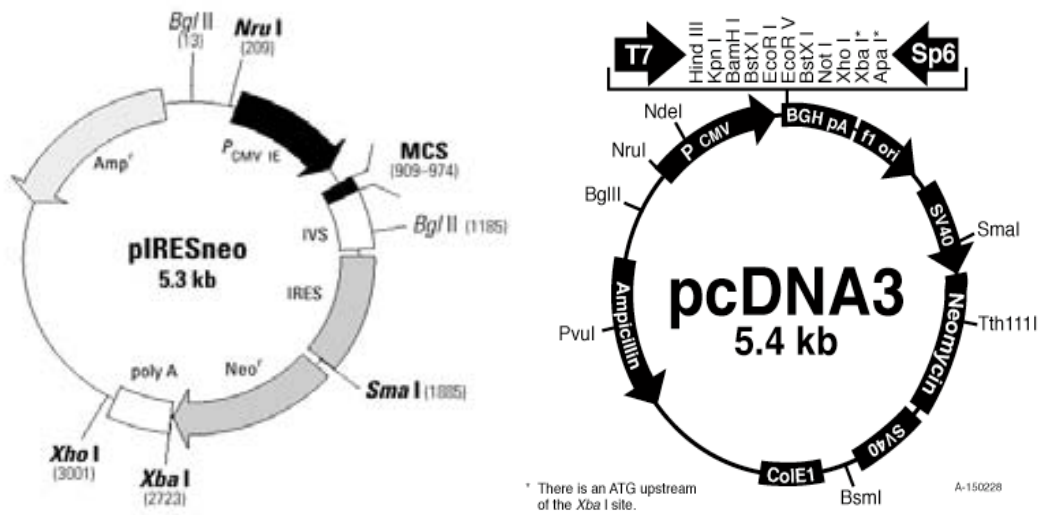


Fig. 74.-Esquema dels vectors pIRESneo (esquerra) i pcDNA3 (dreta).

### 1.2.2. Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids utilitzats per realitzar la PCR en temps real en aquest treball es mostren a la taula següent:

Taula 9.-Taula resum dels oligonucleòtids utilitzats per la Real Time PCR subministrats per Roche.

Nom	Seqüència (5'-3')	Long.	Tm (°C)	Tamany (pb)
<b>Sondes TaqMan®</b>				
<i>bcl2</i>	GATAACGGAGGCTGGGATGCCTTTG	25	60	85
<i>GAPDH</i>	TGAACGGATTGGCCGTATTGGGCG	25	60	107

### 1.2.3. Anticossos

En aquest treball experimental s'han utilitzat els següents anticossos (taula 10 i 11):

#### Anticossos primaris:

**Taula 10.-Taula resum dels anticossos primaris** utilitzats per Western Blot

Proteïna	Casa Comercial (referència)	Clonalitat	Hoste	MW (kDa)
Bak	Millipore (ABC12)	Policlonal	Rabbit	24
Bax	Ab cam (ab 10813)	Policlonal	Rabbit	21
Bim/Bcl2l11	Ab cam (ab 7888)	Policlonal	Rabbit	23
Bcl-2	Ab cam(ab 18210)	Policlonal	Rabbit	25
VRK2	Sigma (V2140)	Policlonal	Rabbit	58
$\alpha$ -tubulina	Sigma (T-6074)	Monoclonal	Rabbit	50
caspasa 3	Santa Cruz Biotech.(sc-7148)	Monoclonal	Rabbit	32
citocrom <i>c</i>	Ab cam (ab 13575)	Monoclonal (IgG2 <sub>b</sub> )	Mouse	15
VDAC	Ab cam (ab 16816)	Monoclonal (IgG2 <sub>b</sub> )	Mouse	31
BHRF1	Millipore (MAB 8188)	Monoclonal (IgG2 <sub>a</sub> )	Mouse	17
BHRF1 EBV anti-(EA-R) Protein p17	Advanced Biotechnologies (13-150-100)	Monoclonal (IgG2 <sub>a</sub> )	Mouse	17
p21	Santa Cruz Biotech.(sc-471)	Policlonal	Rabbit	21

#### Anticossos secundaris:

**Taula 11.-Taula resum dels anticossos secundaris** utilitzats per Western Blot.

Proteïna	Casa Comercial (referència)
Rabbit anti-mouse IgG2 <sub>a</sub> -HRP	Invitrogen (610220)
Goat anti-rabbit IgG2-HRP	Santa Cruz Biotechnologies (sc 2004)
Rabbit anti-mouse-HRP	Dako (P0161)



### 1.3. MEDIS DE CULTIU

#### 1.3.1. Bacteris

##### Medi LB ( Luria Bertani):

Triptona	10 g (Oxoid)
Extracte de llevat	5 g (Oxoid)
NaCl	5 g (Panreac)
H <sub>2</sub> O mQ	Fins a 1 litre

S'ajusta el pH entre 7.0 i 7.5 amb una solució de NaOH al 30%. El medi s'esterilitza en l'autoclau, 120°C durant 20 min.

Per preparar medi sòlid: afegir 12 g d'agar (Oxoid) per litre de medi LB, autoclavar, afegir els antibiòtics -ampicilina (Britapen) o kanamicina (Roche)- a una concentració final de 50 µg/mL i de 30 µg/mL respectivament i plaquejar.

##### Medi SOB (conservació cèl·lules competents):

Triptona	20 g (Oxoid)
Extracte de llevat	5 g (Oxoid)

Portar-ho fins a 1000 mL, ajustar el pH a 7,0 i autoclavar.

Afegir de forma estèril:

KCl 1M	2,5 mL (Panreac)
MgCl <sub>2</sub> 1M	10 mL (Panreac)
MgSO <sub>4</sub> 1M	10 mL (Panreac)
NaCl 5M	2 mL (Panreac)

##### Medi SOC (transformacions):

SOB	980 mL
Glucosa 1M	20 ml

#### 1.3.2. Cèl·lules de mamífer

##### Medi DMEM (medi Eagle modificat de Dulbecco)

S'utilitza el medi comercial DMEM GlutaMAX® 4,5 g/L de glucosa d'Invitrogen (31966). En el cas dels experiments en medi sense glutamina s'utilitza el medi DMEM comercial d'Invitrogen (21969).

Els dos es suplementen amb 4% (V/V) de sèrum de vedella (FBS, Fetal Bovine Serum de Sigma). En el cas de fer la selecció de les cèl·lules transfectades s'afegeix al medi 3 mg/mL de Neomicina (G-418 Sigma).

#### **1.4. TAMPONS I SOLUCIONS**

##### **1.4.1. Relacionats amb proteïnes**

###### **Tampó de lisi per Western Blot:**

- 7 M urea (Amersham Biosciences)
- 2 M Tiourea (GE Healthcare)
- 4% Chaps (Sigma)
- 40 mM Tris-base (Amersham Biosciences)
- 10 mM DTT (0,1M) (Sigma)
- 0,05 mg/mL DNAsa I (20mg/mL)
- 1/200 Inhibidors (P8340 Sigma)

###### **Tampó de càrrega (2X) per Western Blot:**

- 3,55 mL H<sub>2</sub>O milli-Q
- 1,25 mL Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (tampó concentrador)
- 2,5 mL glicerol (Amersham Biosciences)
- 40 mM Tris-base (Amersham Biosciences)
- 2 mL SDS 10% (Sigma)
- 0,2 mL blau de bromofenol 0,5% (Amersham Biosciences)

El blau de bromofenol (Amersham Biosciences) es prepara afegint 50 mg de blau de bromofenol a 10 mL d' H<sub>2</sub>O milli-Q. Guardar a 4°C.

Per preparar les mostres, s'afegeixen 25µL de β-mercaptoetanol (Sigma) a 475µL de tampó de càrrega (2X). Aquesta mescla es fa servir per diluir la mostra 1:1.

###### **Tampó de separador (4X) per Western Blot: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8**

- 18,15 g de Tris base (Amersham Biosciences)
- Afegir 50 mL d' H<sub>2</sub>O milli-Q, agitar i ajustar el pH a 8,8 amb HCl concentrat
- Enrasar a 100 mL i guardar a 4°C

###### **Tampó de concentrador (4X) per Western Blot: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8**

- 6 g de Tris base (Amersham Biosciences)
- Afegir 50 mL d' H<sub>2</sub>O milli-Q, agitar i ajustar el pH a 6,8 amb HCl concentrat
- Enrasar a 100 mL i guardar a 4°C

**Tampó de migració (10X) per Western Blot:**

15,15 g de Tris base (Amersham Biosciences)  
72 g Glicina (Amersham Biosciences)  
Afegir 300 mL d' H<sub>2</sub>O milli-Q, agitar i enrasar a 500 mL  
1% (p/V) SDS (Sigma)  
El pH ha d'estar a 8,3 ± 0,2  
Guardar a 4°C

**Tampó de transferència per Western Blot:**

200 mL metanol (Merck)  
100 mL tampó de migració (10X)  
Afegir 700 mL d' H<sub>2</sub>O milli-Q

**Tampó de saturació per Western Blot:**

2,5 g llet en pols desnatada (Nestlé)  
50 mL tampó PBS 0,1% Tween 20 o PBS-0,1 % NP-40

**Tampó de lisi mitocondrial:**

2% CHAPS en TBS (1X)

**Tampó de lisi per immunoprecipitació:**

50 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
ajustar el pH a 7,4 amb HCl concentrat  
0,1% Nonidet P-40 (Sigma)

**TBS (1X) (Thermo scientific):**

25 mM Tris-HCl  
0.15 M NaCl  
ajustar el pH a 7.2 amb HCl concentrat

**PBS (1X) (Sigma):**

140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
ajustar el pH a 7.2 amb HCl concentrat

**PBS (1X) 0,1% Tween 20:**

Afegir 1 mL de Tween 20 (Sigma) en 1 L de PBS (1X)

**PBS (1X) 0,1% NP-40:**

Afegir 1 mL de Nonidet P-40 (Sigma) en 1 L de PBS (1X)

**SDS 10% (Sigma)**

**Acrid: Bisacrilamida (30%/0,8%) (Bio-Rad)**

És important que tot els eppendorfs utilitzats estiguin nets si s'ha d'utilitzar per l'anàlisi de mostres proteiques o lisats cel·lulars. Per netejar-los correctament s'ha de fer un primer rentat amb H<sub>2</sub>O miliQ, posteriorment rentar amb metanol i deixar assecar.

### 1.4.2. Relacionats amb els àcids nucleics

#### TBE (10X) (Sigma):

108 g Tris base  
55 g àcid bòricl  
9,3 g EDTA  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
ajustar a 1 L

#### Loading dye (6X):

Utilitzar el tampó de càrrega de Fermentas (R0611).

#### DNA ladder mix (0.1 µg/µL):

Utilitzar el marcador d'àcids nucleics de GeneRuler® Fermentas.

#### SYBR green:

Utilitzar SYBR green (Invitrogen) per la tinció dels gels d'agarosa.

#### Aigua DEPC

Utilitzar H<sub>2</sub>O tractada amb Dietilpirocarbonat (DEPC) (Sigma) pel tractament de RNA.

### 1.4.3. Tampons i solucions generals

#### Paraformaldehid 4%

Diluir 2,5 mL Paraformaldehid 16% (Sigma) en 7,5 mL PBS 1X

#### Solucio de tinció per Cicle Cel·lular

10 mL de 0,1% (V/V) Tritó X-100 (Sigma) en PBS 1X

Afegir 0,2 mL de DNasa-free RNasa A (Fermentas) 10 mg/mL

Afegir 0,2 mL de IP (Sigma) 1 mg/mL

#### PBS 0,1M

8 g·L<sup>-1</sup> NaCl  
0,2 g·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
2,8 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O  
0,2 g·L<sup>-1</sup> KCl pH 7.4

## 2. MÈTODES

### 2.1. CULTIU CEL·LULAR

#### 2.1.1. Sistemes de cultiu de la soca bacteriana

Els cultius d'*E. coli* s'han realitzat en erlenmeyers de diferents volums (25, 50 i 250 mL) i en plaques de Petri amb 20 ml de medi sòlid.

De cada soca s'han conservat cultius estoc glicerinars d'1.5 mL en medi LB líquid al 15-20% de glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$  (congelador Nuair, UN-6512E).

#### 2.1.2. Cultiu de cèl·lules animals

La línia cel·lular d'hibridoma KB26.5- $\emptyset$  i KB26.5-*bhrf1*, es conserva en criotubs (Nunc) congelats en un contenidor de nitrogen líquid (Forma Scientific, CMR 8031, Cryomed) a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Abans de realitzar els experiments, s'ha de descongelar un dels criotubs i iniciar el cultiu en suspensió, del qual es fan ressembres durant un període no superior a tres mesos. La preservació en nitrogen líquid de les sublínies obtingudes en aquest treball s'ha realitzat seguint el protocol estàndard amb DMSO [260]. Un cop descongelades, les cèl·lules es cultiven en suspensió en flascons de 25 cm<sup>2</sup> i es ressembren cada 2-3 dies pel seu manteniment, que és quan el cultiu es troba en plena fase exponencial, amb un inòcul de  $2 \cdot 10^5$  cel/mL en 10 mL de medi DMEM base fresc amb 4% FBS. D'aquesta manera es proporciona de nou tots aquells nutrients que s'estaven exhaustint -glucosa, glutamina i altres aminoàcids, vitamines i components del sèrum- i s'eliminen els subproductes del metabolisme cel·lular que poden arribar a tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula a concentracions elevades -com l'amoni i el lactat-, que acidifiquen el medi. Aquests cultius permeten disposar sempre d'un estoc de cèl·lules a partir del qual es fan créixer els inòculs per iniciar els experiments.

Per induir l'apoptosi a les cèl·lules d'hibridoma, s'utilitza el medi DMEM sense glutamina amb 4,5 g/L de glucosa d'Invitrogen suplementat amb 4% FBS. A partir d'un cultiu en fase exponencial, i per tenir una concentració cel·lular de  $7.5 \cdot 10^5$  cel/mL, es centrifuga utilitzant la centrífuga Eppendorf 5840R (800 rpm, 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ) el volum necessari de preinòcul, s'elimina el sobrenadant i es ressuspend el pellet cel·lular amb medi DMEM sense glutamina, es torna a centrifugar a les mateixes condicions i es repeteix el procés dos cops més per assegurar-nos d'eliminar el medi inicial residual. A

continuació es pot sembrar amb el volum necessari de DMEM sense glutamina el flascó desitjat.

### **2.1.2.1. Sistemes de cultiu de cèl·lules animals**

Els sistemes de cultiu utilitzats en aquest treball experimental han estat:

- FLASCONS DE CULTIU (Orange Scientific) de 25 cm<sup>2</sup>, de 75 cm<sup>2</sup> i 150 cm<sup>2</sup>, amb filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus al tap per facilitar l'intercanvi de gasos amb l'exterior i permetre el control del pH a l'incubador de CO<sub>2</sub>. En aquests flascons s'han realitzat experiments amb cèl·lules en suspensió i les ressembres de la línia cel·lular.
- PLAQUES DE CULTIU DE 6 I 12 POUS (Orange Scientifics) per a volums de 2 mL de medi per pou. Han estat el sistema escollit per a realitzar els cultius amb els inhibidors de Bcl-2.

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

Es controla l'esterilitat dels cultius mantenint alíquotes de medi sense cèl·lules a l'incubador i comprovant al microscopi l'absència de bacteris, llevats o fongs.

