

## **4. RESULTATS.**

### ***4.1. Establiment del model***

L'estabilització d'HIF-1 $\alpha$  provocada per una disminució en la concentració d'oxigen és un fenomen generalitzat en cèl·lules de mamífer i, per tant, el seguiment de la quantitat d'aquesta proteïna és un bon control de l'establiment de la resposta a l'estrés hipòxic.

Per a l'elecció d'una línia cel·lular de treball s'analitzà la inducció d'HIF-1 $\alpha$  després d'una incubació amb CoCl<sub>2</sub> (com a mimètic d'hipòxia) de diverses línies cel·lulars (U373 MG, glioblastoma; HT29, càncer de colon; M21, melanoma; SW1116, càncer colorectal; HUVEC, endotelial venosa), comparant extractes proteics de cultius mantinguts en condicions normals (Control) amb extractes de cèl·lules incubades amb CoCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M durant 4 h.

La línia U373 MG mostrà una marcada sobreexpressió de la proteïna en resposta a cobalt (Figura 18 – Apèndix 2), amb nivells més elevats que les altres línies testades (no es mostren els resultats). S'observà també la presència de la proteïna en el control (normòxia), encara que en poca quantitat; una possible explicació per a això és el fet que la línia és mutant per a PTEN [376]. Com s'explica en el capítol 1.4.4.3., mutacions en aquest gen provoquen l'estabilització d'HIF-1 $\alpha$  independentment de l'estat d'oxigenació. Aquest nivell basal, però, és baix, i permet veure clarament la inducció de la proteïna provocada pel cobalt.

Per tant, la línia U373 MG es determinà vàlida com a model cel·lular de resposta a hipòxia, ja que presenta un marcat augment de la proteïna HIF-1 $\alpha$  després d'una incubació amb el mimètic CoCl<sub>2</sub>.

Un cop seleccionada la línia cel·lular, es comprovà l'estimulació per hipòxia (amb un incubador al 2% d'O<sub>2</sub>), fent assajos també a 4 h. S'observà que pre-equilibrant el medi de cultiu en hipòxia abans de posar-lo en contacte amb les cèl·lules,

la inducció d'HIF-1 $\alpha$  era més marcada que sense equilibrat (Figura 19 – Apèndix 2). Això és degut a que amb el medi equilibrat les cèl·lules pateixen la privació d'oxigen des del moment en que hi entren en contacte; en canvi, amb un medi sense equilibrar es depèn de la velocitat de difusió dels gasos per a aconseguir la substitució total de l'oxigen pel nitrogen [375]. Com que els assajos es volien fer posteriorment a temps curts, es decidí aplicar sempre el pre-equilibrat del medi, per a aconseguir exposicions hipòxiques d'exactament el temps desitjat.

Com es veu a la figura 19 (Apèndix 2), la inducció d'HIF-1 $\alpha$  per cobalt és major que per hipòxia, per a una mateixa durada de l'estrés. Això mostra que les rutes de senyalització de tots dos estímuls són diferents, com s'explica en el capítol 1.4.4.1.

Un cop comprovada l'expressió d'HIF-1 $\alpha$  en resposta a hipòxia es començaren a provar exposicions a temps més curts (15 min, 30 min, 1 h, 2 h i 3 h). L'anàlisi per Western Blot mostrà que ja als 15 min hi havia una estabilització d'HIF-1 $\alpha$ , i que a partir d'1 o 2 h apareixia la banda corresponent a la forma fosforil·lada de la proteïna (la forma activa transcripcionalment) (Figura 20 – Apèndix 2). La presència d'aquesta modificació post-traducciona es comprovà per desfosforil·lació de les mostres amb fosfatasa alcalina (Figura 21 – Apèndix 2).

Segons aquests resultats podem dividir la resposta a hipòxia en dos blocs temporals: en els primers instants s'activen els mecanismes de senyalització que porten a l'estabilització d'HIF-1 $\alpha$ ; a temps més llargs d'estrés (aproximadament a partir de la primera o segona hora) es dona la seva activació transcripcional.

