



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

PROTECCIÓ DEL PROCÉS DE MORT
CEL·LULAR PROGRAMADA EN CULTIUS
***IN VITRO* DE CÈL·LULES ANIMALS**

Memòria que, per optar al grau de
Doctor en Ciències, presenta
Joaquim VIVES i ARMENGOL

Bellaterra, novembre de 2001

JORDI JOAN CAIRÓ i BADILLO, professor associat del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona; LLUÍS CORNUDELLA i MIR, investigador científic, i EVA PRATS i MIRAVITLLAS, investigadora interina, de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona IBMB-CSIC,

CERTIFIQUEM:

que el llicenciat Joaquim Vives i Armengol ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, de la UAB, i de Biologia Molecular i Cel·lular, de l'IBMB-CSIC (ambdós departaments són unitats del Centre de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya) el treball que amb el títol de: "Protecció del procés de mort cel·lular programada en cultius *in vitro* de cèl·lules animals" es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, novembre de 2001

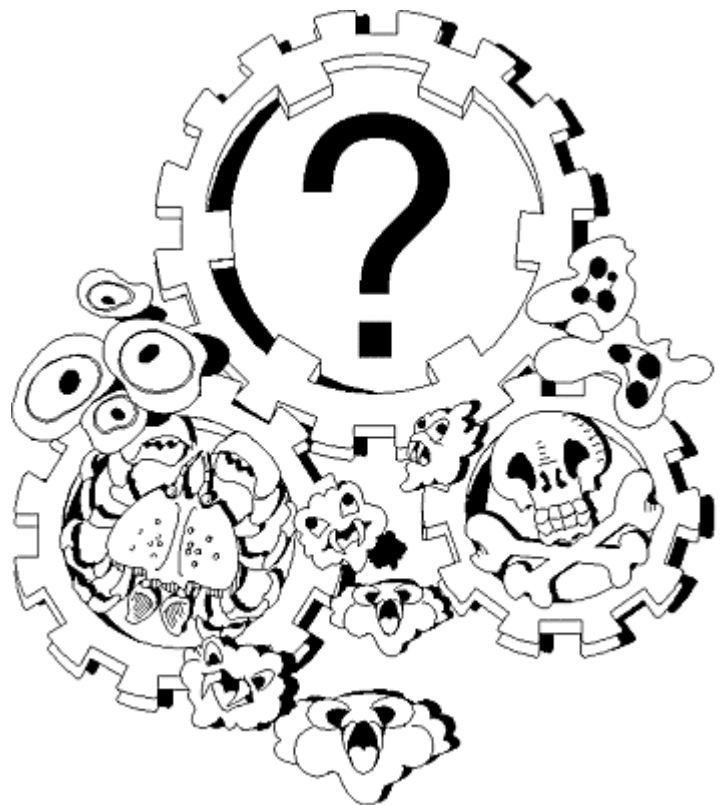
Jordi Joan Cairó i Badillo

Lluís Cornudella i Mir

Eva Prats i Miravitllas

Apoptosis –the regulated destruction of a cell- is a complicated process.

HENGARTNER MO (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776



AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Va ser per la Mercè del 97, que va començar el meu doctorat.

De llavors ençà he tingut temps per conèixer un grapat de gent de qui he après ciència i moltes altres coses més i a qui ara, després de quatre anys i escaig viscuts a mig camí entre l'IBMB-CSIC i la UAB, vull agrair sincerament tant el seu ajut com la seva companyia. I és que fer el doctorat ha estat un exercici per aprendre a treballar en equip i a tirar endavant la feina bo i trobar-me, de vegades, situacions complicades de molts tipus. Això sí, he tingut sort de compartir molts moments, i molt bonics, amb els companys de laboratori. A tots vosaltres us dedico aquest apartat.