### **2.1.2.2. Recompte cel·lular**

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

Per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, es tenyeixen amb una mescla 1:1 d'una dissolució de blau de tripà (Sigma) diluïda al 0.2% (V/V) en PBS 0.1 M o NaCl 0,9% (p/v) i la mostra cel·lular. El colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes i els dona un color blavós. Per contra, les cèl·lules vives es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant. Una gota de la dissolució es diposita a la zona de recompte de l'hemacitòmetre i es cobreix amb un cobreobjectes (Menzel-Gäser). A continuació, es realitza el recompte de cèl·lules vives i mortes en cadascun dels quatre

camp. Els dos valors superior i inferior obtinguts es rebutgen, mentre que dels altres dos es fa la mitja.

### 2.1.2.3. Càlcul de la concentració i viabilitat cel·lular

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

$$[\text{cel} / \text{mL}] = \frac{n_1 + n_2}{d \times V_{\text{camp}}}$$

**Eq. 1.-** on  $n_1$  i  $n_2$  són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps acceptats,  $m$  és el nombre de camps comptats i té un valor de 2,  $d$  és la dilució amb blau de tripà realitzada i és 0,5, i  $V$  és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de  $10^{-4}$  mL.

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

$$\% \text{Viabilitat} = \frac{\text{Concentració cèl·lules viables}}{\text{Concentració cèl·lules totals}} \times 100$$

### 2.1.2.4. Càlcul del temps de duplicació i de la durada de les fases del cicle cel·lular

Per una determinada velocitat específica de creixement,  $\mu$ , el temps de duplicació o la durada total del cicle cel·lular  $t_d$  (dies) pot ser determinada per:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

**Eq. 2.-** Equació per determinar el temps de duplicació en un cultiu en discontinu. La velocitat específica de creixement es pot determinar a partir de la fase exponencial del cultiu.

$$t_{G_1} = t_d \cdot \left[ 1 - \frac{\ln(2 - f_{G_1})}{\ln 2} \right] \quad \text{a}$$

$$t_{G_{2/M}} = \frac{\ln(f_{G_{2/M}} + 1)}{\ln 2} \cdot t_d \quad \text{b}$$

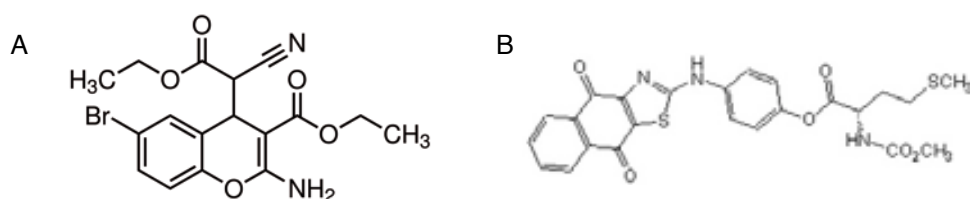
$$t_s = \left[ \frac{\ln(2 - f_{G_1}) - \ln(f_{G_{2/M}} + 1)}{\ln(2)} \right] \cdot t_d \quad \text{c}$$

**Eq. 3.- Determinació del temps de residència de cada fase del cicle cel·lular.** La equació (a) permet determinar la durada específica de la fase G<sub>1</sub>, la eq.(b) la durada de la fase G<sub>2/M</sub> i la (c) la durada de la fase S. On f<sub>G<sub>1</sub></sub> és la fracció de cèl·lules en la fase G<sub>1</sub> i f<sub>G<sub>2/M</sub></sub> és la fracció de cèl·lules en fase G<sub>2</sub> i M. Es poden determinar a partir de l'anàlisi per citometria de flux de la distribució del cicle cel·lular (veure apartat 5.3)

### 2.1.2.5. Cultiu amb inhibidors de Bcl-2

Per tal d'inhibir la funció de Bcl-2 sobre els cultius d'hibridomes, es van utilitzar dos inhibidors químics comercials per fer un perfil de mort cel·lular, aplicant al cultiu un gradient de concentració.

Es va fer servir l'inhibidor HA14-1 (Calbiochem) i l'inhibidor YC-137 (Calbiochem), ambdós són inhibidors específics per Bcl-2, els quals són capaços de travessar la membrana plasmàtica sense necessitat de permeabilitzar les cèl·lules (figura 75).



**Fig. 75.- Estructura dels inhibidors de Bcl-2 utilitzats.** A) Esquema de l'inhibidor HA14-1 i B) esquema de l'inhibidor YC-137.

Els contingut dels vials es van ressuspèndre en 1 mL de DMSO, per obtenir una concentració de solució mare. Es parteix d'aquesta solució per a treballar, la part de l'estoc que no s'utilitza es manté a -30°C. Convé no guardar més de dos mesos la solució mare ja que són inestables un cop dissolts.



Es van utilitzar aquests inhibidors tant en cultius amb medi complet, com en estudis d'inducció de l'apoptosi amb medi DMEM sense glutamina suplementat amb 4% de FBS. Tant sols es va aplicar la dilució necessària a partir de la solució mare directament sobre el cultiu, utilitzant DMSO com a diluent. Pels estudis de determinació de la concentració d'inhibidor òptima, es va mantenir el mateix volum total (inhibidor i diluent). D'aquesta manera com a control es va utilitzar DMSO, per controlar que els efectes sobre el cultiu siguin deguts als inhibidors. Es van fer servir plaques de 12 i 24 pous (Orange Scientific) per aquests estudis amb 1 mL per pou.

#### **2.1.2.6. Cultiu en perfusió**

El cultiu en perfusió es va dur a terme en un flascó agitat amb un volum de treball de 50 mL i amb un recanvi de medi DMEM al 4% de FBS cada 24 hores. El flascó es va inocular amb  $2 \cdot 10^5$  cel/mL i es va incubar a 37°C, en una atmosfera saturada d'humitat (95%) per evitar l'evaporació del medi i amb un 5% de CO<sub>2</sub> per controlar el pH en medis amb tampó bicarbonat. La durada del cultiu va ser de 12 dies i al llarg de l'experiment es va realitzar un seguiment de la viabilitat del cultiu.

## **2.2. ANÀLISI I MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS**

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

Es va utilitzar el kit d'extracció *Hispeed plasmid Midi kit* (Qiagen) seguint les instruccions dels proveïdors.

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

Per l'obtenció de DNA genòmic de les cèl·lules d'hibridoma es va utilitzar el kit *Apoptotic DNA ladder kit* (Roche) seguint les instruccions del fabricant.

### **2.2.3. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis**

#### **2.2.3.1. Reaccions de modificació del DNA**

En la realització de subclonatges s'han emprat les següents reaccions de modificació del DNA: digestió amb enzims de restricció, fosforilació, defosforilació i lligació. Els protocols utilitzats són els descrits als manuals *Molecular Cloning: A Laboratory manual* [260] i *Current Protocols in Molecular Biology* [261], tenint en compte, a més a més, les recomanacions dels fabricants per a cadascun dels productes utilitzats. En aquest treball hem utilitzat enzims provinents de la casa comercial Fermentas.

### 2.2.3.2. Electroforesi en gel d'agarosa no desnaturalitzant

Un cop ha finalitzada la reacció de PCR, o bé s'ha dut a terme una reacció de digestió de DNA, o la lligació d'un fragment prèviament amplificat a un plasmidi digerit, es detecta el producte obtingut mitjançant un gel d'agarosa no desnaturalitzant que separa fragments de DNA en funció del seu tamany. El DNA es visualitza per tinció amb un compost comercial anomenat SYBR Green (Invitrogen), que anàlogament al bromur d'etidi, s'integra a l'estructura del DNA i el fa visible sota el transil·luminador UV.

Per dur a terme els gels d'agarosa cal també TBE (1X) (Sigma), també de càrrega (6X) (Fermentas), agarosa en pols (Sigma), cubeta d'electroforesi, font d'alimentació, pinta de 10 o 15 pous i marcador de pes molecular GeneRuler® (Fermentas).

El procediment consisteix en pesar l'agarosa segons el percentatge que es vulgui fer el gel (a més proporció d'agarosa, més resolució aconseguirem i per tant podrem veure fragments més petits). El més corrent és d'entre el 0,8-2%. S'afegeix el tampó TBE 1X i s'escalfa al microones per tal que dissolgui l'agarosa, es deixa refredar i s'afegeix el SYBR Green (segons recomanació del fabricant). Un cop gelificat, es carrega la mostra amb el tampó de càrrega. El gel s'observa al transil·luminador de llum ultraviolada.

La radiació ultraviolada de 260 nm absorbida pels àcids nucleics es transmet al SYBR Green emetent com a resultat fluorescència a 590 nm que és proporcional a la quantitat d'àcid nucleic present.

### 2.2.3.3. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

El mètode emprat està basat en una resina que uneix el DNA. S'ha fet servir el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), seguint les especificacions del fabricant.

### 2.2.3.4. Preparació i transformació de cèl·lules competents d'*E.coli*

El mètode per obtenir cèl·lules d'*E. coli* competents per la seva transformació per xoc tèrmic és el següent:

*Protocol de preparació de cèl·lules competents:*

- Inocular un minicultiu de 5 mL de SOB o LB (medi sense antibiòtics) a partir d'un glicerinat de la soca d'*E. coli* que ens interessi, i incubar o/n a 37°C.

- Diluir el cultiu crecut o/n a 1:100 amb medi SOB o LB (sense antibiòtics) i agitar (200 rpm) a 37°C fins a obtenir una D.O<sub>550</sub> d'entre 0,3-0,5.
- Transferir les cèl·lules a tubs de centrífuga i refredar en gel durant 10 min.
- Centrifugar les cèl·lules 7 min a 3500 rpm a 4°C.
- Descartar el sobrenadant amb cura i ressuspensar el pellet amb 5 mL de MgCl<sub>2</sub> 10 mM (taula 12), estèril i en fred. Un cop ressuspensades s'afegeixen 120 mL addicionals de MgCl<sub>2</sub> 10 mM.
- Centrifugar 7 min a 3500 rpm a 4°C.
- Eliminar el sobrenadant amb cura i ressuspensar el pellet afegint 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM, 20% glicerol (taula 12), estèril i en fred. Afegir 5 mL addicionals de CaCl<sub>2</sub> 50 mM, 20% glicerol un cop s'ha ressuspès el pellet.
- Deixar en gel 1h com a mínim.
- Transferir en eppendorfs 400 µL de la suspensió cel·lular en tubs estèrils.
- Conservar a -80°C.

Taula 12.- Taula de proporcions per la preparació de MgCl<sub>2</sub> i CaCl<sub>2</sub>/glicerol.

**10 mM MgCl<sub>2</sub>**

STOCK	100 mL	200 mL	300 mL	400 mL	500 mL
1 M MgCl <sub>2</sub> (mL)	1	2	3	4	5
dd H <sub>2</sub> O (mL)	99	198	297	396	495

**50 mM CaCl<sub>2</sub>, 20% glicerol**

STOCK	100 mL	200 mL	300 mL	400 mL	500 mL
1 M CaCl <sub>2</sub> (mL)	5	10	15	20	25
Glicerol (mL)	20	40	60	80	100
dd H <sub>2</sub> O (mL)	75	150	225	300	375

Les sol·lucions han d'estar autoclavades.

*Transformació de cèl·lules competents:*

- Descongelar els vials amb les cèl·lules competents en gel i afegir 25-50 ng de DNA plasmídic a 20 µL de cèl·lules competents.
- Mesclar bé (sense vortejar)

- Incubar en gel 20-30 min.
- Incubar a 42°C durant 40 s en un bany d'aigua (xoc tèrmic).
- Posar els tubs en gel durant 10 min.
- Afegir 80 µL de medi SOC o LB (sense antibiòtics).
- Mesclar durant 2-4 h a 225 rpm a 37°C.
- Plaquejar en plaques LB amb el corresponent antibiòtic.
- Incubar a 37°C o/n en posició invertida.

Un cop descongelades les cèl·lules competents, han de ser descartades si no s'han utilitzat i mai congelar de nou.

### 2.3. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és un mètode ràpid per amplificar enzimàticament fragments específics de DNA. Els reactius i la metodologia que es va emprar són els indicats per els kits *PCR Master Mix* i *PWO Master Mix* (Roche).

#### 2.3.1. Condicions generals de PCR

Per dur a terme la reacció en cadena de la polimerasa cal mesclar en les proporcions descrites els següents reactius proporcionat pel fabricant (taula 13);

Taula 13.- Composició dels elements necessaris per la reacció de PCR.

Components	Volum (µl)	Concentració final
DNA motlle	x	0,1 - 0,75 µg
dNTP (2.5 mM)	5	0,25 mM
Tampó 5X	5	1x
Encebador dret	1	0,2 µM
Encebador esquerra	1	0,2 µM
DNA polimerasa	x	1 U
H <sub>2</sub> O ultrapura estèril	Fins a 50 µL	

Es col·loca el tub en el termociclador Gene Cycler (Bio-Rad) i es comencen els cicles d'amplificació tal i com es mostra en el programa següent (taula 14):

**Taula 14.- Esquema dels cicles de PCR.** On  $T_h$  és la temperatura específica per a cada parell d'encebadors i  $N$  el temps d'extensió (es calcula que es necessita 1' per cada 1000 pb).

Nº de cicles	Temperatura (°C)	Durada	Funció
1	95	2 min	Desnaturalitzar el motlle
30	95	30 s	Desnaturalització
	$T_h$	45 s	Unió motlle-encebadors
	72	1 min	Elongació
1	72	$N$ min	Elongació addicional

La temperatura d'hibridació  $T_h$  (temperatura a la qual l'encebador s'uneix al DNA motlle) es calcula com  $T_m - 5^\circ\text{C}$ . En el cas que l'amplificació no doni el resultat esperat, cal determinar la temperatura d'hibridació empíricament. El temps d'elongació de la cadena depèn de la longitud del fragment que es vol amplificar.

Els fragments de DNA resultants de la PCR es van purificar retallant el producte d'interès després de la seva resolució en gels d'agarosa. El producte de PCR es va purificar utilitzant el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant.

Els fragments de DNA obtinguts per PCR es van dur a seqüenciar al Servei de Seqüenciació i Síntesi d'Àcids Nucleics de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

### 2.3.2. RT-PCR

La reacció de RT-PCR permet analitzar l'expressió d'un determinat gen tot retrotranscrivint els seus transcrits (mRNA) a cDNA, per després utilitzar-lo com a motlle en una reacció de PCR convencional.

La síntesi de cDNA de primera cadena s'ha realitzat a partir de RNA total, seguint els passos indicats al kit *Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit* (Roche), que utilitza una retrotranscriptasa d'alta fidelitat juntament amb la polimerasa *Pwo* per obtenir el DNA còpia. Es parteix d'1  $\mu\text{g}$  de RNA total i s'utilitzen hexanucleòtids a l'atzar com a encebadors, s'uneixen a diversos llocs del RNA i generen cDNA curts, per tant són ideals per evitar estructures secundàries en el motlle i a més a més transcriuen de forma més eficaç les regions 5' dels mRNA. Un cop obtingut el cDNA, es pot realitzar una PCR convencional o bé una PCR en temps real (taula 15).

Taula 15.- Esquema dels cicles de RT-PCR.