En base als resultats, es trià la inducció a 30 min per a estudiar els canvis proteics relacionats amb els primers moments de l'estrés hipòxic.

#### **4.2. Electroforesi bidimensional i identificació de proteïnes**

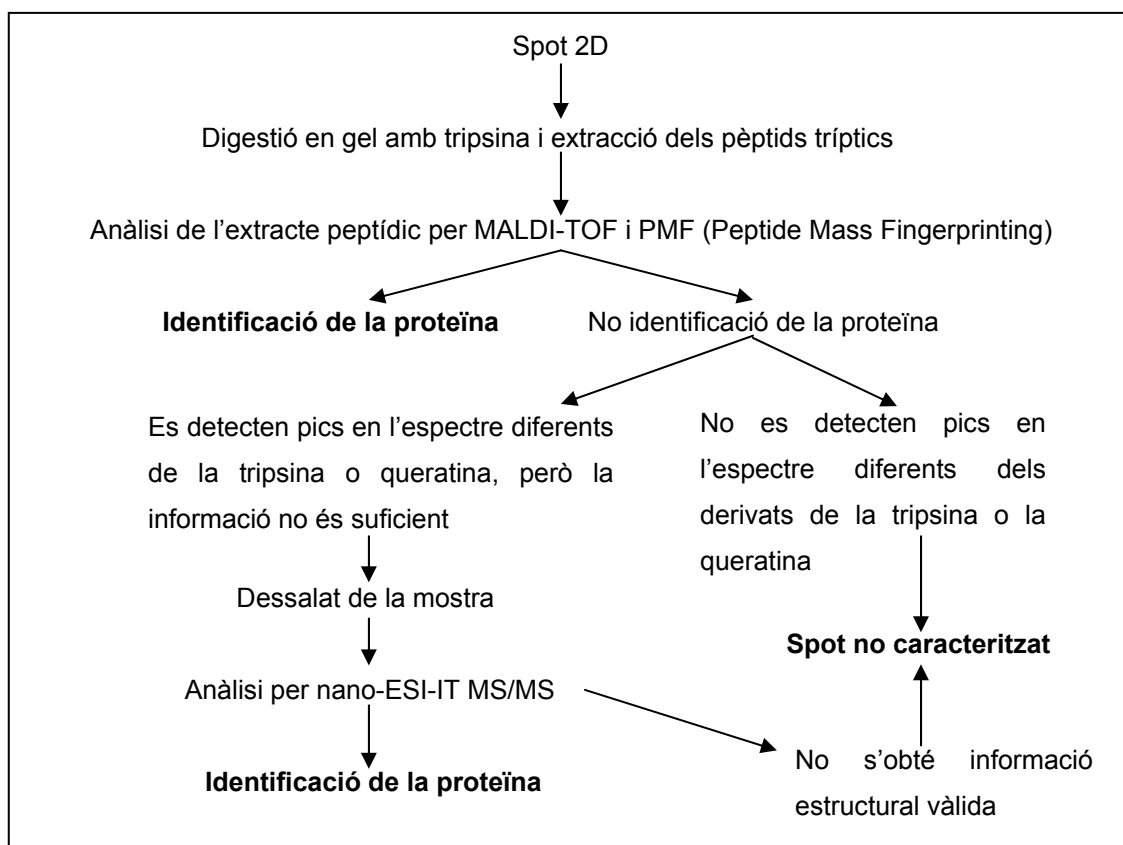
Es prepararen extractes totals de proteïna de cèl·lules control (normòxiques) i incubades 30 min en hipòxia (2% O<sub>2</sub>) per a la seva anàlisi mitjançant electroforesi bidimensional. Es feren 3 assajos independents (3 mostres control i 3 estimulacions), i un gel bidimensional de cadascun (6 gels en total).

S'escanejaren els gels, i les imatges s'analitzaren i es compararen considerant el promig dels 3 gels corresponents a cada condició (control i hipòxia). L'estudi es completà posteriorment considerant cada gel per separat.

