

## **5. DISCUSSIÓ**

### ***5.1. Valoració del mètode***

A part d'exhibir una marcada inducció d'HIF-1 $\alpha$  en resposta a l'estrés hipòxic (en comparació amb altres línies cel·lulars), i mostrar una clara diferenciació entre les etapes d'estabilització (a temps inicials) i transactivació de la proteïna (per fosforilació, a partir de la primera o segona hora), la línia cel·lular U373 MG (glioblastoma) es considerarà un model interessant de treball per les característiques intrínseques d'aquest tipus de tumors. Un 60% dels tumors cerebrals són gliomes, i d'aquests, els glioblastomes són els més comuns i malignes. La supervivència mitja dels afectats és de 3 mesos, que incrementa a només 1 any després d'un tractament adequat, únicament paliatiu, i que inclou cirurgia, radioteràpia i quimioteràpia. Els glioblastomes contenen un elevat nombre de mutacions, moltes d'elles en gens relacionats amb la via de senyalització per hipòxia: p53 i PTEN estan freqüentment inactivats, i Hdm2 sol mostrar sobreexpressió (fins a un 60% dels casos). Per aquest motiu es pot suposar que la resposta a hipòxia d'aquesta línia cel·lular ha de tenir lloc per vies molt específiques, possiblement alternatives a la d'altres tipus cel·lulars (tant tumorals com normals). A més, es pot suposar que la hipòxia és un fenomen freqüent en aquest tipus de tumors, donat que són altament hemorràgics. Els estudis amb aquesta línia, per tant, poden portar a la identificació de noves dianes farmacològiques amb major especificitat (en aquest cas sobre tumors cerebrals) i, en darrer terme, amb menys efectes secundaris.

La capacitat de resposta a hipòxia aporta generalment grans avantatges a la cèl·lula tumoral, promovent, entre altres, la resistència a apoptosi i una major capacitat de metastatització. Cada cop es coneixen més proteïnes implicades en aquesta via de senyalització, i de fet moltes d'elles ja són actualment dianes farmacològiques (HIF-1 $\alpha$  o hsp90, per exemple). Es pot hipotetitzar, però, que la interrupció de la resposta en

els moments inicials, abans de poder arribar a l'activació de proteïnes com HIF-1 pot ser igualment efectiva en el tractament antitumoral. És per aquest motiu que aquest treball se centrà en l'estudi de la senyalització en els primers instants de l'estrés hipòxic (30 min), on ja s'observa una certa estabilització d'HIF-1 $\alpha$ , però encara no s'ha donat la seva transactivació. Es decidí fer una anàlisi a nivell proteòmic, mitjançant la tècnica d'electroforesi bidimensional lligada a espectrometria de masses, de les possibles diferències d'expressió o modificacions post-traduccionals provocades per l'exposició a hipòxia (2% d'O<sub>2</sub>) de cèl·lules de glioblastoma (U373 MG). 12 proteïnes mostraren variacions, bé de concentració o bé de pI, després de 30 min d'exposició a l'estrés; addicionalment se'n seleccionaren 3, sense canvis aparents, com a control de la tècnica. Els 15 spots es retallaren d'un gel bidimensional i s'analitzaren per espectrometria de masses MALDI-TOF i nano-ESI-IT.

D'aquests 15 spots se n'aconseguien identificar un total de 8. Els 7 restants (spots 169 a 466 i 506) correspongueren a proteïnes poc abundants, o situades en zones amb baixa resolució del gel bidimensional. El volum d'aquests spots experimenta molta variació entre condicions de normòxia i hipòxia, i per tant seria interessant poder-los estudiar. Per a obtenir spots analitzables, es podria incrementar la quantitat de proteïna carregada en els gels; això, però, afectaria negativament la resolució, ja que com més quantitat de mostra es carrega també incrementen les impureses (àcids nucleics, sals, lípids), dificultant la separació. Per a eliminar-les es podrien usar tècniques com la diàlisi, la filtració o la precipitació, encara que també suposaria un risc de pèrdua de mostra. És per això que en la preparació dels extractes proteics s'ha d'arribar a una solució de compromís entre l'eliminació d'impureses i la pèrdua de mostra. En el cas d'aquest treball es trià la simplicitat en la preparació dels extractes, que, tot i conservar certa quantitat d'impureses, manté una representació de totes les proteïnes existents, analitzables perfectament en la zona del gel amb bona resolució. Un cop estudiada aquesta zona, i veient que hi ha altres spots interessants

amb menor definició, el següent pas seria realitzar el tractament adequat de la mostra per a resoldre altres regions del gel.

La tinció amb plata, tot i ser el mètode no radiactiu més sensible per a la detecció de proteïnes en un gel electroforètic (5-80 ng), presenta certes limitacions, que s'han de tenir en compte a l'hora d'analitzar els resultats; és un procés complex, amb molts de passos, i hi ha molts elements que poden ser font de variabilitat entre les diferents tincions, sobretot tenint en compte que cada gel es tenyeix per separat:

- Els temps d'incubació amb cada reactiu de tot el procés de tinció, sobretot els rentats, la incubació amb el nitrat de plata i el revelat, han de ser molt precisos per a donar resultats reproduïbles, ja que poden fer que una tinció sigui més intensa que una altra.
- Impureses en el gel i/o en l'aigua usada per a preparar els reactius poden donar una tinció dolenta.
- Cada proteïna fixa la plata de manera diferent, i en algun cas la intensitat observada podria no correspondre's amb la quantitat real de proteïna.
- La saturació de la tinció pot fer que alguns spots tinguin aparentment la mateixa intensitat, molt elevada a més. Possiblement una tinció més feble posaria en evidència diferències d'intensitat, però es deixarien de veure la majoria de proteïnes. S'ha d'arribar, doncs, a un compromís en la intensitat de la tinció, sabent que sempre es perden dades.
- En principi, en tots els gels es carrega la mateixa quantitat de proteïna, però per a evitar errors en aquest punt, la intensitat de cada spot es normalitza en funció de la intensitat total dels spots detectada en un gel. Això resta certa variabilitat als resultats, però se segueix dependent de la qualitat de la tinció.

Una alternativa a la tinció amb plata seria el marcatge de les mostres amb fluoròfors, per a detectar el total de la proteïna de manera semblant a la plata. El Sypro Ruby, per exemple, té una sensibilitat d'1 ng, i un rang de detecció quantitativa que

arriba fins a 1000 ng (major que el de la plata). Per tant, aquest marcatge fluorescent no arribaria tant aviat a la saturació i es podria fer una millor detecció. Actualment aquest seria el mètode de tinció elegit. També es podrien fer servir fluoròfors del tipus Cy2, Cy3 i Cy5, marcant les mostres abans de la separació electroforètica. En aquests casos es possibilita la separació simultània de les mostres control amb les tractades, que, un cop marcades (cadascuna amb un fluoròfor diferent), es poden barrejar i resoldre a la vegada, amb el que s'elimina la variabilitat lligada a aquest pas. El fluoròfor canvia la mida de les proteïnes (en la mateixa proporció per a totes), però no la càrrega, de manera que la separació per pl es manté igual. Detecta canvis de proteïna del 10%, però s'ha de fer poc marcatge (3% de la proteïna), perquè l'excés de fluorescència pot donar falsos positius. Però també és de suposar que cada proteïna uneixi els fluoròfors de manera diferent, i que diferències en la quantitat de mostra carregada puguin afectar la intensitat final detectada.

Per tots aquests motius, la diferencialitat (comparant condicions d'hipòxia i normòxia) en el volum dels spots identificats per tinció amb plata es volgué confirmar amb una anàlisi per Western Blot de les proteïnes corresponents. Aquesta es considerà la tècnica més addient per a fer les comprovacions: la seva sensibilitat és molt elevada (es pot detectar, per quimioluminescència, menys d'1 pg d'antigen), i el senyal obtingut és proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra. Com que totes les mostres es detecten a la vegada amb el mateix anticòs (mateixos temps d'incubació, de rentat i de revelat), la variabilitat en aquest punt no existeix; en principi, la comparació entre mostres seria més fiable que per tinció amb plata. Evitar la saturació del senyal és també senzill: es pot exposar menys temps la pel·lícula fotogràfica a la membrana incubada amb el reactiu quimioluminescent o utilitzar un sistema de detecció de les intensitats que les analitzi en funció del temps, de manera que abans d'arribar a la saturació del senyal s'hagi pogut determinar si hi ha una diferència real d'intensitats entre les diferents mostres. Així, de totes les proteïnes

identificades per electroforesi bidimensional més tinció amb plata en aquest treball, es descartaren totes aquelles per a les que no s'obtingué confirmació per Western Blot.

