



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Mecanismes moleculars i efecte terapèutic
antiangiogènec del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en un
model ortotòpic de càncer de mama**

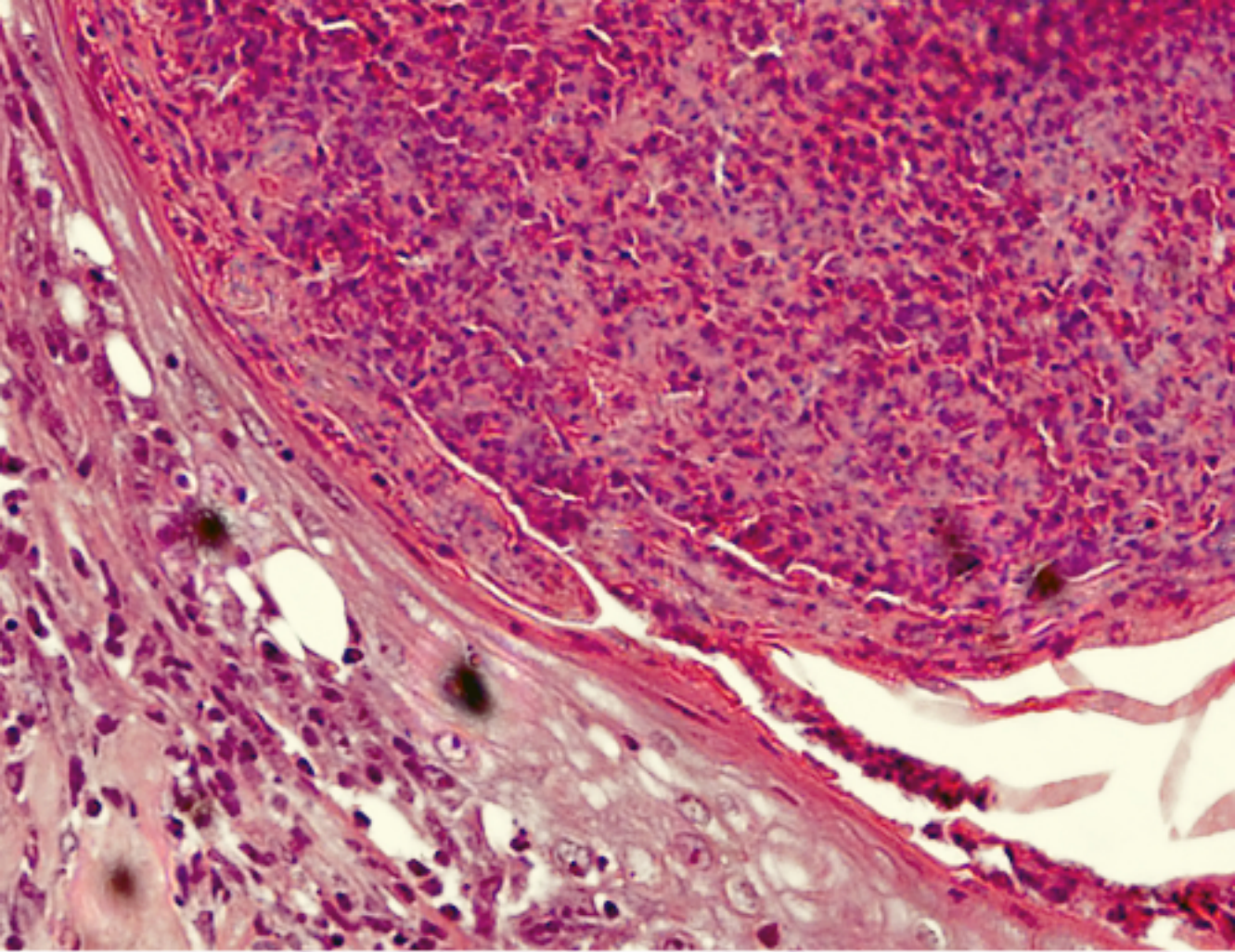
Sònia Solé Sánchez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0. Spain License.

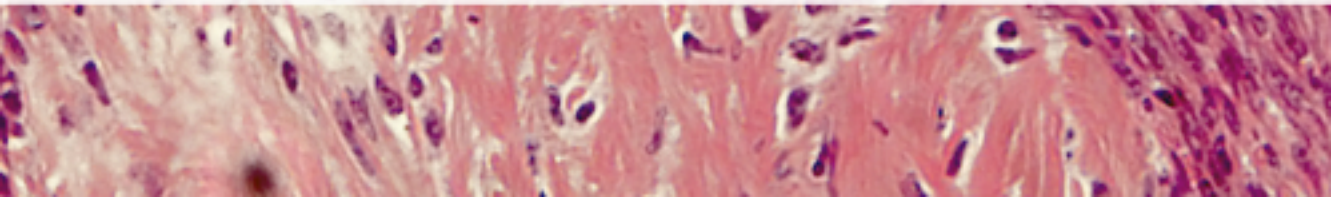


Tesi Doctoral

Mecanismes moleculars i efecte terapèutic
antiangiogènic del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en un
model ortotòpic de càncer de mama

Sònia Solé Sánchez

Barcelona, 2015





Universitat de Barcelona



Memòria de Tesi realitzada a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Mecanismes moleculars i efecte terapèutic antiangiogènec del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en un model ortotòpic de càncer de mama

Programa de Doctorat en Biomedicina
Universitat de Barcelona

Bienni 2012-2013

LABORATORI DE GENÈTICA MOLECULAR
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Presentada per:
SÒNIA SOLÉ SÁNCHEZ

Directora/Tutora:

Doctoranda:

Mercè Pérez Riba
Lab. Genètica Molecular
IDIBELL

Sònia Solé Sánchez

Barcelona, setembre 2015



Universitat de Barcelona



Memòria de Tesi realitzada a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Mecanismes moleculars i efecte terapèutic antiangiogènec del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en un model ortotòpic de càncer de mama

Programa de Doctorat en Biomedicina
Universitat de Barcelona

Bienni 2012-2013

LABORATORI DE GENÈTICA MOLECULAR
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Presentada per:
SÒNIA SOLÉ SÁNCHEZ

Directora/Tutora:

Doctoranda:

Mercè Pérez Riba
Lab. Genètica Molecular
IDIBELL

Sònia Solé Sánchez

Barcelona, setembre 2015

Per a tu,

AGRAÏMENTS

“Com si d’un partit es tractés, ens entrenem molt, moltíssim, per a posar-nos en forma i aprendre el millor possible totes les tècniques i tàctiques que necessitem per a guanyar un resultat experimental en cada tir, o per a intentar-ho “n” vegades fins que acabi sumant al marcador.

Com si d’un partit es tractés, notem la pressió del rellotge, la del públic, la de l’entrenador, però sobretot la que ens posem a nosaltres mateixos i que va sempre a favor de l’equip rival [...] Tot i algunes lesions, puc dir ben alt que he jugat el meu partit, que he lluitat per la pilota, i que he acabat formant part de l’equip guanyador. Agraeixo als qui m’han acompanyat fins a la pista, a qui m’ha animat des de la grada, a l’entrenadora que m’ha dit què fer però sobretot a la que m’ha explicat el per què. També a vosaltres, els qui heu format part, en algun moment, del meu equip, i al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte per haver-me proporcionat un vestidor FPU on poder-me posar l’equipació, canviar-me les vambes i sortir a competir. Gràcies.”

Diuen que fer-se gran és un creixement continu i que es basa en conèixer-se a un mateix en totes les situacions possibles. Aquesta tesi, per mi, simbolitza a parts iguals un creixement personal agressiu i un aprenentatge científic que ha anat accelerant des que va començar. Sí, m’he fet una mica gran.

En primer lloc i per ordre cronològic, vull agrair al Dr. Juan I. Aróstegui, per a fer créixer la meva curiositat en el món de la recerca, per les llargues estones que es va quedar amb mi després de la seva jornada laboral tan sols per a explicar-me experiments i presentar-me el món de la investigació des del seu punt de vista. Però, sobretot, per seguir encara present en la meva trajectòria científica després de tants anys.

En segon lloc vull incloure un agraïment agredolç a la Dra. Purificación Muñoz per aquella trucada que confirmava la meva incorporació al seu grup d’investigació, probablement un dels millors dies que puc recordar. Gràcies a ella vaig conèixer persones magnífiques i essencials com *la Crustaci* i els seu exèrcit de *nens de bigotis llargs i cua rosada*, entre molts altres companys de departament (Octavio, Manolo, "la Griega", Sonia, Olga, Diana, Toni, Àlex, Marta, Pasqualle). Gràcies als postdocs nòrdics (i no tan nòrdics) per a venir amb mi a *fer quatre tirs* entre incubació i incubació, especialment al Max.

També vull donar les gràcies a la Dra. Mercè Pérez per obrir-me les portes del seu lab de bat a bat sense prejudicis. Sense ella hagués sigut molt difícil, si no impossible, firmar una tesi doctoral.

Álvaro, què t'he de dir? Hem compartit moltes coses amb poc temps: pronoms febles, classes improvisades d'*step*, *culebrons* de cap de setmana, moments d'arròs covat i d' *in fusions*... sera difícil oblidar-me'n! Gràcies també per ajudar-me en l'últim *sprint* de la tesi, ha sigut molt important per mi. Gràcies Eva, per a ser tant eficient en resoldre imprevistos i, juntament amb el Sergio, per a ser el papi i la mami del lab. Gràcies a tots tres per ensenyar-me tantes tècniques i per estar allà quan em feia falta.

M'agradaria donar les gràcies a la gent de "*La Comarca*", amb especial *carinyo* a l'entrenadora de vòlei, la Montse, amb qui he pogut intercanviar tant moments divertits d'esport com converses serioses. El Jordi i l'Andreu, les torres bessones del lab, per arrancar-me sempre un somriure, tant al costat de l'estabulari com a l'altra banda de l'Atlàntic. Al Sanjib, l'indi més poc indi que he conegut mai, per a escoltar-me quan tenia massa coses al cap i poc temps per pensar-hi. A la Yanani, la primera índia que he tingut el plaer de conèixer i per *lo dolça* que és. També vull donar les gràcies a l'Antònia i al Javi, per a obrir-se a mi i tractar-me com ho han fet.

Vull mencionar també al personal de seguretat (Jordi, Ingrid, Carlos) i a la *mama-Noël* per agrair-los les visites rutinàries en les hores bruixes, amb alguns sobresalts que em mantenien, per força, desperta.

També vull agrair al personal de la cafeteria (Xavi, Laura, Fabio, Carlos, Miguel, Enric) per aprendre's el meu nom al tercer dia, servir-me cafès somrients, entrepans d'emergència i menús *in extremis* en els dies en què menjar a l'hora que toca comportava la descoordinació dels experiments.

