

3. MATERIALS I MÈTODES.

Cultius cel·lulars.

El glioblastoma humà U373 MG (ATCC) es cultivà en monocapa en un incubador humidificat (Forma Scientific) a 37 °C i 5% CO₂ / 95% aire, amb medi RPMI 1640 amb GlutamaxTM (GibcoTM) suplementat amb un 10% de Serum Fetal Boví (FCS) (Biological Industries o GibcoTM). Tots els assajos es feren amb les cèl·lules en passis 18-19 i al 80% de confluència, en flascons de 75 o 150 cm² (NunclonTM surface; NuncTM).

Per a l'estimulació amb clorur de cobalt (CoCl₂) s'aspirà el medi de les cèl·lules i es substituï per medi fresc amb CoCl₂ 100 µM (Merck); en els flascons control es substituï per medi fresc. S'incubà 4h a 37 °C i 5% CO₂ / 95% aire (concentració i temps determinats segons la bibliografia).

Per al tractament hipòxic s'utilitzà un incubador humidificat (ThermoForma, model 3141), a 37 °C, 2% O₂ i 5% CO₂. Abans de fer el tractament, s'equilibraren 15 o 30 ml de medi fresc (per a flascons de 75 o 150 cm² respectivament) durant 3 h 30 min en condicions d'hipòxia [375]. Després d'aquest temps s'aspirà el medi de les cèl·lules i es substituï pel medi equilibrat. Es deixà incubant en hipòxia durant el temps determinat. Per als flascons control, s'aspirà el medi i es substituï per 30 ml de medi fresc equilibrat a 37 °C i 5% CO₂ (normòxia); s'incubà en aquestes condicions el mateix temps que els flascons hipòxics.

Les cèl·lules endotelials HUVEC (Advancell) es cultivaren en monocapa en un incubador humidificat a 37 °C i 5% CO₂ / 95% aire, amb medi EBM[®] (Clonetics[®]) suplementat amb EGMTM SingleQuots[®] (Clonetics[®]) (hEGF 0.01 ng/ml, hidrocortisona 0.1 µg/ml, BBE (Extracte Cerebral Boví) 12 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml) i FCS al 10 %. Tots els assajos es feren amb les cèl·lules en passis 7-9 i al 80% de confluència.

El melanoma humà M21 es cultivà en monocapa en un incubador humidificat a 37 °C i 5% CO₂ / 95% aire, amb medi RPMI 1640 amb GlutamaxTM i suplementat amb un 10% de FCS.

Obtenció d'extractes proteics.

Extracte total per a Western Blot i immunoprecipitació: es decantà el medi de les cèl·lules i s'afegí PBS fred (tampó fosfat 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, KCl 3 mM). Es rascaren les cèl·lules i es recollí tot en un tub. Es centrifugà 5 min a 1400 rpm i 4 °C. Es feu un rentat del pellet amb PBS fred. S'aspirà completament el PBS i es resuspengué amb 3 volums (respecte el volum del pellet sec) de tampó de lisi RIPA fred (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, Igepal CA-630 0.5%, EDTA 5 mM, NaCl 250 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM) suplementat amb PMSF 1 mM (SIGMA[®]) i una dilució 1:100 de Cocktail d'inhibidors de proteases (SIGMA[®]). Es deixà 30 min en gel i es centrifugà 30 min a 12000 rpm i 4 °C. Es recuperà el sobrenadant, es quantificà segons el mètode Bradford i es congelà a -20 °C.

Extracte total per a assajos de desfosforilació: s'obtingué com en el cas anterior, però sense afegir el detergent Igepal CA-630 al tampó RIPA.

Extracte total per a electroforesi bidimensional: es decantà el medi de les cèl·lules i s'afegí PBS fred. Es rascaren les cèl·lules i es recollí tot en un tub. Es centrifugà 5 min a 1400 rpm i 4 °C. Es feu un rentat amb PBS fred. Es feu un darrer rentat amb Tris-HCl 10 mM, Sorbitol 250 mM, pH 7 fred. S'aspirà completament el tampó i es resuspengué el pellet en 2 volums (respecte el volum del pellet sec) de tampó de lisi fred (Urea 8 M, CHAPS 2%, Tris 40 mM). Es triturà el pellet i es centrifugà 30 min a 13000 rpm i 4 °C. Es recuperà el sobrenadant, es quantificà segons el mètode Bradford i es congelà a -80 °C.

Western Blot.