Es compararen els volums dels spots de cada condició, i se seleccionaren 15 proteïnes (Figura 22 – Apèndix 2):

- aquelles que presentaven expressió augmentada en hipòxia (relació de volums hipòxia/normòxia major o igual a 1.5) o que només estaven presents en les mostres estimulades (Taula 6 – Apèndix 1).
- aquelles que mostraven menor expressió en hipòxia (relació de volums normòxia/hipòxia major o igual a 1.5) (Taula 7 – Apèndix 1).
- aquelles que presentaven variacions aparents de pI i que, per tant, possiblement, estaven patint una modificació post-traducciona (Taula 8 – Apèndix 1).
- també es retallaren 3 spots que no mostraven variació apreciable en la quantitat de proteïna, com a control (Taula 9 – Apèndix 1).

Els 15 spots s'analitzaren per espectrometria de masses MALDI-TOF; la confirmació de la identitat, en els casos necessaris, es feu per espectrometria de masses nano-ESI-IT MS/MS. Se seguí el següent esquema de treball:



La llista de proteïnes identificades es mostra a la taula 10 (Apèndix 1).

S'aconseguí identificar només el 50% dels spots. Aquest baix nombre es degué principalment a la baixa quantitat de proteïna present a la mostra.

L'spot 163, de 38 kDa i pI 5.9, s'identificà com a enolasa. Aquest enzim, però, té un pes molecular de 47 kDa i un pI de 7.01, el que feu suposar que la caracterització era errònia. Tot i això, la identificació era pràcticament inequívoca, per haver estat realitzada amb nano-ESI. Una revisió bibliogràfica [377] permeté constatar que el gen de l'enolasa té un lloc alternatiu d'iniciació (Met93 o Met96 enlloc de la Met1) que produeix una proteïna, MBP-1 (c-myc promoter binding protein), de 37-38 kDa i pI 5.9. Aquesta proteïna és igual a l'enolasa excepte en la seva part N-terminal, que es troba eliminada; totes dues proteïnes (enolasa i MBP-1) són producte del mateix gen, i, de fet, tenen el mateix nombre d'entrada a Swiss-prot. Per tant, es concloué que l'spot identificat en el gel bidimensional corresponia a MBP-1.

En el moment de fer la identificació, la proteïna corresponent als spots 359 i 441 no es trobava inclosa a la base de dades Swiss-prot; el número d'accés corresponia a Genepept. Es va determinar una homologia amb la proteïna de ratolí "ionized calcium binding adapter molecule 2", amb nº genpept 12082067. Posteriorment la seqüència de ratolí aparegué a Swiss-prot, amb número Q9EQX4 i identificada com a Iba2 (Ionized Calcium Binding Adapter Molecule 2); l'homòloga humana, tot i que no es descrigué com a Iba2, sinó com a proteïna hipotètica, també obtingué un número d'identificació, Q9H9G0. Per altra banda es confirmà que tots dos spots, retallats de gels diferents, corresponien a la mateixa proteïna, i que probablement es tractava d'una modificació post-traducciona.

Els spots 98 i 100 corresponen a la mateixa proteïna, probablement a formes diferentment fosforilades.

En l'apèndix 3 es detallen les dades de Swiss-prot per a cada proteïna identificada, així com les seves seqüències proteiques i de DNA.

#### **4.3. Validació dels resultats**

Es comprovà, per Western Blot (en el cas de disposar d'un anticòs), si la selecció de les proteïnes per l'aproximació d'electroforesi bidimensional era vàlida. Es prepararen extractes proteics de cèl·lules control (normòxiques) i cèl·lules tractades 30 min en hipòxia, així com extractes de 4 h i 24 h d'hipòxia, per a completar la informació. Es decidí fer la immunodetecció sobre separacions bidimensionals, per a localitzar i quantificar únicament l'spot d'interés, i evitar així la contribució d'unions inespecífiques de l'anticòs a la intensitat mesurada; de fet, es constatà que, en molts casos, a l'alçada d'un mateix pes molecular els anticossos detectaven spots addicionals al d'interés (Figura 23 – Apèndix 2); això hagués quedat emmascarat en un gel monodimensional, i hagués portat a la quantificació de tot el conjunt d'intensitats, no només a la corresponent a l'spot a estudiar. Així mateix, es realitzà