De les 8 identificacions realitzades, 5 correspongueren a proteïnes amb variacions en la seva quantitat o en el punt isoelèctric en resposta a hipòxia; d'aquestes, dues resultaren ser la mateixa proteïna, deixant un total de 4 candidates a estudiar: "Protein disulfide isomerase A6 precursor" (P5), "Proteasome subunit  $\alpha$  type I" (C2), " $\alpha$ -enolase/MBP-1" i "Ionized calcium binding adapter molecule 2" (Iba2). Dues es confirmaren com a positius ("Proteasome subunit  $\alpha$  type I" i "Iba2"), i s'analitzen més endavant. Les altres dues no obtingueren confirmació:

P5 (Protein disulfide isomerase A6 precursor). Aquesta proteïna és membre de la família PDI (Protein Disulfide Isomerase), enzims implicats en la maduració de proteïnes de secreció en el reticle endoplasmàtic i caracteritzats per la presència d'un o més dominis amb plegament homòleg a la tioredoxina. P5, localitzada a reticle endoplasmàtic, es troba sobreexpressada en cèl·lules amb resistència a tiourea [381] i en cèl·lules preincubades amb insulina. No es coneixen homòlegs en altres espècies diferents de mamífer.

Tot i que no s'aconseguí demostrar per Western Blot que la quantitat de P5 augmentés en resposta a hipòxia (tal i com es veié en la tinció amb plata de l'electroforesi bidimensional), sí s'observà una sobreexpressió significativa del seu mRNA durant la primera hora de l'estrés hipòxic, suggerint que l'increment en la quantitat de proteïna és possible; tot i això, cal considerar que un augment de l'expressió de mRNA no sempre es tradueix a nivell proteic. L'estudi de la presència de P5 en diferents línies cel·lulars mostrà la seva ubiqüitat i el seu elevat nivell d'expressió: això pot dificultar el correcte anàlisi de la quantitat de proteïna a nivell de tinció amb plata, i per tant és plausible que ens trobem front un fals positiu; més si tenim en compte que la relació de volums entre la mostra hipòxica i normòxica

determinada en l'anàlisi inicial fou de 1.59, només lleugerament superior a l'1.5 establert com a punt de tall per a seleccionar proteïnes candidates. Aquest petit marge pot suposar un gran error per a una proteïna tan abundant, ja que les intensitats a analitzar estan molt properes a la saturació.

Altres membres de la família d'isomerasas (però no P5) s'han relacionat anteriorment amb la hipòxia, com PDI, EndoPDI o PDI-A3, que veuen la seva quantitat augmentada en aquests casos [382-384]. És interessant assenyalar que PDI és una de les subunitats que conformen el tetràmer amb activitat col·làgena-prolilhidroxilasa [385]. Com s'ha comentat, un dels enzims claus de la regulació d'HIF-1 $\alpha$  en resposta a hipòxia és PHD, amb activitat prolilhidroxilasa. Per comparació, es pot inferir que aquest enzim també podria constar d'una subunitat de la família PDI en la seva estructura, i seria lògic aventurar que es tractés d'un d'aquests membres sobreexpressats en hipòxia. Tot i això, PHD s'ha revelat com a enzim monomèric, i per tant aquesta hipòtesi quedaria descartada.

Aquesta família de proteïnes també s'ha implicat en processos cancerígens: PDI-A3 està sobreexpressada en càncer de cèrvix i estomacal [386,387], PDI en càncer de mama i pàncrees [388,389] i Erp60 en càncer colorectal [390]. No hi ha, però, cap dada referent a P5.

$\alpha$ -enolase / MBP-1. El gen  *$\alpha$ -enolasa* genera un mRNA amb dos llocs alternatius d'inici de la traducció [377]. El primer, en la metionina 1, dona lloc a l' $\alpha$ -enolasa, enzim glicolític localitzat a citosol que catalitza la formació de fosfoenolpiruvat a partir de 2-fosfoglicerat, el segon dels dos intermediaris que generen ATP durant la glicòlisi. El segon lloc d'inici de la traducció, 400 bp més endavant, dona un producte anomenat MBP-1 (Myc-binding protein). Aquesta proteïna, localitzada a nucli, s'uneix al promotor del gen *c-myc*, protooncogen que controla el creixement i la diferenciació cel·lular, i regula negativament la seva expressió; és, per tant, un potencial supressor

de tumors. De fet, la seva sobreexpressió inhibeix la formació de tumors en ratolins. MBP-1 no mostra activitat enolasa.

Per concordància amb el pes molecular i el pI, es concloué que l'spot n° 163 identificat en aquest treball corresponia a la proteïna MBP-1. La confirmació dels resultats de l'electroforesi bidimensional per Western Blot no fou possible en aquest cas per manca de disponibilitat d'un anticòs adequat. En principi, qualsevol anticòs generat contra l'extrem C-terminal de la proteïna ha de reconèixer tant la isoforma amb funció enolasa com la variant MBP-1, ja que aquesta zona és comú a totes. Però no fou el cas de l'anticòs testat, que no mostrà reconeixement en la regió del gel bidimensional on es trobava MBP-1. L'estudi a nivell de mRNA tampoc mostrà variacions; tot i això, és difícil diferenciar si estem analitzant l'expressió de MBP-1 o  $\alpha$ -enolasa, ja que el mRNA és el mateix per a ambdues.

Seria interessant poder comprovar si la disminució de MBP-1 en resposta a hipòxia observada en els assajos d'electroforesi bidimensional realment es dona. En la bibliografia no s'ha reportat cap cas de regulació d'aquesta proteïna per oxigen, però sí per a  $\alpha$ -enolasa, que és un gen diana d'HIF-1 [391] i mostra una marcada sobreexpressió amb la baixada d'oxigen. El fet que la quantitat d' $\alpha$ -enolasa augmenti en resposta a hipòxia, i en canvi en aquest treball s'hagi reportat una disminució de MBP-1, no es contradia necessàriament, ja que són proteïnes amb funcions diferents. Una inhibició de MBP-1 en cèl·lules canceroses (que té activitat supressora de tumors) [392], seria un nou mecanisme promotor de la tumorigènesi promogut per hipòxia; de fet, MBP-1 s'ha trobat expressada en menors quantitats en carcinoma hepatocel·lular [393]. Subratllant les diferències entre MBP-1 i  $\alpha$ -enolasa, aquesta darrera també s'ha relacionat amb la progressió tumoral, però en aquest cas per sobreexpressió, i se sol usar com a marcador tumoral [394]. Hi ha un cas reportat, però, on una disminució de l'enzim es relaciona amb una major agressivitat de la malaltia [395].

Les altres tres proteïnes identificades foren triades com a control del mètode; d'aquestes també dues correspongueren a la mateixa proteïna, deixant un total de 2 a estudiar: "Dynactin p50 subunit" i "26s protease regulatory subunit 6A". Aquesta darrera tampoc es pogué confirmar a nivell de Western Blot, per no disponibilitat d'anticòs. La dada sorprenent correspongué a l'spot corresponent a la subunitat p50 de la dinactina. Tot i que segons els resultats de l'anàlisi bidimensional la relació de volums entre la mostra control i el de la mostra hipòxica era d'1.18 (menor a l'1.5 establert com a llindar), l'estudi per Western Blot mostrà increments significatius de la quantitat de proteïna a mesura que augmentava el temps d'estrés. Ens podem trobar en un cas semblant al de la proteïna P5: la subunitat p50 és una proteïna ubíqua i molt abundant, i la diferència entre l'1.18 obtingut i l'1.5 determinat com a marge pot correspondre a l'error en la quantificació de la tinció amb plata donat per l'elevada intensitat dels spots; ens podríem trobar, en aquest cas, amb un fals negatiu. Per aquest motiu, aquesta proteïna s'analitza posteriorment com a possible diana farmacològica.

Tot i que l'aproximació experimental pretenia analitzar canvis a nivell proteic, es realitzaren també anàlisis de l'expressió de mRNA per a completar les dades. No s'esperaven variacions molt acusades en l'expressió del missatger, tenint en compte sobretot els temps curts assajats i de fet només en un cas s'obtingué un augment de l'expressió (P5). En la resta la quantitat de missatger es mantingué invariable.