Entre 50 i 100 µg d'extracte proteic es barrejaren amb un volum igual de tampó de càrrega 2X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 2%, β-Mercaptoetanol 5%) i se separaren electroforèticament amb un gel al 12% d'acrilamida (MiniProtean; BioRad), segons el mètode de Laemmli (SDS-PAGE). El gel es transferí en mullat sobre una membrana de PVDF (BioTrace™ PVDF; Pall) segons el mètode de Towi. Es bloquejà la membrana durant 1 h a temperatura ambient amb PBS High (Na₂HPO₄ 35 mM, NaH₂PO₄·H₂O 12.5 mM, NaCl 2.5 M, pH 7.2) + Tween 20 0.1% + llet 5% i després s'incubà amb un anticòs primari (Taula 4 – Apèndix 1) diluït en solució de bloqueig. Es feren 3 rentats de 10 min amb PBS High + Tween 20 0.1% i després s'incubà la membrana amb un anticòs secundari conjugat a peroxidasa, triat en funció de l'espècie corresponent a l'anticòs primari (Taula 5 – Apèndix 1), diluït en solució de bloqueig, durant 45 min - 1 h a T^a ambient. Es feren 3 rentats de 10 min amb PBS High + Tween 20 0.1% i es feu reaccionar la membrana amb ECL™ (Amersham Biosciences). La detecció de la quimioluminescència emesa es feu per exposició de la membrana a un film fotogràfic (Hyperfilm™ECL; Amersham Biosciences), a temps variables segons l'anticòs (Taula 4 – Apèndix 1), i posterior revelat.

Detecció d'Iba2: 100 µg de proteïna total se separaren electroforèticament amb un gel al 15% d'acrilamida. La transferència, el bloqueig i la immunodetecció es realitzaren segons s'ha descrit anteriorment, i s'utilitzà l'anticòs policlonal anti-Iba2 #751 (Taula 4 – Apèndix 1) com a primari.

Detecció d'HIF-1α: 100 µg de proteïna total se separaren electroforèticament amb un gel al 7.5% d'acrilamida. La transferència es realitzà segons descrit anteriorment. Després es bloquejà la membrana durant 1 h a temperatura ambient amb Tris 10 mM pH 7.5 + NaCl 100 mM + Tween 20 0.1% + llet 5% i s'incubà amb l'anticòs primari anti-HIF-1α (Taula 4 – Apèndix 1) diluït en solució de bloqueig. L'anticòs secundari (conjugat a peroxidasa) també es diluí en solució de bloqueig, i els

rentats corresponents es feren amb tampó Tris 10 mM pH 7.5 + NaCl 100 mM + Tween 20 0.1%.

Per a l'anàlisi de la intensitat de les bandes en el film s'utilitzà el programa "ImageMaster 1D Elite v3.01" (Amersham Biosciences).

Electroforesi bidimensional.

Per a la primera dimensió s'utilitzà el IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences). Es barrejaren 150 µg de la mostra amb tampó de rehidratació (Urea 8 M, CHAPS 2%, IPG Buffer pH 4-7 0.5% (Amersham Biosciences), DTT 10 mM, Blau de Bromofenol) fins a un volum final de 350 µl i s'aplicà sobre una tira de primera dimensió Immobiline™ dry strip pH 4-7, 18 cm (Amersham Biosciences). Les condicions d'enfoc foren: 12 h de rehidratació a 100 V, fins a 1200 V·h; 1 hora a 500 V (Step-n-hold), fins a 500 V·h; 1 h 30 min a 1000 V (Step-n-hold), fins a 1500 V·h; 1 h de gradient de 1000 a 8000 V, fins a 4500 V·h; 5 h a 8000 V (Step-n-hold), fins a 80000 V·h; tot a 20 °C.

Per a la segona dimensió s'utilitzà el Multiphor II (Amersham Biosciences), i gels preparats ExcelGel™XL (Amersham Biosciences) amb un gradient de 12 – 14 % d'acrilamida. S'equilibrà la tira de primera dimensió durant 15 min amb tampó d'equilibrat (Tris-HCl 75 mM, Urea 6 M, Glicerol 30%, SDS 2%, Blau de Bromofenol) més DTT 3 mM i 15 min amb tampó d'equilibrat més iodoacetamida 40 mg/ml. S'aplicaren 20 mA, 1000 V, 40 W durant 30 min i 40 mA, 1000 V, 40 W durant 3 h.

Es realitzà tinció amb plata: fixació durant 1 h amb Etanol 30%, Acètic 10%; rentat de 20 min amb Etanol 30%; rentat de 10 min amb aigua Milli-Q; sensibilització durant 1 min amb Na₂S₂O₃ x 5H₂O 0.2 g/l; 3 rentats de 20 segons amb aigua Milli-Q; tinció amb plata durant 45 min amb AgNO₃ 2 g/l; revelat de 1 a 10 min amb Na₂CO₃ 60 g/l, Na₂S₂O₃ x 5 H₂O 4 mg/l; aturada de la reacció durant 5 min amb Tris 50 g/l, Acètic 2.5%.

