

Tesi doctoral presentada per En/Na

Helena EIXARCH PUIGCERVER

amb el títol

**"Identificació de noves dianes en càncer:
mecanismes de resposta a
la inducció per hipòxia "**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 28 de febrer de 2006.

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



És gairebé una obligació escriure un full d'agraïments per a les primeres pàgines d'una tesi. No per això la sinceritat és menor i, a més, és una oportunitat per a expressar coses que, tot i que es porten ben arrelades dins el cor, mai no ens atrevim a verbalitzar.

Per on començar? Són tantes les persones que han influït d'una manera o d'una altra en la consecució d'aquest treball que es fa difícil establir un ordre.

Evidentment, tota la gent del LBI de Merck Farma y Quimica S.A. mereix una menció apart.

A Ramon Messeguer li dec cinc anys d'experiències, dintre i fora del laboratori, que m'han forjat com a científica i com a persona. He après què significa que algú confii en tu, i he pogut conèixer de primera mà què és la recerca, aquesta feina amb la que somniava ja de ben petita. Només puc dir: moltes gràcies.

Al Dr. Jaume Piulats, gràcies per permetre que aquest projecte anés endavant. El seu suport a la recerca és admirable, i possibilita la formació de nous científics dins un món on és difícil tenir oportunitats.

A Tamara Caparrós, Toni Coll i Alícia Martínez: són impagables totes les hores del vostre temps que heu invertit en gran part de la feina experimental que aquí s'exposa.

Al meu company José Luís Hernández, que ha estat en molts casos el meu guia i mestre en qüestions experimentals, un exemple a seguir en quant al mètode científic, i sempre una persona de confiança.

A les meves companyes de despatx, Blanca Rodés i Alicia Gómez, pels seus consells i observacions, no només (o gairebé mai) referits a temes laborals.

A Imma Rosas, Pilar Antón, Marta Soler i Carmen Recacha, perquè sempre que ho he necessitat, m'han donat la seva ajuda.

En general, a tot el grup que habita el B5, per les tertúlies del matí al voltant del café, per la música i pel bon ambient. He d'annexionar obligatòriament a aquest grup a Marc Masa, que, a més de les seves visites ocasionals per aquesta zona, ha estat un bon suport en temes informàtics, i un excel.lent col.lega.

A tots aquells amb els que he compartit els esmorzars o dinars, per les bones estones: Laura Espanya, Núria Puig, Rosa Hervás, Charo Sánchez, Joana Veja, Carmen Calvis, Olga Rodríguez, Marta Escorihuela, Anna Rodríguez, Josep M^a Martínez (de hobby, culé), Marina Corominas, Jordi Grimaó, Clàudia Casas i Francesc Blasco, que sempre ha mostrat un gran interès per la cultura de la "meva terra". I a Francesc Mitjans, Fina Araqué, Ana Carceller, Gemma Tarrasón, Oriol Massó, Montse Abella i Jaume Adan, que sempre han tingut paraules de suport per a mi.

A Neus Sánchez i Núria Soriano, per l'ajuda inestimable en qualsevol tema, i per mostrar sempre la seva cara més amable i simpàtica.

A Olga Maldonado, Ana Cortés i Sole García: la vostra feina és indispensable per a que la meva es pugui fer impecablement. Moltes gràcies per la vostra col.laboració, per la vostra disponibilitat, i per les petites estones de conversa.

A Elisabet Rosell, que va guiar la meva primera estada en un laboratori, gràcies pel teu entusiasme, és contagiós.

A Joaquín Abián i Montse Carrascal, pels mesos que em van acollir en el seu laboratori; va ser una gran experiència. També per tot el suport experimental que m'han donat durant aquests anys, i per comptar amb mí per als nous projectes, moltes gràcies.

A Adela Mazo i Carles Ciutat: amb les col.laboracions dels vostres departaments heu possibilitat la meva feina.

A Imma i Montse (i a David i Josep, per extensió), per una bona convivència.

A tots els meus amics: quantes vegades he sacrificat les estones que havíem de passar junts en favor dels meus estudis o de la meva feina! ... Tot i això sempre puc comptar amb vosaltres. Moltes gràcies per acceptar-me com sóc.

A tota la meva família, per qüestionar ben poc les meves decisions.

Als meus pares, perquè sense ells res de tot això hagués estat possible. No es pot expressar de cap manera què han significat per a mí els seus esforços, i mai l'agraïment serà suficient.

A Neus, i tots els que vindran després d'ella, perquè ens donen l'alegria de viure.

A Pablo, per ser pacient.

Moltes gràcies a tots.