una anàlisi de l'expressió de mRNA mitjançant PCR semiquantitativa. Tot i que l'aproximació experimental seguida es basava en estudis proteics, es va pensar en completar les dades, i més tenint en compte que no es disposava d'anticòs per a totes les proteïnes a estudiar.

Tot seguit es comenten els resultats de la validació de cada proteïna candidata.

#### Protein disulfide isomerase A6 precursor (P5) (Figura 24 – Apèndix 2).

La sobreexpressió de la proteïna als 30 min de tractament en hipòxia no es confirmà, i tampoc s'observà en la resta de temps assajats (la variació aparent que hi ha a les 4h no és estadísticament significativa). L'expressió de mRNA mostrà augments significatius fins a 1 h d'hipòxia (la dispersió de les dades de la mostra dels 30 min resta significància); posteriorment s'observà un retorn a nivells basals de mRNA.

#### Proteasome subunit $\alpha$ type I (Component C2) (Figura 25 – Apèndix 2).

Tot i que per observació de les imatges del Western Blot la variació en la quantitat de proteïna a mesura que augmentava el temps d'hipòxia era evident, l'estadística no donà significància, encara que fou molt propera. Les variacions en l'expressió de mRNA tampoc foren significatives.

#### $\alpha$ -enolase / MBP-1 (Figura 26 – Apèndix 2).

L'anticòs anti-enolasa utilitzat reconegué les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  de l'enzim, però no la variant MBP-1 (no es mostren els resultats), tot i estar generat contra la part C-terminal de la proteïna, que és la que comparteixen totes. Per tant, no es pogueren obtenir dades a nivell proteic. L'expressió a nivell de mRNA no presentà canvis significatius.

Iba2 (Figura 27 – Apèndix 2).

En el cas d'aquesta proteïna no es pretenia confirmar una variació en la seva quantitat en resposta a hipòxia, sinó un canvi de punt isoelèctric (pI). Extractes proteics de cèl·lules U373 MG incubades en normòxia o en hipòxia se separaren per electroforesi bidimensional i es transferiren a membrana. Amb un anticòs específic contra Iba2 es detectà l'spot de cada separació, i s'analitzà la seva posició. Aquesta es comparà també amb la d'extractes proteics normòxics sotmesos a desfosforilació per fosfatasa alcalina. Per a situar i comparar exactament la localització d'Iba2, s'agafaren tres punts de referència (corresponents a deteccions inespecífiques del propi anticòs anti-Iba2). En la figura 27 (Apèndix 2) s'aprecia com l'spot d'Iba2 de la mostra hipòxica es troba en la mateixa posició que el de la mostra desfosforilada, i desplaçat respecte el de la mostra normòxica; per tant, podem considerar que després d'una incubació en hipòxia la proteïna pateix una desfosforilació. En el control, a més, s'observen les dues formes de la proteïna, amb un lleuger predomini de la forma fosforilada. No s'apreciaren variacions significatives a nivell de mRNA.

Dynactin p50 subunit (Figura 28 – Apèndix 2).

Aquest spot, que es va retallar com a control, presentà sorprenentment variacions significatives en la quantitat de proteïna (un increment) a mesura que augmentà el temps d'exposició a hipòxia. Es considerà que la quantitat de mRNA no varia.

26s protease regulatory subunit (Figura 29 – Apèndix 2).

En aquest cas no es disposà d'anticòs per a l'anàlisi proteic. Les variacions en la quantitat de mRNA no foren significatives.