Gràcies també al Dr. Oriol Casanovas, Dr. Jordi Vilardell, Dra. Àngels Fabra, Dra. Mar Iglesias, Dr. August Vidal, Dr. Fernando Aguado, Dr. Ramon Messeguer, Dra. Agnès Figueras, Dra. Anjana Rao i a BCN Peptides S.A i AVIVA pel seu consell i/o col·laboració en la part experimental presentada en aquest treball.

No puc escriure agraïments sense pensar en les persones més importants de totes, les que aguanten cada dia els efectes secundaris d'una tesi doctoral: les alegries, les motivacions, la il·lusió, l'ambició però també les frustracions, les preocupacions, els neguits, les presses i decepcions. Per ells també hi hauria d'haver un reconeixement oficial, però fins que no hi sigui seguirem escrivint sobre ells en tots els agraïments de totes les tesis, com si això fos suficient! Gràcies Papa, Mama i *Tita p'tita* per estar amb mi de forma incondicional. Sé que durant massa temps us vaig mantenir apartats de la llista de prioritats; és un error que he pagat amb escreix però n'he après, us ho asseguro. Gràcies mama per a desviure't pels teus *cors petits* i exigir-nos sempre més en els estudis, cada any ha sigut més dur que l'anterior, però, com algú va escriure... " tu això ja ho sabies". Gràcies Papa per a fer-me veure la importància de l'aprenentatge i mostrar-me el sacrifici com un efecte secundari; és el combustible que m'has ensenyat a cremar. Gràcies *Tita*, per a ser qui realment entén els altibaixos de la recerca i per dir-me les coses com les penses, ni que em costi acceptar-les.

Seguim sent les bessones més diferents del món però ens complementem la "Mar" de bé. Sóc qui sóc, i on sóc, gràcies a vosaltres.

Gràcies a tu també, Cai, per a compartir quasi un terç de la teva vida amb mi i donar-me aquell recolzament indispensable per a seguir endavant. Per les abraçades de "no entenc massa què et passa però sé que ho necessites" i per acceptar la meva dedicació a la tesi, tot i essent el "nosaltres" el més perjudicat.

Durant aquests anys de doctorat, no recordo festes boges o sopars que acaben amb un cafè amb llet, però sí que tinc una història a cada racó del Duran i Reynals. En una etapa o en una altra, per uns experiments o per uns altres... Fins i tot ara, després de més d'un any sense passejar-me pels passadissos, seria capaç de dibuixar-lo amb els ulls tancats. He tingut moments molt bons, bons, no tant bons, dolents i els que preferiria no recordar, però cada un d'ells m'ha donat una visió de la ciència diferent i tots formen part d'aquest doctorat únic que, en breu, hauré acabat.

Per últim i no per això el menys important, gràcies Gerard, per capgirar el meu món, per fer punxa als llapis de colors, donar-me un full en blanc i assegurar-me a pintar amb mi un futur... sense tesi!

Gràcies

I. LLISTAT DE TAULES I FIGURES

II. LLISTAT D'ABREVIATURES

1.INTRODUCCIÓ.....p.1

1.1. EL CÀNCERp. 2

- 1.1.1. Inducció de l'angiogènesi tumoral.....p. 3
- 1.1.2. Evasió dels inhibidors de creixement.....p. 9
- 1.1.3. Senyalització proliferativa crònica sostinguda.....p. 10
- 1.1.4. Capacitat de proliferació infinita.....p. 11
- 1.1.5. Resistència a la mort cel·lular.....p. 11
- 1.1.6. Capacitat de migració, d'invasió i metàstasi.....p. 12
 - 1.1.6.1. Migració.....p.13
 - 1.1.6.2. Invasió.....p.14
 - 1.1.6.3. Metàstasi.....p.16
- 1.1.7. Inflamació sostinguda.....p. 20
 - 1.1.7.1. Microambient tumoral.....p.21
 - 1.1.7.2. Macròfags associats a tumor o TAM.....p.22
 - 1.1.7.3. Polimorfonucleats o PMNs.....p.23
- 1.1.8. Evasió de la resposta immunitària.....p.24
- 1.1.9. Reprogramació del metabolisme energètic.....p.25

1.2. CÀNCER DE MAMA.....p. 26

- 1.2.1. Càncer de mama Triple Negatiu (TNBC).....p. 28
- 1.2.2. Via de senyalització de Calcineurina-NFATc.....p.29
 - 1.2.2.1. Calcineurina.....p.31
 - 1.2.2.2. NFATc.....p.36
 - 1.2.2.2.1. Interacció Cn-NFATc.....p.39
 - 1.2.2.2.2.Regulació dels NFATcp.42
 - 1.2.2.2.3. NFAT i càncer.....p.43
 - 1.2.2.3. Reguladors exògens de la via de senyalització Cn-NFATcp.45
 - 1.2.2.3.1. CsA, FK506 i càncer.....p.48
 - 1.2.2.4. Reguladors endògens de la via de senyalització Cn-NFATcp.49
 - 1.2.2.4.1. La família de les RCANsp.49

2.OBJECTIUS.....p.56

3.MATERIALS I MÈTODES.....p.60

3.1. PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DE BACTERIS.....p. 62

- 3.1.1. Soques bacterianes.....p.62
 - 3.1.1.1. Genotip de la soca E. coli DH5α.....p.62
- 3.1.2. Preparació dels bacteris quimiocompetents DH5α.....p.62

ÍNDIX

3.1.3. Transformació per xoc tèrmic de bacteris quimiocompetents DH5 α	p.63
3.1.4. Producció de proteïnes heteròlogues en bactèries.	p.63
3.1.5. Cribratge dels clons bacterians per a la producció de proteïnes.....	p.64
3.1.6. Producció de proteïnes recombinants a gran escala.....	p.65
3.1.7. Purificació de proteïnes fusionades a GST.....	p.65
3.1.8. Emmagatzematge de bacteris en estocs de glicerol.....	p.66
3.1.9. Amplificació i purificació de plasmidis de DNA.....	p.67
3.1.9.1. HA-NFAT1(1-460)-EGFP.....	p.67
3.1.9.2. pGEX-6P-1.....	p.67
3.1.9.3. CMV-Renilla i pRLNull.....	p.68
3.2. PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DE LENTIVIRUS.....	p. 68
3.2.1. Sistemes d'empaquetament de lentiviris de segona generació.....	p.68
3.2.1.1. Vectors de transferència.....	p.69
3.2.1.1.1. pWPI-EGFP-IRES-HA.....	p.69
3.2.1.1.2. pWPT-EGFP.....	p.70
3.2.1.2. Vector d'empaquetament.....	p.70
3.2.1.3. Vector de l'envolta.....	p.71
3.2.2. Producció i purificació de lentivirus.....	p.71
3.2.3. Titulació de l'estoc de lentivirus.....	p.73
3.3. PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DEL DNA.....	p. 75
3.3.1. Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR).....	p.75
3.3.1.1. Amplificació de DNA per PCR per a clonatges.....	p.75
3.3.1.2. PCR de cribratge de presència de DNA específic en colònies bacterianes.....	p.76
3.3.1.3. PCR de seqüenciació del DNA.....	p.76
3.3.1.4. PCR de genotipació.....	p.77
3.3.1.5. PCR a temps real per a la determinació dels nivells de mRNA.....	p.78
3.3.2. Electroforesi del DNA.....	p.82
3.3.2.1. Gels d'agarosa.....	p.82
3.3.3. Quantificació del DNA.....	p.82
3.3.4. Digestió amb enzims de restricció.....	p.83
3.3.5. Purificació del fragment del DNA en gel d'agarosa.	p.84
3.3.6. Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina de gamba.....	p.84
3.3.7. Reacció de lligació de DNA.....	p.84
3.3.8. PCR de cribratge de bacteris portadors d'insert del DNA	
3.3.9. Seqüenciació del DNA.....	p.85

3.4. PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES.....	p. 86
3.4.1. Preparació d'extractes totals de cèl·lules eucariotes.....	p.86
3.4.1.1. A partir de cultius de línies cèl·lulars humanes.....	p.86
3.4.1.2. A partir de teixits de mamífer	p.87
3.4.2. Quantificació de proteïna mitjançant l'assaig colorimètric de l'àcid bicinconínic	p.88
3.4.3. Gels d'electroforesi SDS-PAGE desnaturalitzants.....	p.88
3.4.3.1. Gels SDS-PAGE de gradient	p.89
3.4.4. Detecció d'interacció de proteïnes per Pull down.....	p.91
3.4.5. Transferència de western	p.92
3.4.6. Detecció de proteïnes en les membranes de nitrocel·lulosa o PVDF	p.93
3.4.6.1. Tinció amb Ponceau-S	p.93
3.4.6.2. Immunodetecció de proteïnes	p.93
3.4.7. Immunodetecció de proteïnes en mostres de teixit	p.95
3.4.7.1. Immunodetecció de proteïnes per immunohistoquímica i immunofluorescència en teixit inclòs en parafina.....	p.95
3.4.7.2. Immunodetecció de proteïnes en mostres de teixit congelades incloses en medi OCT per IHC o IF.....	p.99
3.4.8. Immunodetecció de proteïnes en cèl·lules en cultiu: Immunocitofluorescència(ICF)	p.101
3.4.9. Anticossos anti-NFATc	p.103
3.5. CULTIU CEL·LULAR I MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES DE MAMÍFER.....	p. 103
3.5.1. Cultiu i manteniment de línies cel·lulars humanes.....	p.104
3.5.2. Estimulació cel·lular per a l'activació de la via Cn-NFAT.p.104	
3.5.3. Criopreservació de les cèl·lules de mamífer.....	p.105
3.5.4. Test de micoplasma en línies cel·lulars eucariotes.....	p.105
3.5.5. Transfecció de cèl·lules de mamífer	p.106
3.5.6. Transducció de cultius de cèl·lules eucariotes amb partícules lentivirals.....	p.108
3.5.7. Assaig de l'activitat transcripcional dels NFATc mitjançant el gen reporter de la luciferasa.....	p.108
3.5.8. Assajos de tancament de ferides i migració cel·lular (wound healing).....	p.110
3.5.9. Assaig de creixement cel·lular independent d'ancoratge	p.111
3.6. MANIPULACIÓ D'ANIMALS.....	p. 113
3.6.1. Models de ratolí.....	p.113
3.6.1.1. Model de ratolí transgènic de sobreproducció de la proteïna RCAN1 humana, (PACC77tghRCAN1).....	p.113