Així doncs, en primer lloc, vull deixar ben clar que si el tribunal decideix que mereixo ser Doctor serà, a banda del que hi he posat de mi mateix, culpa de quatre persones que ho han fet possible amb el seu suport i confiança: en Lluís Cornudella, per batallar fins aconseguir la meva beca i per guiar-me durant aquests anys; en Quico Gòdia, per donar-me un projecte i un grup i, entre moltes altres coses més, la llibertat de volar als laboratoris d'en Martin Fussenegger (ETH, Zürich, Suïssa) i del John C. Reed (Burnham Institute, La Jolla, Califòrnia); l'Eva Prats, per ensenyar-me Biologia Molecular per un *tubu* i assessorar el meu treball; i en Jordi J. Cairó, per ensenyar-me tot el que ell sap d'hibridomes i d'infinitat de coses més però, sobretot, per haver-me sabut ajudar quan més ho he necessitat.

MOMENTS



La benvinguda la va catalitzar en Carles Paredes, un dels païos més intel·ligents i trempats que en aquell època corria pel Departament. Així vaig conèixer la Georgina Vidal, la Sílvia Romero, la Mercè Fité, l'Anne Vernerey, l'Àlicia Serrano, l'Elvira César, l'Aina Solà i la *tot-terreny* Rosi Tello.

En aquell temps, al grup de MAbS érem l'Albert Tintó, en Toni Casablanques, en Xavi Gàmez, la Clàudia Altamirano, la Glòria González, en Carles, en Jordi i en Quico. Aviat també s'hi va incorporar la Carme Gabernet, amb qui vam compartir taulell i les alegries i maldecaps del dia a dia al laboratori. Ah, i de les excursions! Sovint eren diàries. Amunt i avall, de Barcelona a Bellaterra, i al revés... per assistir a cursos de doctorat que moltes vegades ens van decebre.

Del MAbS actual, he de destacar els aires renovats que ens han portat l'Albert i en Martí, amb qui, juntament amb en Jordi, hem creuat el Sàhara, i envaït Magisteri, i visitat freqüentment el Bar de Ciències, i les companyes de Biotecnologia, ...

La gent del CID ja me la coneixia, hi havia fet les pràctiques de la llicenciatura l'estiu de l'any anterior. Els esmorzars amb la Maite, la Rosa Debón, l'Eva i en Jaume; els dinars (i tertúlies de sobretaula!) amb la Sònia i en Carles, la Natàlia García-Reyero, en David *loquehagafalata* Carro (què se'n sap del farmacèutic de Canet?), la Sònia Trigueros, en Benjamí Piña i en Josep Portugal (ostres, quines ulleres de sol més *xules!*); i la Sara Pagans; i el suport tècnic de la Jenny Colom; i la Virgina Amador, que em feia de taxista en algun dels viatges a l'Autònoma, i que ara ja publica al *Cell!*

Després de defensar el màster, vaig tenir la possibilitat de conèixer com es treballa en altres laboratoris. Així, la meua

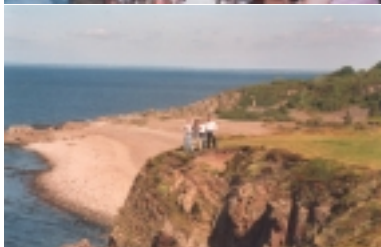
MOMENTS



primera visita a l'estranger fou a l'ETH on, de la mà d'en Martin Fussenegger (amb la que no agafava el *yoyo-desestressant*, em refereixo), vaig aprendre les bases dels sistemes d'expressió regulables i la sorprenent *Champion's league PCR*. Tot això, amb l'agradable i enriquidora companyia d'en Sam Moser, l'Steffan Schlater, la Connie Fux, l'Hito i la Romina. Ei, sense oblidar l'olotina Lúdia Vergès, a qui vaig conèixer a la residència d'estudiants, i en Xavi Barril, *amic d'un amic*, i amb qui fem un equip curiós, encara que ni els seus dos metres d'alçada ni la meva gràcia culinària ens va servir per tombar una truita de dos quilos i mig de patates, cinc cebes i una dotzena d'ous... Un any després ens vam retrobar a SF, quan jo estava al laboratori d'en John Reed, un home sorprenent de qui vaig aprendre a entendre la ciència de forma diferent. La meva estada al Burnham, però, no hagués estat el mateix sense l'ajut inestimable de la Uge Ariza. Vull també recordar breument els companys de laboratori: els sempre somrients Vasco i Loredana; en Henry i la Christianne; també la Clotilde Huet, i el grup del cafè de la tarda, en Jesús Blasco, en Farid Hanai i la canadenc Marie.