L'anàlisi de les imatges dels gels es feu amb el programa "ImageMaster 2D Elite v4.01" (Amersham Biosciences), i l'anàlisi de les dades amb el "ImageMaster 2D Database" (Amersham Biosciences). Es compararen els gels corresponents a les diferents condicions d'assaig, i se seleccionaren com a diferencials els punts que presentaven com a mínim un volum 1.5 cops major o menor respecte el que s'observava en el gel control.

Espectrometria de masses.

Amb els punts retallats dels gels bidimensionals es feu una digestió en gel amb Tripsina 40 ng/ μ l durant 14 h. S'extreieren els pèptids de digestió amb Acetonitril 50%, Àcid trifluoroacètic 0.25% i s'analitzaren per espectrometria de masses MALDI-TOF (Voyager-DETMPRO; PerSeptive Biosystems), utilitzant una matriu de CHCA (àcid α -ciano-4-hidroxicinnàmic). Les masses obtingudes s'analitzaren amb l'aplicació MS-Fit de Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) sobre la base de dades SwissProt per a determinar la identitat de la proteïna. Aquesta identitat es confirmà, en els casos necessaris, per seqüenciació amb espectrometria de masses nano-ESI-IT MS/MS (LCQ; Finnigan).

Western Blot amb gels bidimensionals.

La primera dimensió es realitzà segons descrit anteriorment.

Per a la segona dimensió s'utilitzaren gels preparats ExcelGelTMXL (Amersham Biosciences), amb un gradient de 8 – 18 % d'acrilamida. L'equilibrat de la tira de primera dimensió es realitzà segons descrit anteriorment, i s'aplicaren 20 mA, 600 V, 30 W durant 30 min i 50 mA, 600 V, 30 W durant 1 h.

La transferència i immunodetecció es realitzaren segons s'ha descrit anteriorment. En aquest cas, la detecció d'Iba2 es realitzà amb l'anticòs #750 (Taula 4 – Apèndix 1).

Per a l'anàlisi de la intensitat de les bandes en el film s'utilitzà el programa "1D Image Analysis Software" (Kodak).

PCR semiquantitatiu.

Cèl·lules U373 MG es lisaren amb guanidina (Clontech), i s'obtingué el RNA total per extracció amb fenol/cloroform. Aquest RNA es tractà amb DNasa I (DNase-free™; Ambion®), seguint el protocol comercial. A partir d'1 µg de RNA s'obtingué cDNA segons indicacions del kit "SUPERSCRIPT™ II Rnase H⁺ Reverse Transcriptase" (Invitrogen™), amb un encebador Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (concentració final = 0.8 µM).

Alternativament, s'utilitzà una bateria de cDNAs de diferents teixits (Human multiple tissue cDNA, Clontech).

Amb aquests cDNAs es realitzaren les corresponents reaccions de PCR, amb les parelles d'encebadors corresponents a cada gen en estudi. Els encebadors utilitzats foren:

- Protein disulfide isomerase A6 precursor (P5):

Codificant: 5'-TCGGGGGACGGAGCGGAGGATACAGTT-3'

Complementari: 5'-GTCCACAGCCACCCCCACATTTTCTTTTTG-3'

- Proteasome subunit α type I (component C2):

Codificant: 5'-GAAAAGGGCGCAATCAGAGC-3'

Complementari: 5'-GCTGTGCCTTTCTCTGTGGTCTTTCTTC-3'

- Alpha-enolase/MBP-1:

Codificant: 5'-GGCGTTCAATGTCATCAATGGCGGTTCT-3'

Complementari: 5'-TTGGCGATCCTCTTTGGGTTGGTCACTGT-3'

- Iba2:

Codificant: 5'-CGGGCGAGCTCAGCAACAGGTTCC-3'

Complementari: 5'-GGGGCTGCTCTCGTTGGCTTTTCCTT-3'

- Dynactin p50 subunit:

Codificant: 5'-TTGCCAGGAATGAGCCAGATGTTTATGA-3'

Complementari: 5'-TTTCCCCCTGATCCCCCTTTGCTGTTCTT-3'

- 26s Protease regulatory subunit:

Codificant: 5'-CTCCAAAAGGGGTGCTGATGTATG-3'

Complementari: 5'-TAGGCGTAGTATTGTAGGTTGGCTTTCTT-3'

La localització dels encebadors dins la seqüència completa de cDNA es troba a l'apèndix 3.

En la mateixa barreja de reacció s'afegí una altra parella de primers, corresponents a la β -actina o al 18s rRNA, com a control intern, per a permetre la quantificació de les bandes. S'utilitzaren els reactius i les indicacions dels kits "QuantumRNA™ β -actin internal standards" o "QuantumRNA™ 18s internal standards" (Ambion®).