Resumint, el mètode d'estudi per electroforesi bidimensional i tinció amb plata permeté identificar correctament dues proteïnes de les quatre candidates (Proteasome subunit  $\alpha$  type I i Iba2), una no obtingué confirmació per Western Blot (P5), i de la darrera no es disposen dades ( $\alpha$ -enolasa/MBP-1). També es posà en relleu una proteïna (Dynactin p50 subunit), que no mostrà variacions en la tinció amb plata, però sí en l'anàlisi per Western Blot. La tècnica d'electroforesi bidimensional combinada

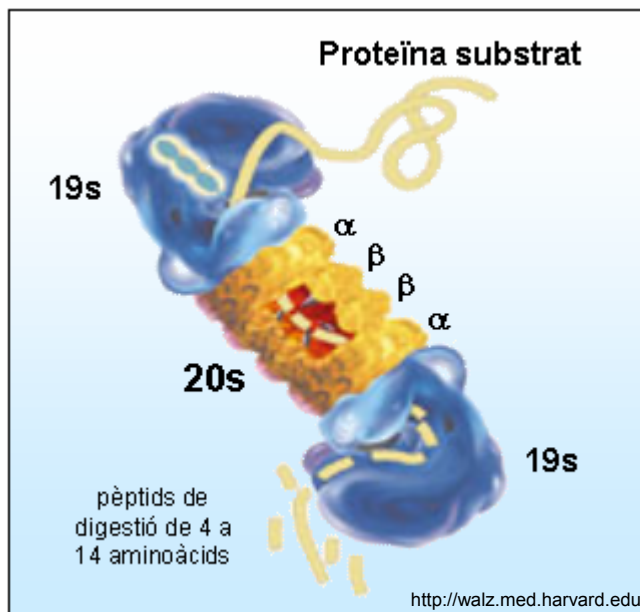


amb espectrometria de masses té un elevat potencial per a la detecció de proteïnes amb expressió diferencial en resposta a diversos estímuls (en aquest cas la hipòxia), tot i que sempre s'ha de fer comprovacions, degut a l'existència de possibles falsos positius i negatius.

## 5.2. Anàlisi de les proteïnes com a possibles dianes terapèutiques

### 5.2.1. Proteasome subunit $\alpha$ type I (component C2)

La via del proteasoma 26s<sup>k</sup> és el mecanisme principal mitjançant el qual es degraden selectivament les proteïnes en cèl·lules eucariotes (revisat per Wolf i Hilt [396]). Aquest complex proteic s'ha trobat en el citoplasma, en la cara citoplasmàtica del reticle endoplasmàtic i en el nucli. La seva estructura està molt conservada en totes les espècies: amb una massa aproximada de 2000 kDa, està constituït per un complex central 20s amb activitat proteolítica, i per dos complexos 19s, cada un a un extrem, amb funcions reguladores (Figura 56).



**Figura 56.** Estructura del proteasoma 26s.

<sup>k</sup> 26s (i 20s i 19s més endavant) es refereixen a la constant de sedimentació del complex proteic.

El complex 20s està constituït per 4 anells de 7 proteïnes cada un, que formen una estructura de barril. Els dos anells externs contenen 7 subunitats  $\alpha$ , i els dos interns 7 subunitats  $\beta$  (estructura  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ); totes són diferents entre elles (es numeren de  $\alpha_1$  a  $\alpha_7$  i de  $\beta_1$  a  $\beta_7$ ), i s'han de situar en l'ordre correcte dins del complex 20s per a donar una estructura activa; el plegament de cada subunitat facilita les interaccions i l'organització addients. Només tres de les 7 subunitats  $\beta$  (ninguna subunitat  $\alpha$ ) tenen activitat catalítica. Per ordre decreixent d'importància són:  $\beta_5$  (activitat quimotripsina),  $\beta_2$  (activitat tripsina) i  $\beta_1$  (activitat peptidil-glutamil-peptidasa, hidròlisi després d'aminoàcids àcids). Considerant l'existència de dos anells de subunitats  $\beta$ , tenim en total 6 centres catalíticament actius en el proteasoma 26s. El barril 20s conté tres cavitats: les dues exteriors (avantcambres) estan formades per un anell  $\alpha$  i un  $\beta$ , i poden acomodar una gran quantitat de proteïnes substrat o productes de degradació. La cavitat interna està formada per dos anells  $\beta$ , i conté l'activitat enzimàtica; per la seva mida només pot acomodar substrats desplegats, de manera que s'exclouen les proteïnes natives plegades.

Les subunitats 19s tenen activitat isopeptidasa, oxidorreductasa i ATPasa, que els permeten realitzar les següents funcions reguladores:

- Unió selectiva a substrats proteics per reconeixement específic de cadenes poliubiquitina unides a les proteïnes diana; en casos comptats es reconeixen motius proteics específics (sol ser el cas de pèptids que ja estan desestructurats).
- Desplegament dels substrats.
- Eliminació de les cadenes poliubiquitina.
- Obertura de l'entrada a la subunitat 20s formada per les subunitats  $\alpha$ ; el porus d'entrada és prou petit per a assegurar que només passin polipèptids desplegats.
- Internació dels substrats a la cambra catalítica del complex 20s.

La pèrdua de funcionalitat del proteasoma (per tractament farmacològic), desestabilitza l'equilibri de síntesi i degradació de proteïnes de la cèl·lula, provocant

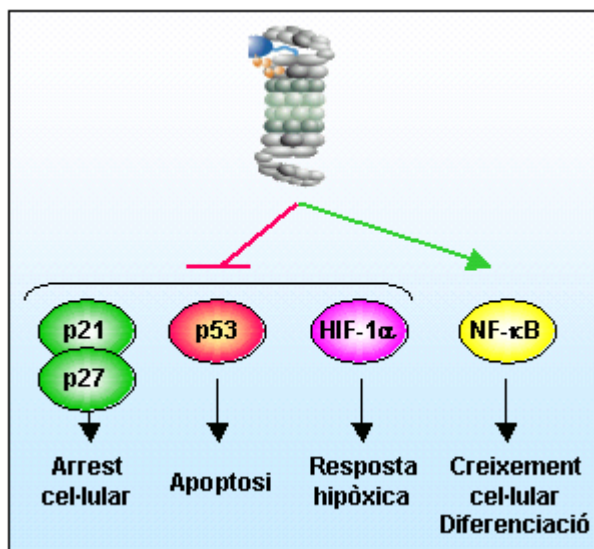
l'acumulació de restes proteics i finalment la mort per apoptosi. Aquests efectes, *a priori*, haurien de ser comuns a cèl·lules normals i tumorals, donada la ubiqüitat del proteasoma i el control sobre funcions cel·lulars generals que realitza, com la maduració proteica i la mitosi. En canvi, les cèl·lules canceroses mostren clarament una major sensibilitat, i, de fet, el tractament amb bortezomib (també anomenat VELCADE), inhibidor del proteasoma 26s, ha mostrat disminució del creixement tumoral. Aquesta molècula ha estat la primera amb aquestes propietats en arribar a clínica, donant resultats positius en assajos de fase I, II i III, amb remissions de la malaltia en alguns casos [397]. Addicionalment, la teràpia combinada amb bortezomib i agents quimioterapèutics (com la camptotecina, inhibidor de la topoisomerasa, o la talidomida), ha mostrat major inhibició tumoral que el monotractament, fins i tot en casos descrits de resistència a cada fàrmac per separat.

Dels diversos processos controlats pel proteasoma, quatre es consideren els principals responsables de l'efecte anticancerígen de la seva inhibició [398]: per regulació de molècules com les selectines, queda alterat el procés d'adhesió; l'angiogènesi s'inhibeix per bloqueig de la producció de molècules com VEGF i els seus receptors; també disminueix la invasió tumoral i la metàstasi; així mateix es modifica el control del cicle i la mort cel·lular. Possiblement, la regulació de proteïnes implicades en la proliferació, el creixement i la supervivència per part del proteasoma cobra molta importància en cèl·lules tumorals, donada l'elevada taxa proliferativa que les caracteritza. La degradació proteasomal regula l'activitat de moltes proteïnes implicades en el creixement cel·lular, com p21 i p27<sup>1</sup>; de proteïnes reguladores de l'apoptosi, com les caspases, p53 i TRAIL; i de factors de transcripció com NF-κB i HIF-1 (Figura 57). Com que NF-κB (inhibit pel bloqueig del proteasoma) promou la quimio- i radioresistència, el tractament està menys afectat per la resistència a fàrmacs. La inhibició del proteasoma provoca també l'estabilització d'HIF-α. En general, el factor HIF es considera positiu per al desenvolupament tumoral, promovent

---

<sup>1</sup> Inhibidors de cdk's que indueixen la parada del cicle cel·lular.

l'angiogènesi i la resistència a apoptosi, i per tant sembla contradictori que un inhibidor del proteasoma pugui tenir efectes beneficiosos contra el càncer. Però cal recordar que HIF- $\alpha$  també ha mostrat propietats proapoptòtiques i nocives per al creixement tumoral, i que per tant la seva estabilització podria arribar a ser positiva. Els seus efectes sobre la progressió tumoral són molt dependents del background genètic de cada tipus cel·lular, i si tenim en compte que la inhibició proteasomal promou l'activació de proteïnes proapoptòtiques com p53, és possible que la resultant final impliqui un predomini de les propietats proapoptòtiques d'HIF. La teràpia combinada, en aquest cas, podria millorar els resultats: per exemple, el tractament amb Bortezomib promouria l'apoptosi tumoral, i la combinació amb Topotecan (veure capítol 1.5.1.) evitaria qualsevol activitat protumorigènica residual d'HIF.