ÍNDIX

3.6.1.2. Genotipat del model de ratolí tghRCAN1..	p.113
3.6.1.3. Ratolins atímics BALB/c (nude mice).....	p.114
3.6.1.4. Model de xenograft de càncer de mama humà	p.114
3.6.1.5. Transducció de cèl·lules MDA-MB-231 amb lentivirus.....	p.115
3.6.1.6. Injecció de la línia cel·lular MDA-MB-231..	p.116
3.6.1.7. Mesura dels tumors.....	p.116
3.6.1.8. Assaig de metàstasi experimental per injecció de cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb RCAN3 a la vena de la cua dels ratolins BALB/c immunodeprimits ..	p.116
3.6.2. Sacrifici dels animals i extracció de mostres.....	p.117
3.6.3. Manteniment de la colònia de ratolins.....	p.118
3.7. PROTOCOLS ESTÀNDARDS D'HISTOLOGIA.....	p. 119
3.7.1. Inclusió de les mostres en parafina.....	p.119
3.7.2. Inclusió i congelació de mostres en OCT.....	p.120
3.7.3. Detecció d'apoptosi amb la tècnica de túnel.....	p.121
3.8. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	p. 123
3.9. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS DE LABORATORI.....	p. 124
4. RESULTATS.....	p. 128
4.1. RCAN3 INHIBEIX LA TRANSLOCACIÓ NUCLEAR DE NFATc2 ENDÒGENA EN LA LÍNIA CEL·LULAR HUMANA DE CÀNCER DE MAMA MDA-MB- 231.....	p. 132
4.1.1. Caracterització d'un anticòs anti-NFATc2 per a ICF.....	p.132
4.1.2. RCAN3 inhibeix la translocació nuclear de NFATc2 en cèl·lules TNBC MDA-MB-231	p.135
4.2. RCAN3 INHIBEIX L'ACTIVACIÓ DELS NFATc EN CÈL·LULES MDA-MB-231 <i>in vitro</i>	p. 137
4.3. LA SOBREPRODUCCIÓ DE RCAN3 INHIBEIX L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE GENS DEPENDENTS DE NFATc COM COX-2 EN MDA-MB-231 <i>in vitro</i>	p. 140.
4.4. LA SOBREPRODUCCIÓ DE RCAN3 NO SEMBLA AFECTAR LA CAPACITAT DE MIGRACIÓ DE LA LÍNIA CEL·LULAR DE CÀNCER DE MAMA HUMÀ MDA- MB-231.....	p.142

- 4.5. RCAN3 NO SEMBLA AFECTAR LA CAPACITAT DE CREIXEMENT INDEPENDENT D'ANCORATGE EN CÈL·LULES DE LA LÍNIA MDA-MB-231 *in vitro*.....p. 146**
- 4.6. LA SOBREPDUCCIÓ DE RCAN3 INHIBEIX LA PROGRESSIÓ TUMORAL EN TUMORS ORTOTÒPICS DE CÀNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIU HUMÀ MTJANÇANT LA INHIBICIÓ DE LA VA DE SENYALITZACIÓ Cn-NFATc ..p.148**
- 4.6.1. Els tumors ortotòpics de càncer de mama triple negatiu humà que sobreproduïxen RCAN3 presenten una disminució significativa en el pes i el volum tumoral respecte els tumors control.....p.149
- 4.6.2. La sobreproducció de RCAN3 en cèl·lules tumorals inhibeix la translocació dels NFATc a nucli *in vivo*p.151
- 4.6.3. La sobreproducció de RCAN3 no modula l'expressió gènica de *NFATc2* en cèl·lules MDA-MB-231 ni MDA-MB-468 *in vitro*p.155
- 4.6.4. L'expressió gènica regulada pels NFATc està inhibida en els tumors RCAN3p.157
- 4.6.5. Els tumors RCAN3 presenten un increment de la proliferació cel·lular i de l'apoptosi però no afecten la necrosi tumoralp.159
- 4.6.6. La sobreproducció de RCAN3 inhibeix l'angiogènesi tumoral *in vivo*.....p.164
- 4.6.7. La sobreproducció de RCAN3 disminueix la infiltració tumoral de cèl·lules polimorfonuclears inflamatòries en els tumors ortotòpics TNBCp.167
- 4.6.8. RCAN3 no sembla afectar la transició mesenquimo-epitelial (MET) en tumors ortotòpics TNBC *in vivo*.....p.168
- 4.6.9. Els tumors RCAN3 presenten una disminució dels marcadors premetastàtics ID1 i/o S100A4p.173
- 4.7. EL PÈPTID DERIVAT DE RCAN3 QUE INCLOU EL SEU MOTIU PxlxIT, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, INHIBEIX LA SENYALITZACIÓ DE Cn-NFATc *in vitro*.....p. 176**
- 4.7.1. La sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ disminueix l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*.....p.178
- 4.7.2. El pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix la producció de proteïnes codificades per gens regulats pels NFATc com *COX-2* en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*.....p.182
- 4.7.3. La inhibició de la via de senyalització de Cn-NFATc incrementa la migració cel·lular en la línia cel·lular de càncer de mama humà MDA-MB-231 *in vitro*p.183
- 4.8. EFECTE ANTITUMORAL DEL PÈPTID R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ EN TUMORS ORTOTÒPICS DE TNBC *in vivo*p. 185**

ÍNDEX

4.8.1. Els tumors EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten un menor volum tumoral que els tumors EGFP	p.185
4.8.2. Els tumors EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una major inhibició de la translocació nuclear de NFATc que els tumors EGFP	p.187
4.8.3. La sobreproducció del pèptid EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ no altera l'expressió gènica de <i>NFATc2</i> en cèl·lules MDa-MB-231 <i>in vitro</i>	p.189
4.8.4. La sobreproducció del pèptid EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix l'expressió gènica de <i>IL-8</i> i <i>CSF-2</i> i la producció de proteïna COX-2 i IL-8 en tumors ortotòpics TNBC <i>in vivo</i>	p.190
4.8.5. Els tumors EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten menys proliferació i un increment en l'apoptosi cel·lular respecte els tumors EGFP, però no s'observen diferències en la necrosi tumoral	p.192
4.8.6. L'angiogènesi tumoral està inhibida en els tumors EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰	p.196
4.8.7. La sobreproducció del pèptid R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ disminueix la presència de cèl·lules polimorfonucleades (PMN) en l'infiltrat tumoral	p.197
4.8.8. EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ no afecta la transició epitelio-mesenquimal (EMT) en tumors ortotòpics TNBC humans	p.200
4.8.9. El pèptid EGFP-R3 ¹⁷⁸⁻²¹⁰ causa una disminució dels marcadors premetastàtics ID1 i S100A4 <i>in vivo</i>	p.201
4.9. TERÀPIA PROTEICA ANTITUMORAL AMB EL PÈPTID R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ EN TUMORS ORTOTÒPICS TNBC	p. 203
4.9.1. Efecte dels pèptids MP1 i MP2 en l'activació transcripcional dels NFATc en cèl·lules MDA-MB 231 <i>in vitro</i>	p.203
4.9.2. El tractament amb pèptid MP1 o MP2 inhibeix l'angiogènesi en els tumors ortotòpics TNBC humans ja formats.....	p.207
4.9.3. El tractament tumoral amb els pèptids MP1 i MP2 inhibeix la infiltració de cèl·lules polimorfonucleades en els tumors ortotòpics TNBC humans.....	p.210
5.DISCUSSIÓ.....	p.214
6.CONCLUSIONS.....	p.240
7.ANEX.....	p.244
7.1. ARTICLE 1.....	p. 246
7.2. ARTICLE 2.....	p. 248
8. REFERÈNCIES.....	p.250

I. LLISTAT DE TAULES I FIGURES

Introducció

- Figura 1.** Característiques pròpies del Càncer.
- Figura 2.** Models d'angiogènesi tumoral.
- Figura 3.** Processos pels quals passa una cèl·lula tumoral des del tumor primari fins a la formació de la metàstasi en un òrgan secundari
- Figura 4.** La via de senyalització cel·lular de Cn-NFATc i la seva regulació
- Figura 5.** Estructura de la Cn
- Figura 6.** Esquema de les proteïnes NFATc basat en NFATc1
- Figura 7.** Conservació dels motius descrits dels NFATcs d'unió a Cn
- Figura 8.** Estructura de la Calcineurina
- Figura 9.** Els pèptids PxlXIT i LxVP s'uneixen a epítops solapats en la CNA
- Figura 10.** Esquema de l'estructura terciària dels complexos ciclofilines/CsA/Cn (A) i FKBP/FK506/Cn
- Figura 11.** Comparació entre les estructures gèniques dels membres de la família RCAN humana
- Figura 12.** Estructura gènica del gen RCAN3 humà, transcrits i isoformes de la proteïna.
- Figura 13.** Representació esquemàtica dels motius conservats en les proteïnes RCAN de l'Eukària
- Taula 1.** Classificació del càncer de mama en els 4 subtipus segons criteris moleculars i la prevalença aproximada a nivell mundial
- Taula 2.** Substrats de la Calcineurina i funcions corresponents en diferents processos cel·lulars
- Taula 3.** Resum dels fenotips observats en estudis funcionals en els quals es va delectonar un o més components de la família dels NFATcs

Materials i mètodes

- Taula 1.** Encebadors i sondes UPL usades en la qPCR a temps real.
- Taula 2.** Composició SDS-PAGE de gradient al 3-15 %.
- Taula 3.** Anticossos usats en els experiments de transferència de western per a la detecció de proteïnes a partir d'extractes cel·lulars tant de cultiu cel·lular com de teixit tumoral
- Taula 4.** Llistat d'anticossos usats sobre teixit parafinat. S'inclouen tant els anticossos usats en tècniques d'IHC com de IF o TUNEL.
- Taula 5.** Llistat d'anticossos usats sobre teixit inclòs en OCT
- Taula 6.** Encebadors usats pel test de detecció de DNA de micoplasma.
- Table 7.** Llistat d'encebadors per a la genotipació del model de ratolí que sobreexpressa la proteïna RCAN1 humana C57 Bl/6 PACC77tg RCAN1.