Nº de cicles	Temperatura (°C)	Durada	Funció
1	50	30 min	Allargar la còpia de cDNA
1	94	2 min	Desnaturalització
35	94	30 s	Desnaturalització
	T <sub>h</sub>	45 s	Unió motlle-encebadors
	68	1 min	Elongació
1	68	10 min	Elongació final

Si es vol fer una amplificació d'un gen concret a partir del seu mRNA en un sol pas, es pot fer una RT-PCR utilitzant el kit *Titan One Tube RT-PCR kit* (Roche) (figura 76), que utilitza l'activitat de la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosi aviària (AMV) per a la síntesi de la primera cadena de cDNA i una barreja de Taq i Pwo polimerases per a la seva amplificació. Es parteix d'1 µg de RNA total i utilitzant el termociclador iQ5 (Bio-Rad) i el programa següent, del qual únicament s'han modificat les T<sub>h</sub>, segons les seqüències dels encebadors dissenyats, i el temps d'elongació de la cadena, segons la longitud del fragment que es volia amplificar:

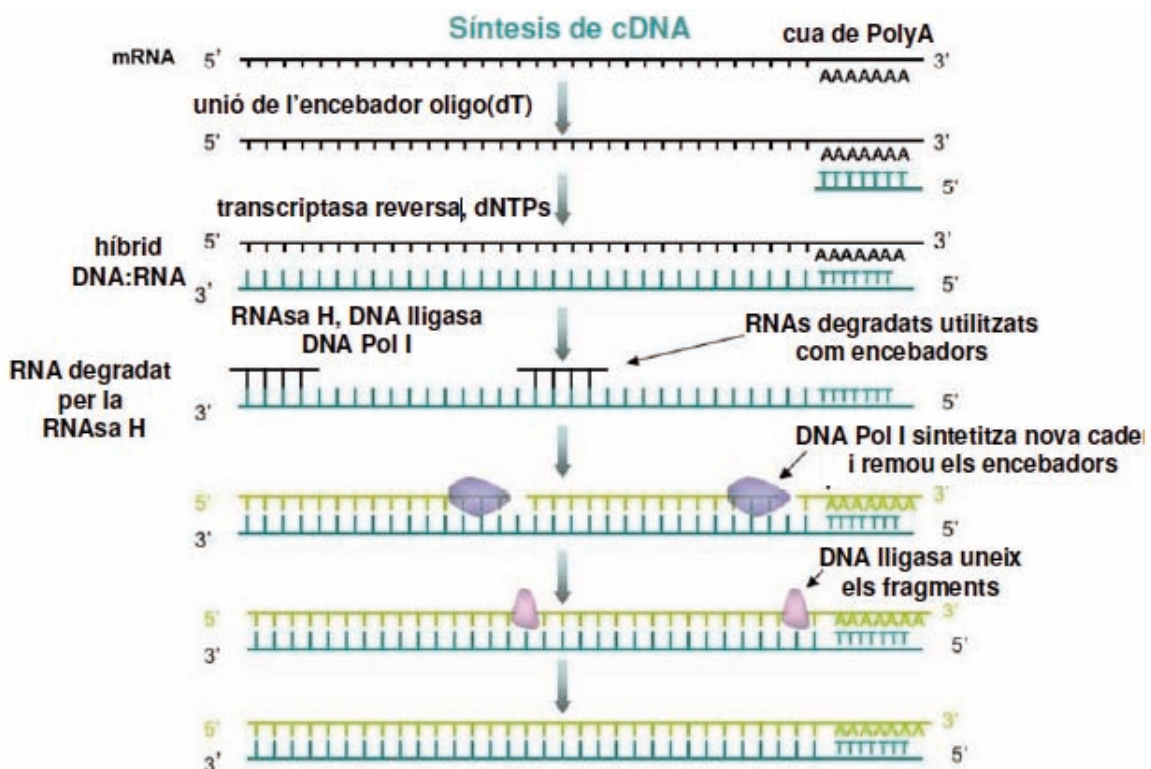


Fig. 76.- Síntesi de cDNA. Esquema de la síntesi de cDNA a partir de RNA utilitzant oligo dT [262].

El producte d'aquesta reacció és el cDNA d'un gen concret que s'estigui expressant a la cèl·lula en un determinat moment.

### 2.3.3. Reacció de PCR en Temps Real (Real-Time PCR)

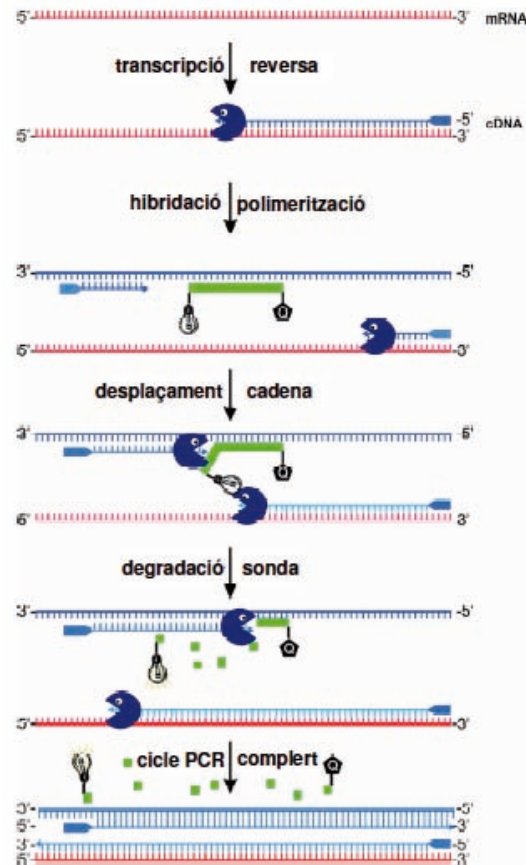
En la PCR a temps real, el producte de PCR s'analitza en uns cicles en els que encara hi ha una relació lineal entre el producte de partida i la quantitat d'amplicó sintetitzat. La PCR a temps real permet la detecció del producte de PCR a mida que aquest s'acumula, i per tant, proporciona un mètode molt sensible per a la quantificació del nombre de còpies d'una mostra o la comparació dels nivells d'expressió entre mostres diferents.

Les reaccions de PCR en temps real venen caracteritzades pel cicle en què l'amplificació d'un determinat producte es detecte per primer cop. La PCR en temps real permet tant una quantificació absoluta del número de còpies de cada missatger com una quantificació relativa, basada en el paràmetre  $C_T$  (cicle llindar o *threshold cycle*), el qual es fixa com el cicle en què la fluorescència supera un llindar prèviament fixat (*threshold*). Per tant, s'ha d'utilitzar un control endogen com a element normalitzador. La relació entre el  $C_T$  de la diana i el del control endogen proporciona el valor de  $C_T$  normalitzat ( $C_{TN}$ ) de la diana, que serveix per estandaritzar la quantitat del cDNA afegit a la reacció.

Els oligonucleòtids contra Bcl-2 (Mm00477631\_m1), GAPDH (Mm99999915\_g1) (control endogen) van ser dissenyats per TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Aquest sistema es basa en la utilització d'una sonda consistent en un oligonucleòtid que porta unides dos tipus de molècules: un marcador fluorescent (o *reporter*) al seu extrem 5' i un reductor de l'emissió (o *quencher*) a l'extrem 3'. Mentre la sonda es troba intacta, la proximitat del *quencher* redueix enromement la fluorescència emesa per *reporter* pel fenomen de FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*). A mesura que la Taq DNA polimerasa allarga el *primer*, l'activitat 5' nucleasa d'aquesta degrada la sonda, que es troba unida entre els dos *primers*. D'aquesta manera els dos fluorocroms es separen, incrementant així el senyal del *reporter*. A cada cicle hi ha més molècules de *reporter* alliberades, produint-se un augment de la fluorescència proporcional a la quantitat d'amplicó general (figura 76).

Materials:

- Aparell Bio-Rad iQ5.
- Sondes TaqMan® i *primers*. En el nostre cas les sondes estaven marcades amb el fluorocrom FAM que emet al canal del verd.
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, No Amperase UNG
- Micro Seal 'B' filam (Bio-Rad)
- Hard-Shell® Full-Height 96-well Semi-Skirted PCR Plates (Bio-Rad)



**Fig. 77.- Principi d'acció de les sondes TaqMan®.** La fluorescència s'incorpora a la reacció de PCR pel mètode de l'assaig 5' nucleasa que utilitza una sonda i uns *primers* específics per la seqüència que es vol detectar. La sonda i els *primers* s'uneixen al cDNA i comença la polimerització. Quan l'enzim arriba a la sonda, l'activitat 5' nucleasa de la polimerasa la desplaça i l'acaba trencant. Això fa que el fluorocrom que emet la fluorescència (R, *reporter*) se separi de l'altre fluorocrom (Q, *quencher*) i que s'emeti la fluorescència. A mesura que es van sintetitzant noves cadenes de DNA l'emissió de fluorescència augmenta i queda enregistrat en l'aparell, donant la mesura de fluorescència a cada cicle de la PCR [262].



Les condicions generals de Real-Time PCR emprades en aquest treball es descriuen a continuació:

cDNA	2 µL (1 µg de RNA total)
TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X	25 µL
20X TaqMan® Gene Expression Assay Mix	2 µL
H <sub>2</sub> O Milli Q DNAsa/RNAsa free	21 µL

Afegim 24 µL a cada pou de la placa.

Es van mesclar tots els components indicats i es mantenen a 4°C fins a programar el termociclador.

Els cicles utilitzats van ser (taula 16):

Taula 16.- Esquema dels cicles de PCR en Temps Real.

Nº de cicles	Temperatura (°C)	Durada	Funció
1	95	10 min	Desnaturalitzar el motlle
30	95	15 s	Desnaturalització
	60	1 min	Anellament/Extensió

Tal i com s'ha comentat prèviament, aquest mètode es basa en el càlcul de la relació entre el C<sub>T</sub> de la diana i el del control endogen, que serveix per a estandaritzar la quantitat de RNA o DNA afegit a la reacció. Tot i això, aquest valor és un valor sense cap unitat que pot ser utilitzat per a la comparació relativa de la quantitat de la diana entre diferents mostres. Una forma d'aconseguir-ho és designar una de les mostres com a calibrador. El calibrador no és més que una mostra que serveix com a base per a comparar els resultats, és a dir, el que proporciona el valor 1 de l'expressió.

La quantitat de la diana, normalitzada al control endogen i relativa al calibrador, ve donada per:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

on  $\Delta C_T = C_{T \text{ diana}} - C_{T \text{ control endogen}}$

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ mostra}} - \Delta C_{T \text{ calibrador}}$

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

Es segueixen les indicacions del kit d'extracció *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen) per a obtenir el RNA<sub>TOTAL</sub> de les cèl·lules d'hibridoma. Aquest sistema d'extracció ens permet obtenir la fracció de RNA<sub>TOTAL</sub> lliure de contaminació de DNA genòmic. Això és important de cara a la realització de la PCR en Temps Real i que aquesta només amplifiqui els gens que s'estan expressant en un determinat moment.

És important utilitzar el material de plàstic adequat per aquest procés, treballar a la campana de bioseguretat i utilitzar sempre guants, així com material autoclavat o estèril lliure de DNases i RNases.

### 2.3.3.2. Quantificació de RNA<sub>TOTAL</sub>

Per quantificar i determinar la integritat del RNA<sub>total</sub> extret de les cèl·lules d'hibridoma, utilitzem el sistema *Experion Automated Electrophoresis Station* (Bio-Rad) amb els xips RNA StdSens (Bio-Rad).

### 2.3.4. Microarrays de DNA

La tecnologia de microxips de DNA és una de les eines més poderoses que disposa actualment la genòmica per tal d'obtenir informació sobre les funcions dels diferents gens, conèixer en quins processos participen, de quina manera estan regulats, la interacció amb altres productes gènics, com varien els nivells d'expressió entre diferents tipus cel·lulars i fases de cultiu, i com varia l'expressió gènica sota diferents condicions ambientals, entre d'altres.

Els microarrays permeten la quantificació relativa de l'expressió gènica, amb l'avantatge d'analitzar centenars o milers de gens alhora. El concepte bàsic dels *arrays* és la immobilització de fragments coneguts de DNA (sondes) en suports sòlids, amb la posterior unió de les seqüències complementaries d'aquests àcids nucleics presents en la mostra biològica d'interès (com es pot veure en la figura 78).

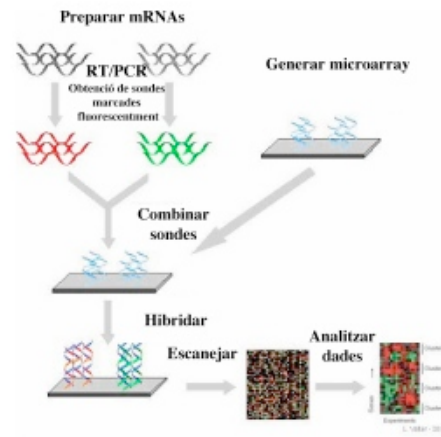


Fig. 78.- Incubació d'arrays. Esquema del protocol d'incubació d'un array [262].

Existeixen dos tipus principals de microarrays que es diferencien en funció del mètode de fabricació i de la naturalesa de l'àcid nucleic immobilitzat, els microarrays de DNA i els microarrays d'oligonucleòtids.

Els microarrays d'oligonucleòtids es sintetitzen per fotolitografia, que consisteix en la síntesi *in situ* d'oligonucleòtids de 25 bases. En la síntesi, es parteix d'una superfície de vidre coberta de quars amb un compost sensible a la llum que evita la unió del primer oligonucleòtid de la sonda. L'emascarament litogràfic s'utilitza per a bloquejar o permetre la transmissió de la llum en localitzacions específiques del suport, activant així el compost químic. A continuació, la superfície s'incuba amb una solució que conté el nucleòtid d'interès, que s'acoblarà només en aquelles regions on el vidre ha estat desprotegit per il·luminació. El nucleòtid presenta també un grup de protecció sensible a la llum, de manera que el cicle es va repetint. Així, es van sintetitzant les sondes mitjançant cicles de química combinatòria. Aquesta tecnologia requereix una infraestructura molt sofisticada i la seva utilització, pel moment, està limitada a unes poques empreses especialitzades entre les que destaca Affymetrix.

Els microarrays de DNA es sintetitzen generalment per impressió del DNA en superfícies de vidre recobertes químicament per a permetre la unió del DNA. Aquesta unió pot ser iònica (amines o lisines) o covalent (epòxids o aldehids). El DNA utilitzat prové de productes de PCR, de 500 a 2500 bases, que són purificats per tal d'eliminar les sals, els primers i les proteïnes presents en la reacció de PCR. Cada punt de l'array, el que anomenem sonda, es genera per la deposició de pocs nanolitres del producte purificat. En funció del mètode d'impressió utilitzat, el diàmetre de la sonda varia entre 100 i 300  $\mu\text{m}$ .

En aquest tipus de microarrays es realitza una hibridació per competència entre la mostra d'interès i una de referència, marcades cadascuna amb un fluorocrom diferent (normalment Cy3 i Cy5).