**Figura 57.** Regulació de funcions cel·lulars pel proteasoma.

El proteasoma 26s degrada proteïnes com p21, p27, p53 i HIF-1 $\alpha$ , inhibint per tant la seva funció. També degrada I $\kappa$ B $\alpha$ , regulador negatiu de NF $\kappa$ B, i per tant activa la funció del factor de transcripció. La inhibició farmacològica del proteasoma 26s, així, promouria l'arrest cel·lular, l'apoptosi i la resposta a hipòxia, i inhibiria el creixement cel·lular i la diferenciació.

La subunitat  $\alpha$ 6 del proteasoma, també anomenada C2 (Proteasome subunit  $\alpha$  type I), correspon a la proteïna seleccionada en aquest treball per la seva possible implicació en la resposta a hipòxia (per sobreexpressió després de l'estrés en cèl·lules tumorals). Aquesta subunitat (i proteïnes que hi interaccionen) s'ha relacionat anteriorment amb processos cancerígens, però no en relació a hipòxia: en mostres de càncer de tiroides s'ha descrit una sobreexpressió de C2, així com de PA28- $\gamma$ ,

activador del proteasoma 20s, especialment en les regions on el creixement tumoral es veu accelerat, i l'inhibidor del proteasoma clasto-lactacystin beta-lactona afecta negativament el creixement de línies cel·lulars d'aques tipus de càncer [399]. Així mateix, la subunitat C2 i la ubiquitina s'han trobat sobreexpressades a nivell de mRNA en carcinomes renals humans i en línies cel·lulars de carcinoma de ronyó, tot i que això no es tradueix en un augment a nivell proteic (s'hipotetitzo que en cèl·lules tumorals, molt proliferatives, hi ha un "turnover" ràpid del proteasoma) [400]. El proteasoma està també implicat en la pèrdua de pes provocada pel càncer (caquèxia), per sobreactivació del catabolisme proteic. S'han descrit augments en l'expressió de la subunitat C2, entre d'altres, en teixit muscular, que correlacionen amb aquesta pèrdua de pes [401]. Els tractaments amb  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirat (HMB) redueixen l'expressió de les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  del proteasoma 20s en un 50%, i també l'expressió de les subunitats ATPasa del complex 19s, atenuant la seva activitat i evitant la caquèxia [402].

Els resultats d'aquest treball han mostrat que la subunitat  $\alpha_6$  és ubíqua i s'expressa en quantitats elevades en tots els teixits analitzats (fet comprensible si considerem la funció universal que realitza), excepte en cervell. A nivell proteic es troba en totes les mostres testades (totes elles tumorals), també en glioblastoma. Caldria analitzar, doncs, mostres de cervell sà per a comprovar si hi ha realment una diferència en l'expressió proteica entre mostres sanes i mostres tumorals. També es podria donar el cas de tenir expressió de subunitats  $\alpha$  específiques de cervell. Aquest fenomen es dona per a les subunitats  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_5$ , que són substituïdes per isoformes específicament activables per interferó, formant l'anomenat immunoproteasoma, que genera els pèptids antigènics presentats pel complex MHC de classe I. També s'han trobat isoformes de les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  en plantes i en *Drosophila*, indicant que poden existir subtipus de proteasomes amb funcions específiques. Per això potser a nivell de mRNA no detectem C2 en cervell (ja que la seqüència de DNA és molt específica),

però l'estructura proteica podria ser prou semblant per a ser reconeguda per un anticòs.

La sobreexpressió de la subunitat  $\alpha 6$  (C2) trobada en aquest treball podria suposar un augment de l'activitat del proteasoma 26s, promovent possiblement la proliferació cel·lular i inhibint l'apoptosi en cèl·lules tumorals (veure figura 57, proteïnes regulades pel proteasoma), estimulant la progressió tumoral per regulació dels processos d'adhesió, angiogènesi i invasió tumoral. En relació a l'estrés hipòxic, un increment de l'activitat proteasomal suposaria una major taxa de degradació d'HIF-1 $\alpha$  després del retorn a condicions de normòxia. Això es podria interpretar com un mecanisme d'autoregulació negativa de la via de resposta a hipòxia. Es desconeix també si aquesta proteïna té funcions addicionals a la relacionada amb el proteasoma que puguin tenir relació amb la resposta a hipòxia.

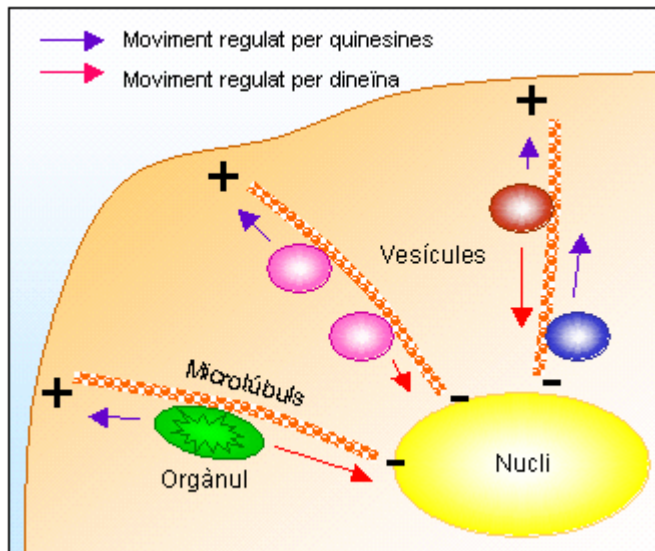
En resum, tenint en compte les dades experimentals obtingudes, es pot suggerir que C2 té una participació en la resposta a hipòxia, possiblement en la ruta de degradació d'HIF-1 $\alpha$ , i considerant la bibliografia existent, que també podria promoure la progressió tumoral per regulació de les proteïnes implicades en la proliferació cel·lular. Per tant podria considerar-se com a diana farmacològica.

### **5.2.2. Dinactina (subunitat p50)**

El transport de vesícules i orgànuls entre les diferents regions cel·lulars no es dona per difusió, sinó per acció de dos grups de proteïnes motores, les dineïnes i les quinesines, que transporten la seva càrrega al llarg dels raïls formats pels microtúbuls (Figura 58). La dinactina regula aquest transport, ja que interacciona amb totes dues proteïnes motores, actuant de nexa d'unió entre aquestes, la vesícula o orgànul i el microtúbul.

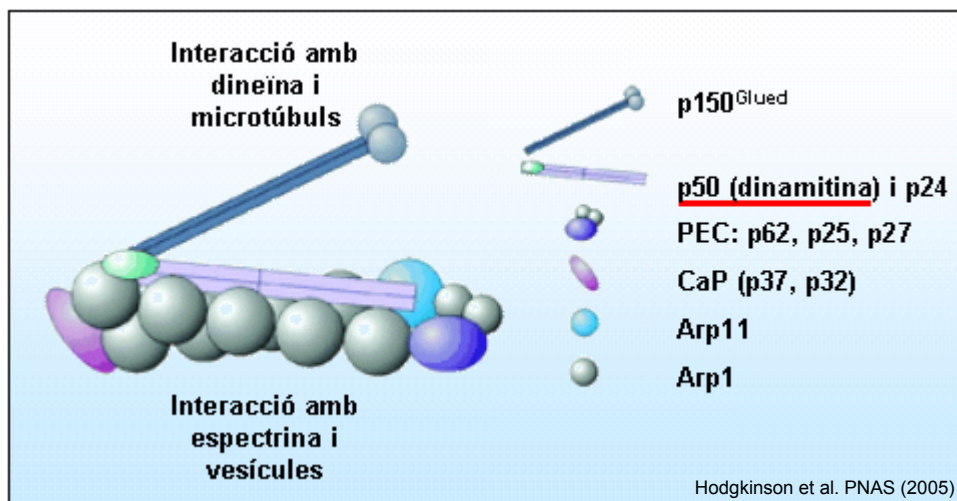
La dinactina és un complex multiproteic compost almenys per 9 polipèptids [403] (Figura 59): un filament central format per 10 còpies de la proteïna Arp1 (Actin-

related-protein 1), semblant a la F-actina, que forma l'esquelet de l'estructura i s'uneix a l'espectrina i per tant a la càrrega a transportar; un heterodímer, CaP (actin capping protein), constituït per p37 i p32, que funciona com a coberta en un extrem i que possiblement estabilitza l'esquelet; en l'altre extrem, el PEC (pointed-end complex), que conté quatre proteïnes: Arp11, p62, p27 i p25, de les quals les tres darreres contenen regions d'unió a l'element a transportar; dues còpies de p150<sup>Glued</sup>, que és la subunitat més gran del complex i forma la prolongació d'un braç que interacciona amb la dineïna i els microtúbuls (és, per tant, la subunitat clau en la regulació del moviment



**Figura 58.** Transport de vesícules i orgànuls a través dels microtúbuls.

El moviment anterògrad cap al pol positiu dels microtúbuls (la perifèria cel·lular) està facilitat per proteïnes motores de la família de les quinesines; el moviment retrògrad cap als extrems negatius (nucli cel·lular) està controlat per la dineïna.