Resultats

- Figura 1.** La proteïna RCAN3 interacciona marcadament amb Cn però la proteïna mutant RCAN3 AAQ ho fa molt dèbilment.
- Figura 2.** L'estimulació de la via Cn-NFAT amb Ionomicina i calci provoquen la translocació de NFATc2 de ratolí en cèl·lules HEK 293T.
- Figura 3.** L'anticòs anti-NFATc2 humà detecta de forma específica la proteïna NFATc2 humana endògena present en cèl·lules HEK 293T *in vitro*.
- Figura 4.** La sobreproducció de RCAN3, però no la de RCAN3 AAQ, inhibeix la translocació de NFATc2 endogen de citosol a nucli
- Figura 5.** La sobreproducció de RCAN3 inhibeix l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules de TNBC humanes MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*
- Figura 6.** RCAN3 inhibeix la producció de proteïna COX-2 de forma dosi-dependent en cèl·lules MDA-MB-231 TNBC *in vitro*.
- Figura 7.** La sobreproducció de RCAN3 no sembla afectar la capacitat de migració de les cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*.
- Figura 8.** Efecte de RCAN3 sobre la migració de cèl·lules MDA-MB-231 mitjançant l'assaig de formació de colònies en agar tou.
- Figura 9.** La sobreproducció de RCAN3 en cèl·lules TNBC MDA-MB-231 inhibeix marcadament el creixement de tumors ortotòpics de TNBC *in vivo*.
- Figura 10.** La sobreproducció de RCAN3 en les cèl·lules tumorals produeix una reducció marcada dels nivells proteics de NFATc2 i de manera focalitzada la inhibició de la translocació nuclear de NFATc2
- Figura 11.** L'expressió gènica de NFATc2 no està regulada per RCAN3 en cultius de cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468.
- Figura 12.** La sobreproducció de RCAN3 en tumors ortotòpics disminueix significativament l'expressió gènica de gens dependents de NFATc com *IL-8* i *CSF2* així com els nivells de proteïna COX-2 i *IL-8*.
- Figura 13.** La sobreproducció de RCAN3 disminueix la proliferació de les cèl·lules tumorals *in vivo*.
- figura 14.** Els tumors RCAN3 presenten una reducció marcada de l'apoptosi cel·lular respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ mentre que la necrosi cel·lular és similar en tots els casos.
- Figura 15.** RCAN3 inhibeix l'angiogènesi tumoral en els tumors RCAN3
- Figura 16.** RCAN3 bloqueja de forma significativa la infiltració de cèl·lules polimorfonucleades en tumors RCAN3 en comparació amb els tumors EGFP i RCAN3 AAQ.
- Figura 17.** La inhibició de la via de Cn-NFATc disminueix la presència de TAMs en la massa tumoral.
- Figura 18.** RCAN3 no sembla afectar la transició mesenquimo-epitelial en els tumors ortotòpics RCAN3 de TNBC humans.
- Figura 19.** Els tumors RCAN3 presenten una disminució significativa de la producció dels marcadors metastàtics ID1 i S100A4 respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ

- Figura 20** Conservació de la seqüència del pèptid CIC de les proteïnes RCAN humanes.
- Figura 21.** La sobreproducció de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ afecta la translocació dels NFATc a nucli en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*.
- Figura 22.** El pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules de TNBC humanes MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*.
- Figura 23.** La sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix la producció de COX-2 en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*
- Figura 24.** La sobreproducció de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ incrementa la migació de cèl·lules MDA-MB-231
- Figura 25.** Els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten un menor volum tumoral que els tumors EGFP control.
- Figura 26.** Els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ produeixen una disminució marcada de l'abundància de la proteïna NFATc2 i de manera focalitzada una inhibició de la translocació nuclear de NFATc2 respecte els tumors EGFP control.
- Figura 27.** La producció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no altera l'expressió gènica de NFATc2 en cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*.
- Figura 28.** R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix l'expressió gènica de IL-8 i CSF2 i la producció de les proteïnes IL-8 i COX-2 en tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.
- Figura 29.** Els tumors que sobreproduïen R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una menor proliferació *in vivo*.
- Figura 30.** EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ incrementa l'apoptosi però no la necrosi tumoral en els tumors ortotòpics TNBC R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ humans.
- Figura 31.** L'angiogènesi està inhibida en els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.
- Figura 32.** La infiltració de PMN és pràcticament absent en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en comparació amb els tumors EGFP.
- Figura 33.** La sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no altera la presència de TAMs en la massa tumoral.
- Figura 34.** Els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no semblen alterar el fenotip mesenquimal cel·lular observat en els tumors EGFP.
- Figura 35.** Els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ tenen una producció de marcadors metastàtics com ID1 i S100A4 molt inferior a la dels tumors EGFP.
- Figura 36.** El tractament amb els pèptids MP1 i MP2 inhibeix l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*
- Figura 37.** L'administració dels pèptids MP1 i MP2 per injecció subcutània peritumoral no afecta al creixement dels tumors ortotòpics TNBC humans ja formats.
- Figura 38.** El tractament anti-tumoral amb els pèptids MP1 o MP2 inhibeix l'angiogènesi tumoral *in vivo*.
- Figura 39.** La teràpia peptídica amb MP1 i MP2 inhibeix la infiltració de PMN en el micorambient tumoral

II. LLISTAT D'ABREVIATURES

AKAP79 Proteïna d'ancoratge 79	HIF Factor d'hipòxia induïble
AP1 Activador protein 1	HPF Camp de gran augment
BSA Albúmina sèrica bovina	HRP Peroxidasa de rave
Ca²⁺ Calci	ICF Immunocitofluorescència
Cabin 1 Proteïna d'unió a Cn 1	ID1 Ihibidor 1 de la proteïna d'unió a DNA
CaM Calmodulina	IF Immunofluorescència
cDNA àcid desoxiribonucleic complementari	IHC Immunohistoquímica
cfu Unitats formadores de colònies	Io ionomicina
Cm^R Resistència al cloramfenicol	IL-8 interleuquina-8
CMV Citomegalovirus	INF-α interferó- α
Cn Calcineurina	kb quilobase
CnA subunitat catalítica de la calcineurina	kDa quiloDalton
CnB subunitat reguladora de la calcineurina	MAPK quinases activades per mitògens
COX-2 Ciclooxigenasa-2	min minut
CsA Ciclosporina A	MMPs Metaloproteïnases de la matriu extracel·lular
CSF2 <i>colony stimulating factor2</i>	MOI Molècules infectives
°C Graus centígrads	mRNA àcid ribonucleic missatge
DAB <i>3,3'-Diaminobenzidine</i>	NFATc Factor nuclear de cèl·lules T activades
DAPI <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	NLS Senyal de localització nuclear
DNA àcid desociribonucleic	OCT Temperatura de tall òptima
DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	OD Densitat òptica
DMSO <i>Dimetil sulfòxid</i>	o/n tota la nit
Dox Doxiciclina	pb parells de bases
ECM matriu extracel·lular	PDGF <i>Factor de creixement derivat de plaquetes</i>
EGFP proteïna verda fluorescent (més intensa)	PFA Paraformaldehid
EGFR receptor de factor de creixement epidermal	PI3K fosfatidilinositol 3-quinasa
EMT transició epiteliomesenquimal	PMN Polimorfonucleats
EPK Família de les proteïnes quinases Eucariotes	RCANs Regulador de calcineurin 3, calcipressin-3
FBS Sèrum fetal boví	rpm Revolucions per minut
Fw Directe (fa referència a l'encebador)	RT Temperatura ambient
g força centrífuga relativa	RT-PCR Reacció en cadena de la polimerasa associada a transcriptasa reversa
g grams	qPCR PCR quantitativa
h hora	Rv Indirecte (fa referència a l'encebador)
HE Hematòxilina-eosina	

SAGE Anàlisi Sèriat de l'Expressió
Gènica
SD Síndrome de Down
shRNA *short hairpin* RNA
TAMs Macròfags associats a tumor
TGF- α Factor de creixement
tumoral- α
TGF- β Factor de creixement
tumoral - β
TU Unitats transductives o
infectives per cèl·lula
TUNEL *Terminal deoxynucleotidyl
transferase dUTP nick end labeling*

Tm *melting temperature*
T β RII receptor TGF- β
U unitats
VEGF Factor de creixement vascular
i endotelial
v/v volum/ volum
WB western de transferència
WT wild type (salvatge)
s segon
 μ g, ng, mg micrograms,
nanograms, miligrams
respectivament

A grayscale microscopic image of biological tissue, likely a cross-section of an organ. The image shows various cellular structures, including what appears to be a layer of epithelial cells on the right side, transitioning into a more fibrous or connective tissue region. The overall texture is complex and detailed, typical of histological sections.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 EL CÀNCER

El càncer (en termes mèdics, "neoplàsia maligna") es defineix com un tipus de malaltia en què un grup de cèl·lules desenvolupen un creixement descontrolat, migració, invasió (intrusió i destrucció dels teixits adjacents) i a vegades metàstasi (les cèl·lules s'estenen a altres punts del cos a través de la limfa i/o la sang). Aquestes tres propietats dels càncers malignes els distingeixen dels tumors benignes, que s'autolimiten i no envaeixen altres teixits ni metastatitzen, entenent com a metastatitzar el procés de formació d'un altre tumor en un lloc diferent d'on s'ha desenvolupat el tumor primari o original. La majoria de càncers formen un tumor sòlid, però alguns com els hematològics (afecten a la sang) no ho fan.

El càncer provoca aproximadament un 13% de totes les morts humanes. Segons la Societat Americana del Càncer, al voltant d'uns 7 milions de persones moren de càncer arreu del món cada any. Concretament, a l'Estat espanyol sorgeixen uns 220.000 nous casos de càncer cada any, això equival a uns 250 casos per cada 100.000 persones. D'entre aquests, el càncer més comú és el de colon (15 % dels nous casos), seguit del càncer de pròstata i el de pulmó (13 %). El càncer de mama és el tercer més freqüent amb un 12 % d'incidència en aquesta regió. Pel què fa a la mortalitat, quasi el 50 % (uns 100.000 malalts) moren cada any a l'Estat espanyol. La mortalitat més elevada correspon amb un 20 % del total al càncer de pulmó, seguit del càncer de colon amb un 15 %. En tercer lloc hi ha el càncer de mama, amb un 6 % d'incidència (World Health Organization).

El coneixement sobre la biologia del càncer ha incrementat exponencialment des de la definició de la malaltia fins a l'actualitat. A l'any 2000, Hanahan i Weinberg van definir 6 característiques principals pròpies del càncer que són: inducció de l'angiogènesi, evasió cel·lular dels inhibidors del creixement, senyalització proliferativa crònica sostinguda, capacitat de proliferació infinita, resistència a la mort cel·lular i capacitat d'invasió i metàstasi (Hanahan and Weinberg, 2000). Actualment a aquests trets característics se n'hi afegeixen dos més: la reprogramació del metabolisme energètic i l'evasió de la resposta immunitària. Respecte a l'etiologia del càncer, es descriuen dues causes principals: la inestabilitat genètica i mutacions, i la inflamació sostinguda, que passen a incloure's a les característiques principals pròpies del

càncer (Figura 1) (Hanahan and Weinberg, 2011). No tots els tumors es comporten igual però amb aquestes 8 característiques pròpies del càncer, les cèl·lules tumorals són capaces de sobreviure provocant disfuncions en diferents òrgans i teixits fins a causar, en el pitjor dels casos, la mort de l'organisme.