També vull recordar la companyia al despatx de la Cristina Canaleta, l'Anna Morist, la Neus *terremoto* López, en David Resina (Figuera's *gipsy king*), les Annes (Montràs i Surribas), la Sandra Masot. I també la jovenalla del despatx del costat: la Núria Creus (amb qui hem compartit molts caps de setmana, ponts i algun estiu, però també l'organització dels concursos de coques i pastissos, i el de fotografia; i la paradeta a la Festa Major; i el cinema al seminari; ai, la *kla...* quin encert!), la María Torrijos (que riem, entre el cafè del matí i el *so sexy* de la *Gipsy hour*), la Maite Pijuan (que ens va *obrir les portes de ca seva* l'estiu passat... molt del qui hi ha aquí va ser escrit allà, ja veus!), l'Albert Guisasola (qui ha demostrat ser capaç de suportar prou bé la meua eufòria matinerica en els trajectes amb cotxe de la darrera temporada), la Vanesa i la Lorena, en Ramon-Ramon (el

MOMENTS



més *sexy* del Departament; potser hauríem de demanar una barra americana al nou edifici de l'ETSE, encara que sense ella...), la Trinitat Suau (sempre disposada a donar un cop de mà), en Jordi i la Txell. I també la Christel, i l'Aitor, i en Luís Vidal, i l'Eli Garicano, i la Carol, i el Manuel, i l'Òscar, i el nostre motorista: en Dani Cardona (*porque lo que más nos gusta... no cal que preguntí el què*). I la Paqui, i en Julio, i l'Oriol (ostres noi, tu sí que ens saps de fer el que fas! Visca la informàtica per qui l'entengui!), i en Fernando, i en Pau, i en Juan, i l'Olga i el conjunt de funcionaris titulars i catedràtics que omplen el menjador a l'hora de dinar.

Ah! I els companys de llicenciatura: en Lluís Vilarroig (tan lluny, però sempre en contacte!), les Montses (Mira, Oliveras i Pous), l'Isma i l'Eva; en Quim de los Ríos, l'Àlex (gràcies per enzims de restricció, filtres, consells, i per perseverar en quedar amb mi per anar a jugar a *squash*, amb 'lo' patata que sóc jo), les Sílvies (Moreno, Guerrero i Bronsoms), la Sònia, la Susana i en Jordi.

De la nova fornada del CID, vull agrair la companyia i simpatia de la Carol Cela, les Sílvies, la Raquel, l'Ana (Venessolana tota ella) i la Ivet. Ah! I, com no, és impossible no fer referència a Canet'01, la trobada científica de les unitats de Biologia Molecular i Bioquímica del Desenvolupament de la Societat Catalana de Biologia, on un farmacèutic, sense conèixer-nos de res, ens va obrir la porta de la seva farmàcia i la vam liar amb Codorniu i un biberó a la *rebotica* (com deia en David, '*esta noche es mágica*'). Allà hi vaig conèixer l'Olga Méndez, qui em va fer quatre recomanacions per a la detecció del Bcl-2 endogen en l'hibridoma.

En el transcurs de la tesi, també he tingut la possibilitat d'ensenyar allò que he après. Així, han passat per les meves mans (ep! no penseu malament...) la Merete Bigum, l'Anna Belén, en Marc Valer, i la Sandra Juanola. Gràcies a tots quatre per escoltar-

MOMENTS



me i creure'm quan us deia que es poden fer restriccions en un microones. No sé pas qui ha après més de qui, però ja és això... ah, què?

M'agradaria recordar, també, la gent de les tertúlies dels dissabtes a les 17:00 al bar de la Sala Cabañes, en especial a en Germán, responsable del disseny de la portada d'aquesta memòria.