**Figura 59.** Estructura del complex dinactina.

bidireccional); la unió d'aquest braç a l'esquelet d'Arp1 es dona a través d'un complex format per dues molècules de p24 i quatre molècules de p50 (també anomenada dinamitina). La subunitat p50 és la segona més abundant del macrocomplex, i també interacciona amb els microtúbuls i la dineïna. Aquesta proteïna ha estat identificada en aquest treball com a sobreexpressada en hipòxia.

Els processos que regula la dinactina intervenen en diverses funcions cel·lulars, com el transport d'òrgànuls o altre material encapsulat en vesícules (per exemple DNA, o càpsides víriques després d'una infecció) entre el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi; també en el moviment centrípet de lisosomes i endosomes o en l'axogènesi i transport axonal de vesícules unides a membrana. Durant la mitosi controla la formació del centrosoma, per transport de les proteïnes que n'acabaran formant part; així mateix regula l'estructuració del fus mitòtic i el moviment cromosomal. Com que aquests processos afecten la proliferació cel·lular, en aquest punt es podria influir sobre el desenvolupament tumoral.

Tot i això, no s'han descrit mutacions o disfuncions del complex dinactina (tampoc de la subunitat p50) relacionades amb el càncer, però sí en proteïnes amb les que aquesta interacciona; així mateix tampoc s'ha descrit cap relació amb els processos de resposta a hipòxia. Una estructura centrosomal incorrecta pot provocar inestabilitat genòmica, i per tant, qualsevol disfunció en el complex que l'organitza pot promoure la transformació tumoral. La Pim-1 quinasa (proto-oncogen que promou la formació de limfomes i es troba sobreexpressat en càncer de pròstata) dirigeix, mitjançant fosforilacions, la formació del complex proteic que organitza el centrosoma, del qual forma part la dinactina [404]. Així mateix, PCM-1 forma part dels satèl·lits centriolars que organitzen la formació del centrosoma, per reclutament de proteïnes de manera dependent de microtúbuls i dinactina [405]; una fusió del gen PCM-1 amb el domini tirosin quinasa del proto-oncogen RET està activada freqüentment en carcinomes del tiroides [406]. La formació d'un complex entre la dineïna, la dinactina i la proteïna NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus) és necessària per a orientar



correctament els pols dels microtúbuls durant la formació del fus mitòtic. La sobreexpressió de NuMA promou la formació de fusos multipolars, i el desenvolupament de càncer [407]. NADE (p75<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) inhibeix el creixement cel·lular tumoral *in vivo*, i la dinactina és una possible proteïna d'interacció amb ella [408]. Finalment, el transport de p53 a nucli està controlat per la dineïna, i per tant per la dinactina [409].

La subunitat p50, identificada en aquest treball per una possible sobreexpressió en hipòxia, es troba present a nivell proteic en totes les línies cel·lulars assajades, en quantitats molt semblants en tots els casos. L'expressió a nivell de mRNA és també ubíqua, però presenta major variabilitat entre teixits, sent més elevada en cor, ronyó i pàncreas. Ens trobem també en el cas d'un complex proteic amb una funció comú a tots els tipus cel·lulars, i per tant és lògic suposar que la seva presència serà generalitzada.

En relació a l'augment de proteïna observada, cal comentar que concentracions experimentalment elevades (per sobreexpressió) de p50, lluny de sobreactivar el complex dinactina, provoquen la seva dissociació [410], per impediment de la interacció entre la dineïna i la seva càrrega, i entre p150<sup>Glued</sup> i Arp1: per tant, la sobreexpressió de p50 observada en hipòxia podria provocar una disminució en l'activitat del complex dinactina, i per tant promoure la inestabilitat genètica característica de les cèl·lules tumorals sotmeses a aquest estrès, per malformació de les estructures centrosomals. La inhibició de la dinactina provoca també una aturada de la mitosi cel·lular en prometafase; això podria contribuir també a l'aturada en la proliferació observada en hipòxia. La inhibició del transport a través dels microtúbuls per infecció vírica evita la sortida de receptors que responen a TNF, i per tant es perd sensibilitat a senyals proapoptòtics [411]; la hipòxia també podria provocar la resistència a apoptosi per aquesta via. La sobreexpressió d'altres components del complex dinactina també té efectes negatius sobre el seu funcionament: en el cas de

p150<sup>Glued</sup>, no s'altera la integritat del complex dinactina, però sí l'estructura de l'aparell de Golgi i els microtúbuls [412]; així mateix, la sobreexpressió d'Arp1 provoca una aturada del cicle cel·lular en prometafase [413].

Així, es podria suggerir que l'augment en la quantitat de la subunitat p50 del complex dinactina observada en hipòxia provocaria una malfunció d'aquest complex, i per tant, major inestabilitat genètica que podria portar a la progressió tumoral. Per altra banda, podria també contribuir a l'aturada del cicle cel·lular observada en hipòxia, i a la resistència a senyals proapoptòtics. Estem parlant, però, d'una malfunció del complex dinactina; una inhibició total de la seva activitat, en canvi, podria tenir efectes absolutament negatius per a la cèl·lula, semblants als dels disruptors de microtúbuls utilitzats en teràpia antitumoral, impeding la correcta proliferació cel·lular i provocant la mort cel·lular. Fins el moment no s'ha descrit cap fàrmac que inhibeixi cap component del complex dinactina amb aplicacions per al tractament antitumoral, i tampoc en relació amb les proteïnes d'interacció que s'han esmentat anteriorment. La subunitat p50 es podria considerar com una possible diana farmacològica antitumoral, però cal tenir en compte la dificultat afegida que té l'obtenció d'un compost amb capacitat per a alterar interaccions entre proteïnes, com seria desitjable en aquest cas, i per tant això limita les possibilitats. A més, caldria estudiar més a fons (intentant confirmar) la participació de p50 en els processos de resposta a hipòxia, per a ampliar el rang d'actuació farmacològica.

### 5.2.3. *Iba2*

La funció i les propietats d'*Iba2* són desconegudes, i els assajos d'aquest treball s'han dirigit en base a les característiques d'*Iba1*, proteïna homòloga en un 63%.

*Iba1* (Ionized calcium binding adapter molecule 1)<sup>m</sup> (revisat per Deininger et al. [414]), proteïna de 17 kDa, és membre de la família de proteïnes amb motius "EF hand" d'unió a calci. Té dos d'aquests motius, dels quals només un és actiu, i funciona com a molécula adaptadora, mitjançant senyals de calci cap a altres proteïnes. Es troba conservada des de protozoos a mamífers, fet que reflexa la seva importància funcional. El gen produeix variants de splicing, anomenades IRT-1, BART-1, G1 i Hara-1, amb diferents motius proteics ("leucine zippers", hèlixs transmembranals, motius "EF hand", llocs de glicosilació i de fosforilació), que els confereixen diferents propietats biològiques. Concretament, *Iba1* està fosforilada en una serina i no conté llocs de glicosilació, pèptids senyal o regions transmembranals. El seu mRNA està molt expressat en testicles, moderadament en melsa, però molt poc en cervell, pulmó i ronyó; dins de les cèl·lules del cervell, la seva presència és específica de microglia (macròfags especialtzats del SNC activats en resposta a dany neuronal), i pràcticament indetectable en la resta de tipus cel·lulars (neurons, astroglia i fibroblasts de la meninge) [415]. Se sobreexpressa en la microglia activada en resposta a MCSF, IL-6 i Interferó- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), regulant la seva funció, per exemple després d'una isquèmia cerebral, d'una mort neuronal per apoptosi, en tumors cerebrals (gliomes) o en la malaltia de Creutzfeldt-Jakob [416]. La proteïna modula, de fet, diversos aspectes dels canvis estructurals del citoesquelet d'actina que es donen per a facilitar la migració i capacitat fagocitant durant aquesta activació [417] (la seva detecció s'utilitza com a marcador d'aquest procés):

---

<sup>m</sup> En la bibliografia es troben noms alternatius per a aquesta proteïna: AIF-1 (allograft inflammatory factor 1), MRF-1 (Microglia Response Factor) o dantaina.