Figura 1. Característiques pròpies del Càncer. Aquesta figura resumeix les 8 característiques principals que defineixen el càncer. Il·lustració adaptada de Hanahan and Weinberg, 2011).

A continuació es fa un resum de cada una d'aquestes característiques del càncer.

1.1.1 Inducció de l'angiogènesi tumoral

L'angiogènesi és el procés fisiològic que consisteix en la formació de vasos sanguinis nous a partir dels vasos preexistents i té lloc durant el desenvolupament amb una sèrie d'esdeveniments controlats que porten a una neovascularització que satisfà els requeriments dels teixits en creixement. Els vasos sanguinis i els components de l'estroma responen a factors pro i antiangiogènics que permeten el remodelament vascular durant el desenvolupament embrionari, la cura de ferides i l'embaràs. No obstant, en situacions patològiques com el càncer també s'indueixen les mateixes vies de senyalització.

Els tumors, a partir d'un volum de 1-2mm³ aproximadament comencen a tenir necessitats metabòliques restrictives d'aportació d'oxigen i nutrients a les cèl·lules tumorals. En aquest moment el tumor no pot créixer si no aconsegueix satisfer aquesta demanda i canvia a un fenotip que atrau vasos sanguinis de l'estroma que l'engloba. Aquest canvi és degut a l'equilibri entre els factors proangiogènics i antiangiogènics alliberats tant per les cèl·lules tumorals com les de l'hoste (Kyung Sun lee *et al.*, 2012). Tot i no entrar en detall, hi ha diferents vies de formació de vasos en funció de la manera com es formen i els tipus cel·lulars implicats (Figura 2). Així, hi ha l'angiogènesi per brots (Ferrara N., and Davis-Smyth, *et al.*, 1997), angiogènesi a partir de la creació de ponts luminals en vasos preexistents (Burri *et al.*, 2004), gràcies al reclutament de progenitors endotelials (Asahara *et al.* 1997), o angiogènesi per imitació en les quals les cèl·lules tumorals adopten morfologia de cèl·lules endotelials per a formar els vasos (Cao *et al.*, 2013).

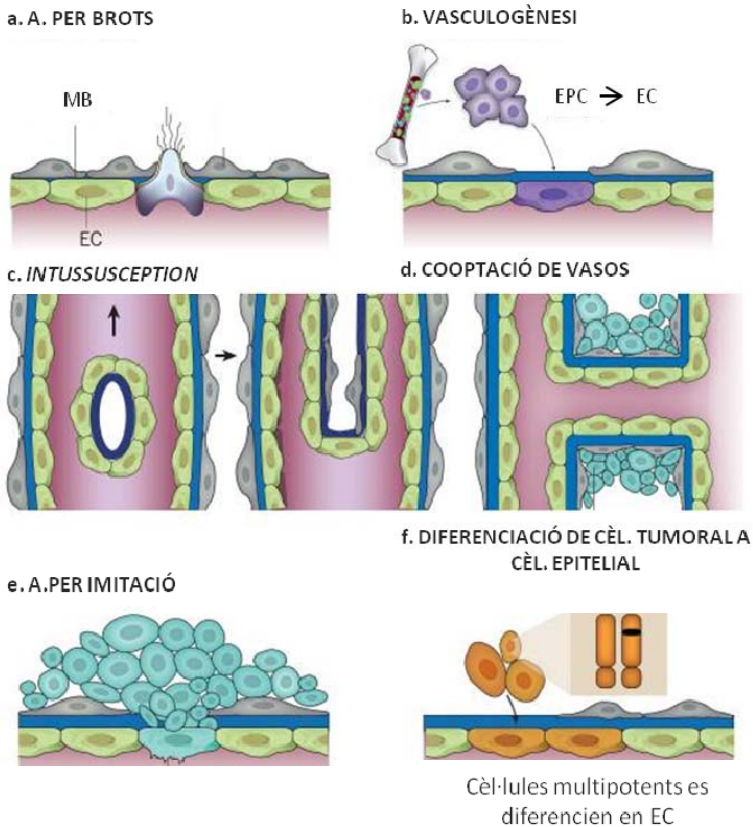


Figura 2. Models d'angiogènesi tumoral. Angiogènesi a) Angiogènesi (A) per brots. El creixement està guiat per cèl·lules epitelials diferenciades que inicien protusions de membrana que marquen la direcció del nou vas (MB: membrana basal; EC: Cèl·lula endotelial). b) Vasculogènesi. Cèl·lules progenitores de cèl·lules endotelials (EPC) es diferencien a cèl·lules endotelials (EC) per a formar la nova xarxa vascular. c) *Intussusception*. Formació de vasos per fraccionament luminal de vasos preexistents. d) Cooptació de vasos. Les cèl·lules tumorals creixen envoltant els vasos preexistents e) Angiogènesi (A) per imitació, quan les cèl·lules tumorals fan la funció de les cèl·lules epitelials. f) Angiogènesi per diferenciació de les cèl·lules pluripotents del tumor a cèl·lules endotelials (Figura adaptada de Carmeliet and Jain, 2011).

Hi ha molta varietat en els senyals angiogènics que indueixen les cèl·lules endotelials a adoptar un fenotip activat: les cèl·lules endotelials perden les unions que les mantenen adherides a les seves veïnes i a l'estroma, alliberen un seguit de factors proangiogènics formant un gradient quimiotàctic, proliferen formant tubs provisionals, recluten cèl·lules perivasculares per a què les ajudin a establir-se i a madurar i, finalment, remodelen i formen una xarxa vascular funcional que nodrirà el tumor (Weis and Cheresh, 2011). Ara bé, tots aquests tipus d'angiogènesi, a excepció de l'angiogènesi per imitació, tenen un factor proangiogènic comú, el factor de creixement endotelial i vascular (VEGF).

VEGF és el principal factor inductor de l'angiogènesi. S'han descrit sis membres de la família de VEGF: VEGF-A, -B, -C, -D, -E i PlGF. L'inductor principal de l'angiogènesi és el VEGF-A, al qual s'hi refereix de forma general com a VEGF (i també en aquesta memòria a partir d'ara) (Ferrara *et al.*, 2002, Hicklin and Ellis, 2005).

El VEGF s'expressa en cèl·lules endotelials, cèl·lules de la musculatura llisa i macròfags. El VEGF es detecta en molts tipus de tumors humans i els nivells proteics elevats aberrants s'associen a un mal pronòstic de la malaltia. L'increment del VEGF pot ser induït per diversos factors com la hipòxia, el pH, citoquines, factors de creixement i hormones sexuals com els estrògens. Els factors genètics també poden estar implicats en l'increment de l'expressió gènica del VEGF, així com l'activació de diferents oncogens o la inactivació de gens supressors de tumors (Kerbel *and* Folkman, 2002).

Els membres de la família del VEGF tenen la capacitat d'unir-se a receptors tirosina quinasa com els receptor de VEGF (VEGFR). Hi ha 3 tipus de VEGFR: VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3. La unió lligand-receptor produeix la dimerització de dos VEGFR i posteriorment es produeix l'autofosforilació de residus tirosina al domini intracel·lular del receptor. Aquestes fosfotirosines serveixen de lloc d'unió a altres proteïnes, iniciant així una cascada de senyals intracel·lulars que modulen l'activació

de varies vies de senyals de transducció com per exemple Cn-NFATc, PI3K-Akt, Ras-MAPK, Raf-ERK, que comportaran diferents efectes funcionals a nivell cel·lular/tissular. En concret, una de les vies a través de la qual el VEGF estimula l'angiogènesi és mitjançant l'activació de la via de Cn - NFATc. Tot i que es parlarà d'aquestes proteïnes més endavant, la Cn és una proteïna amb activitat fosfatasa dependent de calci i els Factors Nuclears de les cèl·lules T Activades (NFATc) són factors de transcripció que interaccionen amb la Cn i es desfosforilen, s'activen i es transloquen a nucli on regulen la transcripció gènica dels seus gens diana. S'ha demostrat que la via Cn-NFATc té un paper clau en l'activació de la resposta immunitària durant l'activació dels limfòcits T però també té un rol important en altres tipus cel·lulars en la mediació de les respostes proangiogèniques (Zaichuk *et al* 2004; Minami *et al* 2004), tant en situacions fisiològiques, on s'activen gens pro-angiogènics com la interleuquina-8 (IL-8) per exemple en l'embaràs, com en situacions patològiques com en el desenvolupament d'alguns càncers com el càncer de mama (Siamakpour-Reihani *et al.*, 2011). Per tant, a part del VEGF, altres proteïnes formen part del denominador comú en l'angiogènesi tumoral com ara IL-8 o la ciclooxigenasa 2 (COX-2 or PTGS2 for *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*) l'expressió gènica de les quals està regulada pels NFATc i modula la resposta pro-angiogènica en càncer de mama (Yiu *et al.*, 2006).

La proteïna IL-8 (o CXCL8) és una quimoquina proinflamatòria i quimioattractant (Shao *et al.*, 2013). El gen de la *IL-8* codifica per una preproteïna de 99 aminoàcids que és processada fins a obtenir una proteïna de 77 aminoàcids. L'expressió de *IL-8* està regulada pels factors de transcripció NFATc i factor intensificador de la cadena lleugera kappa de les cèl·lules B activades (*NFκB*). També es regula per altres estímuls com el factor de necrosi tumoral (*TNFα*), l'estrès ambiental, la hipòxia, hormones d'estrès, etc. Els efectes biològics de IL-8 estan mediat per la unió de IL-8 als receptors CXCR1 i CXCR2 que s'associen a diferents receptors de proteïna kinases units a proteïnes G. L'activació de les vies de senyalització que es desencadenen per la unió de lligand-receptor afecten diferents processos cel·lulars. S'ha descrit que la senyalització per IL-8 pot activar proteïna quinases que fosforil·len el receptor de VEGF, VEGFR2, en cèl·lules endotelials per a permetre una major permeabilitat en la barrera endotelial (Martin *et al.*, 2009). També s'han descrit efectes d'aquesta via sobre la proteïna actina del citoesquelet que facilitaria l'adquisició de capacitats invasives a les cèl·lules tumorals (Lai *et al.*, 2012). Molts tipus de càncer presenten nivells proteïcs alts i aberrants de IL-8 incloent el càncer de mama Triple Negatiu (TNBC), entre d'altres (Penson *et al.*, 2000). En el càncer de mama, la IL-8 està inversament