La reacció de PCR s'analitzà per electroforesi en gel d'agarosa i tinció amb Bromur d'Etidi. Per a la mesura de la intensitat de les bandes, s'utilitzà el programa "ImageMaster 1D Elite v3.01".

Desfosforilació de proteïnes.

250 μ g d'extracte total de cèl·lules U373 MG es barrejaren amb 10 μ l de tampó de desfosforilació 10x (Tris-HCl 0.5 M, EDTA 1 mM, pH 8.5) i 100 U de fosfatasa alcalina (Roche). El volum final s'ajustà a 200 μ l amb tampó RIPA sense detergents més PMSF i cocktail d'inhibidors de proteases i s'incubà 9 h a 37 °C. Després d'aquest temps, les mostres es tractaren de dues formes diferents: es concentraren utilitzant columnes Microcon® (Millipore) amb un límit d'exclusió de 3000 Da, seguint les indicacions del producte i s'analitzaren per Western Blot. Alternativament es canvià el tampó de reacció per tampó de lisi de 2D, utilitzant les mateixes columnes (es realitzaren tres filtracions completes per a aconseguir el canvi de tampó);

posteriorment la mostra se separà per electroforesi bidimensional i es transferí a una membrana de PVDF, com s'ha descrit anteriorment, per tal de fer la detecció amb els anticossos corresponents.

Clonatge, expressió i purificació d'*lba2*.

A partir de cDNA de cèl·lules U373 MG s'amplificà per PCR la seqüència corresponent a la regió codificant d'*lba2*, afegint en els extrems les seqüències de restricció corresponents als enzims NheI i NotI. Els encebadors utilitzats foren:

Codificant: 5'-GCGCATA(*NheI*)GCTAGC(*NheI*)ATGTCGGGCGAGCTCAGCAA
CAGGTTG

Complementari: 5'-GCGCATAG(*NotI*)CGGCCGC(*NotI*)CATATGCGCACCGGG
TCCTCAGGGCAGGCTAGCAATGTC

El producte de PCR corresponent es retallà d'un gel d'agarosa, es purificà amb el kit "Wizard® SV Gel and PCR clean-up system" (Promega) i es lligà al vector pCR®II (Invitrogen™). Amb aquesta construcció es transformaren per xoc tèrmic cèl·lules *E. coli* DH5α competents (Library efficiency® DH5α™ Competent cells; Invitrogen™) i se seleccionà i expandí una colònia positiva, que es feu servir per a purificar quantitats més grans del vector. Per seqüenciació es comprovà la validesa de la construcció.

Aquesta es digerí amb els enzims NheI i NotI (Promega), i el fragment resultant es lligà en el vector pET28b (Novagen), que prèviament s'havia digerit amb els mateixos enzims (aquesta construcció afegeix una prolongació de 6 histidines en l'extrem C-terminal de la proteïna, que permet la seva posterior purificació). La construcció s'amplificà per transformació de cèl·lules DH5α competents, i a partir d'una colònia positiva es purificaren quantitats més grans del vector. Per seqüenciació es comprovà la validesa de la construcció.

Aquesta s'utilitzà per a transformar cèl·lules *E. coli* BL21 competents (BL21-Codon Plus[®](DE3) Competent cells ; Stratagene). Una colònia positiva s'utilitzà per a expressar la proteïna.

Les cèl·lules es feren créixer en medi LB suplementat amb kanamicina 50 µg/ml (SIGMA[®]), i al arribar a una densitat òptica de 0.4 – 1 a 580 nm, s'afegí IPTG (Promega) fins a una concentració final d'1 mM. A les 3 h es recollí el pellet per centrifugació i es resuspengué en tampó fosfat (Na₂HPO₄·2H₂O 10 mM, NaH₂PO₄·H₂O 10 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.4) amb imidazol 100 mM (Merck). S'obtingué la fracció citoplasmàtica soluble de l'extracte, per lisi cel·lular amb lisozim 100 µg/ml, sonicació i centrifugació, i es feu passar per una columna carregada amb ions Ni²⁺ (HisTrap[™]; Amersham Biosciences), on la proteïna quedà retinuda. La proteïna s'eluí amb tampó fosfat més imidazol 300 mM. La puresa de la proteïna es comprovà per tinció amb Coomassie Blue, i la seva identitat es comprovà per espectrometria de masses MALDI-TOF i per Western Blot utilitzant un anticòs dirigit contra el fragment C-terminal de 6 histidines.