Per a completar l'estudi de les proteïnes seleccionades s'analitzà la seva presència en diferents línies cel·lulars per Western Blot (per als casos en què hi havia

un anticòs disponible). En la figura 30 (Apèndix 2) es mostren els resultats. Les proteïnes estan presents en totes les línies cel·lulars assajades, excepte Iba2, que presenta una expressió en general més baixa, pràcticament inexistent en molts casos.

S'estudià també l'expressió a nivell de mRNA en diferents teixits. En la figura 31 (Apèndix 2) es mostren els resultats. La majoria de gens té una expressió apreciable en gairebé tots els teixits, excepte Iba2, que s'expressa moderadament en gran part dels teixits (en molts casos és gairebé inexistent).

#### **4.4. Iba2**

Com que l'elecció d'Iba2 en el gel bidimensional no estava basada en variacions de la seva quantitat, sinó en una modificació del seu punt isoelèctric, es va considerar que era més fiable, ja que no era dependent de la qualitat de la tinció amb plata o de la detecció per Western Blot, i era directament observable. A més, el fet de ser una proteïna poc coneguda ampliava les possibilitats d'estudi. Per aquest motiu es decidí procedir a la seva caracterització i estudi funcional.

##### **4.4.1. Clonatge, expressió i purificació**

La seqüència codificant completa d'Iba2, comprovada per seqüenciació, s'insertà en un vector pET28b, i amb aquesta construcció es transformaren cèl·lules *E.Coli* BL21 competents, induïbles per IPTG, per a produir la proteïna recombinant. Aquest vector afegeix una prolongació de 6 histidines (His) a la part N-terminal de la proteïna original, el que facilita la seva detecció i purificació. Per a optimitzar-ne la producció, s'analitzà aquesta en funció del temps d'incubació de les cèl·lules. El seguiment es feu per Western Blot, detectant la prolongació d'histidines amb l'anticòs corresponent (Figura 32 – Apèndix 2). En base als resultats es decidí fer produccions de proteïna a 3 hores, ja que a temps més llargs la quantitat generada era la mateixa i es corria el risc de patir degradació.



Es comprovà, tot seguit, el compartiment cel·lular on s'acumulava la proteïna un cop produïda. S'obtingueren les fraccions corresponents al citoplasma i als cossos d'inclusió bacterians, i s'analitzaren per Western Blot (Figura 33 – Apèndix 2). Tot i que en els cossos d'inclusió es trobava proteïna acumulada en grans quantitats, es decidí descartar aquesta fracció, ja que la producció a citoplasma era igualment elevada, i en els cossos la proteïna podia estar desestructurada.

Amb els extractes citoplasmàtics es procedí a la separació d'His-Iba2 de la resta de proteïnes bacterianes. S'utilitzà una columna carregada amb ions níquel, ja que les histidines tenen propietats quelants i queden unides a aquest metall. Un cop es dona la unió i es renta la columna de la resta de compostos de l'extracte, es procedeix a l'elució de la proteïna. Tant el tampó de rentat com el d'elució contenen imidazol, que competeix per la unió a níquel. Variant la concentració d'imidazol (variant l'astringència), s'aconsegueix, inicialment, eliminar qualsevol unió inespecífica a la columna de manera que només queda unida la proteïna amb histidines, i posteriorment, eluir la proteïna d'interès. Per a determinar aquesta concentració es carregà una columna de níquel amb extractes citoplasmàtics contenint His-Iba2, utilitzant un tampó amb imidazol 10 mM. Gradualment s'anà augmentant l'astringència fins a 500 mM, i les fraccions eluides s'analitzaren per Western Blot (Figura 34 – Apèndix 2). La banda corresponent a His-Iba2 només s'observà a partir d'una concentració d'imidazol de 300 mM. Per tant, aquest es determinà com a tampó d'elució; per als rentats es decidí usar una concentració menor, però suficientment elevada per a assegurar una bona eliminació de les impureses i inespecificitats (100 mM).

Així, un cop determinats els paràmetres de l'expressió i la purificació, s'escalà el procés per a obtenir quantitats majors de la proteïna. En la figura 35 (Apèndix 2) es mostra el grau de puresa de la proteïna un cop finalitzat tot el procés.