relacionada amb la presència del receptor d'estrògens, per tant, IL-8 es troba altament expressat en càncers sense receptors d'estrògens (ER negatius) o TNBC on les cèl·lules que els formen tenen capacitat d'invasió i, per tant, un mal pronòstic. També s'ha relacionat, per tant, amb la capacitat d'angiogènesi del TNBC (Frend *et al.*, 2003; Chen Yao *et al* 2007; Koch *et al.*, 1992; Strieter *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1993). Una activació de la via de senyalització de la IL-8 pot induir una major capacitat de motilitat i d'invasió a la cèl·lula, procés clau en les cèl·lules tumorals. A més, els receptors de IL-8 es troben en cèl·lules tumorals, endotelials i neutròfils entre d'altres. Això suggereix que la secreció de IL-8, des de les cèl·lules tumorals, pot influir un ampli ventall de tipus cel·lulars per a generar un microambient adequat per al creixement del tumor, ja sigui mitjançant senyalització autocrina o paracrina. Diversos factors de transcripció, alhora, poden regular l'expressió gènica de *IL-8*, com ara els NFATc i els NFκβ. Els NFATc interaccionen amb el factor de transcripció anomenat Proteïna Activadora 1 (AP1) que és un complex de proteïnes (Jun/Fos). Ambdós factors de transcripció, NFATc i AP1, formen un dímer que s'uneix al lloc d'unió dels NFATc presents en el promotor de la *IL-8*. D'aquesta manera es pot regular, en aquest cas activar, l'expressió gènica de *IL-8* (Okamoto *et al* 1994). En resum, la IL-8 regula diferents processos cel·lulars com la proliferació, diferenciació, resposta vers l'estrès cel·lular i l'apoptosi. Això s'ha demostrat a partir d'experiments en els quals s'inhibeix la senyalització de IL-8 a través de molècules de RNA silenciador (siRNA) específiques pel RNAm de *IL-8*. Quan s'inhibeix l'expressió gènica de la *IL-8* s'afavoreix la inducció de la síntesi de proteïnes que inhibeixen proteïnes reguladores del cicle cel·lular com les ciclines i, per tant, promouen l'arrest cel·lular. Aquest resultat confirmen els resultats obtinguts quan es neutralitza la proteïna IL-8, mitjançant anticossos, que demostren que es bloqueja l'angiogènesi i la invasió tumoral (Shao *et al* 2013).

Respecte al gen de la *COX-2*, forma part d'una família d'enzims la funció dels quals és la producció de prostaglandines (PGs) a partir de l'àcid araquidònic (àcid gras poliinsaturat de 20 carbonis que s'obté de la hidròlisi dels fosfolípids de les membranes cel·lulars). *COX-1* té una expressió constitutiva i ubiqua, en canvi, *COX-2* s'expressa a nivells baixos en els diferents òrgans i només s'indueix com a resposta patofisiològica en processos d'estrès com a resposta inflamatòria, com a control hemodinàmic renal i d'homeòstasis, entre d'altres (Smith *et al* 2001). *COX-2* s'expressa de manera constitutiva exclusivament en ronyons, vesícules seminals i el sistema nerviós central (Ek *et al.*, 2001).

L'expressió gènica de COX-2 pot ser induïda per diverses vies de senyalització com la via de la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK), la via de NFATc, o la via de la proteïna quinasa B de serina/treonina AKT o el factor de transcripció AP1 (Rodrigues *et al.*, 2004). La implicació de COX-2 en la progressió tumoral està àmpliament confirmada per diferents estudis, inicialment en models de càncer de colon (Oshima *et al.*, 1996). A més, s'ha detectat una sobreexpressió gènica de COX-2 en gran varietat de càncers com en el càncer de cap i coll (Chan *et al.*, 1999), gliomes (Shono *et al.*, 2001) o hepatocarcinomes (Shiota *et al.*, 1999), entre d'altres. Liu *et al.* van descriure el paper de COX-2 en càncer de mama; van observar que l'expressió gènica de COX-2 sota un promotor viral d'expressió constitutiva en la glàndula mamària d'un ratolí afavoria la progressió tumoral (Liu *et al.*, 2001). Més endavant es va observar que COX-2 induïx càncer de mama de forma dependent de la senyalització dels NFATc (Yiu *et al.*, 2006).

Pel que fa als aspectes mecànics, COX-2 està implicada en diversos processos de la progressió tumoral com ara en la inhibició de l'apoptosi cel·lular (Tsuji *et al.*, 1995), en la capacitat d'invasió i metastasi gràcies a la seva regulació positiva sobre l'expressió de metaloproteïnases com la MMP9 (Fernandez *et al.*, 2000) però, sobretot, COX-2 està relacionada amb la inducció de l'angiogènesi. En aquest procés, s'ha demostrat que la sobreproducció de COX-2 en cèl·lules de càncer de colon incrementa els nivells de proteïna VEGF i el nombre de vasos intratumorals (Tsuji *et al.*, 1998). Pel contrari, una inhibició de COX-2 redueix el nombre de vasos en la mostra d'estudi (en aquest cas, còrnies de rata; Masferrer *et al.*, 2000). No es coneix encara el mecanisme d'acció en cada un dels processos en els que la COX-2 està implicada però, increments en la seva producció, generaria un microambient avantatjós per al desenvolupament tumoral. Les prostaglandines es secreten des de diversos tipus cel·lulars, tant de cèl·lules tumorals com de cèl·lules de l'estroma o endotelials, i els efectes que generen es deuen a la unió de les prostaglandines amb receptors presents en la superfície cel·lular. La interacció de les prostaglandines amb receptors específics (com ara els receptors del factor de creixement epitelial o EGFR) activa diverses proteïnes com AKT, VEGF, el transductor de senyal o activador de la transcripció 3 (STAT3) o el factor induït per hipòxia 1 (HIF-1), que acaben promovent l'angiogènesi. La resposta a la senyalització derivada de la interacció amb prostaglandines també pot activar proteïnes implicades en la proliferació cel·lular com ara el receptor proliferador i activador del peroxisoma o PPAR β/δ .

En la última dècada s'han usat com a fàrmacs antitumorals tot un seguit de molècules antagonistes dels receptors de prostanoids (prostaglandines majoritàriament). En càncer de mama, per exemple, el tractament amb aquests agents han tingut resultats positius ja que han aconseguit disminuir la metàstasi (Ma *et al.*, 2010; Subbaramaiah *et al.* 2008). També s'han usat, en teràpia, agents anti-COX-2 que donaven resultats positius contra el càncer però que portaven associats un efecte secundari o indesitjat a nivell cardíac.

1.1.2 Evasió dels inhibidors de creixement

En la transformació cel·lular, una altra de les característiques que es pot trobar és la insensibilitat de les cèl·lules als inhibidors de creixement, és a dir, la pèrdua de regulació del cicle cel·lular. Moltes fases del cicle cel·lular es regulen per gens supressors de tumors que limiten el creixement cel·lular i la proliferació. La pèrdua de funció dels supressors tumorals altera la cèl·lula i en facilita la seva transformació. D'entre els gens supressors de tumors més coneguts hi ha el gen de la proteïna tumoral 53 (*TP53*) que codifica per la proteïna p53 i el gen del retinoblastoma (*RB*) que codifica per la proteïna retinoblastoma (RB). Les seves funcions són diferents però tenen un objectiu comú: el control del cicle cel·lular. p53 rep informació de factors estressants o anòmals com ara danys al DNA, nivells baixos de glucosa o d'oxigen, deficiència en la quantitat de nucleòtids, etc., i respon aturant el cicle cel·lular fins a tornar a un estat normalitzat. En cas que els danys siguin excessius i no puguin ser reparats, p53 induirà les vies d'activació de la mort cel·lular, concretament de l'apoptosi. Les diverses funcions de p53 depenen de cada context i del tipus cel·lular, així com de la persistència i de la gravetat de cada situació o dany genòmic.

Les funcions de la proteïna RB es centren més en el control de les proteïnes reguladores del cicle cel·lular. La mutació o la pèrdua de funció de RB permet una proliferació continuada de la cèl·lula afectada. L'alteració d'un gen supressor de tumor no comporta necessàriament la pèrdua total del control del cicle cel·lular però amb la mutació d'un gen supressor de tumors incrementa la probabilitat de mutació o alteració d'un altre gen fins a tenir una pèrdua important en la funcionalitat global dels gens supressors de tumors (Burkhart and Sage, 2008; Deshpande *et al.*, 2005; Sherr and Mc Cormick, 2002).

1.1.3 Senyalització proliferativa crònica sostinguda

La cèl·lula rep informació del seu voltant gràcies als receptors de membrana, canals, etc., que iniciaran vies de senyalització per, finalment, regular l'expressió gènica i permetre, a la cèl·lula, poder respondre a l'estimulació a la qual és sotmesa.

Un dels trets propis de les cèl·lules tumorals és la capacitat de proliferar il·limitadament. Les cèl·lules sanes reben estímuls de proliferació, així com estímuls de d'aturada o arrest del cicle cel·lular. A banda de la desregulació dels factors implicats en el control de la progressió del cicle cel·lular, hi ha altres formes d'aconseguir aquesta proliferació crònica. Per una banda, les cèl·lules tumorals poden presentar nivells proteics incrementats de receptors de creixement cel·lular com EGFR. D'aquesta manera, la proliferació cel·lular incrementa fins que la disponibilitat del lligand EGF és el factor limitant (Cheng *et al.*, 2008). Aquest lligand pot ser, alhora, sintetitzat per la mateixa cèl·lula tumoral iniciant, així, una senyalització autocrina o sintetitzat per cèl·lules adjacents que afecten les cèl·lules tumorals mitjançant una senyalització paracrina. Per altra banda, les cèl·lules tumorals poden patir mutacions somàtiques en els dominis intracel·lulars dels receptors o en proteïnes de les vies de senyalització regulades per l'activació d'aquests receptors, de manera que la senyalització del creixement cel·lular sigui independent a la presència del lligand corresponent (Davies and Samuels, 2010).

Un altre camí pel qual una cèl·lula pot estimular el seu creixement de forma constant és mitjançant el segrest dels factors de creixement en la matriu extracel·lular. L'activitat de proteases, sulfatases o altres enzims alliberats a la matriu que puguin activar factors de creixement poden estar implicats també en aquest increment de disponibilitat de lligands que acabaran activant la proliferació cel·lular. Cal tenir en compte, també, que en les diferents vies de senyalització hi ha factors reguladors negatius que limiten l'activació d'aquestes vies. Qualsevol mutació o alteració en aquests circuits inhibidors de regulació donaria com a resultat una activació crònica d'estímuls que promouen la proliferació cel·lular (Mosesson *et al.*, 2008).