Vull agrair la feina que fan la Rosi Tello i la Pepi Murillo, les laborants; i l'Àngels Aguilar i la Nati Campamelós, les secretàries del Departament; i els meus telefonistes particulars: els i les companys de despatx, quina paciència que teniu!

Agraeixo la feina excel·lent de les persones que condueixen els Serveis de Microscòpia Electrònica, de Citometria de Flux, de Cultius Cel·lulars i de Seqüenciació de DNA de l'Autònoma. D'ells vull destacar l'ajut inestimable de l'Anna Barceló i de la Manuela Costa; així com la Carme Nogués i en Joan Blanco, ambdós del Departament de Biologia Cel·lular de la UAB, per assessorar-me en la detecció de cèl·lules transfectades amb GFP; i en José Piedra, del Departament de Biofísica de la Facultat de Medicina de la UAB per fer una ullada (decisiva!!!) en el protocol de les transferències *Western*.

He deixat pel final el meu agraïment a aquells qui més estimo i que m'han donat el més gran suport i la millor comprensió: els meu pares, la meva germana i, sobretot, la Laura, qui hagut de patir (i gaudir!) amb mi els caps de setmana i les vacances al laboratori. És ben veritat que, bo i no treballar junts, s'ha convertit en la millor companya de feina.

Bellaterra, 14 de novembre de 2001



ÍNDEX

RESUM	1
INTRODUCCIÓ	7
1. IMPORTÀNCIA I PROBLEMÀTIQUES DEL CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS	9
1.1. El cultiu de cèl·lules animals	9
1.2. Hibridomes: cèl·lules productores d'anticossos monoclonals	11
1.3. El cultiu de cèl·lules d'hibridoma i la seva problemàtica	12
1.4. La mort per apoptosi de l'hibridoma KB26.5	14
1.5. Determinació dels principals inductors de l'apoptosi en cultius d'hibridomes	20
1.6. Relació entre metabolisme i apoptosi	25
1.7. Importància de les diferents rutes metabòliques en el procés d'inducció de l'apoptosi	26
1.8. Estratègies per evitar la mort per apoptosi en els bioreactors	28
1.8.1. Optimització de les variables extracel·lulars i del sistema de cultiu	30
1.8.2. Reformulació del medi de cultiu	33
1.8.3. Optimització del processos bioquímics intracel·lulars	35
OBJECTIUS	37
2. OBJECTIUS	39
2.1. Objectiu general	42
2.2. Objectius específics	
RESULTATS I DISCUSSIÓ	45
3. TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL I EXECUCIÓ DEL PROGRAMA DE MORT	47

3.1. Apoptosi i cicle cel·lular	49
3.2. La transducció del senyal	51
3.3. Gens implicats en la transducció del senyal apoptòtic	54
3.4. Identificació de l'expressió de membres de la família del bcl-2	56
3.4.1. <i>bcl-2</i>	56
3.4.2. <i>bcl-x_L</i>	58
3.4.3. <i>bax</i>	60
3.4.4. <i>bak</i>	61
3.4.5. <i>bcl-w</i>	61
3.4.6. <i>mcl-1</i>	62
3.4.7. Valoració dels resultats obtinguts en la identificació de gens de la família del Bcl-2 en l'hibridoma KB26.5	63
3.5. Les Caspases: proteases responsables de la fase efectora de la PCD	64
3.5. Identificació de l'expressió de Caspases en l'hibridoma KB26.5	68
3.5.1. Caspasa 1	69
3.5.2. Caspasa 2	69
3.5.3. Caspasa 3	70
3.5.4. Caspasa 9	71
3.6. Estudi del paper de les Caspases en l'apoptosi de l'hibridoma KB26.5	72
3.6.1. z-VAD-fmk	72
3.6.2. Ac-DEVD-cmk	76
3.6.3. z-YVAD-cmk	79
3.6.4. Ús combinat dels inhibidors z-VAD-fmk i Ac-DEVD-cmk	81
3.6.5. Importància de les Caspases en l'execució de l'apoptosi en l'hibridoma	84
4. PROTECCIÓ I RECUPERACIÓ DE CULTIUS D'HIBRIDOMA MITJANÇANT REFORMULACIÓ DEL MEDI DE CULTIU	87
4.1. Aturada del cicle cel·lular en cultius de cèl·lules animals	89