Tanmateix, tot experiment de microarray consta de diversos passos comuns:

- Aïllament del RNA de les mostres biològiques.
- Generació de les dianes marcades. Per a cada hibridació calen de 10 a 30 µg de diana marcada. En molts casos no es disposa de tanta quantitat de mostra, pel que és recomanable un primer pas d'amplificació del RNA (aRNA). A continuació s'efectua una retrotranscripció del aRNA amb l'objectiu d'obtenir les sondes de DNA marcades fluorescentment.
- Hibridació de les sondes marcades. El protocol d'hibridació utilitzat varia en funció de la longitud de les sondes, del tipus d'array, de la química d'immobilització utilitzada i del tipus de diana marcada.
- Detecció del senyal i anàlisi de les dades. Els senyals dels micorarrays es detecten per escaneig, utilitzant un lector de fluorescència. Aquests escàners porten associat un *software* que permet la identificació de les sondes individuals i la mesura de la intensitat de cadascuna. Les dades obtingudes han de ser normalitzades amb la finalitat d'ajustar les diferències d'intensitat. A partir d'aquí ja es poden calcular els canvis d'expressió de cada gen. L'elevada quantitat de dades que es generen fa necessària la utilització de diversos programes informàtics per tal de facilitar aquest procés.
- Validació de les dades de l'array mitjançant tècniques alternatives.

En aquest assaig, es van utilitzar les mostres control, és a dir, l'hibridoma KB26.5-∅ i mostres de les cèl·lules d'hibridoma KB26.5-*bhrf1*. Les mostres es varen recollir a diferents temps d'un cultiu discontinu a les 48 i 96 h. A més a més, també es va obtenir mostra a les 24 h d'un cultiu on s'indueix l'apoptosi per falta de glutamina. D'aquestes mostres es va fer l'extracció de RNA, com es descriu a l'apartat 2.5 d'aquest capítol. Seguidament es va quantificar mesurant l'absorbància a 260 nm i es va enviar al Servicio de Análisis de Microarrays de la Unidad de Genómica del CNIC a Madrid.

En aquesta tesi, s'ha utilitzat un microarray Codelink d'Amersham Biosciències, amb 36000 transcripts murins. Cada bioarray ha sigut hibridat amb una mostra de RNA marcada amb biotina. Els arrays hibridats han estat escanejats utilitzant l'escàner Agilent Microarray G2565BA per produir imatges per ser posteriorment processades i quantificades utilitzant el *software* CodeLink™ Expression Analysis v4.1, per l'obtenció inicial dels valors de l'expressió gènica de l'array.

El sistema classifica les intensitats segons la seva qualitat associant les etiquetes G (bones), M (mitjana) i R (regular). Pel seu tractament es descarten les intensitats etiquetades com a R.

## 2.4. MICROSCÒPIA

### 2.4.1. Fixació i muntatge de les mostres de cèl·lules

S'han preparat les mostres per a visualitzar les cèl·lules al microscopi fixant-les amb paraformaldèid (PFA) 4% durant 30 min a temperatura ambient. Després es renten 2 cops amb PBS. Per muntar les preparacions, es posa un cubreobjectes sobre el portaobjectes, havent posat medi de preparació i es segella amb laca d'angles.

En el nostre cas, prèviament a la immunocitoquímica amb mostra fixada, cal marcar l'anticòs anti BHRF1 directament, ja que al provindre de cèl·lules murines i ser un isotip IgG<sub>2A</sub> no es pot utilitzar un anticòs secundari sense que hi hagi la possibilitat de tenir alguna interacció per part de l'anticòs secundari amb la cadena pesada de la immunoglobulina produïda per les cèl·lules d'hibridoma.

És per això que s'utilitza el kit *Alexa Fluor® 488 Microscale Protein Labeling kit* (Molecular Probes) per conjuguar un fluorocrom com és l'Alexa Fluor 488 a través de l'èster de tetrafluorofenil (TFP) amb les amines de les proteïnes, formant un complex estable entre la proteïna i el fluorocrom.

### 2.4.2. Marcatge fluorescent de proteïnes

El procediment és el següent:

- Preparar bicarbonat sòdic 1M: afegir 1 mL d'aigua milliQ al vial del component B (bicarbonat sòdic). Pipetejar per dissoldre totalment.

- Transferir 60 µL de la proteïna/anticòs (Monoclonal Ab (EA-R) p17) al tub de reacció (component C) i afegir-hi 6 µL de bicarbonat sòdic.
- Afegir 10 µL d'aigua milliQ a un dels vials Alexa Fluor® 488 TFP (component A) i dissoldre bé. Nota: Preparar aquesta solució just abans de ser utilitzada
- Afegir 2 µL de la solució del fluorocrom (Alexa Fluor® 488) al tub de reacció que conté la proteïna/anticòs i pipetejar diverses vegades.
- Incubar 15 min a temperatura ambient.
- Agitar el component E, el gel de resina, per tal de ressuspènere'l (no vortejar) i transferir uns 800 µL al *spin filter* (component D).
- Centrifugar el *spin filter* a 16000xg durant 15 s. Descartar el tampó que queda al tub de col·lecció del *spin filter*.
- Pipetejar no més de 50 µL del reactiu (proteïna/anticòs + Alexa 488) i dipositar-los sobre el llit de reïna que ha quedat al *spin filter*.
- Centrifugar 1 minut a 16000xg.
- Després de la centrifugació, el tub de col·lecció conté la proteïna/anticòs marcat en 60-100 µL de buffer.

### 2.4.3. Immunocitoquímica

#### 2.4.3.1. Immunocitoquímica amb fixació PFA 4%

- Agafar 1 mL d'un cultiu i centrifugar-les a 1000 rpm durant 5 min.
- Eliminar el sobrenadant
- Afegir 500 µL de Mitotracker® CMXRos RED (Invitrogen) 500 nM ( 2,5 µL a 1 mM en 5 mL de PBS 0,1M) durant 45 min a l'incubador.
- Centrifugar a 1000 rpm durant 5 min. Eliminar el sobrenadant
- Rentar amb PBS 0,1M (prèviament escalfat a 37°C). Aproximadament 1 volum
- Opcional: Tornar a fer el pas de centrifugació i rentat
- Transferir les cèl·lules al porta de polilysina. Idealment Santa Cruz, aprox. 20 µL per pou. Deixar 15 min (tapat)
- Fixar i permeabilitzar les cèl·lules amb PFA 4% (2,5 mL PFA 16% en 10 mL PBS 1X) durant 15 min.

Nota: Mentre es produeix la fixació, preparar BSA 1% (20 mL PBS + 0.2 g BSA).

- Rentar amb PBS 0,01 M filtrat (x3).

- Solució Tritó X-100 (Sigma) 0,25% (25 µL en 10 mL PBS 1X) durant 15 min.  
Nota: la solució ha d'estar prèviament feta, aproximadament 1<sup>a</sup> h abans per evitar les bombolles degudes al detergent).
- Rentar amb PBS 0,01 M filtrat (x3).
- Solució de bloqueig BSA 1% durant 30 min, a temperatura ambient (a les fosques).
- Nota: Preparar la dilució de l'anticòs primari (**1:500**) amb BSA 1%.
- Rentar amb PBS 0,01 M filtrat (x3).
- Incubar amb anticòs primari marcat (30-40 µl sobre cubreobjectes petits/ 50-60 µl sobre portaobjectes) a 37°C durant 1 hora, en condicions d'humitat.
- Rentar amb PBS 0,01 M filtrat (x3).
- Posar Hoescht (1:1000 en PBS1X) i deixar a 37°C durant 10 min.
- Rentar amb PBS 0,01 M filtrat (x3).
- Posar Cell Mask en les mostres corresponents (2 µl en 1000 µl PBS 1X) i deixar a 37°C durant 10 min.
- Rentar amb PBS 0,01 M filtrat (x3).
- Deixar assecar les preparacions (1 hora aproximadament).
- Muntar les preparacions amb 10 µL de Fluoroprep (Biomérieux) i segellant amb laca d'ungles.

Tenir en compte de deixar sempre una preparació sense anticòs marcat (control intern) i una altre afegint l'anticòs però sense marcar-lo fluorescentment (control negatiu) per veure l'autofluorescència de les cèl·lules i tenir-ho en compte alhora de fer les observacions al microscopi confocal (taula 17).

Taula 17.- Anticòs utilitzat per microscòpia confocal.

Anticòs	Dilució
Mouse Monoclonal Ab (EA-R) p17 (anti BHRF1)	1/500

### 2.4.3.2. Col·localització

Per fer els estudis de col·localització en les imatges de microscòpia confocal, on hi ha dos o més marcatges, es tracten les adquisicions amb el *software* de Leica i s'utilitza el tractament d'imatges per mesurar la col·localització entre dos canals basat en el Coeficient d'*Overlap*, derivat del mètode de Pearson de correlació, on s'inclou la intensitat de les senyals dels píxels del canal 1 i canal 2 (assignant valors entre el 0 com a valor

inferior i 1 com a màxim valor de correlació). Aquest mètode té en compte el *background* de la imatge i és independent de la intensitat entre els canals. El número de píxels en els dos canals de la imatge ha de ser similar.

## **2.5. TÈCNIQUES PROTEIQUES**

### **2.5.1. Gels desnaturalitzants d'acrilamida per a proteïnes (SDS-PAGE)**

#### **2.5.1.1. Obtenció del lisat cel·lular total**

L'extracció proteica s'ha realitzat mitjançant lisat cel·lular total amb tampó de lisi. Es centrifuguen les cèl·lules i es renten 3 cops amb PBS 1X, s'afegeix 100 µL de tampó de lisi al pellet cel·lular, es fan 2 polsos de sonicació de 5 s cada un, deixant reposar en gel entre pols i pols i es deixa 4 min a 4°C en agitació circular. Posteriorment es centrifuga a 20000xg (Beckman Coulter Allegra™ 25R) durant 30 min a 4°C. El sobrenadant es guarda en un tub net a -80°C.

#### **2.5.1.2. Extracció de la fracció mitocondrial**

Per fer l'extracció de mitocondris de les cèl·lules d'hibridoma s'han seguit les indicacions del kit *Mitochondria Isolation Kit* (Thermo scientific). En aquest cas s'utilitzen els inhibidors de proteases recomanats pel fabricant, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail kit* (Thermo scientific). Un cop s'obté la fracció mitocondrial, així com la fracció citosòlica es guarden a -80°C. En aquest cas també cal rentar el pellet cel·lular amb PBS 1X 3 cops abans de fer l'extracció mitocondrial.

A partir de la fracció mitocondrial es pot fer un Western-Blot si es lisen els mitocondris utilitzant 75 µL de TBS amb 2% de CHAPS (Thermo scientific), es soniquen 5 s, 2 cops deixant en gel entre pas i pas, es centrifuguen a 20000xg i el sobrenadant es guarda en un tub net a -80°C.

#### **2.5.1.3. Quantificació de proteïna**

Per a realitzar les diferents tècniques proteiques amb l'extracte cel·lular cal saber-ne la concentració. En aquest treball s'ha quantificat la presència de proteïnes en qualsevol extracte cel·lular total o de fraccions cel·lulars mitjançant el mètode Bradford.



Material:

- Reactiu Bradford, *Bio-Rad protein assay*
- Albumin Bovine Serum (BSA), Fraction V, minimum 96% (Sigma) a 0.7 mg/mL
- Placa de 96 pous de fons pla (Nunc)
- Lector de plaques 595 nm (Bio-Tek power wave XS)

Procediment:

A partir de la solució mare de BSA fem les següents dilucions amb H<sub>2</sub>O (taula 18):

**Taula 18.- Taula de dilució de BSA per la quantificació per Bradford.**

Volum	Volum aigua	Concentració	dilució	
200 µL stock	3 mL	44 µg/mL	1/16	a
2 mL a	2 mL	22 µg/mL	1/2	b
2 mL b	2 mL	11 µg/mL	1/2	c
2 mL c	2 mL	5,5 µg/mL	1/2	d
2 mL d	2 mL	2,75 µg/mL	1/2	e
2 mL e	2 mL	1,37 µg/mL	1/2	f
2 mL f	2 mL	0,69 µg/mL	1/2	g

- Posar 200 µL del patró o de mostra en una placa de 96 pous (per triplicat).
- Afegir 50 µL de reactiu Bradford a cada pou.
- Llegir la placa al lector (mesclar bé al afegir el reactiu amb la mostra).

De mostra es fa una dilució 1/100 en aigua (exemple: 6,1µL/610µL) prèviament a fer-la reaccionar amb el reactiu Bradford a la placa.

L'electroforesi unidimensional en condicions denaturalitzants (en presència de SDS) separa les proteïnes basant-se en el seu pes molecular a mesura que es mouen per la matriu d'acrilamida. La mostra de proteïnes es solubilitza bullint-la 5 min en presència de SDS i β-mercaptoetanol (que redueix els enllaços disulfur) i es carrega en el gel

d'electroforesi. Els gels emprats en aquest treball corresponen al sistema clàssic, en què un sistema discontinu de tampons de diferent pH i composició permet la concentració de la mostra de proteïnes en bandes fines que posteriorment són separades d'acord amb el seu pes molecular.

Les electroforesis es van realitzar en un aparell Mini-PROTEAN (Bio-Rad) i les migracions es van realitzar a 30 V fins a la fase concentradora i a 100 V després durant unes 2 h en gels desnaturalitzants d'acrilamida a una concentració adequada a la mida de la proteïna d'interès a analitzar (normalment del 12%), preparats segons les indicacions de la taula 19 i 20 (per a 10 mL):

**Taula 19.- Taula de gel concentrador.**

% gel	mL H <sub>2</sub> O milli-Q	mL tampó concentrador	mL SDS 10%	mL 30%/0.8% acril./ bisacril
4	6.1	2.5	0.1	1.3

**Taula 20.- Taula de gel separador a diferents percentatges d'acrilamida.**

% gel	mL H <sub>2</sub> O milli-Q	mL tampó separador	mL SDS 10%	mL 30%/0.8% acril./ bisacril
10	4.1	2.5	0.1	1.3
12	3.4	2.5	0.1	3.3
15	2.4	2.5	0.1	5.0

Afegir el catalitzador (TEMED) i l'iniciador (APS) per la polimerització del gel en les proporcions següents (taula 21):

**Taula 21.- Proporcions de TEMED i APS necessàries per polimeritzar 10 mL de gel.**

	10 mL
APS (Amersham Biosciences)	50 µL
TEMED (Amersham Biosciences)	15 µL

Procediment:

- Rentar bé els vidres de 1.5 mm i es munten amb els separadors i pincetes subjectant-los.
- Preparar la solució del gel separador al % adequat d'acrilamida.
- Abocar el gel separador fins a 1 cm del final dels pouets de la pinta, s'anivella la part superior del gel amb isopropanol i es deixa polimeritzar durant 1h. A continuació es prepara el gel concentrador al 4%.
- Es descarta l'isopropanol i s'aboca el gel concentrador, col·locant la pinta alhora. El gel es deixa polimeritzar durant uns 30 min.

Les mostres es bullen durant 5 min a 100°C en tampó de càrrega amb SDS 1X, es carreguen 70 µg en el gel i es procedeix a l'electroforesi en tampó de migració, a una intensitat de corrent constant.

Acabada l'electroforesi, es desmunta el sistema i el gel es pot tenyir amb Comassie Blue o bé fer una transferència de proteïnes a membrana (Western-Blot).

### **2.5.2. Transferència de proteïnes (Western Blot)**

Aquesta tècnica aprofita la força i l'especificitat de la interacció antígen-anticòs, per a detectar i identificar proteïnes prèviament separades per mida electrofòricament. L'immunorevelat s'ha dut a terme mitjançant un anticòs secundari conjugat a peroxidasa i hem detectat la reacció de forma quimioluminiscent.