Per eliminar aquesta prolongació d'histidines, la proteïna es digerí durant 8 h a T^a ambient amb 0.005 U/µl de trombina (Thrombin, Restriction Grade; Novagen), i es tornà a passar per una columna carregada amb Ni²⁺, on aquest cop només quedaren retinguts els fragments d'histidina; la proteïna es recuperà de la fracció no retinuda.

Per a concentrar la proteïna i realitzar els canvis de tampó necessaris es feren servir columnes Centriplus[®] (Millipore) amb un límit d'exclusió de 10 kDa, seguint les indicacions del producte.

Obtenció d'un anticòs policlonal de conill anti-Iba2.

Conills femella New Zealand White s'immunitzaren amb 300 µg de proteïna en 1 ml d'Adjuvant Complet de Freund (proporció 1:1). Els dies 21, 42 i 63 de l'assaig s'injectaren records de 150 µg de proteïna en 1 ml d'Adjuvant Incomplet de Freund (proporció 1:1). El dia 73 es feu un sagnat de test, i s'avaluà per ELISA la presència

d'anticòs en el serum. Dues setmanes després s'exsanguinà l'animal i s'obtingué el serum. S'avaluà per ELISA el títol de l'anticòs.

Obtenció d'un anticòs policlonal de ratolí anti-Iba2.

Ratolins femella Balb/c s'immunitzaren amb 500 µg de proteïna associada a l'Adjuvant Complet de Freund (proporció 1:9 antigen:adjuvant). Els dies 14, 21, 28 i 35 s'injectaren records de proteïna diluïda en Adjuvant Incomplet de Freund. S'extragueren ascites 3 i 7 dies després de la tercera inoculació i al finalitzar l'experiment. S'avaluà per ELISA el títol de l'anticòs en el serum.

Clonatge d'Iba2 i expressió en cèl·lules de mamífer.

El clonatge de la seqüència corresponent a la regió codificant d'*Iba2* en pCR[®]II es realitzà segons descrit anteriorment. Els encebadors utilitzats foren:

Codificant: 5'-CT(*Xho*)CTCGAG(*Xho*)ATGTCGGGCGAGCTCAGC

Complementari: 5'-G(*Xho*)CTCGAG(*Xho*)AGTCAGGGCAGGCTAGCAATGTC

La construcció resultant es digerí amb l'enzim *Xho*I (Promega), i el fragment alliberat es lligà en el vector pcDNA-3-HA (InvitrogenTM), que prèviament s'havia digerit amb el mateix enzim (aquest vector afegeix una prolongació de 3 Hemaglutinines en la regió N-terminal de la proteïna). La construcció s'amplificà per transformació de cèl·lules DH5 α competents, i a partir d'una colònia positiva es purificaren quantitats més grans del vector. Per seqüenciació es comprovà la validesa de la construcció, que s'anomenà pcDNA-HA-Iba2.

Per a la transfecció de cèl·lules de mamífer s'utilitzaren dos procediments diferents:

- Cèl·lules U373 MG o M21 creixent al 90-95% de confluència es transfectaren amb LipofectamineTM2000 (InvitrogenTM), segons les indicacions del full tècnic. La relació DNA(µg):LipofectamineTM2000(µl) utilitzada fou de 1:1, i la quantitat total de

DNA fou de 30 µg per cada $1.5 \cdot 10^6$ cèl·lules. A les 24 h de la transfecció s'utilitzaren les cèl·lules per a l'assaig corresponent.

- Transfecció per electroporació: $2 \cdot 10^6$ cèl·lules U373 MG o HUVEC resuspeses en RPMI 1640 amb GlutamaxTM I + FCS 10% es barrejaren amb 30 µg o 20 µg de DNA respectivament, i se'ls aplicà una descàrrega de 960 µF, 72 Ω, 250 V o 1200 µF, 72 Ω, 200 V, respectivament. Se sembraren en plaques de 10 cm (TPP[®]), amb el medi adient per a cada línia cel·lular. 48 h després de la transfecció s'utilitzaren les cèl·lules per a l'assaig corresponent.

La sobreexpressió de la proteïna es comprovà per Western Blot utilitzant un anticòs contra Hemaglutinina o contra Iba2.

Immunohistoquímica.