4.2. Estratègies per a l'aturada del cicle cel·lular en l'hibridoma KB26.5	95
4.2.1. Canvi de la principal font de carboni	105
4.2.3. Reducció de la concentració de sèrum	107
4.2.4. Reducció de la concentració de fosfats	109
4.3. Conclusions de les estratègies seguides per a l'aturada del cicle cel·lular	111
4.4. Ús d'inhibidors inespecífics: el cas del Zn ²⁺	112
4.5. Experiments de retorn de la viabilitat dels cultius	115
5. MODIFICACIÓ GENÈTICA DE L'HIBRIDOMA KB26.5	121
5.1. Dianes per al bloqueig de la PCD	123
5.2. Sobreexpressió de membres antiapoptòtics de la família del Bcl-2	124
5.3. Inhibidors de Caspases	129
5.4. Estratègia de transfecció de l'hibridoma KB26.5	130
5.5. Efectes de la sobreexpressió de gens protectors de l'apoptosi	132
5.5.1. Protectors endògens: Bcl-2 i Bcl-X _L	132
5.5.2. Protectors vírics: KSBcl-2 i BHRF-1	135
5.5.3. Inhibidors de Caspases: X-IAP i p35	139
5.5.4. X-IAP mínima	140
5.6. Inhibició creuada: els <i>súperinhibidors</i>	143
5.6.1. Els mutants <i>Michelangelo</i> i <i>Leonardo</i>	143
5.6.2. Efecte dels mutants en la protecció de l'apoptosi	145
5.6.3. Avaluació de l'efecte dels <i>súperinhibidors</i>	147
5.7. Aplicacions de línies cel·lulars modificades genèticament amb gens protectors de l'apoptosi	148
5.8. Estabilitat de l'expressió en l'hibridoma: ús de vectors amb IRES	149
5.8.1. Ús de construccions bicistròniques en pIRESpuro2	150
5.8.2. Generació de vectors bicistrònics amb el gen de la glutamina sintetasa	153
5.9. Valoració global del treball realitzat	155

CONCLUSIONS	163
6. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES FUTURES DE TREBALL	165
6.1. Conclusions	167
6.2. Perspectives futures de treball	170
MATERIALS I MÈTODES	171
7. MATERIALS I MÈTODES	173
7.1. Consideracions generals de seguretat en laboratoris de Biologia Molecular i Cel·lular	175
7.2. Línia cel·lular, conservació, medis i sistema de cultiu	176
7.3. Mètodes analítics	178
7.3.1. Recompte cel·lular	178
7.3.1.1. Càlcul de la concentració cel·lular	179
7.3.1.2. Càlcul de la viabilitat cel·lular	179
7.3.2. Anàlisi de les concentracions d'aminoàcids, amoni, glucosa i lactat	179
7.3.2.1. Anàlisi de glutamina i altres aminoàcids per HPLC	179
7.3.2.2. Determinació de la concentració de glucosa i lactat	180
7.3.2.3. Determinació de la concentració d'anticòs monoclonal	180
7.4. E. coli : soques, medis i sistemes de cultiu	183
7.5. Extracció i purificació de material genètic	184
7.5.1. Extracció i purificació de DNA plasmídic	184
7.5.2. Extracció i purificació de DNA genòmic	184
7.5.3. Extracció de RNA _{TOTAL}	185
7.6. Obtenció i amplificació enzimàtica de material genètic	186
7.6.1. Amplificació per PCR	186
7.6.2. Amplificació per RT-PCR	187
7.6.3. Disseny dels encebadors	188
7.6.4. Mutagènesi dirigida	188