1.1.4 Capacitat de proliferació infinita

Les cèl·lules tumorals necessiten un potencial de replicació infinita per tal de generar tumors. De forma general, quan les cèl·lules es fan créixer repetidament en cultiu i es divideixen contínuament, entren en un estat de senescència i paren de dividir-se. Ara bé, si alguna cèl·lula aconsegueix passar aquest estat es desencadena tota una via de senyalització que acaba amb la mort de la cèl·lula. Si alguna cèl·lula evita la mort cel·lular, aquesta cèl·lula haurà adquirit la capacitat il·limitada de proliferació o altrament dit, esdevé immortal, fet que la converteix en una cèl·lula seleccionada positivament per a esdevenir potencialment tumoral.

Un aspecte relacionat amb la capacitat indefinida de replicar-se de les cèl·lules tumorals, és l'evasió de la inhibició del creixement cel·lular per contacte. Les cèl·lules no tumorals, quan creixen, ho fan de manera ordenada i genèticament definida en l'estructura tridimensional del teixit concret on es troben. Els contactes cèl·lula-cèl·lula, igual que els contactes amb la matriu cel·lular, estan controlats i coordinats per tal de formar un òrgan funcional. En les cèl·lules en cultiu es manté la capacitat d'unió cèl·lula-cèl·lula de la mateixa manera, però, quan aquestes cèl·lules es divideixen i ocupen la superfície de cultiu, desenvolupen una inhibició del creixement per contacte, senyalització que provoca l'arrest del creixement cel·lular com a conseqüència de la formació d'una monocapa cel·lular. Aquesta inhibició per contacte també és present en els teixits i assegura una homeòstasi normal i funcional. No obstant, els mecanismes moleculars implicats en la inhibició per contacte encara no són gens clars (Cole *et al.*, 2008). Quan la cèl·lula per diverses alteracions genètiques perd aquesta capacitat d'inhibició per contacte és capaç de dividir-se tot i està envoltada de cèl·lules, de manera que pot crear estructures tridimensionals creixent damunt d'altres cèl·lules fins a formar una acumulació de cèl·lules aberrants o tumor.

1.1.5 Resistència a la mort cel·lular

A nivell cel·lular trobem diferents tipus de mort cel·lular. Entre elles hi ha l'apoptosi i la necrosi.

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular programada que s'esdevé per activació d'un mecanisme de suïcidi cel·lular, molt conservat evolutivament, i dirigit fonamentalment a eliminar les cèl·lules supèrflues, velles o malmeses en els organismes multicel·lulars (Steller *et al.*, 1995; Jacobson *et al.* 1997). Durant l'apoptosi el contingut cel·lular es

fragmenta en vesícules que seran fagocitades pels macròfags per a minimitzar el dany al teixit del voltant. El procés d'apoptosi té lloc en esdeveniments fisiològics com l'homeòstasi normal dels teixits, el desenvolupament embrionari i la resposta immunològica. Així, un excés d'apoptosi pot conduir a alteracions en el desenvolupament i a l'aparició de malalties neurodegeneratives, mentre que les deficiències poden portar a malalties autoimmunitàries i a la formació de tumors per increment del nombre de cèl·lules (Thompson *et al.*, 1995). Les cèl·lules apoptòtiques presenten un patró d'alteracions morfològiques característic. Primer, la cèl·lula es contrau i perd els contactes intercel·lulars (pèrdua d'adhesió). Posteriorment, el citosol i la cromatina es condensen i la cèl·lula s'encongeix (condensació). La cromatina que tendeix a marginar-se en forma de mitja lluna contra l'embolcall nuclear es fragmenta i, seguidament, el nucli i la cèl·lula es trenquen en diverses vesícules anomenades cossos apoptòtics (fragmentació). Aquests cossos apoptòtics són ràpidament fagocitats i digerits per cèl·lules fagocítiques sense desencadenar una resposta inflamatòria (fagocitosi) (McConkey *et al.*, 1998; Hetts *et al.*, 1998). Els factors associats a l'aparició de l'apoptosi són bàsicament desequilibris en les vies de senyalització que regulen el creixement com les proteïnes supressores de tumors p53 i RB, entre d'altres. L'alteració molecular d'aquestes vies pot suposar evitar l'apoptosi cel·lular de forma que poden seguir dividint-se sense control i transformar-se en cèl·lules tumorals.

Un altre tipus de mort cel·lular però diferent de l'apoptosi és la necrosi. La necrosi és un procés de mort cel·lular en el qual la cèl·lula afectada es trenca alliberant a l'exterior substàncies que són perjudicials pel teixit en què es troba. D'aquesta manera es recluten cèl·lules inflamatòries la funció de les quals és limitar l'extensió del teixit malmès i fagocitar les restes cel·lulars necròtiques. En el context tumoral però, les cèl·lules inflamatòries promouen el creixement tumoral ja que secreten factors que indueixen l'angiogènesi, la proliferació cel·lular i la capacitat d'invasió. Els tumors sovint toleren un cert grau de mort cel·lular per necrosi per tal que es reclutin cèl·lules inflamatòries que aboquin, al microambient tumoral, factors favorables al creixement del tumor.

1.1.6 Capacitat de migració, d'invasió i metàstasi

La matriu extracel·lular està formada per diversos tipus cel·lulars i proteïnes de secreció que ajuden a mantenir l'organització altament ordenada en estructures cel·lulars (Dietmar W. Siemann, Tumor

microenvironment, ed. Wiley-Blackwell ISBN 978-0-470-74996-8, 2011). Els components de la matriu extracel·lular es produeixen intracel·lularment per les cèl·lules residents a la matriu i es secreten per exocitosi. Una vegada secretades, s'agreguen a la matriu existent. La matriu està formada per una mescla de proteïnes fibroses i glicosaminoglicans. Aquests són polímers de carbohidrats que s'uneixen a les proteïnes de la matriu extracel·lular per a formar els proteoglicans, amb càrrega negativa que atrauen als cations positius com el sodi. El sodi atrau molècules d'aigua per osmosi i per tant ajuda a mantenir la matriu i les cèl·lules residents hidratades. Hi ha diferents tipus de proteoglicans com l'heparan sulfat, el coindritin sulfat o el keratan sulfat. A part dels proteoglicans trobem també àcid hialurònic, que dóna a l'espai extracel·lular resistència contra les forces de compressió i flexibilitat. Això ho aconsegueix gràcies a la gran quantitat de molècules d'aigua que atrau. A la matriu extracel·lular també veiem fibres com el col·lagen (compreu el 90% del contingut de les fibres de proteïna de la matriu), elastina o altres proteïnes com la fibronectina i la laminina que connecten les cèl·lules a la matriu reorganitzant el citoesquelet o la làmina basal respectivament. A més, altres proteïnes es localitzen en aquesta matriu com ara les proteïnes remodeladores de la matriu. Aquestes proteïnes s'alliberen quan es degrada la matriu i s'activen per a regular la regeneració d'aquesta.

Per tal que una cèl·lula es desplaci, ja sigui en condicions fisiològiques com en la reparació d'un teixit o una ferida, és necessari remodelar la matriu extracel·lular, és a dir, trencar la organització local de la matriu. Amb aquesta finalitat, es secreten noves proteïnes per a reparar la matriu extracel·lular i mantenir l'homeòstasi tissular. Durant el desenvolupament tumoral, les cèl·lules diferenciades pròpies d'un teixit que han sofert transformació, poden adquirir capacitats migratòries o invasives, però, per a fer-ho, han de remodelar la matriu extracel·lular.

1.1.6.1 Migració

La migració cel·lular és un procés central del desenvolupament i del manteniment dels organismes multicel·lulars. La formació de teixit durant el desenvolupament embrionari, la cura de ferides, l'angiogènesi i la resposta immunitària requereixen tots un moviment orquestrat de les cèl·lules en una direcció concreta i cap a un lloc específic, sovint en un procés de resposta a un gradient de senyals químiques o quimiotaxi.

Per a la migració cel·lular, la cèl·lula necessita coordinar la formació i destrucció dels punts d'anclatge a la matriu extracel·lular.

Aquests punts d'adhesió no només representen punts d'ancoratge de la cèl·lula a la matriu extracel·lular, sinó en la comunicació cel·lular. Les protrusions de la membrana plasmàtica es creen mitjançant la polimerització de filaments d'actina, en el front de migració, que seran estabilitzats per formació de punts d'adhesió, i que representaran les forces de tracció del resta de la cèl·lula cap a aquests punts. A mesura que la cèl·lula avança, es formen nous punts d'adhesió cel·lular al front i es desfan els punts d'adhesió anteriors.

A més dels punts d'adhesió, les cèl·lules poden mostrar altres estructures per unir-se a la matriu extracel·lular, principalment podosomes, i invadopodis. Aquests punts d'adhesió a la matriu extracel·lular, a més, estan sovint associats a la degradació proteolítica de la matriu. Les proteïnes o receptors de la matriu extracel·lular implicats durant la migració cel·lular són les integrines (unió cèl·lula matriu), els sindecans o els receptors de l'àcid hialurònic present en la matriu, entre d'altres. Respecte a molècules estructurals implicades en la migració hi ha proteïnes com l'actina, ezrina o la radixina. Les cadherines, proteïnes d'unions intercel·lulars, també estan relacionades amb el procés de migració ja que cal desenganxar-se de les cèl·lules adjacents per a iniciar la migració.

En la migració cel·lular també hi estan involucrades les proteïnes COX-2 (Sheng Yang and Hui Han, 2014) i S100A4 (sobre la qual es parlarà posteriorment), i evidentment les metal·loproteïnases (MMPs) per al remodelat de la matriu. La velocitat en la migració cel·lular vindrà donada per la velocitat en la formació i destrucció dels punts d'adhesió cel·lular, on intervenen diverses proteïnes quinases i fosfatases. Durant la progressió tumoral, la migració s'observa tant en el moment en què les cèl·lules es desplacen per a introduir-se en els vasos sanguinis per a ser transportades a un altre teixit de l'organisme, com en el moment de la extravasació o sortida del vas, quan la cèl·lula transformada ha d'arribar en un lloc idoni on iniciar el creixement del focus metastàtic.

1.1.6.2 Invasió

La invasió és la capacitat que tenen les cèl·lules tumorals d'infiltrar-se o penetrar en els teixits normals i/o en els vasos sanguinis i produir metàstasi. La invasió no és deguda solament a la pressió del creixement tumoral, sinó a característiques fenotípiques que adquireixen les cèl·lules canceroses.

A grans trets, el procés d'invasió es bastant similar al de la migració. Durant la invasió, cal destruir tant les unions que ancoren la cèl·lula a d'altres cèl·lules i a la matriu extracel·lular com a la membrana basal mitjançant la secreció d'enzims com les col·lagenases, que destrueixen el col·lagen per a poder-se obrir camí. També cal iniciar el desplaçament o migració fins arribar al vas sanguini o limfàtic on la cèl·lula transformada inicia el procés d'intravasació per a ser transportada a un lloc distal.