Cèl·lules U373 MG se sembraren en un portaobjectes de 8 pous (Lab-Tek[®] II Chamber SlideTM System; Nalge Nunc International) (30.000 cèl·lules per pou), i a les 24 h es transfectaren amb pcDNA-HA o pcDNA-HA-Iba2. 24 hores després es feu el tractament hipòxic corresponent en cada cas i es començà la immunodetecció: les cèl·lules es rentaren amb PBS, glicina 20 mM i es fixaren 10 - 20 min a T^a ambient amb paraformaldehid 3% en tampó fosfat 0.1 M, sacarosa 60 mM. Després de rentar, es permeabilitzaren 7 - 10 min a T^a ambient amb saponina 0.05% en PBS, glicina 20 mM. Després de rentar es feu un bloqueig de 20 min a T^a ambient amb PBS, glicina 20 mM, BSA 1.8% i saponina 0.025%, i es començà la incubació amb l'anticòs primari (ratolí anti-HA; Covance; dilució 1:200) i/o amb Phalloidin-TRITC 0.25 µg/ml (SIGMA[®]) diluïts en solució de bloqueig, durant 45 min - 1 h a 37 °C en cambra humida. Després de rentar s'incubà amb l'anticòs secundari diluït en solució de bloqueig (anti-ratolí conjugat a AlexaFluor-488; Molecular Probes; dilució 1:300) durant 45 min - 1 h a 37 °C en cambra humida. Després de rentar amb PBS es deixà assecat 1 h a T^a ambient (protegit de la llum). Llavors s'afegí sobre cada pou una solució de Mowiol[®] 4-88 (Calbiochem[®]) amb Hoechst 33258 1 µg/ml (SIGMA[®]), es posà un cubreobjectes i es

conservà a 4 °C unes hores abans d'obtenir les imatges per microscopia confocal (Olympus Fluoview 500).

Proliferació.

La proliferació de cèl·lules U373 MG es determinà per incorporació de Bromodeoxiuridina (BrdU), segons les indicacions del kit "Cell proliferation ELISA Biotrak™ System, version 2" (Amersham Biosciences). Els resultats es normalitzaren respecte la quantitat total de proteïna, determinada segons el "BCA™ Protein Assay Kit" (Pierce).

Viabilitat.

Cèl·lules U373 MG s'incubaren 4 h en presència d'MTT 0.3 mg/ml (Merck). Després d'aquest temps s'afegí tampó d'extracció (SDS 200 g/l en N,N-dimetilformamida 50%) fins a una concentració final de 100 g/l, i s'incubà a 37 °C durant aproximadament 16 h. Després d'aquest temps es llegí l'absorbància a 550 i 630 nm. Els resultats es normalitzaren respecte la quantitat total de proteïna, determinada segons el "BCA™ Protein Assay Kit".

Migració.

S'utilitzà un sistema FluoroBlok™ Multiwell (BD Falcon™) de 24 pous amb membrana opaca de 8 µm, aplicant un recobriment de col·làgena 15 µg/µl.

Es comparà la migració observada en normòxia i en hipòxia.

- *Cèl·lules U373 MG.* Se sembraren 50.000 cèl·lules per pou, i en la cavitat inferior s'afegí el medi corresponent a cada condició d'assaig: RPMI 1640 amb Glutamax™; RPMI 1640 amb Glutamax™ + FCS 10%; RPMI 1640 amb Glutamax™ + HGF 20 ng/ml (R&D Systems). Per a les cèl·lules que s'havien d'incubar en hipòxia, aquests medis s'equilibraren prèviament durant 3 h 30 min al 2% d'O₂. Es deixaren

migrar les cèl·lules durant 4 h (en hipòxia o normòxia), i per incubació amb Calceïna-AM 5 µM (Calbiochem®) es detectaren les cèl·lules viables que havien travessat la membrana del pou de cultiu. A partir de les imatges obtingudes es feu un comptatge de les cèl·lules migrades.

- *Cèl·lules HUVEC*. Se sembraren 50.000 cèl·lules per pou, i es deixaren en deprivació durant 2 h. Després d'aquest temps, en la cavitat inferior de cada pou s'afegí el medi corresponent a cada condició d'assaig: EBM®; EBM® + suplement; EBM® + VEGF 10 ng/ml (R&D Systems); EBM® + HGF 20 ng/ml; EBM® + MCSF 50 ng/ml (Chemicon® International). Es deixaren migrar les cèl·lules durant 24 h, i es feu la detecció i comptatge com s'ha descrit anteriorment.

Adhesió.

Plaques de 96 de fons plà (Costar®; Corning Incorporated) es recobriren amb diferents components de la matriu extracel·lular, fent dilucions seriades ½ en PBS. Les matrius i les seves concentracions inicials utilitzades foren:

- Vitronectina: 20 µg/ml
- Fibrinogen (SIGMA®): 100 µg/ml
- Fibronectina (SIGMA®): 100 µg/ml
- Col·làgena (Vitrogen®): 100 µg/ml