Finalment, es procedí a eliminar la prolongació d'histidines. La unió d'aquesta prolongació a la proteïna té insertat un lloc de reconeixement per a la trombina, de

manera que s'utilitzà aquest enzim. Per a optimitzar la digestió, es testaren diferents concentracions de trombina i diferents temps d'incubació, i es determinà que les condicions òptimes eren de 0.005 U/ $\mu$ l durant 8h a T<sup>a</sup> ambient (s'intentà utilitzar la menor concentració possible de trombina, per a minimitzar la contaminació per aquest enzim en la mostra) (Figura 36 – Apèndix 2). Incubacions més llargues o amb concentracions majors de trombina provocaven una digestió excessiva de la proteïna. Per a separar la proteïna de les restes d'histidines i de qualsevol traça d'His-Iba2 no digerida, es tornà a fer servir una columna amb níquel immobilitzat. Aquest cop, però, Iba2 estava continguda en la fracció eluïda just després de carregar la columna, i les restes d'histidines i d'His-Iba2 quedaven retingudes a la columna (Figura 37 – Apèndix 2).

#### **4.4.2. Obtenció d'anticossos policlonals**

Un cop es disposà de la proteïna, s'immunitzaren ratolins i conills per a l'obtenció d'anticossos policlonals. L'anàlisi d'aquests mostrà diferents activitats i especificitats per a cadascun.

S'obtingueren 2 anticossos diferents de conill, #750 i #751. Es comprovà que el #750, tot i que reconeixia la proteïna recombinant purificada (Figura 38 – Apèndix 2), no reconeixia Iba2 en extractes proteics de cèl·lules de mamífer separats per electroforesi convencional. En canvi, sorprenentment, reconeixia clarament l'spot d'Iba2 en un gel bidimensional (Figura 39 – Apèndix 2).

L'anticòs policlonal de conill #751 s'havia d'utilitzar a una concentració molt elevada (dilució 1:50), i no donava bons resultats amb els Westerns bidimensionals. En canvi, la seva detecció d'Iba2 en extractes proteics totals separats per electroforesi convencional sí fou satisfactòria (Figura 40 – Apèndix 2).

L'anticòs policlonal de ratolí mostrà un comportament semblant al #751 de conill (reconeixement de la proteïna en gels monodimensionals però no en gels

bidimensionals), però amb menor intensitat; la seva inespecificitat, però, també fou menor (Figura 41 – Apèndix 2).

Per tant, es decidí utilitzar l'anticòs #750 per a la detecció d'Iba2 en Western Blots bidimensionals i el #751 per a Western Blots convencionals.

#### **4.4.3. Caracterització**

Un cop obtinguts els anticossos, es pogueren fer els Westerns de confirmació de la fosforilació d'Iba2 en hipòxia mostrats a l'apartat 4.3. (Figura 27A – Apèndix 2), així com l'anàlisi de l'expressió proteica d'Iba2 en diferents línies cel·lulars (Figura 30 – Apèndix 2). En general, l'expressió de la proteïna és molt baixa (quan no inexistent) en la majoria de línies. Només s'expressa clarament en glioblastoma (tan sols en una de les tres línies testades), carcinoma de pulmó, de colon, de pàncreas, de mama i en cèl·lules endotelials. Aquest patró d'expressió es troba en concordança amb l'anàlisi a nivell de mRNA realitzat en el mateix apartat (Figura 31 – Apèndix 2), on es mostra que l'expressió és generalment baixa en la majoria de teixits analitzats, excepte en cervell, múscul esquelètic, ronyó, cor i carcinoma de pulmó (coincident amb els resultats a nivell proteic).