- En la formació de les ondulacions de membrana (“ruffles”) i lamelipodis, colocalitza amb l’F-actina (actina filamentosa), tant en estat basal, com després d’una inducció per MCSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor)<sup>n</sup>, que provoca una mobilització total d’Iba1 cap a aquestes estructures. Rac també s’activa, i colocalitza amb Iba1, tot i que no se n’ha demostrat una interacció directa; en canvi, no s’ha vist participació de Cdc42 o Rho en aquest cas<sup>o</sup>. La unió a calci és necessària per a aquesta funció d’Iba1: la formació de les ondulacions induïda per MCSF i regulada per Iba1 i Rac és dependent de PLC- $\gamma$  (Fosfolipasa C- $\gamma$ ) [418]; un cop activat, aquest enzim es transloca a membrana, on catalitza la hidròlisi de PI-4,5-P<sub>2</sub> en diacilglicerol i inositol-1,4,5-P<sub>3</sub>, que mobilitza el calci intracel·lular, i aquest podria modular l’activitat d’Iba1. Així mateix, Iba1 interacciona amb PI-4,5-P<sub>2</sub>, de manera que directa o indirectament estaria implicada en la translocació de PLC- $\gamma$  a membrana.

- En canvi, la unió a calci no és indispensable per a la propietat entrecruant d’actina que també exhibeix Iba1 (de manera específica de macròfags i microglia) durant el mateix procés de formació de les ondulacions [378].

- També forma complexes amb L-fimbrina en aquestes ondulacions, així com en les formacions fagocítiques: totes dues proteïnes cooperen modulant la reorganització de l’actina, però no competeixen per la seva unió. Possiblement Iba1, al unir-se a L-fimbrina, li provoca un canvi conformacional que facilita la seva acció agregant [419].

En resum, Iba1 actua com a molècula adaptadora entre els senyals del factor MCSF i la GTPasa Rac, i està implicada en la regulació de la reorganització del citoesquelet d’actina que controla la proliferació, la migració, la fagocitosi i la producció d’agents bioactius durant l’activació de la microglia (Figura 60).

---

<sup>n</sup> MCSF és essencial per a la diferenciació i maduració de la microglia i és crucial per a mantenir l’activació d’aquesta. La unió al seu receptor (CSF-1R) porta a la dimerització i autofosforilació d’aquest, i a l’activació d’altres molècules de senyalització com PI3K, PLC- $\gamma$ , Grb2, Src, STAT1, STAT3 i Rac, donant lloc a la formació de les ondulacions de membrana que es troben en la microglia que migra.

<sup>o</sup> La reorganització del citoesquelet d’actina està regulada per la família de Rho GTPases (Rho, Rac i Cdc42). Generalment, Rho manté les fibres d’estrés i les adhesions focals en fibroblasts, i en macròfags indueix la contracció cel·lular, controlant l’adhesió i motilitat; Cdc42 promou la formació de filopodis, implicats en el reconeixement del medi extracel·lular; Rac intervé en la formació de lamelipodis i ondulacions de membrana, i regula 3 aspectes de l’activació de la microglia: migració, fagocitosi i formació de radicals via NADPH oxidasa.

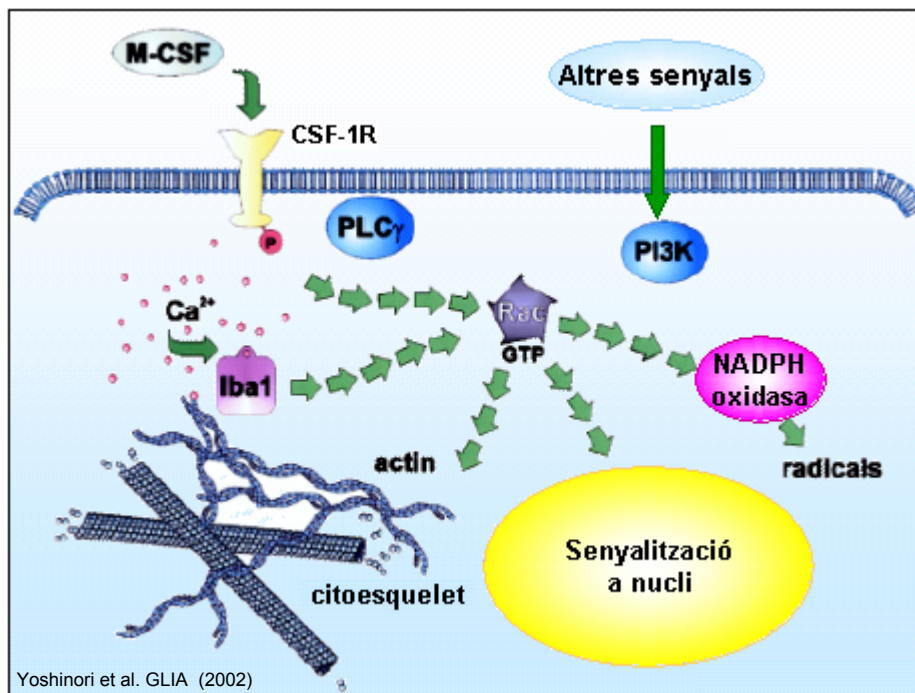
La hipòxia també té efectes sobre algun dels components relacionats amb aquesta activació. En resposta a l'estrés es produeix un increment de les quantitats citoplasmàtiques de calci, per alliberament de les reserves internes i també per entrada des del medi extracel·lular [420], que regulen l'activitat d'HIF-1: s'ha reportat tant una activació del factor de transcripció senyalitzada via MAPK, SAPK o PI3K [379], com una disminució de la seva activitat, possiblement per inhibició de les PHDs [421]. Recíprocament, el factor de transcripció indueix l'expressió i externalització dels canals de calci [422], estimulants així l'entrada de l'ió. És interessant remarcar que, en la majoria de casos estudiats, les variacions en la quantitat de calci són promogudes pels efectes de la despolarització de la membrana sobre canals dependents de voltatge, i aquestes propietats elèctriques són característiques de les cèl·lules excitable, com les neuronals. Per tant, la implicació del calci en la senyalització en resposta a hipòxia és gairebé exclusiva d'aquest tipus de cèl·lules.

La depleció d'ATP i posterior disrupció del citoesquelet d'actina són característiques de la resposta cel·lular a hipòxia, i la família de Rho GTPases (Rho, Rac i Cdc42) també regula la seva organització en aquests casos. L'expressió i activació de Cdc42, Rac1 i RhoA augmenta amb la baixada en la tensió d'oxigen (de manera dependent de ROS), i això modifica, a la vegada, l'activitat d'algunes proteïnes implicades en la resposta a hipòxia:

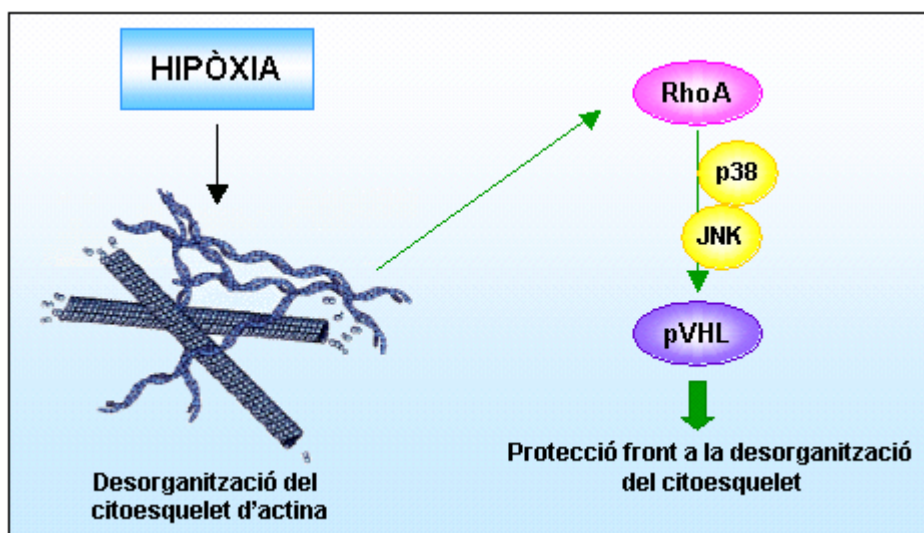
- L'activació de RhoA en hipòxia augmenta l'expressió de pVHL en cèl·lules tumorals, de manera dependent de la disrupció dels components del citoesquelet d'F-actina i  $\alpha$ -tubulina (RhoA, a més d'induir la formació de fibres d'estrés, s'activa en resposta a la despolimerització dels microtúbuls), i per senyalització via p38 i JNK [423]. Com que en hipòxia pVHL no pot interaccionar amb HIF-1 $\alpha$ , la finalitat de la seva activació ha de ser una altra (tot i que també podria tractar-se d'un mecanisme d'autoregulació negativa de la resposta a hipòxia). Anteriorment s'ha observat que pVHL s'uneix a tubulina i pot protegir els microtúbuls de la despolimerització, així com estabilitzar els filaments d'actina. Per tant, possiblement l'activació de Rho i la

sobrerregulació de pVHL en hipòxia serveixi per a protegir la cèl·lula contra el trencament de les fibres d'estrés. És interessant remarcar, però, que aquest mecanisme no s'ha observat per a cèl·lules de glioblastoma. Un esquema de la via de senyalització es mostra a la figura 61.