#### Material:

#### Tampons:

Tampó de saturació

Tampó de transferència

Cubeta MiniPROTEAN per Western-blot

Agitador magnètic

PBS-0.1% Tween 20/NP-40

Membrana Nitrocel·lulosa 0.2 µm de porus (Hybond ECL, GE Healthcare)

Paper Whatman®

Esponges

Bloc de gel

Luminol SuperSignal® West (Thermo Scientific)

Films d'autoradiografia (Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare)

#### Procediment:

*Electrotransferència:*

- El gel de proteïnes, la membrana de nitrocel·lulosa, 2 papers Whatman i les espongetes s'equilibren en solució de transferència durant 5 min.
- Muntar el sandvitx, col·locant des del pol negatiu (color negre al casset) al positiu (vermell): 1 esponja, 1 paper Whatman®, el gel, la membrana de nitrocel·lulosa, 1 paper Whatman®, 1 esponja, evitant de deixar bombolles entre les capes. Es situa entre els elèctrodes de la cubeta de transferència, cobrint-lo amb la solució de transferència.
- Posar la cubeta sobre l'agitador magnètic, havent posat un imant a la cubeta, posem el bloc de gel.
- Transferir durant 1 h a 100V. Es pot comprovar si ha transferit bé tenyint el gel amb Comassie (no han d'aparèixer bandes), i la membrana amb solució Ponceau S (Sigma) (les proteïnes apareixen com a bandes rosades que es poden destenyir amb H<sub>2</sub>O o PBS).

*Immunorevelat amb quimioluminiscència:*

- La membrana s'incuba en solució de saturació durant 2 h a T ambient en agitació.
- A continuació s'incuba amb l'anticòs primari en la dilució adequada en solució de saturació, durant 1h 30 min a T ambient en agitació o bé total la nit a 4°C.
- Es renta la membrana 3 vegades durant 5 min amb la solució de rentat (PBS-0.1% Tween 20 o NP-40).
- S'incuba amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa en la dilució adequada en solució de saturació, durant 2 h a T ambient.
- Es renta la membrana 3 vegades durant 5 min amb solució de rentat.

Per al revelat, s'utilitza la solució de luminol comercial SuperSignal® West, s'incuba la membrana durant 5 min a la foscor, es posa la membrana al casset d'exposició amb el film d'autoradiografia i es fan diferents temps d'exposició per a obtenir un senyal correcte.

### 2.5.3. Anticossos

A continuació es presenta una la taula 22 amb els diferents anticossos utilitzats en els Western Blot i les seves corresponents dilucions:

**Taula 22.-** Anticossos primaris i secundaris utilitzats per l'assaig de Western-Blot amb les solucions i dilucions corresponents.

Anticòs	Solució	Dilució
monoclonal ratolí anti BHRF1 (IgG <sub>2a</sub> )	PBS-0.1% NP-40 + llet desnatada en pols 5%	1/200
monoclonal ratolí anti citocrom <i>c</i> (IgG <sub>2b</sub> )	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/500
monoclonal ratolí anti VDAC (IgG <sub>2b</sub> )	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/500
sèrum conill anti VRK2	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/1000
sèrum conill anti p21	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/200
sèrum conill anti tubulina	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/2500
sèrum conill anti Bak	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/200
sèrum conill anti caspasa 3	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/100
sèrum conill anti Bax	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/200
sèrum conill anti Bim	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/500
sèrum conill anti Bcl-2	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/200
Ac rabbit anti mouse	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/5000
Ac anti-mouse IgG <sub>2a</sub>	PBS-0.1% NP-40 + llet desnatada en pols 5%	1/1000
Ac goat anti-rabbit	PBS-0.1% Tween-20 + llet desnatada en pols 5%	1/2000

#### 2.5.4. Immunoprecipitació

La immunoprecipitació és una tècnica que permet aprofitar la interacció antigen-anticòs per tal de conèixer les interaccions d'una proteïna amb d'altres del seu entorn. En el nostre cas es va realitzar aquesta tècnica per conèixer quines interaccions té la proteïna BHRF1 per comprendre el seu mecanisme d'actuació.

S'utilitza en un primer moment el mètode d'immunoprecipitació descrit al *Pierce® Crosslink Immunoprecipitation Kit* (Thermo Scientific).

Tant els reactius com les mostres s'han de mantenir en gel.

##### A. Unió de l'anticòs a la proteïna /G Plus Agarosa

- Preparar 2 mL de tampó d'acoblament 1X per a cada immunoprecipitació diluint el tampó 20X amb H<sub>2</sub>O milli-Q.
- Mesclar bé la Proteïna G/A Plus Agarose per obtenir una bona suspensió. Tallar una punta de pipeta, afegir 20 µL del *slurry* a cada columna. Centrifugar a 1000 rpm durant 1 min. Descartar el filtrat.
- Rentar la reïna amb 200 µL de tampó d'acoblament, centrifugar i descartar el filtrat. Repetir una altre vegada.
- Tapar el fons de la columna amb un paper absorbent per eliminar l'excés de líquid. Tapar la columna.
- Preparar 15 µg d'anticòs per acoblar. Ajustar el volum a 100 µL amb tampó d'acoblament 1X. Afegir a columna.
- Tapar la columna i incubar en rotació durant 60 min a T ambient, comprovar que hi hagi una bona agitació.
- Treure els taps. Centrifugar a 1000 rpm durant 1 min i guardar filtrat com anticòs no retingut.
- Rentar la reïna amb 100 µL de tampó d'acoblament 1X, centrifugar i descartar el filtrat.
- Rentar la reïna amb 300 µL de tampó d'acoblament 1X, centrifugar i descartar filtrat. Repetir el rentat una cop més.

## B. Crosslinking anticòs

El DSS no és compatible amb tampons que continguin amines (Tris o la Glicina)

- Afegir 217  $\mu\text{L}$  de DMS a una alíquota de DSS per preparar solució 10X (25 mM). Mesclar bé amb pipeta fins que DSS es dissolgui.
- Diluir la solució 1:10 en DMS o DMSO per que quedi DSS a 2,5 mM.
- Tapar el fons de la columna amb un paper absorbent per eliminar l'excés de líquid. Tapar columna.
- Afegir 2,5  $\mu\text{L}$  de tampó d'acoblament 20X, 9  $\mu\text{L}$  de DSS 2.5 mM y 38,5  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  mili-Q a la columna. El volum total de la mescla ha de ser 50  $\mu\text{L}$ . Tapar columna i incubar la reacció de *crosslinking* durant 60 min en rotació a T ambient.
- Treure els taps. Centrifugar a 1000 rpm durant 1min i eliminar el filtrat.
- Afegir 50  $\mu\text{L}$  de tampó d'elució a la columna, centrifugar a 1000 rpm durant 1min i guardar el filtrat per comprovar que s'hagi donat el *crosslinking*.
- Rentar dos cops la reïna amb 100  $\mu\text{L}$  de tampó d'elució i centrifugar per eliminar l'anticòs no *crosslinkat* i per parar la reacció de *crosslinking*.
- Rentar dos cops amb 200  $\mu\text{L}$  de tampó de Lisis/rentat (a 4°C) i centrifugar després de cada rentat.
- La columna està llesta per immunoprecipitació. Si es vol utilitzar durant els pròxims 5 dies, guardar en tampó de Lisis/rentat, però per un període més llarg, guardar reïna en tampó d'acoblament 1X (PBS).

## C. Lisat de les cèl·lules

Es realitzen tres columnes amb tres mostres diferents: KB26.5-*bhrf1* a les 48 h de cultiu en discontinu, KB26.5-*bhrf1* a les 24 h de cultiu en discontinu en condicions d'inducció a l'apoptosi, KB26.5- $\emptyset$  a les 48 h de cultiu en discontinu com a control. En aquest cas la lisi cel·lular ha de ser molt suau comparat amb la lisi per Western Blot ja que no es vol trencar els possibles complexos formats.

- Afegir 1 mL tampó de lisis immunoprecipitació (50mM Tris-HCl pH 7,4 , 150mM NaCl, 0.1% NP-40) amb 5  $\mu\text{L}$  *cocktail* d'inhibidors proteases (Sigma).
- Sonicar 5 polsos, entre pols i pols deixar en gel.
- Agitar 10 min a 4°C en rotació.
- Centrifugar 25 min a 25000xg a 4°C. Recuperar sobrenadant.

- Filtrar sobrenadant amb filtres de 0.22 µm (Whatman Puradisc™) .

Es quantifica la proteïna obtinguda per Bradford (veure apartat 4.1.3)

#### D. Immunoprecipitació.

- Si la columna està en PBS, rentar dos cops amb tampó de Lisis/rentat. Eliminar el filtrat després de cada rentat.
- Tapar el fons de la columna amb un paper absorbent per eliminar l'excés de líquid. Tapar columna.
- Diluir l'extracte cel·lular amb tampó de lisis d'immunoprecipitació. El volum recomanat per la columna *spin* és 300-600 µL. La quantitat de proteïna a carregar és 1000 µg.
- Afegir la mostra a la columna. Tapar la columna i incubar en rotació tota la nit a 4°C.
- Posar la columna en un tub col·lector, centrifugar a 1000 rpm durant 1min i guardar filtrat per comprovar que la IP ha funcionat.
- Posar la columna en un nou tub col·lector, afegir 200 µL de tampó de lisis d'immunoprecipitació i centrifugar.
- Rentar dos cops amb 200 µL tampó de lisis d'immunoprecipitació i centrifugar després de cada rentat.
- Rentar amb 100 µL de tampó d'acondicionament 1X.

#### E.Elució de l'antígen.

- Posar la columna en un tub col·lector i afegir 10 µL de tampó d'elució i centrifugar.
- Afegir 50 µL del tampó d'elució, incubar 5 min a T ambient (la columna no s'ha de mesclar o tapar).
- Centrifugar i guardar l'eluit. Realitzar tres eluits.

#### F. Regeneració de la columna i emmagatzematge

- Afegir 100 µL de tampó d'acoblament a la columna, centrifugar i descartar el filtrat. Repetir una cop més.
- Afegir 200 µL de tampó d'acoblament a la columna. Canviar tap i guardar amb parafilm per evitar que la reïna quedi seca. Par més de 2 setmanes, afegir azida sòdica al 0.02%.



En una segona ocasió es fa una variació en el protocol indicat anteriorment. No conjuguem l'anticòs de forma covalent a la reïna, per millorar el procés d'immunoprecipitació.

Procediment:

S'utilitzen les columnes de retenció de proteïna proporcionades al kit de *Pierce® Crosslink Immunoprecipitation Kit* (Thermo Scientific).

- A un volum de 300 µL de mostra a 4 µg/µL de concentració final, corregir el volum amb tampó de lisi d'immunoprecipitació. (tapar la part inferior de la columna).
- Al mateix tub afegir l'anticòs primari a una concentració final de 0.3 µg/µL.
- Deixar la mescla. en rotació a 4°C tota la nit (Tapar la part superior i inferior de la columna).
- Posar 50 µL de reïna en un altre columna, centrifuguem 1 min a 1000 rpm.
- Afegir 200 µL de tampó de lisi d'immunoprecipitació, centrifuguem 1 min a 1000 rpm.
- Tornar a rentar la reïna amb el mateix tampó.
- Tapar el fons de la columna i afegir 150 µL de tampó de lisi per recuperar la reïna.
- Transferir la reïna a la columna on hi ha la mescla proteïna-anticòs, deixem en rotació durant 2 h a 4°C.
- Seguir els passos d'elució descrits anteriorment, corresponents a les indicacions del kit *Pierce® Crosslink Immunoprecipitation Kit* (Thermo Scientific).

Un cop es tenen les mostres, tant d'elució, com dels diferents rentats, es guarden a -40°C. El resultat s'analitza bé per electroforesi unidimensional seguit de *Western Blot* o alternativament per tinció de plata. En aquest cas, la separació unidimensional del resultat de la immunoprecipitació es va dur a terme utilitzant gels Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels Any KDa (Bio-Rad)

Cal tenir en compte que la fracció eluïda té un pH àcid degut al tampó d'elució, al preparar-les per carregar en un gel desnaturalitzat, s'ha de corregir el pH de la mostra abans, ja que no correria bé. Per corregir el pH es pot fer amb vapors d'amoni fins que s'observi que la mostra un cop afegit el tampó de càrrega passa de color groc a blau.

## 2.6. PROTEOMA

Per analitzar el proteoma de les cèl·lules d'hibridoma, s'escullen tres condicions experimentals utilitzant les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*.

Es fan tres cultius de 150 mL de medi DMEM GlutaMAX® suplementat amb 4% de FBS, s'inoculen dos dels flascons de 150 cm<sup>2</sup> amb  $2 \cdot 10^5$  cel/mL i es recullen a les 48 h i a les 96 h. L'altre flascó s'inocula a  $7,5 \cdot 10^5$  cel/mL amb un medi DMEM sense glutamina suplementat amb 4% de FBS, que es recull a les 24 h.

Els cultius es porten al Servei de Proteòmica de l'Institut de Biologia i Biotecnologia (IBB) de la UAB pel seu tractament i posterior anàlisi.

### 2.6.1. Preparació de les mostres pel gel d'electroforesi de dos dimensions i l'anàlisi proteòmic

Els cultius cel·lulars foren rentats amb PBS (1X) tres cops i les cèl·lules resuspeses amb una solució de lisis (8 M urea, 2 M tiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate [CHAPS], 2% Aminosulfobetaine 14 (ASB-14), 40 mM Tris-HCL pH 8.8). El ASB-14 va ser utilitzat per incrementar la presència de proteïnes de membrana en el gel bidimensional. Aleshores es va realitzar una disrupció de les mostres per sonicació durant 30 segons, seguit de 2 minuts en gel per tal d'evitar la carbamilació de les proteïnes per la degradació de la urea a isocianat. Posteriorment, les mostres foren centrifugades per descartar qualsevol partícula insoluble. Per tal de treure les sals i altres contaminants, les mostres es varen rentar amb *2D-Clean up Kit* (GE Healthcare). Els pèl·lets resultants varen ser resuspesos amb el tampó de lisis mencionada anteriorment. Les mostres es varen deixar a 4°C durant 2 hores per resolubilitzar-les prèviament a carregar-les a la primera dimensió.

La concentració de proteïna per cada mostra va ser calculada utilitzant el 2D-Quant Kit (GE Healthcare).

### 2.6.2. Electroforesi de gels 2-D

El 2-DE va ser realitzat utilitzant reactius i equipament de GE Healthcare. La primera dimensió es va realitzar en tires de gradient de pH (24 cm, pH 3–10) utilitzant un

Ettan IPGphor System. Les mostres foren aplicades al costat del final bàsic de les tires per *cup-loading*, després de ser incubades tota la nit en 450 µl de solució de rehidratació (7 M urea, 2 M tiourea, 2,5% p/v CHAPS, 2% ASB-14 p/v, 0.5% pharmalytes, pH 3–10, 100 mM DeStreak reagent). Després de focalitzar a 70 kVh, les tires van ser equilibrades, primer durant 15 min en 10 mL de solució de reducció (6 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 5 mg/ml dithiothreitol [DTT]), i posteriorment en 10 mL de solució d'alquilació (6 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 22,5 mg/mL iodoacetamide) durant 15 minuts, en una plataforma oscil·lant. La segona dimensió SDS-PAGE es va dur a terme dipositant les tires en gels isocràtics Laemmli de 12,5% (24x20 cm), preparats en plaques de vidre en un sistema Ettan DALT Six. Els gels es van córrer a 20°C a una potència constant de 2,5 W per gel durant 60 min seguit de 17 W per gel fins que el front de blau de bromofenol es troba al final del gel. Cada experiment va ser realitzat per triplicat per obtenir una comparació estadísticament significativa.