7.6.4.1. Encebadors mutagènics	190
7.6.4.2. <i>Donatello</i>	190
7.6.4.3. <i>Michelangelo</i>	191
7.6.4.4. <i>Leonardo</i>	192
7.6.5. Processament de les seqüències de DNA i proteïnes	192
7.7. Plasmidis utilitzats	192
7.7.1. Construcció del vector pIRES-GS.	192
7.7.2. Vector pcDNA3-myc	193
7.7.2. Representació gràfica dels vectors generats	193
7.8. Purificació i separació del material genètic	193
7.8.1. Separació del material genètic per electroforesi en gels d'agarosa	193
7.8.2. Purificació de bandes de DNA	194
7.8.3. Quantificació de la concentració de DNA	194
7.9. Modificacions enzimàtiques del DNA	194
7.10. Transcripció i traducció <i>in vitro</i>	195
7.11. Transformació	196
7.12. Transfecció	196
7.12.1. Reactiu de transfecció	196
7.12.2. Determinació de les concentracions òptimes del marcador de selecció	197
7.12.3. Seguiment de la transfecció	198
7.13. Tècniques per a la detecció de l'apoptosi en l'hibridoma	198
7.13.1. Tècniques quantitatives	198
7.13.1.1. Marcatge amb Annexina-V-Fluos i quantificació per citometria de flux	198
7.13.1.2. Quantificació per microscòpia de fluorescència de morfologies cel·lulars	199
7.13.2. Tècniques qualitatives	200
7.13.2.1. Visualització de l'apoptosi per microscòpia confocal	200
7.13.2.2. Visualització de la fragmentació del DNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa	200

7.13.2.3. Anàlisi del potencial intermembrana mitocondrial	201
7.13.2.4. Detecció de l'alliberament de Citocrom c de mitocondri a citoplasma	201
7.14. Extracció i quantificació de proteïna	202
7.15. SDS-PAGE	203
7.16. Transferència <i>Western</i>	204
7.16.1. Anticòs anti-Caspasa 2	205
7.16.2. Anticòs anti-Caspasa 3	205
7.16.3. Anticòs anti-Caspasa 9	205
7.16.4. Anticòs anti-Bcl-x	205
7.16.5. Anticòs anti-Bcl-2	205
7.16.6. Anticòs anti-Citocrom c	205
7.16.7. Anticòs anti-myc	206
7.16.8. Anticòs secundari	206
7.17. Preparació de medis de cultiu amb inhibidors de l'apoptosi	206
7.17.1. z-VAD-fmk	206
7.17.2. Ac-DEVD-cmk	206
7.17.3. z-YVAD-cmk	207
7.17.4. Medis amb ZnSO ₄	207
7.18. Preparació de medis modificats per a l'aturada del cicle cel·lular	207
7.18.1. Medi base	207
7.18.2. Suplements	207
7.19. Estudi del cicle cel·lular per citometria de flux	208
 REFERÈNCIES	 209
 ABREVIATURES I SÍMBOLS	 231
 ANNEXOS	 237
 ANNEX A: SEQÜÈNCIES CODIFICANTS DELS mRNAs DELS GENS ESTUDIATS	 239

A1. <i>bcl-2</i> (<i>Mus musculus</i>)	242
A2. <i>bcl-x</i> (<i>Mus musculus</i>)	243
A3. <i>bcl-w</i> (<i>Mus musculus</i>)	244
A4. <i>mcl-1</i> (<i>Mus musculus</i>)	245
A5. <i>bak</i> (<i>Mus musculus</i>)	246
A6. NM_007527 <i>bax</i> (<i>Mus musculus</i>)	247
A7. U88990 <i>x-iap</i> (<i>Mus musculus</i>)	248
A8. L28095 <i>caspasa 1</i> (<i>Mus musculus</i>)	249
A9. NM_007610 <i>caspasa 2</i> (<i>Mus musculus</i>)	250
A10. Y13086 <i>caspasa 3</i> (<i>Mus musculus</i>)	251
A11. NM_015733 <i>caspasa 9</i> (<i>Mus musculus</i>)	252
A12. M17416 <i>bhrf-1</i> (Herpesvirus humà de tipus 4)	253
A13. NC_001623 p35 (Autographa californica nucleopolihedrovirus)	254
A14. U67773 <i>ks-bcl-2</i> (Herpesvirus humà tipus 8)	255