- Tant RhoA com Rac1, activades en hipòxia, promouen l'expressió i activació transcripcional d'HIF-1 $\alpha$ , a la vegada que s'inhibeix l'activitat de PTEN i p53 [424-426].



**Figura 60.** Senyalització via Iba1 i Rac en la reordenació del citoesquelet d'actina.



**Figura 61.** Modulació de l'organització del citoesquelet d'actina per hipòxia.

Implicació de la RhoA GTPasa i pVHL.

Segons els resultats d'aquest treball, *Iba2* s'expressa generalment a nivells molt baixos. En teixit normal el seu mRNA només es troba a cor, cervell (anàlogament a *Iba1*), múscul esquelètic i sobretot a ronyó; en teixit tumoral, s'expressa clarament en carcinoma de pulmó. A nivell proteic, la seva presència es limita a cèl·lules endotelials, glioblastoma, càncer de pàncreas, de pulmó, de mama i de colon. Sobre aquesta darrera variant, cal dir que l'anàlisi de mostres de càncer colorectal mitjançant un xip de DNA invertit ha mostrat que el gen *Iba2* experimenta una sobreexpressió en aquests casos. La seva baixa expressió, i l'aparent exclusivitat d'acció amb dependència del tipus cel·lular és de vital importància per a la consideració de la proteïna com a possible diana farmacològica. Si la proteïna només exerceix la seva suposada activitat promotora de la progressió tumoral en tipus concrets de carcinoma (i possiblement en pocs teixits normals), un tractament dirigit contra ella aportaria major especificitat de teixit i menors efectes secundaris.

La confirmació de la participació d'*Iba2* en la resposta a hipòxia no era dependent d'una variació en la quantitat de la proteïna, sinó en el seu punt isoelèctric (pI), provocada possiblement per una desfosforilació. Com s'explica en el capítol de resultats, per a comprovar aquesta modificació es compararen deteccions per Western Blot d'*Iba2* d'extractes proteics de cèl·lules normòxiques, hipòxiques, i de preparacions tractades amb fosfatasa alcalina. La posició de l'spot corresponent a les membranes s'acotà utilitzant tres punts de referència resultants de la detecció immunològica amb l'anticòs anti-*Iba2*. Com que podia quedar el dubte que la mostra desfosforilada tingués un posicionament diferent d'aquests punts provocada pel mateix tractament (de fet es veu una aparició massiva de spots cap a pHs més bàsics del gel, zona on migren les proteïnes amb menor càrrega de grups fosfat), també es considerà la posició de l'actina, que, tot i poder patir també la desfosforilació per fosfatasa alcalina, no mostrà mai una desaparició completa de les formes fosforilades, segurament degut a la seva elevada quantitat. A més, la primera dimensió electroforètica dels tres extractes a comparar, que determina la separació per pI, es realitzà simultàniament,

per a evitar qualsevol variabilitat en aquest punt. En conjunt, s'aconseguí localitzar sense cap dubte la posició dels tres spots de referència en les tres membranes, i això permeté situar en darrer terme Iba2, i comprovar que efectivament experimentava un desplaçament cap a pl majors, tant després d'una incubació en hipòxia com d'un tractament amb fosfatasa alcalina. En la figura 27 (Apèndix 2) s'aprecia també com en la mostra normòxica coexisteixen les dues formes d'Iba2 (fosforilada i desfosforilada); en la tinció amb plata aquest segon spot no s'aprecia, possiblement per la menor sensibilitat de la tècnica. Per tant, es pot concloure que Iba2 pateix una desfosforilació als 30 minuts de l'establiment de l'estrés hipòxic.

Tot i que per interessos farmacològics s'ha estudiat directament la possible implicació d'Iba2 en el desenvolupament tumoral, seria interessant conèixer els mecanismes bioquímics de la seva regulació, com per exemple els efectes (activants o desactivants) d'aquesta desfosforilació sobre la funció d'Iba2. La seva homòloga, Iba1, també es troba fosforilada (en una serina), de manera que una modificació post-traduccionals conservada en tots dos membres de la família ha de tenir alguna significància. Estudis amb inhibidors de fosfatases i quinases podrien aportar llum sobre aquestes incògnites. L'anàlisi de la seqüència de la proteïna mostra 7 llocs putatius de fosforilació, 4 per PKC i 3 per Casein quinasa 2; aquesta darrera ha estat implicada en la ruta de senyalització de l'activació d'HIF-1. En hipòxia també s'ha descrit l'activació de la fosfatasa PP1 [427], que actua sobre substrats específics, com pRb, de manera que Iba2 podria ser també una diana seva o d'alguna altra fosfatasa.

Els assajos d'immunohistoquímica demostren que Iba2 colocalitza amb l'actina en les ondulacions de membrana, de manera homòloga a Iba1, i que perd aquesta localització en resposta a hipòxia. Existeix un cas semblant descrit a la literatura: l'anòxia provoca la dissociació de la proteïna Ezrin del citoesquelet d'actina en cèl·lules renals afectades per una isquèmia, i la posterior desestabilització d'aquest, provocant la ruptura de l'estructura renal. A més, i anàlogament a Iba2, aquesta proteïna també està fosforilada en normòxia i desfosforilada en hipòxia [428]. Dades recents confirmen



la unió a actina d'Iba2: AQP2 (Aquaporin-2), canal d'aigua que regula l'homeostasi hídrica corporal, es transporta cap a membrana, i s'ha proposat que un macrocomplex proteic actua com a força motora d'aquest tràfic. Totes les proteïnes identificades en aquest complex tenen la propietat d'unir actina, i Iba2 forma part d'ell [429]. En relació amb AQP2, és interessant destacar que AQP1 té un paper prominent en la migració de les cèl·lules endotelials durant l'angiogènesi (promovent la formació de les ondulacions de membrana i els lamelipodis), i que la seva inhibició impedeix el creixement tumoral en ratolins. Així mateix, AQP4 està implicada en la migració de les cèl·lules de l'astroglia, que té lloc en resposta al dany cerebral provocat per una isquèmia o un tumor [430,431]. Per tant, suposant que Iba2 també participi en el transport d'AQP1 i/o AQP4, la seva inhibició farmacològica podria, hipotèticament, tenir activitat antiangiogènica i antitumoral.

Com s'ha comentat, Iba1, en la seva acció moduladora de la reordenació del citoesquelet d'actina, senyalitza via la GTPasa Rac (Figura 58). Iba2, anàlogament, podria interactuar amb alguna proteïna d'aquesta família. De fet, Rac s'activa en resposta a hipòxia ja als 30 min, coincidint amb el temps en que es dona la desfosforilació d'Iba2 detectada en aquest treball. Amb assajos d'immunoprecipitació, però, no s'aconseguí demostrar cap interacció entre Iba2 i RhoA, Rac1 o Cdc42 (no es mostren els resultats). Això, però, no exclou aquesta possibilitat, ja que de fet no precipità cap altra proteïna a part d'Iba2 (observat per tinció amb plata; no es mostra el resultat). Si la interacció d'Iba2 amb altres proteïnes és molt feble, és possible que les diferents condicions d'assaig testades fossin massa astringents, de manera que una millora en el protocol permetria obtenir noves dades. A més, en la detecció immunològica de les immunoprecipitacions només es testà la presència de RhoA, Rac1 i Cdc42, i podria donar-se el cas que Iba2 interaccionés amb algun altre membre de la família. RhoG, per exemple, i anàlogament a Rac1 (que coopera amb Iba1), també indueix la formació de lamelipodis i ondulacions de membrana. Per tant, potser Iba2 senyalitza via una d'aquestes altres proteïnes de la família.