### 2.6.3. Tinció de plata i anàlisi de les imatges

Els gels 2-D foren tenyits amb plata. Els gels foren fixats en dos passos, en 40% etanol i 10% àcid acètic durant 30 min per cada pas. La sensibilització va ser duta a terme durant 30 min en 30% etanol, 5% (p/v) tiosulfat de sodi i 6.8% (p/v) d'acetat de sodi. Després de rentar 3 cops durant 5 min cada vegada en aigua, foren incubats amb 2,5% (p/v) nitrat de plata durant 20 min. Els gels van ser rentats en 2 etapes de 1 min cada una amb aigua i revelats amb 3% (p/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 0,025% (v/v) formaldehid en aigua fins que el contrast desitjat es fa visible. La reacció es va aturar amb 1,5% (p/v) EDTA-Na<sub>2</sub>. Després d'aturar la reacció, els gels van ser rentats amb aigua dues vegades.

Les imatges van ser analitzades amb el programari específic Progenesis SameSpots Version 4.1 (Nonlinear Dynamics, UK). Es va utilitzar el test estadístic ANOVA  $p < 0,05$

## 2.7. ANÀLISI DE CICLE CEL·LULAR I APOPTOSI PER CITOMETRIA DE FLUX

La citometria de flux consisteix en la mesura d'una sèrie de paràmetres de la cèl·lula en un sistema de flux. Les cèl·lules són obligades a passar alineades una a una davant un feix de làser mitjançant un flux continuat. Cada cèl·lula, a la vegada que dispersa la llum, emet llum fluorescent com a conseqüència de l'excitació del làser a la que és sotmesa. Els paràmetres que s'han mesurat són:

**Dispersió frontal de llum làser (FSC):** és proporcional a la mida de la partícula analitzada. És recollida i amplificada per un fotodetector amb un filtre de densitat neutre.

**Dispersió lateral de llum làser (SSC):** és proporcional a la granulositat o complexitat de la partícula analitzada. És recollida i amplificada en direcció perpendicular al feix del làser mitjançant un fotomultiplicador.

**Fluorescència verda:** és proporcional als antígens revelats amb una proteïna conjugada a Annexin-FITC (assaigs d'apoptosi) o a la fluorescència dels monòmers del fluorocrom lipofílic JC-1 (assaigs de potencial de membrana mitocondrial). És recollida i amplificada de forma logarítmica mitjançant un fotomultiplicador amb els filtres 550DC + 525BP.

**Fluorescència vermella:** és proporcional a la fluorescència del iodur de propidi (IP), als agregats del fluorocrom lipofílic JC-1. És recollida i amplificada de forma logarítmica mitjançant un fotomultiplicador amb els filtres 645DC + 675BP.

Els experiments es van dur a terme al Servei de Citometria de l'Institut de Biologia i Biotecnologia (IBB) de la UAB utilitzant un citòmetre FACS Calibur (Becton Dickinson).

### **2.7.1. Determinació de l'apoptosi**

La membrana plasmàtica està formada per una bicapa lipídica de distribució asimètrica. En l'apoptosi primerenca es perd l'asimetria en la distribució de fosfolípids de forma que la fosfatidilserina, que en condicions normals es troba exclusivament en la cara interna, passa a exposar-se a la cara exterior de la membrana. L'anexina V és una molècula que s'uneix preferentment als fosfolípids carregats negativament, mitjançant una unió reversible dependent de calci, per la qual cosa s'unirà a la fosfatidilserina de les cèl·lules apoptòtiques.

En processos d'apoptosi avançada i necrosi, la membrana plasmàtica es deteriora i esdevé permeable a substàncies com el iodur de propidi (IP) que s'intercala en la doble cadena de DNA. La viabilitat cel·lular i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques es determina per citometria de flux, mitjançant un doble marcatge amb anexina V conjugada amb FITC (fluorescència verda) i iodur de propidi (fluorescència vermella). Així s'obté el percentatge de cèl·lules vives (anexina i iodur de propidi negatives), cèl·lules apoptòtiques primerenques (positives pel marcatge d'anexina i negatives pel de IP) i cèl·lules amb apoptosi avançada o necrosi (anexina i iodur de propidi positives).

S'utilitza el *Annexin-V-Fluos staining kit* (Roche) seguint les instruccions del fabricant.

### 2.7.2. Determinació de la integritat mitocondrial

Els assaigs dissenyats per avaluar l'estat funcional del mitocondri són eines molt útils per veure el seu paper en el procés apoptòtic.

Recentment l'interès s'ha centrat en assaigs destinats a l'estudi del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) durant l'apoptosi. L'energia alliberada durant les reaccions d'oxidació en la cadena respiratòria és emmagatzemada com un gradient electroquímic a través de la membrana mitocondrial i el potencial de membrana mitocondrial es refereix al seu estat de polarització. La caiguda del potencial de membrana mitocondrial resulta en una despolarització del potencial de membrana i és observat durant els estadis inicials de l'apoptosi i pot ser un pre-requisit per l'alliberació del citocrom *c*.

Per observar aquest fenomen s'utilitza el kit *BD™ MitoScreen Kit* (Becton Dickinson), el qual consta d'un compost lipofílic cationic permeable a membrana que la seva fluorescència és reflex del potencial de membrana mitocondrial. Aquest compost JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina iodur) és un fluorocrom que forma monòmers a baixes concentracions i agregats a altes. Tant els monòmers com els agregats exhibeixen fluorescència en la zona de l'espectre corresponent al color verd, el qual es pot mesurar per aquest canal del citòmetre de flux.

Quan les cèl·lules són viables, el JC-1 penetra a través de la membrana plasmàtica com a monòmers. La captació del JC-1 al mitocondri és conduït pel potencial de membrana mitocondrial. El potencial de membrana d'un mitocondri normal és polaritzat i JC-1 és ràpidament captat per aquest mitocondri. Aquesta captació incrementa el gradient de concentració del compost, induint a la formació d'agregats de JC-1 a l'interior del mitocondri. Aquests agregats mostren un salt cap a l'espectre vermell donant valors alts de fluorescència vermella. Per tant en les cèl·lules sanes observem tant fluorescència verda com vermella.

El compost JC-1 no s'acumula al mitocondri quan aquest està despolaritzat i per tant es manté al citoplasma com a monòmers. Aquests no tenen la capacitat d'emetre a la zona vermella de l'espectre, i conseqüentment no es veurà senyal captada pel detector

del citòmetre. Així un mitocondri que passi d'un  $\Delta\psi$  polaritzat a despolaritzat degut a l'entrada en apoptosi alliberarà el JC-1 al citoplasma en forma de monòmers perdent intensitat de fluorescència vermella, mantenint la verda si es mesura amb un citòmetre de flux.

Seguint les indicacions del fabricant, es pot fer el seguiment del potencial de membrana mitocondrial en les cèl·lules d'hibridoma KB26.5- $\emptyset$  així com les KB26.5-*bhrf1*.

### **2.7.3. Assaigs de cicle cel·lular**

La citometria de flux permet determinar el cicle cel·lular mitjançant la determinació de la quantitat de DNA de les cèl·lules. La distribució típica del DNA d'una població cel·lular en creixement està formada per dos pics que corresponen a la fase  $G_0/G_1$  i a la fase  $G_2/M$  i una vall corresponent a la fase S. En la fase S correspon a la síntesi de DNA.

La mesura de la quantitat de DNA es basa en la capacitat dels marcadors fluorescents per unir-s'hi específicament. Les cèl·lules tenyides amb el marcador emeten una fluorescència proporcional al contingut de DNA. L'histograma que s'obté mostra el nombre de cèl·lules respecte a la quantitat de fluorescència. A partir de l'histograma es poden utilitzar diversos mètodes informàtics per a calcular el percentatge de cèl·lules en cada fase.

#### Procediment:

El protocol utilitzat fa servir etanol per fixar i permeabilitzar les cèl·lules, permetent l'accés del colorant i que aquest s'uneixi al DNA, això permet guardar les mostres a  $-30^\circ\text{C}$  en el cas que sigui necessari.

- Afegir 4,5 mL d'etanol 70% a tubs falcon de 15 mL. Mantenir en gel els tubs.
- Recollir  $10^6$  -  $10^7$  cèl·lules i afegir 5 mL de PBS 1X.
- centrifugar 6 min a 200.
- Eliminar el sobrenadant.
- Ressuspendre el pellet amb 0,5 mL PBS 1X.

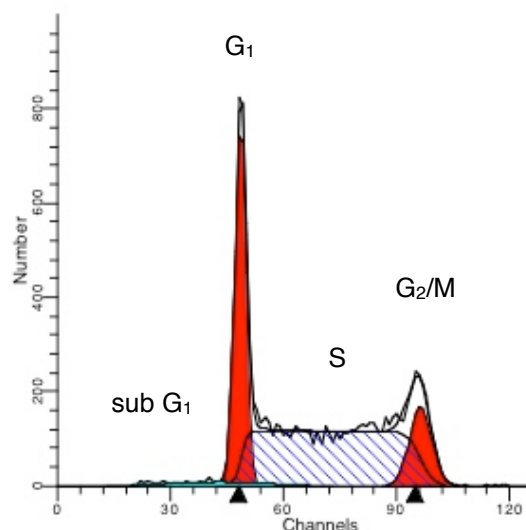
És important aconseguir una suspensió cel·lular sense agrumollaments

- Transferir la suspensió als tubs amb etanol 70%. Mantenir les cèl·lules en fixador  $\geq$  2 hores.

- Guardar els tubs a 0°C o a -40°C.

Un cop fixades, les cèl·lules es poden tenyir amb iodur de propidi (IP).

- Centrifugar la suspensió d'etanol amb les cèl·lules fixades 5 min a 200 xg.
- Decantar el sobrenadant.
- Ressuspensió el pellet amb 5 mL de PBS 1X, esperar 60 s.
- Centrifugar 5 min a 200xg.
- Eliminar el sobrenadant.
- Ressuspensió el pellet amb la solució de tinció, mantenir 15 min a 37°C o 30 min a temperatura ambient.
- Analitzar per citometria de flux. (fixant l'excitació a 488 nm i l'emissió a 600 nm).



**Fig. 79.- Exemple de distribució de cycle cel·lular obtingut per FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*).** El programa distingeix les cèl·lules que es troben amb la seva dotació cromosòmica normal, en la fase G<sub>1</sub>, i aquelles que han duplicat la seva dotació cromosòmica, fase G<sub>2</sub>/M. Aquelles cèl·lules que es troben entre aquestes dues fases pertanyen a la fase S. Es pot distingir també la població cel·lular que ha degradat el seu DNA amb motiu de la presència de cèl·lules apoptòtiques, zona sub G<sub>1</sub>.

## 2.8. CARIOTIPATGE DE LA LÍNIA D'HIBRIDOMA KB26.5

S'ha cariotipat tant les cèl·lules d'hibridoma KB26.5-*bhrf1* com les KB26.5-∅. D'aquestes últimes, es cariotipen la línia original o *master stock*, i una línia mantinguda al llarg de diferents passes (13 ressembres). Pel que fa a les cèl·lules KB26.5-*bhrf1*, es mantenen durant 64 ressembres i es cariotipen.

El cariotipatge va ser realitzat per la doctora Carme Nogués del Departament de Biologia Cel·lular de la UAB. El protocol utilitzat fou el descrit a continuació:

- Afegir Colcemid al cultiu en fase exponencial ( $[\text{colcemid}] = 0,2 \mu\text{g/mL}$ ).
- Incubar 2 h.
- Passat aquest temps recuperar tot el volum de la suspensió cel·lular.
- Centrifugar a  $20^\circ\text{C}$  , 5' min y  $300 \times g$ .
- Eliminar el sobrenadant i ressuspendre el pèl·let.
- Afegir la solució hipotònica gota a gota ( $[\text{KCl}] = 0,075\text{M}$ ) precalentada a  $37^\circ\text{C}$ .
- Incubar al bany 5 min.
- Centrifugar el tub 5 min a  $400 \times g$ .
- Eliminar el sobrenadant i ressuspendre el pèl·let.
- Fixar amb Carnoy (metanol:acètic=3:1) gota a gota.
- Centrifugar 5 min a  $400 \times g$ .
- Repetir la fixació 3 vegades.
- Realitzar les extensions.
- Al dia següent tenyir amb Leishmann (4 tampó:1 colorant) entre 3 min-8 min.
- Observar al microscopi.



## BIBLIOGRAFIA

---



1. Hesse, F., & Wagner, R. (2000). Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 173–180.
2. Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), 1393–1398.
3. Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497.
4. Reichert, J. M., & Valge-Archer, V. E. (2007). Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(5), 349–356.
5. Brekke, O. H., & Sandlie, I. (2003). Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(1), 52–62.
6. Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 345–352.
7. Kelley, B. (2009). Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at a crossroads, *mAbs*, 1(5), 443-452.
8. Aggarwal, S. (2010). What's fueling the biotech engine-2009-2010. *Nature biotechnology*, 28(11), 1165–1171.
9. Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnology*, 28(9), 917.
10. Shukla, A. A., & Thömmes, J. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 253–261.

11. Simpson, N. H., Singh, R. P., Emery, A. N., & Al-Rubeai, M. (1999). Bcl 2 over expression reduces growth rate and prolongs G1 phase in continuous chemostat cultures of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(2), 174–186.
12. Al-Rubeai, M., & Singh, R. P. (1998). Apoptosis in cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(2), 152–156.
13. Goswami, J., Sinskey, A. J., Steller, H., Stephanopoulos, G. N., & Wang, D. I. (1999). Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(6), 632–640.
14. Tey, B. T., Singh, R. P., Piredda, L., Piacentini, M., & Al-Rubeai, M. (2000). Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures. *Journal of Biotechnology*, 79(2), 147–159.
15. Sanfeliu, A. (1995). Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars. *Cell Death and Differentiation*, Tesi Doctoral–Universitat Autònoma de Barcelona.
16. Tintó, A. (1999). Millora de cultius in vitro d'hibridomes mitjançant el desenvolupament d'un sistema de perfusió i la inhibició de la mort cel·lular programada. Tesi Doctoral–Universitat Autònoma de Barcelona.
17. Paredes, C. (1998). Anàlisi i redistribució dels fluxos metabòlics en cèl·lules animals., Tesi Doctoral–Universitat Autònoma de Barcelona.
18. Gabernet, C. (1999). *Disseny d'estratègies per a la inhibició de l'apoptosi en cultius d'hibridomes*. Tesi Doctoral–Universitat Autònoma de Barcelona.
19. Vives, J. (2001). *Protecció del procés de mort cel·lular programada en cultius in vitro de cèl·lules animals*. Tesi Doctoral–Universitat Autònoma de Barcelona.
20. Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96–99.