ANNEX B: MAPES DE VECTORS 257

B1. pcDNA3 (Invitrogen)	260
B2. pcDNA3-myc (Ryosuke)	261
B3. pIRESneo (Clontech)	262
B4. pIRESpuro2 (Clontech)	263
B5. pIRES2-EGFP (Clontech)	264
B6. pEE12 (Lonza Biologics)	265
B7. pSG5: <i>ksbcl-2</i> (Dr. Jean M. Hardwick)	266
B8. pIRES-GS	267
B9. pcDNA3: <i>bcl-2</i>	268
B10. pcDNA3: <i>bcl-xL</i>	269
B11. pcDNA3: <i>bhrf-1</i>	270
B12. pcDNA3: <i>ksbcl-2</i>	271
B13. pcDNA3: <i>x-iap</i>	272
B14. pcDNA3: <i>p35</i>	273
B15. pcDNA3: <i>bcl-w</i>	274
B16. pcDNA3: <i>mcl-1</i>	275

B17. pcDNA3: <i>bax</i>	276
B18. pcDNA3: <i>bak</i>	277
B19. pcDNA3: <i>myc-Donatello</i>	278
B20. pcDNA3: <i>myc-Michelangelo</i>	279
B21. pcDNA3: <i>myc-Leonardo</i>	280
B22. pIRESpuro2: <i>bhrf-1</i>	281
B23. pIRESpuro2: <i>ksbcl-2</i>	282
B24. pIRESpuro2: <i>p35</i>	283
ANNEX C: RECURSOS A LA XARXA	285

RESUM

PROTECCIÓ DEL PROCÉS DE MORT CEL·LULAR PROGRAMADA EN CULTIUS *IN VITRO* DE CÈL·LULES ANIMALS

El potencial que ofereix l'ús a gran escala de molècules produïdes en cèl·lules animals en diagnòstic, terapèutica i processos de purificació, entre d'altres camps d'interès biotecnològic, ha portat a les empreses farmacèutiques a dirigir l'atenció cap a la millora de processos basats en el seu cultiu per obtenir densitats cel·lulars i concentracions de producte cada vegada més elevats. En aquestes condicions, un dels principals obstacles amb que es topa el cultiu en bioreactors és la pèrdua de viabilitat dels cultius i l'acumulació de cèl·lules mortes dins els bioreactors degut a factors com l'agitació, exhauriment de nutrients i de factors de creixement, així com elevades concentracions de subproductes tòxics del metabolisme. Això limita el progrés del cultiu per dos motius: primerament, per la necessitat de ràpides velocitats de divisió cel·lular per substituir les cèl·lules mortes, que fan reduir la productivitat específica; i, d'altra banda, per l'alliberament de proteases, DNA i altres components de les cèl·lules mortes, que porten a la degradació del producte d'interès i compliquen la seva purificació.

Davant la impossibilitat econòmica i física de controlar enginyerilment tots els paràmetres involucrats, en aquest treball se suggereix la possibilitat d'utilitzar estratègies de perfusió bifàsica en cultius de cèl·lules d'hibridoma, en els quals, després d'un període inicial de creixement exponencial, es perfusiona un medi de cultiu modificat que alenteixi el creixement, evitant així el consum desmesurat de nutrients i la producció excessiva de subproductes tòxics del metabolisme. Entre les modificacions efectuades s'hi inclou la substitució, reducció i addició de components del medi, dels quals els millors resultats s'han obtingut disminuint la concentració de sèrum del medi, així com substituïnt la principal font de carboni i reduint les concentracions de fosfats.

Malauradament, aquesta reformulació del medi de cultiu, si bé permet alentir la proliferació cel·lular, encara provoca l'augment del nombre de cèl·lules no viables que moren, com es demostra en aquest treball, seguint un procés de desmantellament intern perfectament ordenat, codificat genèticament, que es coneix amb el nom de *mort cel·lular programada* o *apoptosi*.