Així mateix, s'analitzà l'expressió gènica d'*Iba2* en mostres tumorals humanes en comparació amb mostres de teixit normal mitjançant un xip de DNA invertit. En aquest xip es troben immobilitzades 50 barreges representatives de cDNAs de càncer colorectal amb la seva respectiva parella de teixit normal. La sonda amb la que es fa la hibridació correspon a una seqüència del gen a estudiar, en aquest cas el d'*Iba2*. En la figura 42 (Apèndix 2) s'esquematitza el funcionament d'aquest xip. S'obtingueren diferències significatives d'expressió d'*Iba2* entre les mostres tumorals i les normals, i es concloué que el gen se sobreexpressa en casos de càncer colorectal (Figura 43 – Apèndix 2).

#### 4.4.4. Estudis funcionals

Iba2 forma part de la família de proteïnes amb motius “EF hand” d’unió a calci, i es volgué comprovar que efectivament tenia la propietat d’unir l’ió. Amb assajos d’unió a calci radiactiu (“calcium blotting”), s’aconseguí demostrar que la proteïna recombinant purificada efectivament fixa l’ió (Figura 44 – Apèndix 2), tot i que molt feblement.

Per a completar els estudis funcionals es decidí clonar el gen *Iba2* en un vector addient per a l’expressió de la proteïna en cèl·lules de mamífer, pcDNA-HA, que afegeix una prolongació de tres hemaglutinines (HA) a la proteïna original que facilita la seva detecció immunològica. Per Western Blot es comprovà que, efectivament, la transfecció de cèl·lules amb aquesta construcció provocava la sobreexpressió de la proteïna, que en aquest cas tenia un pes molecular proper als 30 kDa, degut a l’addició dels grups HA. En la transfecció amb vector pcDNA-HA no s’observà la mateixa banda (Figura 41 – Apèndix 2).

S’ha descrit que Iba1, proteïna de la família d’Iba2, i que comparteix un 63% d’homologia amb aquesta, s’uneix als filaments d’actina durant els processos d’activació de la microglia [378], i es decidí comprovar si Iba2 compartia aquesta propietat. S’incubaren cèl·lules U373 MG transfectades amb pcDNA-HA-Iba2 a diferents temps d’hipòxia (1 h, 4 h i 24 h al 2% O<sub>2</sub>), es fixaren sobre portaobjectes, i es feu una detecció immunològica de la prolongació d’hemaglutinines, així com dels filaments d’actina (amb faloidina). Es feu també una incubació control en normòxia. S’observà una colocalització clara d’Iba2 amb actina en els “ruffles” cel·lulars (ondulacions de la membrana) que s’anà perdent a mesura que augmentava el temps d’incubació en hipòxia. Iba2 també es detectà perinuclearment, tot i que podria ser simplement un reflex de la síntesi proteica (Figura 45 – Apèndix 2).

També s'estudià si la proteïna era secretada a medi extracel·lular o si la seva funció estava limitada a nivell intracel·lular. Cèl·lules U373 MG i M21 transfectades amb pcDNA-HA-Iba2 (i els corresponents controls de transfecció), s'incubaren en normòxia (control) i a diferents temps d'hipòxia (30 min, 2 h, 4 h i 24 h al 2% O<sub>2</sub>). Es triaren aquestes dues línies per a comparar el comportament de cèl·lules que expressen la proteïna constitutivament (U373 MG) amb el de cèl·lules que en presenten una expressió gairebé nul·la (M21). Es recolliren alíquotes del medi de cultiu a cadascun dels temps, i s'analitzà per ELISA la presència d'Iba2 (Taula 16 – Apèndix 1). Amb cèl·lules U373 MG, la proteïna es detectà en el medi extracel·lular a les 24 h de l'exposició hipòxica, però no en el corresponent control normòxic; la quantitat secretada, però, no augmentà encara que les cèl·lules estiguessin sobreexpressant la proteïna per estar transfectades amb pcDNA-HA-Iba2. La línia M21, que normalment expressa quantitats molt baixes de la proteïna, no mostrà secreció en cap cas.