21. Novack, D. V., & J, K. S. (1994). Bcl-2 Protein Expression During Murine Development. *The Americal Journal of Pathology*, 145(1), 61–73.
22. Boehmer, von, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell*, 76(2), 219–228.
23. Squier, M. K. T., & John Cohen, J. (1994). Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Current Opinion in Immunology*, 6(3), 447–452.
24. Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 9(7), 501–507.
25. Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemistry Journal*, 326, 1–16.
26. Green, D., & Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology*, 8(7), 267–271.
27. Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science*, 305(5684), 626–629.
28. Garrido, C., & Kroemer, G. (2004). Life“s smile, death”s grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 639–646.
29. Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Hengartner, M., Abrams, J. M., et al. (2008). No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ*, 15(7), 1113–1123.
30. de Graaf, A. O., van den Heuvel, L. P., Dijkman, H. B. P. M., De Abreu, R. A., Birkenkamp, K. U., de Witte, T., et al. (2004). Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 299(2), 533–540.
31. Yang, M.-Y., Chuang, H., Chen, R.-F., & Yang, K. D. (2002). Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. *J Leukoc Biol*, 71(2), 231–237.
32. Kroemer, G., & Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Review Cancer*, 5(11), 886–897.

33. Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(9-10), 1371–1387.
34. Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43.
35. Nicotera, P., & Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757–2765.
36. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer.*, 26(4), 239–257.
37. Vaux, D. L., & Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
38. Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3), 231–241.
39. Xu, G., & Shi, Y. (2007). Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell research*, 17(9), 759–771.
40. Vermeulen, K., Bockstaele, D., & Berneman, Z. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology*, 84(10), 627–639.
41. Mahoney, J. A., & Rosen, A. (2005). Apoptosis and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 17(6), 583–588.
42. Kroemer, G., Zamzami, N., & Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 18(1), 44–51.
43. Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 47–59.

44. Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. W., & Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74(5), 845–853.
45. Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 16(10), 2794–2804.
46. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81(4), 505–512.
47. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltseve, Y. V., & Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-Interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-Induced Cell Death. *Cell*, 85(6), 803–815.
48. Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., et al. (1996). FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signaling Complex. *Cell*, 85(6), 817–827.
49. Krammer, P. H., Arnold, R., & Lavrik, I. N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol*, 7(7), 532–542.
50. Nieminen, A. I., Partanen, J. I., Hau, A., & Klefstrom, J. (2007). c-Myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *EMBO J*, 26(4), 1055–1067.
51. Johnstone, R. W., Frew, A. J., & Smyth, M. J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*, 8(10), 782–798.
52. Micheau, O., & Tschopp, J. R. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, 114(2), 181–190.
53. Cain, K., Bratton, S. B., & Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84(2-3), 203–214.

54. Newmeyer, D. D., & Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death. *Cell*, 112(4), 481–490.
55. Kroemer, G., & Martin, S. J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nat Med*, 11(7), 725–730.
56. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441–446.
57. Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95–99.
58. Yin, X.-M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., et al. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400(6747), 886–891.
59. Kaufmann, T., Tai, L., Ekert, P. G., Huang, D. C. S., Norris, F., Lindemann, R. K., et al. (2007). The BH3-Only Protein Bid Is Dispensable for DNA Damage- and Replicative Stress-Induced Apoptosis or Cell-Cycle Arrest. *Cell*, 129(2), 423–433.
60. Krampe, B., & Al-Rubeai, M. (2010). Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*, 62(3), 175–188.
61. Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), 440–442.
62. Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337.
63. Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., & Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, 348(6299), 331–333.



64. Huang, Q., Petros, A. M., Virgin, H. W., Fesik, S. W., & Olejniczak, E. T. (2002). Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3428–3433.
65. Marchini, A., Tomkinson, B., Cohen, J. I., & Kieff, E. (1991). BHRF1, the Epstein-Barr virus gene with homology to Bc12, is dispensable for B-lymphocyte transformation and virus replication. *J. Virol.*, 65(11), 5991–6000.
66. Kvensakul, M., van Delft, M. F., Lee, E. F., Gulbis, J. M., Fairlie, W. D., Huang, D. C. S., & Colman, P. M. (2007). A Structural Viral Mimic of Prosurvival Bcl-2: A Pivotal Role for Sequestering Proapoptotic Bax and Bak. *Molecular Cell*, 25(6), 933–942.
67. Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., Van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315(5813), 856.
68. Youle, R. J. (2007). CELL BIOLOGY: Cellular Demolition and the Rules of Engagement. *Science*, 315(5813), 776–777.
69. Hardwick, J. M., & Youle, R. J. (2009). SnapShot: BCL-2 Proteins. *Cell*, 138(2), 404.e1–404.e2.
70. Aouacheria, A., Brunet, F. D. R., & Gouy, M. (2005). Phylogenomics of Life-Or-Death Switches in Multicellular Animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip Families of Apoptotic Regulators. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12), 2395–2416.
71. Grinberg, M., Sarig, R., Zaltsman, Y., Frumkin, D., Grammatikakis, N., Reuveny, E., & Gross, A. (2002). tBID Homooligomerizes in the Mitochondrial Membrane to Induce Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 12237–12245.
72. Schendel, S. L., Azimov, R., Paw Ȇowski, K., Godzik, A., Kagan, B. L., & Reed, J. C. (1999). Ion Channel Activity of the BH3 Only Bcl-2 Family Member, BID. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21932–21936.

73. Wiens, M., Krasko, A., Müller, C. I., & Müller, W. E. G. (2000). Molecular Evolution of Apoptotic Pathways: Cloning of Key Domains from Sponges (Bcl-2 Homology Domains and Death Domains) and Their Phylogenetic Relationships. *Journal of Molecular Evolution*, 50(6), 520–531.
74. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., et al. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053–1058.
75. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell*, 7(3), 673–682.
76. Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J.-W. J., Koenderman, L., & Coffey, P. J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology*, 10(19), 1201–1204.
77. Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., et al. (2007). ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell*, 129(7), 1337–1349.
78. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., & Korsmeyer, S. J. (1996). Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell*, 87(4), 619–628.
79. Li, H., Zhu, H., Xu, C.-J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, 94(4), 491–501.
80. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell*, 94(4), 481–490.
81. Akiyama, T., Bouillet, P., Miyazaki, T., Kadono, Y., Chikuda, H., Chung, U.-I., et al. (2003). Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J*, 22(24), 6653–6664.

- 
82. Ley, R., Ewings, K. E., Hadfield, K., & Cook, S. J. (2005). Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ*, *12*(8), 1008–1014.
83. Shimazu, T., Degenhardt, K., Nur-E-Kamal, A., Zhang, J., Yoshida, T., Zhang, Y., et al. (2007). NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes & Development*, *21*(8), 929–941.
84. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2005). BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Molecular Cell*, *17*(4), 525–535.
85. Certo, M., Moore, V. D. G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., & Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, *9*(5), 351–365.
86. Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, *6*(5), 513–519.
87. Wei, M. C., Zong, W.-X., Cheng, E. H. Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., et al. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, *292*(5517), 727–730.
88. Wolter, K. G., Hsu, Y.-T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X.-G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, *139*(5), 1281–1292.
89. Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., et al. (2002). Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. *Cell*, *111*(3), 331–342.

90. Sawada, M., Hayes, P., & Matsuyama, S. (2003). Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nature cell biology*, 5(4), 352–357.
91. Zamzami, N., & Kroemer, G. (2003). Apoptosis: Mitochondrial Membrane Permeabilization - The (W)hole Story? *Current Biology*, 13(2), R71–R73.
92. Korsmeyer, S. J., We, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., & Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death & Differentiation*, 7, 1166–1173.
93. Cheng, E. H. Y. A., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., & Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-XL sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Molecular Cell*, 8(3), 705–711.
94. Czabotar, P. E., Colman, P. M., & Huang, D. C. S. (2009). Bax activation by Bim? *Cell Death Differ*, 16(9), 1187–1191.
95. Willis, S. N., & Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 617–625.
96. Ruffolo, S. C., & Shore, G. C. (2003). BCL-2 Selectively Interacts with the BID-induced Open Conformer of BAK, Inhibiting BAK Auto-oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 25039–25045.
97. Ott, M., Norberg, E., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2009). Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell Death Differ*, 16(8), 1075–1082.
98. Leber, B., Lin, J., & Andrews, D. W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*, 29(38), 5221–5230.
99. Basañez, G., Sharpe, J. C., Galanis, J., Brandt, T. B., Hardwick, J. M., & Zimmerberg, J. (2002). Bax-type Apoptotic Proteins Porate Pure Lipid Bilayers through a

- Mechanism Sensitive to Intrinsic Monolayer Curvature. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49360–49365.
100. Wu, Y., Mehew, J. W., Heckman, C. A., Arcinas, M., & Boxer, L. M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene*, 20(2), 240–251.
101. Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U. M. (2003). p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Molecular Cell*, 11(3), 577–590.
102. Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., & Green, D. R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*, 309(5741), 1732.
103. Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 594–604.
104. Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., & Shoshan-Barmatz, V. (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochemical Journal*, 377(Pt 2), 347.
105. On, O., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. (1999). NF-KappaB activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401, 82–85.
106. Datta, S. R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S. W., Yaffe, M. B., & Greenberg, M. E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular Cell*, 6(1), 41–51.
107. Pastorino, J. G., Shulga, N., & Hoek, J. B. (2002). Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7610–7618.

108. Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*(7), 1261–1274.
109. Schroeter, H., Boyd, C. S., Ahmed, R., Spencer, J., Duncan, R. F., Rice-Evans, C., & Cadenas, E. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochemical Journal*, *372*(Pt 2), 359.
110. Yin, K. J., Kim, G. M., Lee, J. M., He, Y. Y., Xu, J., & Hsu, C. Y. (2005). JNK activation contributes to DP5 induction and apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Neurobiology of disease*, *20*(3), 881–889.
111. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, *91*(4), 479–489.
112. Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T., & Snyder, S. H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature cell biology*, *5*(12), 1051–1061.
113. Boehning, D., Patterson, R. L., & Snyder, S. H. (2004). Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *3*(3), 252.
114. Lüthi, A. U., & Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, *14*(4), 641–650.
115. Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, *284*(5756), 555–556.
116. Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., & Stephan, H. (2000). Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nature Genetics*, *25*(2), 177–181.
117. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic

- lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7), 2207.
118. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1545.
119. Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 100(1), 71–78.
120. Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246(4930), 629–634.
121. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4 ed., pp. 983–1026). New York: Garland Science.
122. Chang, F., Lee, J. T., Navolanic, P. M., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Blalock, W. L., et al. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 17(3), 590–603.
123. Humphrey, T., & Brooks, G. (2005). *Cell Cycle Control. Mechanisms and Protocols. Methods in Molecular Biology* (Vol. 296, pp. 113–139). Humana Press.
124. Foster, D. A., Yellen, P., Xu, L., & Saqcena, M. (2011). Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes & Cancer*, 1(11), 1124–1131.
125. Vermeulen, K., Berneman, Z. N., & Van Bockstaele, D. R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell proliferation*, 36(3), 165–175.
126. Tintó, A., Gabernet, C., Vives, J., Prats, E., Cairó, J. J., Cornudella, L., & Gòdia, F. (2002). The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition

- allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 205–214.
127. Arden, N., & Betenbaugh, M. J. (2004). Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends in Biotechnology*, 22(4), 174–180.
128. Kim, N. S., & Lee, G. M. (2002). Response of recombinant Chinese hamster ovary cells to hyperosmotic pressure: effect of Bcl-2 overexpression. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 237–248.
129. Vives, J., Juanola, S., Cairó, J. J., & Gòdia, F. (2003). Metabolic engineering of apoptosis in cultured animal cells: implications for the biotechnology industry. *Metabolic engineering*, 5(2), 124–132.
130. Basañez, G., Zhang, J., Chau, B. N., Maksaev, G. I., Frolov, V. A., Brandt, T. A., et al. (2001). Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J. Biol. Chem.*, 276(33), 31083–31091.
131. Jonas, E. A., Hickman, J. A., Chachar, M., Polster, B. M., Brandt, T. A., Fannjiang, Y., et al. (2004). Proapoptotic N-truncated BCL-xL protein activates endogenous mitochondrial channels in living synaptic terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13590–13595.
132. Figueroa, B., Chen, S., Oyler, G. A., Hardwick, J. M., & Betenbaugh, M. J. (2004). Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(6), 589–600.
133. Sauerwald, T. M., Figueroa, B., Jr, Hardwick, J. M., Oyler, G. A., & Betenbaugh, M. J. (2006). Combining caspase and mitochondrial dysfunction inhibitors of apoptosis to limit cell death in mammalian cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(2), 362–372.



134. Snipas, S. (1997). Target Protease Specificity of the Viral Serpin CrmA. ANALYSIS OF FIVE CASPASES. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7797–7800.
135. Postigo, A., & Eitz Ferrer, P. (2009). Viral inhibitors reveal overlapping themes in regulation of cell death and innate immunity. *Microbes and Infection*, 11(13), 1071–1078.
136. Nonoyama, M., Huang, C. H., Pagano, J. S., Klein, G., & Singh, S. (1973). DNA of Epstein-Barr Virus Detected in Tissue of Burkitt's Lymphoma and Nasopharyngeal Carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3265–3268.
137. Young, L. S., Dawson, C. W., Clark, D., Rupani, H., Busson, P., Tursz, T., et al. (1988). Epstein--Barr Virus Gene Expression in Nasopharyngeal Carcinoma. *J Gen Virol*, 69(5), 1051–1065.
138. Chapman, A. L. N., & Rickinson, A. B. (1998). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Annals of Oncology*, 9(suppl 5), S5–S16.
139. Huang, Q., Petros, A. M., Virgin, H. W., Fesik, S. W., & Olejniczak, E. T. (2003). Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr virus, a homolog of human Bcl-2. *J Mol Biol*, 332(5), 1123–1130.
140. Khanim, F., Dawson, C., Meseda, C. A., Dawson, J., Mackett, M., & Young, L. S. (1997). BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. *J Gen Virol*, 78(11), 2987–2999.
141. Young, L. S., Dawson, C. W., & Eliopoulos, A. G. (1999). Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. *Biochem Soc Trans*, 27(6), 807–812.
142. Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304(5671), 734–736.

143. Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J. P., Desrosiers, R. C., Edwards, R., et al. (2006). Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog*, 2(3), e23.
144. Xing, L., & Kieff, E. (2007). Epstein-Barr virus BHRF1 micro- and stable RNAs during latency III and after induction of replication. *J. Virol.*, 81(18), 9967–9975.
145. Feederle, R., Linnstaedt, S. D., Bannert, H., Lips, H., Bencun, M., Cullen, B. R., & Delecluse, H. J. (2011). A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS pathogens*, 7(2), e1001294.
146. Bellows, D. S., Chau, B. N., Lee, P., Lazebnik, Y., Burns, W. H., & Hardwick, J. M. (2000). Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase-mediated conversion to proapoptotic proteins. *Journal of Virology*, 74(11), 5024.
147. Polster, B. M., Pevsner, J., & Hardwick, J. M. (2004). Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1644(2-3), 211–227.
148. Juanola, S., Vives, J., Milián, E., Prats, E., Cairó, J., & Gòdia, F. (2009). Expression of BHRF1 improves survival of murine hybridoma cultures in batch and continuous modes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(1), 43–57.
149. Fussenegger, M., & Bailey, J. E. (1998). Molecular Regulation of Cell-Cycle Progression and Apoptosis in Mammalian Cells: Implications for Biotechnology. *Biotechnol. Prog.*, 14, 807–833.
150. Fussenegger, M., Schlatter, S., Dätwyler, D., Mazur, X., & Bailey, J. E. (1998). Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Nature biotechnology*, 16(5), 468–472.
151. Gàmez, X. (2000). Estudi d'estratègies de cultiu per a cèl·lules animals, basades en eines d'instrumentació i control., Tesi Doctoral–Universitat Autònoma de Barcelona.