S'incubà tota la nit a 4 °C, es buidà l'excés, i es rentà un cop amb PBS. Es bloquejà durant 1 h a 37 °C amb PBS + BSA 1%. Durant aquest temps, les cèl·lules a assajar s'incubaren en normòxia o en hipòxia. Posteriorment es sembraren 30.000 cèl·lules U373 MG resuspeses en 50 µl d'RPMI 1640 amb Glutamax™I amb BSA a l'1% i s'incubaren 1 hora a 37 °C en un incubador humidificat al 5% CO₂ / 95% aire per a condicions de normòxia i 2% O₂ per a condicions d'hipòxia. Després d'aquest temps es buidà la placa amb molta suavitat i es feren dos rentats amb PBS, per immersió. S'afegiren 50 µl de Paraformaldehid al 4% i s'incubà 20 min a T^a ambient. Es buidà i es rentà dos cops amb aigua, per immersió, i s'afegiren 50 µl de Cristall violeta al

0.1%. S'incubà 20 min a T^a ambient, es buidà i es rentà 3 cops amb aigua, per immersió. Es deixà assecar tota la nit a 37 °C, s'afegiren 50 µl d'HCl 0.1 M i es llegí immediatament l'absorbància a 630 nm.

Desenvolupament de cèl·lules de mamífer transfectades establement.

Cèl·lules U373 MG i M21 es transfectaren amb pcDNA-HA i pcDNA-HA-Iba2 segons descrit anteriorment. El medi de cultiu es suplementà amb Neomicina/Geneticina (G418 sulfate; Calbiochem[®]) per a seleccionar les cèl·lules transfectades. Es començà amb una concentració de 0.5 g/l, i quan les cèl·lules s'estabilitzaren, s'augmentà la concentració a 1 g/l. Per dilució màxima, se sembraren les cèl·lules en placa de 96 pous (Costar[®]; Corning Incorporated) a raó de 0.1 cèl·lula per pou, per a assegurar la presència d'un clon únic en cada pou on es veiés creixement cel·lular. Els clons s'expandiren i es congelaren, i per Western Blot es comprovà si mantenien la sobreexpressió de la proteïna.

Immunoprecipitació.

Entre 500 µg i 1 mg d'extracte proteic total es barrejaren amb 8 µg d'anticòs primari anti-HA (Covance) i s'incubaren 2 h a 4 °C en rotació. S'afegiren 20 µl de Proteïna A/G unida a agarosa (Santa Cruz Biotechnology) i s'incubà 3 h a 4 °C en rotació. Es centrifugà 30 s a 2500 rpm i 4 °C, i després d'eliminar el sobrenadant es realitzaren 4 rentats amb tampó RIPA més PMSF i Cocktail d'inhibidors de proteases. Després del darrer rentat s'eliminà tot el sobrenadant i es resuspengué el pellet amb 20 µl de tampó de càrrega d'electroforesi (SDS-PAGE) 2x. S'incubà la barreja 10 min a 37 °C, es centrifugà 30 s a 2500 rpm i es carregà tot el sobrenadant en un gel d'acrilamida al 15% per a separar les mostres electroforèticament. Posteriorment, el gel electroforètic es tenyí amb plata per a l'estudi de les bandes precipitades, o es

transferí a membrana per a fer la detecció immunològica contra Iba2, Rhoa, Rac1 i Cdc42 (Taula 4 – Apèndix 2).

RNA d'interferència.

La seqüència de mRNA d'Iba2 s'introduí en el software de predicció de siRNAs de "Bioinformatics & Research Computing" (<http://jura.wi.mit.edu>), i s'obtingueren un conjunt de polinucleòtids amb elevada probabilitat de provocar la interferència per RNA. Un cop es comprovà que les seqüències no tenien homologia amb cap altre gen, se sintetitzaren 6 d'aquests siRNAs amb el *Silencer*TM siRNA construction kit (Ambion[®]), i es transfectaren cèl·lules U373 MG amb 2.8 µg (200 pmol) de cada un (150000 cèl·lules per pou en una placa de 6 pous). Per a la transfecció s'utilitzà el medi jetSITM (Polyplus transfection), en una proporció de 3 µl per µg de siRNA, seguint el protocol comercial. 48 h després de la transfecció es comprovaren els nivells de mRNA d'Iba2 per RT-PCR, i els nivells de proteïna per Western Blot. La seqüència que major disminució de la quantitat de proteïna mostrà fou la dirigida contra una regió de la zona 3'-UTR del mRNA, amb seqüència 5'-aatgtctttgtaaagcacaatt-3' (corresponent al cDNA). Es sintetitzà també un siRNA amb la mateixa seqüència desordenada (5'-aacttagcagtgacatttaaattcctgtctc-3'), com a control negatiu, que no mostrà desaparició d'Iba2 a nivell de mRNA ni de proteïna.

Unió a calci.