ÍNDIX

| | |
|--|-----------|
| Abreviacions..... | 5 |
| 1. Introducció..... | 7 |
| 1.1. Càncer..... | 7 |
| 1.1.1. Biologia del càncer..... | 7 |
| 1.2. Angiogènesi tumoral..... | 10 |
| 1.2.1. Factors angiogènics..... | 13 |
| 1.2.1.1. VEGF..... | 13 |
| 1.2.1.2. Tie i angiopoietines..... | 13 |
| 1.2.1.3. FGF..... | 14 |
| 1.2.1.4. Altres..... | 14 |
| 1.2.2. Factors antiangiogènics..... | 15 |
| 1.3. L'estrés hipòxic..... | 15 |
| 1.3.1. Hipòxia i angiogènesi..... | 16 |
| 1.3.2. Factors de transcripció..... | 17 |
| 1.3.2.1. AP-1..... | 18 |
| 1.3.2.2. NF- κ B..... | 18 |
| 1.3.2.3. Sp1..... | 19 |
| 1.3.2.4. MTF-1..... | 20 |
| 1.4. HIF-1..... | 20 |
| 1.4.1. Estructura..... | 21 |
| 1.4.2. Regulació de l'estabilitat d'HIF-1 per la concentració d'oxigen..... | 23 |
| 1.4.2.1. pVHL, PHDs i degradació proteasomal..... | 23 |
| 1.4.2.2. Sumoilació..... | 29 |
| 1.4.2.3. p53..... | 29 |
| 1.4.2.4. Hsp90..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 1.4.2.5. Òxid nítric (NO)..... | 32 |
| 1.4.2.6. mRNA | 32 |
| 1.4.3. Regulació de l'activitat transcripcional d'HIF-1 per la concentració d'oxigen..... | 33 |
| 1.4.3.1. p300/CBP i FIH-1..... | 33 |
| 1.4.3.2. HDACs (Histona-deacetilases)..... | 36 |
| 1.4.3.3. Rutes quinasa..... | 36 |
| 1.4.3.4. ROS..... | 39 |
| 1.4.3.5. PHD2..... | 41 |
| 1.4.3.6. Altres..... | 41 |
| 1.4.4. Regulació d'HIF-1 independent de la concentració d'oxigen.... | 41 |
| 1.4.4.1. Clorur de cobalt (CoCl ₂)..... | 42 |
| 1.4.4.2. Òxid nítric (NO)..... | 43 |
| 1.4.4.3. Oncogens i gens supressors de tumors..... | 44 |
| 1.4.5. HIF-2 α | 47 |
| 1.4.6. HIF en els processos fisiològics no tumorigènics..... | 48 |
| 1.5. Hipòxia, HIF i càncer..... | 49 |
| 1.5.1. Aproximacions terapèutiques..... | 51 |
| 2. Objectius..... | 59 |
| 3. Materials i mètodes..... | 61 |
| 4. Resultats..... | 79 |
| 4.1. Establiment del model..... | 79 |
| 4.2. Electroforesi bidimensional i identificació de proteïnes..... | 81 |
| 4.3. Validació dels resultats..... | 83 |
| 4.4. Iba2..... | 86 |
| 4.4.1. Clonatge, expressió i purificació..... | 86 |
| 4.4.2. Obtenció d'anticossos policlonals..... | 88 |
| 4.4.3. Caracterització..... | 89 |

| | |
|---|-----|
| 4.4.4. Estudis funcionals..... | 90 |
| 5. Discussió..... | 95 |
| 5.1. Valoració del mètode..... | 95 |
| 5.2. Anàlisi de possibles dianes farmacològiques..... | 103 |
| 5.2.1. Proteasome subunit α type I (component C2)..... | 103 |
| 5.2.2. Dynactin p50 subunit..... | 108 |
| 5.2.3. Iba2..... | 113 |
| 6. Conclusions..... | 125 |
| 7. Bibliografia..... | 127 |
| 8. Apèndix..... | 155 |

ABREVIACIONS

AMPK: AMP-activated Protein Kinase

Ang: Angiopoietina

ARCON: Accelerated Radiotherapy in Combination with Carbogen and Nicotinamide

ARD1: Arrest-Defective-1 protein

ARNT: Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

ATCC: American Type Culture Collection

bHLH: basic Helix-Loop-Helix

BSA: Bovine Serum Albumin

cDNA: DNA complementari

C-ODD: C-terminal Oxygen-dependent Degradation Domain

C-TAD: C-Terminal Transactivation Domain

DTT: Ditiotreititol

EGF: Epidermal Growth Factor

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESI-IT MS/MS: Electrospray Ionization-Ion Trap Tandem Mass Spectrometry

FCS: Fetal Calf Serum (Serum fetal boví)

FGF: Fibroblast Growth Factor

FIH-1: Factor Inhibiting HIF-1

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3

HA: Hemaglutinina

HDAC: Histone Deacetylase

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIF: Hypoxia-Inducible Factor

HNF-4: Hepatocyte Nuclear Factor 4

HRE: Hypoxia-Responsive Element

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Iba2: Ionized calcium-Binding Adaptor molecule 2

IGF: Insulin-like Growth Factor

IPG: Immobilized pH Gradient

IPTG: Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

JNK: Jun Kinase

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MBP-1: c-Myc promoter Binding Protein-1

MCSF: Macrophage Colony Stimulating Factor
MKP-1: MAPK Phosphatase-1
MMP: Matrix Metalloproteinase
mRNA: RNA missatger
MTF-1: Metal-responsive Transcription Factor 1
mTOR: mammalian Target of Rapamycin
MTT: Bromur de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazoli
NLS: Nuclear Localization Signal
NO: Òxid nítric
N-ODD: N-terminal Oxygen-dependent Degradation Domain
N-TAD: N-terminal Transactivation Domain
ODD: Oxygen-dependent Degradation Domain
PAS: Per/ARNT/Sim
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PHD: Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein
PI3K: Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
PIGF: Placental Growth Factor
PMSF: Phenylmethylsulphonylfluoride
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog
pVHL: Von Hippel Lindau protein
REF-1: Redox Factor-1
RIPA: Radioimmunoprecipitation Assay
ROS: Reactive Oxygen Species
rRNA: RNA ribosomal
SAPK: Stress-Activated Protein Kinase
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TAD: Transactivation Domain
TGF: Transforming Growth Factor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
uPA: urokinase Plasminogen Activator
UTR: Untranslated Region
VBC: pVHL - Elongin B - Elongin C
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: VEGF Receptor