Cal recordar, a més, que la reordenació del citoesquelet d'actina modulada per Iba1 és dependent de la concentració de calci. Els assajos d'unió a l'ió han mostrat que Iba2 és capaç d'interaccionar-hi, tot i que sembla que de manera molt feble (la banda observada és molt tènue), almenys en les condicions de l'assaig i en comparació amb el control positiu (calmodulina). Iba2 només té un motiu "EF hand" d'unió a calci (com ha mostrat l'anàlisi de la seqüència proteica), i potser una constant de dissociació elevada. En comparació amb Iba1, cal assenyalar que aquesta conté dos motius "EF hand" en la seva seqüència, però només un manté la capacitat d'unió a calci. El motiu funcionalment actiu és el mateix que s'ha conservat en Iba2 (es troben en la mateixa posició de la seqüència proteica), i per tant es pot suposar que aquesta regió té certa implicació en l'activitat de totes dues proteïnes. A través de les seves propietats d'unió a l'ió, per tant, Iba2 podria regular la reordenació del citoesquelet d'actina en cèl·lules de glioblastoma en resposta a estímuls com la hipòxia.

Les variacions en els nivells de calci, a més, modulen l'activitat d'HIF en hipòxia; aquesta és una propietat característica de cèl·lules excitable, com les neuronals, i per tant, Iba2, expressada en glioblastoma, podria tenir una funció molt específica en aquest cas. Per a analitzar aquesta possibilitat, s'estudiaren els efectes de la sobreexpressió d'Iba2 sobre l'estabilitat del factor de transcripció, i es comprovà que els nivells de proteïna HIF-1 $\alpha$  no quedaven alterats, independentment de l'estat d'oxigenació. Es podria donar el cas, alternativament, que Iba2 estigués implicada en el control de la seva activitat transcripcional, per exemple via Rho GTPases. Per a comprovar això, es podrien fer estudis amb el gen luciferasa controlat per HRE, i analitzar l'efecte de la sobreexpressió o inhibició d'Iba2 sobre la transcripció, tant en condicions de normòxia com d'hipòxia, junt amb un estudi dels efectes d'inhibidors de Rho GTPases.

Iba2 tampoc ha mostrat cap participació en processos com la proliferació, la viabilitat, l'adhesió o la migració de cèl·lules tumorals. Això no descarta completament que pugui estar implicada en la regulació d'algun d'aquests mecanismes, ja que els

assajos s'han fet només per sobreexpressió de la proteïna, no s'han estudiat les conseqüències de la seva inhibició. És possible que, si per a la funcionalitat d'Iba2 falta una modificació post-traducciona com la desfosforilació, un excés de la proteïna excedeixi les capacitats cel·lulars, per saturació de l'activitat enzimàtica corresponent, en aquest cas d'una fosfatasa. Potser per aquest motiu un excés de la proteïna no té cap efecte sobre les funcions cel·lulars. Caldria, doncs, analitzar l'altra opció, la inhibició d'Iba2. De fet, durant el decurs d'aquest treball, es posà a punt la tècnica d'interferència per siRNA (small interfering RNA)<sup>p</sup>. Tot i que sí s'aconseguí disminuir la quantitat de proteïna, aquesta inhibició no fou reproducible (en cada assaig els nivells foren diferents), de manera que disminuï la fiabilitat dels resultats. Per aquest motiu, queda pendent una millora del protocol, per a una aplicació en futurs assajos.

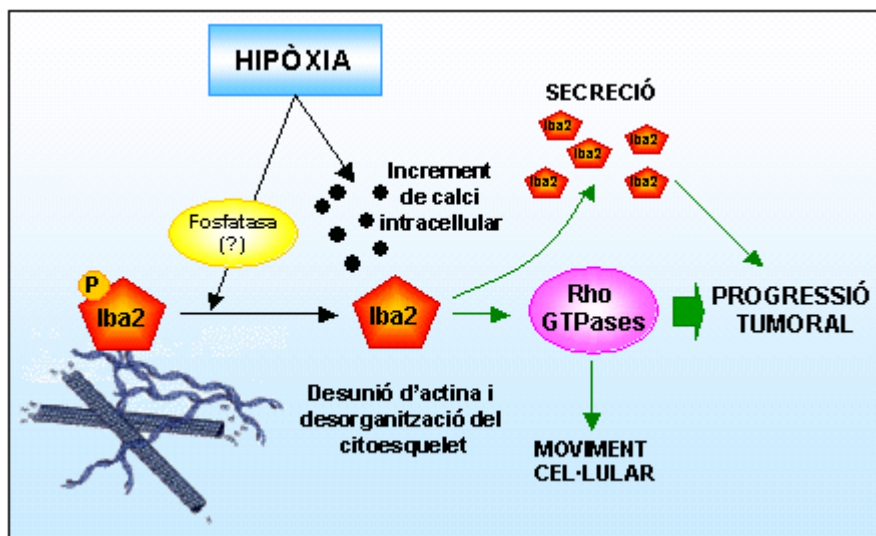
Una altra dada també fa intuir aquesta insensibilitat cel·lular a un excés d'Iba2. Com s'ha vist en els estudis de secreció a medi extracel·lular, la sobreexpressió de la proteïna en U373 MG no provoca diferències entre les cèl·lules control i les transfectades (totes secreten la mateixa quantitat, i només en condicions d'hipòxia). Addicionalment, la línia M21, que normalment no expressa nivells detectables de la proteïna, no la secreta en cap cas; això remarca també l'elevada especificitat d'aquesta ruta de senyalització en funció del tipus cel·lular. La secreció, limitada a condicions d'hipòxia, no s'havia descrit anteriorment per a cap membre de la família, i permet suggerir que Iba2 té també funcions extracel·lulars. Això obre la possibilitat de parlar d'un possible receptor per a la proteïna, bé en les mateixes cèl·lules de glioblastoma (senyalització autocrina), o en altres tipus cel·lulars (senyalització paracrina). És immediat pensar en les cèl·lules endotelials vasculares, que exhibeixen una elevada capacitat migratòria; tot i això, ni la incubació de HUVECs amb Iba2 recombinant, ni la sobreexpressió d'HA-Iba2 provocaren un increment en la migració (no es mostren els resultats).

---

<sup>p</sup> Els siRNAs promouen la degradació dels mRNAs complementaris a ells (en aquest cas el mRNA per a Iba2), i per tant eviten també la síntesi proteica.

Tot i que la sobreexpressió d'Iba2 no tingué efecte sobre cap dels processos estudiats, sí promogué la progressió tumoral en assajos *in vivo* amb cèl·lules U373 MG. De fet, s'observà una absència total de creixement tumoral de les cèl·lules control en comparació amb el desenvolupament de tumors que donaren les cèl·lules que sobreexpressaven HA-Iba2. Es desconeix el mecanisme, que requerirà posteriors estudis. Les cèl·lules M21, en canvi, no quedaren afectades per la presència d'Iba2. Per tant, en una línia que normalment no expressa la proteïna, Iba2 no sembla tenir cap efecte.

En quant a un hipotètic mecanisme d'acció, es podria especular que Iba2 fos responsable, directament o indirecta, de la desestabilització del citoesquelet d'actina en resposta a hipòxia, implicant en aquest cas també a la família de Rho GTPases, i promovent la progressió tumoral. Tot i que no s'ha demostrat la seva participació en els processos de migració, cal considerar que els glioblastomes són tumors molt invasius, i que l'activitat d'Iba2 sobre el citoesquelet podria ser molt beneficiosa. En la figura 62 es mostra una possible via de senyalització, basada en les dades experimentals obtingudes i en la seva homologia amb Iba1; s'ha de tenir en compte, però, que són necessaris encara molts assajos per a confirmar aquesta hipòtesi.



**Figura 62.** Hipòtesi sobre la senyalització d'Iba2 en resposta a hipòxia.

Cal remarcar que aquesta via proposada és probablement molt específica d'uns pocs tipus cel·lulars, donada la limitada expressió d'Iba2. Per exemple, s'ha comentat com pVHL se sobreexpressa en cèl·lules tumorals sotmeses a hipòxia per a evitar la desestructuració del citoesquelet, però que aquest mecanisme no s'observa en glioblastoma; potser això és indicatiu de que la via de resposta a hipòxia és diferent en aquestes cèl·lules. També s'ha de tenir en compte, per exemple, que Iba2 ha mostrat elevada expressió en ronyó; en carcinoma renal, una mutació inactivant es dona freqüentment sobre la proteïna pVHL, i per tant aquesta activitat protectora del citoesquelet tampoc estaria present; un cop més, la via de senyalització d'Iba2 podria ser una alternativa en aquests casos. Caldria estudiar també si la funció d'Iba2 és redundant o complementària a la d'Iba1, ja que aquesta també s'ha trobat sobreexpressada en gliomes.

Analitzats tots els resultats, i considerant totes les hipòtesis, es pot proposar Iba2 com una possible diana farmacològica, tot i que l'elevat desconeixement de la seva funció fa preveure que el seu estudi és un projecte a molt llarg plaç.