Aquest tipus de mort cel·lular es desenvolupa per unes vies bioquímiques establertes, que han estat cartografiades en l'hibridoma KB26.5 amb l'objectiu d'identificar-hi dianes per a una intervenció genètica orientada a retardar el procés de mort per apoptosi en situacions inductores d'aquesta dins els bioreactors.

En primer lloc, es va estudiar el paper del mitocondri com a punt central en la transmissió del senyal de mort cap a les molècules executores de l'apoptosi i on hi realitzen la seva funció reguladora els membres de la família del Bcl-2. Així, es va determinar que la manca de nutrients desencadenava la sortida del Citocrom c de l'espai intermembrana mitocondrial al citoplasma, provocant l'activació de la cascada proteolítica de les Caspases, la importància de les quals en l'execució del procés apoptòtic en l'hibridoma KB26.5 ha quedat palesa en experiments realitzats amb inhibidors peptídics específics d'aquestes proteases. L'ús d'aquests pèptids sintètics ha permès no només retardar la pèrdua de viabilitat dels cultius si no també recuperar-los fins a 36 hores després d'haver induït la mort per manca de glutamina. Malauradament, el seu ús resulta inviable econòmicament per volums de cultiu a escala de bioreactor.

Malgrat tot, els resultats obtinguts suggereixen la via de les Caspases com a punt clau per al bloqueig de l'apoptosi. Per aquest motiu, s'han utilitzat estratègies d'inhibició genètica a dos nivells diferents: sobre membres iniciadors de la ruta de les Caspases i en la protecció de l'alliberament del Citocrom c de mitocondri.

D'entre les diferents possibilitats suggerides per la literatura, es va optar per la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-X_L, així com dels seus homòlegs vírics KSBcl-2 i BHRF-1, per evitar l'alliberament del Citocrom c de mitocondri, punt previ a l'activació de les Caspases; i la sobreexpressió de X-IAP i P35 per a la inhibició específica de les Caspases 3, 7 i 9.

Els resultats han evidenciat la capacitat protectora d'aquestes proteïnes i han permès alentir la disminució de la viabilitat provocada per l'exhauriment de nutrients al medi respecte els cultius control. A més a més, la sobreexpressió dels membres protectors de la família del Bcl-2, tant d'origen endogen com víric, han permès recuperar la viabilitat cel·lular de cultius que havien estat sotmesos a condicions inductores de l'apoptosis durant 48 hores.

Aquests resultats demostren la viabilitat d'incorporar una *vàlvula* de seguretat genètica que permet retardar el procés de mort per apoptosi de cèl·lules que, en altres circumstàncies, morrien

i s'acumularien en el bioreactor. A més a més, la sobreexpressió de gens antiapoptòtics fa les cèl·lules més resistents i permet recuperar cultius que, per causes accidentals inherents a la metodologia emprada en el monitoratge i control del bioprocés o per limitacions físiques de subministrament de nutrients, factors de creixement i oxigen, es vegin sotmeses a condicions inductores de l'apoptosi.

D'aquesta manera, el treball que aquí es presenta contribueix a la creació d'un sistema de cultiu més robust que evitaria l'enorme pèrdua de rendibilitat en el procés d'obtenció del producte desitjat que es dona quan un cultiu entra en la fase de mort per apoptosi.

A més a més, els coneixements adquirits del metabolisme de l'hibridoma i dels seus mecanismes d'inducció de l'apoptosi, han permès dissenyar i generar vectors bicistrònics que enlloc de contenir un marcador de selecció que confereixi resistència a un antibiòtic, que és sempre un agent tòxic per la cèl·lula, contenen en la seva seqüència el gen de la glutamina sintetasa, que permet als hibridomes sobreviure en medis on, enlloc de glutamina, hi hagi present glutamat. Aquest canvi en la formulació del medi no suposa l'addició d'antibiòtics que, d'altra forma, no podrien ser utilitzats a escala industrial, degut al seu elevat cost.