152. Dawson, C. W., Dawson, J., Jones, R., Ward, K., & Young, L. S. (1998). Functional Differences between BHRF1, the Epstein-Barr Virus-Encoded Bcl-2 Homologue, and Bcl-2 in Human Epithelial Cells. *J. Virol.*, *72*(11), 9016–9024.
153. Cross, J. R., Postigo, A., Blight, K., & Downward, J. (2008). Viral pro-survival proteins block separate stages in Bax activation but changes in mitochondrial ultrastructure still occur. *Cell Death Differ*, *15*(6), 997–1008.
154. Li, L. Y., Liu, M. Y., Shih, H. M., Tsai, C. H., & Chen, J. Y. (2006). Human cellular protein VRK2 interacts specifically with Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, and enhances cell survival. *J Gen Virol*, *87*(Pt 10), 2869–2878.
155. Moncada, S., Higgs, E. A., & Colombo, S. L. (2012). Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem. J*, *446*(1), 1–7.
156. Sanfeliu, A., & Stephanopoulos, G. (1999). Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *64*(1), 46–53.
157. Theodorakis, P., D'Sa-Eipper, C., & Subramanian, T. (1996). Unmasking of a proliferation-restraining activity of the anti-apoptosis protein EBV BHRF1. *Oncogene*, *12*(8), 1707–1713.
158. Mazel, S., Burtrum, D., & Petrie, H. T. (1996). Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(5), 2219–2226.
159. Huang, H., Pan, X., & Sun, X. (1997). The effect of the expression of BHRF1 gene of EB virus on the proliferation of the cells of nasopharyngeal carcinoma. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, *32*(5), 290–292.
160. Krampe, B., Fagan, A., Gaora, P. Ó., & Al-Rubeai, M. (2011). Chemostat-based transcriptional analysis of growth rate change and BCL-2 over-expression in NS0 cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(7), 1603–1615.

161. Liston, P., Fong, W. G., & Korneluk, R. G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*, *22*(53), 8568–8580.
162. Rosati, A., Graziano, V., De Laurenzi, V., Pascale, M., & Turco, M. C. (2011). BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death & Disease*, *2*(4), p. e141.
163. Matsui, H., Asou, H., & Inaba, T. (2007). Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Molecular Cell*, *25*(1), 99–112.
164. Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*, *3*(3), 221–227.
165. Grumont, R. J., Rourke, I. J., & Gerondakis, S. (1999). Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes & Development*, *13*(4), 400–411.
166. Mayo, M. W., & Baldwin, A. S. (2000). The transcription factor NF-κB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1470*(2), M55–M62.
167. Zhang, H. M., Cheung, P., Yanagawa, B., McManus, B. M., & Yang, D. C. (2003). BNips: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family. *Apoptosis*, *8*(3), 229–236.
168. Kim, H., Tu, H. C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., et al. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, *36*(3), 487–499.
169. Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell*, *7*(3), 683–694.
170. Vaseva, A. V., & Moll, U. M. (2008). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta*.

171. Zhao, Y., Coloff, J. L., Ferguson, E. C., Jacobs, S. R., Cui, K., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Metabolism Attenuates p53 and Puma-dependent Cell Death upon Growth Factor Deprivation. *J. Biol. Chem.*, *283*(52), 36344–36353.
172. Alarcon-Vargas, D. (2002). p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*, *23*(4), 541–547.
173. Vousden, K. H., & Ryan, K. M. (2009). p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, *9*(10), 691–700.
174. Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., et al. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development*, *19*(11), 1294–1305.
175. Zhao, Y., Altman, B. J., Coloff, J. L., Herman, C. E., Jacobs, S. R., Wieman, H. L., et al. (2007). Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Molecular and cellular biology*, *27*(12), 4328–4339.
176. Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E., & Green, D. R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular Cell*, *21*(6), 749–760.
177. Duronio, V. (2008). The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J*, *415*, 333–344.
178. Rumble, J. M., Bertrand, M. J. M., Csomos, R. A., Wright, C. W., Albert, L., Mak, T. W., et al. (2008). Apoptotic sensitivity of murine IAP-deficient cells. *The Biochemical journal*, *415*(1), 21.
179. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, *102*(1), 33–42.

180. Slee, E. A. (1999). Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3,-6,-7,-8,and -10in a Caspase-9-dependent Manner. *The Journal of Cell Biology*, 144(2), 281–292.
181. Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., & Bredesen, D. E. (2001). Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program.
182. Cory, S., Huang, D. C. S., & Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22(53), 8590–8607.
183. Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400–414.
184. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131–149.
185. Watanabe, S., & Arai, K.-I. (1996). Roles of the JAK-STAT system in signal transduction via cytokine receptors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(5), 587–596.
186. Suzuki, A., Tsutomi, Y., Yamamoto, N., Shibutani, T., & Akahane, K. (1999). Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Molecular and cellular biology*, 19(5), 3842.
187. Huang, S., Shu, L., Dilling, M. B., Easton, J., Harwood, F. C., Ichijo, H., & Houghton, P. J. (2003). Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21Cip1. *Molecular Cell*, 11(6), 1491–1501.
188. Bi, J.-X., Shuttleworth, J., & Al-Rubeai, M. (2004). Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1-arrested CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(7), 741–749.

189. Astley, K., Naciri, M., Racher, A., & Al-Rubeai, M. (2007). The role of p21cip1 in adaptation of CHO cells to suspension and protein-free culture. *Journal of Biotechnology*, 130(3), 282–290.
190. Yan, Z., DeGregori, J., Shohet, R., Leone, G., Stillman, B., Nevins, J. R., & Williams, R. S. (1998). Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3603–3608.
191. Hateboer, G., Wobst, A., Petersen, B. O., Le Cam, L., Vigo, E., Sardet, C., & Helin, K. (1998). Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Molecular and cellular biology*, 18(11), 6679–6697.
192. Jung, Y.-S., Qian, Y., & Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular signalling*, 22(7), 1003–1012.
193. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*.
194. Maga, G., & Hübscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*.
195. Barradas, M., Monjas, A., Diaz-Meco, M. T., Serrano, M., & Moscat, J. (1999). The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. *EMBO J*, 18(22), 6362–6369.
196. Bottazzi, M. E., Zhu, X., Bohmer, R. M., & Assoian, R. K. (1999). Regulation of P21cip1 Expression by Growth Factors and the Extracellular Matrix Reveals a Role for Transient ERK Activity in G1 Phase. *The Journal of Cell Biology*, 146(6), 1255–1264.
197. Ley, R. (2003). Activation of the ERK1/2 Signaling Pathway Promotes Phosphorylation and Proteasome-dependent Degradation of the BH3-only Protein, Bim. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 18811–18816.

198. Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, *432*(7015), 298–306.
199. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk. *Cell*, *121*(2), 179–193.
200. Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Inflammatory processes: molecular mechanisms and therapeutic opportunities*, *103*(2), 239–252.
201. Weston, C. R., & Davis, R. J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(2), 142–149.
202. Putcha, G. V., Le, S., Frank, S., Besirli, C. G., Clark, K., Chu, B., et al. (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, *38*(6), 899–914.
203. Lei, K., & Davis, R. J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2432.
204. Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, *27*(48), 6245.
205. Greer, E. L., & Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, *24*(50), 7410–7425.
206. Dijkers, P. F., Birkenkamp, K. U., Lam, E. W. F., Thomas, N. S. B., Lammers, J.-W. J., Koenderman, L., & Coffey, P. J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *The Journal of Cell Biology*, *156*(3), 531–542.
207. Liang, J., & Slingerland, J. M. (2003). Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression. *Cell Cycle*, *2*(4), 336–342.



208. Chen, C., Edelstein, L. C., & Gelinas, C. (2000). The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Molecular and cellular biology*, *20*(8), 2687–2695.
209. Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science*.
210. Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, *18*(16), 1926.
211. Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, *124*(3), 471–484.
212. Fingar, D. C., & Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, *23*(18), 3151–3171.
213. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., & Guan, K. L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology*, *10*(8), 935–945.
214. Dreesen, I. A. J., & Fussenegger, M. (2011). Ectopic expression of human mTOR increases viability, robustness, cell size, proliferation, and antibody production of chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(4), 853-866.
215. Wong, D. C. F., Wong, K. T. K., Lee, Y. Y., Morin, P. N., Heng, C. K., & Yap, M. G. S. (2006). Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, *94*(2), 373–382.
216. Wong, D. C., Wong, K. T., Nissom, P. M., Heng, C. K., & Yap, M. G. (2006). Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, *95*(3), 350–361.
217. Chou, S. P., Tsai, C. H., Li, L. Y., Liu, M. Y., & Chen, J. Y. (2004). Characterization of Monoclonal Antibody to the Epstein-Barr Virus BHRF1 Protein, a Homologue of Bcl-2. *Hybridoma and Hybridomics*, *23*(1), 29-37.

218. Chen-Levy, Z., Nourse, J., & Cleary, M. L. (1989). The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t (14; 18) translocation. *Molecular and cellular biology*, 9(2), 701.
219. Janiak, F., Leber, B., & Andrews, D. W. (1994). Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9842–9849.
220. Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M., & Matsuyama, S. (1998). Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1-2), 127–137.
221. Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13(15), 1899–1911.
222. Wilson-Annan, J., O'Reilly, L. A., Crawford, S. A., Hausmann, G., Beaumont, J. G., Parma, L.P., et al. (2003). Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *The Journal of Cell Biology*, 162(5), 877–888.
223. Huang, D. C. S., & Strasser, A. (2000). BH3-Only Proteins--Essential Initiators of Apoptotic Cell Death. *Cell*, 103(6), 839–842.
224. Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*, 2(9), 647–656.
225. Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., et al. (2011). Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell*, 145(1), 104–116.
226. Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., & Kluck, R. M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), 521-531.

227. Gavathiotis, E., Reyna, D. E., Davis, M. L., Bird, G. H., & Walensky, L. D. (2010). BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Molecular Cell*, *40*(3), 481–492.
228. Walensky, L. D., & Gavathiotis, E. (2011). BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends in Biochemical Sciences*.
229. Uren, R. T., Dewson, G., Chen, L., Coyne, S. C., Huang, D. C., Adams, J. M., & Kluck, R. M. (2007). Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J. Cell Biol.*, *177*(2), 277–287.
230. Kirsch, D. G., Doseff, A., Chau, B. N., Lim, D. S., de Souza-Pinto, N. C., Hansford, R., et al. (1999). Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 21155.
231. O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., & Huang, D. C. S. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*, *17*(2), 384–395.
232. Puthalakath, H., Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., King, S. M., & Strasser, A. (1999). The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Molecular Cell*, *3*(3), 287–296.
233. Zhang, Y., Fujita, N., & Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*, *18*(5), 1131.
234. Blanco, S., Klimcakova, L., Vega, F. M., & Lazo, P. A. (2006). The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *FEBS J*, *273*(11), 2487–2504.

235. Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., & Kappler, J. W. (2003). The Structure of a Bcl-xL/Bim Fragment Complex:: Implications for Bim Function. *Immunity*, 19(3), 341–352.
236. Kvensakul, M., Wei, A. H., Fletcher, J. I., Willis, S. N., Chen, L., Roberts, A. W., et al. (2010). Structural basis for apoptosis inhibition by Epstein-Barr virus BHRF1. *PLoS pathogens*, 6(12), e1001236.
237. Sattler, M., Liang, H., Nettessheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275(5302), 983.
238. Suzuki, M., Youle, R. J., & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 103(4), 645–654.
239. Dinand, V., Malik, A., Mohanty, B., Chander, B., Arya, L. S., & Dawar, R. (2009). Low apoptotic index & bak expression in EBV-associated childhood classical Hodgkin lymphoma. *Indian J Med Res*, 130(5), 526–532.
240. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., et al. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1261–1271.
241. Wang, J.-L., Liu, D., Zhang, Z.-J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S. M., et al. (2000). Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7124–7129.
242. Real, P. J., Cao, Y., Wang, R., Nikolovska-Coleska, Z., Sanz-Ortiz, J., Wang, S., & Fernandez-Luna, J. L. (2004). Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res*, 64(21), 7947–7953.

243. Flanagan, A. M., & Letai, A. (2007). BH3 domains define selective inhibitory interactions with BHRF-1 and KSHV BCL-2. *Cell Death Differ*, *15*(3), 580–588.
244. Desbien, A. L., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2009). The Epstein-Barr virus Bcl-2 homolog, BHRF1, blocks apoptosis by binding to a limited amount of Bim. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(14), 5663–5668.
245. Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., & Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, *2*(3), 183–192.
246. Dewson, G., & Kluck, R. M. (2010). Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, *2*, 9–22.
247. Dewson, G., Kratina, T., Sim, H. W., Puthalakath, H., Adams, J. M., Colman, P. M., & Kluck, R. M. (2008). To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3: groove interactions. *Molecular Cell*, *30*(3), 369–380.
248. Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C. L., Adams, J. M., & Kluck, R. M. (2009). Bak Activation for Apoptosis Involves Oligomerization of Dimers via Their [alpha] 6 Helices. *Molecular Cell*, *36*(4), 696–703.
249. Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., et al. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, *17*(3), 393–403.
250. Blanco, S., Santos, C., & Lazo, P. A. (2007). Vaccinia-related kinase 2 modulates the stress response to hypoxia mediated by TAK1. *Mol. Cell. Biol.*, *27*(20), 7273–7283.
251. Scheeff, E. D., Eswaran, J., Bunkoczi, G., Knapp, S., & Manning, G. (2009). Structure of the Pseudokinase VRK3 Reveals a Degraded Catalytic Site, a Highly Conserved Kinase Fold, and a Putative Regulatory Binding Site. *Structure*, *17*(1), 128–138.

252. Fernandez, I. F., Blanco, S., Lozano, J., & Lazo, P. A. (2010). VRK2 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Inversely Correlates with ErbB2 in Human Breast Cancer. *Molecular and cellular biology*, 30(19), 4687.
253. Tey, B. T., Singh, R. P., Piredda, L., Piacentini, M., & Al-Rubeai, M. (2000). Influence of Bcl-2 on cell death during the cultivation of a Chinese hamster ovary cell line expressing a chimeric antibody. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1), 31–43.
254. Tey, B. T., & Al-Rubeai, M. (2005). Effect of Bcl-2 overexpression on cell cycle and antibody productivity in chemostat cultures of myeloma NS0 cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(3), 303–310.
255. Linette, G. P., Li, Y., Roth, K., & Korsmeyer, S. J. (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9545–9552.
256. Janumyan, Y. M., Sansam, C. G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E. L., Penn, L. Z., et al. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J*, 22(20), 5459–5470.
257. Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., Strasser, A., & Cory, S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J*, 16(15), 4628–4638.
258. Campàs, C., Cosiàlls, A. M., Barragán, M., Iglesias-Serret, D., Santidrián, A. F., Coll-Mulet, L., et al. (2006). Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Experimental Hematology*, 34(12), 1663–1669.
259. Vairo, G., Soos, T. J., Upton, T. M., Zalvide, J., & DeCaprio, J. A. (2000). Bcl-2 Retards Cell Cycle Entry through p27Kip1, pRB Relative p130, and Altered E2F Regulation. *Molecular and cellular biology*, 20(13), 4745-4753.

260. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Sambrook: Commonly used techniques in molecular cloning -, *Molecular cloning: a laboratory manual*.
261. Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
262. Camats, M. (2008). Mecanismes de senyalització intracel·lular regulats per la proteïna p19 H-Ras, Tesi Doctoral–Universitat Autònoma de Barcelona.