Mitjançant electroforesi d'acrilamida al 15% (SDS-PAGE) se separaren les següents mostres proteiques:

- Calmodulina de cervell boví (SIGMA[®]). 5 µg. Control positiu.
- Avidina. 20 µg. Control negatiu.
- Iba2, proteïna recombinant expressada en E. coli. 30 µg.

La separació es transferí a una membrana de PVDF, i es rentà dos cops amb Imidazol-HCl 10 mM, pH 6.8, KCl 60 mM, MgCl₂ 5 mM, 5 min cada vegada. S'incubà amb ⁴⁵CaCl₂ 2 µCi/ml (Amersham Biosciences) diluït en el tampó anterior, 16 h a T^a ambient, i es rentà 2 cops amb etanol 50% (30 s per rentat). S'exposà 8 h a una pantalla "Storage Phosphor Screen" (Amersham Biosciences) i s'obtingué la imatge amb un escàner Typhoon 8600 (Amersham Biosciences).

ELISA

Sobre una placa de 96 pous de fons còncav (Nunc™) es realitzà un recobriment amb l'anticòs de conill anti-Iba2 (10 µg/ml) durant 16 h a 4 °C. Es feu un rentat amb PBS + Tween 20 0.1%. Es bloquejà durant 1 h a T^a ambient amb PBS + BSA 3%, es rentà amb PBS + Tween 20 0.1%, i s'afegiren 50 µl de la mostra corresponent a cada pou. Per al blanc s'afegiren 50 µl del tampó de dilució de la mostra. S'incubà 6 h a T^a ambient, es feren 5 rentats amb PBS + Tween 20 0.1% i s'afegí una dilució 1:500 de l'anticòs #750 de ratolí anti-Iba2 en PBS + BSA 1%. S'incubà 16 h a 4 °C, es rentà 5 cops amb PBS + Tween 20 0.1% i s'afegí una dilució 1:1000 d'un anticòs anti-ratolí conjugat a fosfatasa alcalina (DakoCytomation). S'incubà 1 h a T^a ambient, es feren 5 rentats amb PBS + Tween 20 0.1% i s'afegí 1 mg/ml de 4-nitrofenil fosfat (Calbiochem®) en tampó dietanolamina (dietanolamina 10 mM, MgCl₂ 0.5 mM, azida sòdica 0.02%, pH 9.8). S'incubà 48 h a T^a ambient i es feu una lectura de l'absorbància a 405 nm.

Creixement tumoral *in vivo*

4·10⁶ de cèl·lules U373 MG en un volum de 100 µl de HBSS (wild-type i transfectades amb pcDNA-HA o pcDNA-HA-Iba2) s'injectaren subcutàniament en ratolins femella de la soca Hsd:Athymic Nude (Harlan Interfarma Iberica S.L.), amb 10 animals per grup. Totes les cèl·lules tenien una viabilitat superior al 90%. Es permeté

el desenvolupament dels tumors, i dos cops per setmana es mesurà el volum d'aquests, segons la fórmula $D \cdot d^2/2$, on D és el diàmetre major i d el diàmetre menor del tumor. Es comparà el creixement tumoral en funció del temps dels tres grups d'animals.

$1 \cdot 10^6$ de cèl·lules M21 en un volum de 100 μ l de HBSS (wild-type i transfectades amb pcDNA-HA o pcDNA-HA-Iba2) es punxaren subcutàniament en ratolins femella de la soca Hsd:Athymic Nude (Harlan Interfarma Iberica S.L.), amb 10 animals per grup. Totes les cèl·lules tenien una viabilitat superior al 90%. Es permeté el desenvolupament dels tumors, i dos cops per setmana es mesurà el volum d'aquests, segons la fórmula $D \cdot d^2/2$, on D és el diàmetre major i d el diàmetre menor del tumor. Es comparà el creixement tumoral en funció del temps dels tres grups d'animals.

Al final de l'experiment se sacrificaren els animals i s'extragué 1 ml de sang, amb agulles heparinitzades per a evitar la coagulació; es centrifugà 10 min a 3000 rpm per a obtenir el serum, i es congelà a -20 °C fins a l'anàlisi per ELISA de la presència d'Iba2. Els tumors de cada animal s'extragueren i es pesaren. Una fracció es congelà a -80 °C per a analitzar posteriorment la presència d'Iba2 per Western Blot. L'altra fracció s'inclogué en O.C.T.TM Compound (Polivinil alcohol <11%, Carbowax <5%) (Tissue-Tek[®]) i es congelà a -80 °C per al seu posterior anàlisi histològic.

Tractament estadístic de les dades.

Per a l'anàlisi estadística de les dades s'utilitzà en tots els casos el programa "GraphPad Prism v3.00" (GraphPad Software, Inc). S'aplicà la t de student, amb un test aparellat de 2 cues i un interval de confiança del 95%.