Considerant que el calci és un element regulador de la resposta a hipòxia, molts cops a través de la modulació d'HIF-1 [379], s'analitzà si la sobreexpressió d'Iba2 (que interacciona amb l'ió) tenia algun efecte sobre l'estabilització d'HIF-1 $\alpha$  en resposta a hipòxia. Cèl·lules U373 MG transfectades amb pcDNA-HA-Iba2 i els corresponents controls s'incubaren en hipòxia a diferents temps (30 min, 2 h i 4 h al 2% O<sub>2</sub>) i s'analitzà la quantitat de proteïna HIF-1 $\alpha$  present en els extractes cel·lulars totals; no s'observà ninguna diferència entre les cèl·lules que sobreexpressaven HA-Iba2 i les cèl·lules control, tot i que semblà que la presència dels vectors *per se* provocava una disminució de la quantitat total d'HIF-1 $\alpha$  expressada (Figura 46 – Apèndix 2).

També s'estudiaren els efectes de la sobreexpressió d'HA-Iba2 sobre la viabilitat i proliferació de cèl·lules U373 MG, comparant condicions de normòxia i

hipòxia. En les figures 47 i 48 (Apèndix 2) es mostren els resultats. En cap cas Iba2 exhibí una participació en aquests processos, ja que el comportament de les cèl·lules que sobreexpressaven HA-Iba2 fou el mateix que el de les cèl·lules control, i tampoc s'observaren diferències entre les incubacions en normòxia i hipòxia. A nivell general, però, la viabilitat de les cèl·lules hipòxiques semblà major que la de les normòxiques.

La sobreexpressió d'HA-Iba2 tampoc afectà l'adhesió de cèl·lules U373 MG a diferents matrius proteiques (vitronectina, fibrinogen, fibronectina i col·làgena) (Figura 49 – Apèndix 2). Les cèl·lules mostraren el mateix comportament amb independència dels nivells d'expressió d'HA-Iba2 i de les condicions d'oxigenació.

S'analitzà igualment la migració de cèl·lules U373 MG induïda per HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Figura 50 – Apèndix 2). Aquest és un factor amb propietats promigratòries demostrades, capaç d'exercir efectes sinèrgics amb la hipòxia, promovent la invasió tumoral [380]. La sobreexpressió d'HA-Iba2 no modificà la migració en cap cas, i tampoc s'observaren diferències entre normòxia i hipòxia. També s'analitzaren els efectes de MCSF (Macrophage-Colony-Stimulating Factor), factor essencial per a l'activació de la microglia, i promotor de la seva migració per senyalització a través d'Iba1. Aquest factor, però, ni tan sols provocà una migració a nivell basal de les cèl·lules (no es mostren els resultats).

La finalitat última de l'estudi era trobar una possible nova diana farmacològica, i per tant, tot i no haver determinat la funcionalitat d'Iba2, existia la possibilitat que la proteïna influís en la progressió tumoral mitjançant algun mecanisme desconegut. Per aquest motiu, es decidí transfectar establement cèl·lules U373 MG i M21 amb pcDNA-HA i pcDNA-HA-Iba2 per a realitzar un estudi de creixement tumoral *in vivo*. Un cop es comprovà que les cèl·lules mantenien l'expressió de la proteïna (Figura 51 – Apèndix 2) s'injectaren subcutàniament en ratolins femella atímics i s'estudià el creixement dels

tumors dels diferents grups d'animals. En les figures 52 i 53 (Apèndix 2) es troben representats gràficament el creixement tumoral en funció del temps per a cada línia cel·lular i el pes dels tumors al final de l'experiment, respectivament, i en la figura 54 (Apèndix 2) es mostra una imatge representativa de cada grup d'animals. Les cèl·lules U373 MG sobreexpressant HA-Iba2 mostraren un major creixement tumoral que els controls (que de fet no progressaren). En canvi, les cèl·lules M21 no mostraren diferències significatives entre grups. Al final de l'experiment, es comprovà per Western Blot que els tumors crescuts mantenien la sobreexpressió d'HA-Iba2, front a la manca d'expressió en els controls (Figura 55 – Apèndix 2).