Per metastatitzar les cèl·lules canceroses s'han de desprendre del tumor sòlid, i per a això requereixen la pèrdua de les adhesions intercel·lulars. Ara bé, els contactes cèl·lula- cèl·lula, igual que els cèl·lula-matriu extracel·lular, confereixen als epitelis cel·lulars una forta senyal de supervivència mentre que la pèrdua d'adhesió cel·lular és un potent inductor d'apoptosi. El procés pel qual les cèl·lules tumorals perden aquestes unions sense patir mort cel·lular s'anomena transició epiteliomesenquimal (EMT) i és essencial per a la capacitat d'invasió i metàstasi. L'EMT és un procés clau i essencial durant el desenvolupament embrionari normal. Fa uns anys es va associar EMT en algunes condicions patològiques com la progressió tumoral ja que durant aquest procés les cèl·lules pateixen canvis dràstics com ara la pèrdua, per part de les cèl·lules epitelials, del fenotip específic de cèl·lula epitelial per adquirir un fenotip propi de cèl·lules mesenquimals. Concretament en les cèl·lules transformades, algunes proteïnes involucrades en les unions adherents com la E-caderina i la α -catenina, pròpies del fenotip epitelial, mostren una infraproducció i, en canvi, les proteïnes típiques del fenotip mesenquimal com ara la N-caderina, la vimentina i la fibronectina estan sobreproduïdes. Com a conseqüència de la EMT, les cèl·lules epitelials perden les estructures involucrades en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula i la polaritat, i per contra, obtenen la capacitat d'invasió i mobilitat/migració cel·lular. L'adquisició de fenotips EMT està relacionat amb la carcinogènesi, invasió, metàstasi i mal pronòstic o baixa supervivència i un augment del risc de càncer recurrent en pacients amb diferents tipus de tumors sòlids com els tumors de mama, bufeta o colorrectal (Hwajin and Moon, 2010).

La EMT està controlada per diversos repressors transcripcionals com Snail, Slug, TWIST, i la família de les proteïnes ZEB. En general en processos no patològics, aquest procés és complex i està estrictament controlat de manera temporal i espacial per assegurar el destí de les cèl·lules i per evitar la conversió cap a un fenotip invasiu després de la migració cel·lular cap a la seva localització corresponent (Yee *et al.*, 2010).

1.1.6.3 Metàstasi

La metàstasi es defineix com la formació d'un o més focus tumorals secundaris en òrgans no contigus al tumor primari, i és quasi sempre la causa dels fracassos dels tractaments i de la mort dels pacients amb càncer (Welch and Wei, 1998).

El procés metastàtic es divideix en diverses etapes biològiques seqüencials. En primer lloc hi ha un creixement tumoral, que és seguit per la formació de nous vasos sanguinis (angiogènesi). Algunes cèl·lules tumorals es desprenen del tumor primari, envaeixen l'estroma adjacent (invasió local) i penetren en el torrent sanguini o limfàtic (intravasació). Les cèl·lules tumorals, a la sang o la limfa, interactuen amb altres tipus cel·lulars de manera que poden sobreviure fins arribar a l'òrgan diana (transport i interacció). En el lloc secundari, les cèl·lules s'adhereixen a molècules específiques o queden aturades per limitacions físiques (adhesió/arrest). Les cèl·lules que s'adhereixen a l'endoteli poden induir una ràpida retracció activa de les cèl·lules endotelials que els permet interaccionar amb la membrana basal. Es produeix la degradació local de la membrana basal, alhora que es formen pseudopodis en la cèl·lula tumoral, els quals creuen aquesta membrana. Finalment, les cèl·lules endotelials es relaxen i s'acaba així l'extravasació de la cèl·lula tumoral. Aquesta cèl·lula ara queda separada del torrent sanguini i es pot restablir el flux habitual en el vas (Gómez and Curiel, 1998).

Posteriorment, les cèl·lules tumorals envaeixen i migren a través de l'estroma del teixit diana (migració). Finalment, la proliferació de les cèl·lules tumorals en els òrgans colonitzats dóna lloc a les metàstasis (Figura 3) (Welch and Wei, 1998; Engers and Gabbert, 2000).

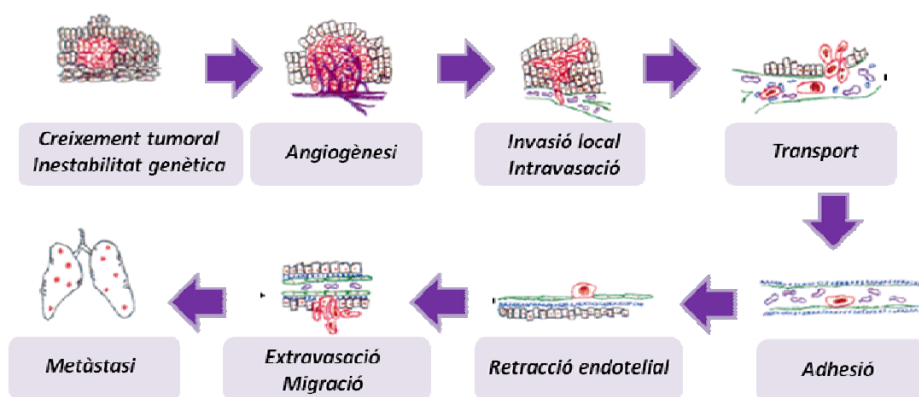


Figura 3. Processos pels quals passa una cèl·lula tumoral des del tumor primari fins a la formació de la metàstasi en un òrgan secundari. Esquema adaptat de *Welch i Rinker-Schaeffer, 1999*.

És conegut que les cèl·lules de cada tipus de tumor tenen una tendència a formar metàstasis en òrgans específics. Existeixen dues hipòtesis per explicar aquest fet. La primera, coneguda com "Llabor i Sòl" (*seed and soil*) proposa que cada cèl·lula tumoral s'estableix allà on troba un microambient adient per les seves capacitats i possibilitats de proliferar, probablement degut a l'existència de receptors i senyals propicis en els teixits on creixeran les metàstasis (Paget *et al.*, 1889). Aquesta hipòtesis també té en compte que la cèl·lula tumoral, des del lloc on es troba el tumor primari, alliberarà un seguit de factors procreixement que contribuirà a la generació del microambient necessari en el lloc de la formació del tumor secundari (Dietmar W. Siemann. *Tumor microenvironment*, ed. Wiley-Blackwell ISBN 978-0-470-74996-8, 2011).

La segona hipòtesi, anomenada "mecànica", plantejada quaranta anys més tard per James Ewing, proposa que la preferència d'un teixit per allotjar el creixement de metàstasis depèn del nombre de cèl·lules tumorals que li arribin per la circulació. D'acord amb això i segons la hipòtesi mecànica, les cèl·lules tumorals formaran metàstasis en el primer microcapil·lar adient en què quedin atrapades. De fet, ambdues hipòtesis no són excloents, sinó que, probablement, constitueixen part de la veritable situació (Chambers *et al.*, 2000). Recentment, Müller *et al.* (2001) han suggerit una tercera hipòtesi basada en la quimioatracció per a la formació de metàstasis en determinats òrgans ja que van identificar en el càncer de mama tot un seguit de quimiocines (com la CXCL12) en òrgans diana i receptors de quimiocines (com CXCR4).

En el cas del càncer de mama les cèl·lules tumorals es disseminen tant per via limfàtica com per via hemàtica, i les localitzacions metastàtiques més freqüents són els ganglis axil·lars i supraclaviculars homolaterals (61 %), els ossos (60 %), els pulmons (34 %), el cervell (23 %) i el fetge (20 %) (Mallon *et al.*, 2000; Carty *et al.*, 1995).

La invasió d'un òrgan per una cèl·lula tumoral, o per un grup d'elles, no implica necessàriament que allà s'hagi de desenvolupar una metàstasi clínicament aparent. De fet, l'establiment de metàstasis per les cèl·lules tumorals que han aconseguit arribar a la circulació sanguínia o limfàtica és, afortunadament, un procés molt poc eficient, estimat en menys d'un 0,05 % de les cèl·lules que hi arriben (Liotta *et al.*, 1974). Aquestes cèl·lules poden quedar en fase latent durant un període de

temps variable, durant el qual poden ser destruïdes per diversos mecanismes immunològics, entrar en apoptosi o proliferar quan les condicions del microambient siguin adients (Engersandi Gabbert *et al.*, 2000). Aquestes micrometàstasis poden mantenir-se molt actives i contenir tant cèl·lules en divisió com cèl·lules en apoptosi. El motiu pel qual aquestes micrometàstasis no creixin pot ser per l'equilibri que existeix entre la proliferació i l'apoptosi (Holmgren *et al.*, 1995). De fet, moltes d'aquestes cèl·lules tumorals estan aturades en la fase G0 del cicle cel·lular i, posteriorment, són capaces d'entrar en el cicle i establir les metàstasis molts anys després de l'exèresi del tumor primari (Marches *et al.*, 1998).

La investigació en el camp de la metàstasi està identificant tot un seguit de marcadors de la capacitat metastàtica de les cèl·lules tumorals. Entre aquests marcadors, per exemple, hi ha alguns polimorfismes de gens supressors de metàstasi (KISS) (Cruz *et al.*, 2015), hiperfosforilacions de promotors (Sang *et al.*, 2015), o expressió de diverses proteïnes com la MMP9, ja mencionada abans, o la proteïna S100A4.

Les proteïnes de la família S100 es caracteritzen per una baixa massa molecular i per tenir dos llocs d'unió a calci. Tot i que les proteïnes de la família S100 tenen un grau de conservació estructural i de seqüència elevat, no són funcionalment intercanviables i participen en diferents processos biològics com proliferació, migració o invasió, inflamació i diferenciació. La desregulació de l'expressió de les proteïnes S100 és comú en càncer humà. Hi ha diversos estudis que demostren que la seva contribució al creixement tumoral i a la metàstasi (Davies *et al.*, 1996). Els perfils d'expressió dels membres de la família s100 poden usar-se per a facilitar-ne el diagnòstic i el pronòstic del càncer. No obstant, hi ha membres d'aquesta família que també poden actuar com a supressors de tumors però és rar i sovint específic d'un tipus de càncer. Així S100A7 en càncer de mama ER⁺ (més endavant s'explica la classificació del càncer de mama) actua de supressor de tumors però, en canvi, en càncer de mama ER⁻ promou la progressió tumoral. Les funcions en l'espai extracel·lular de les proteïnes S100 (S100B, S100A2, S100A8, S100A9, S100A12, S100P) i, especialment la S100A4, estan associades a la invasió tumoral i a la metàstasi (Bresnick, *et al.*, 2015). Concretament, la proteïna S100A4 està involucrada en la mobilitat i capacitat metastàtica de les cèl·lules tumorals mitjançant interacció amb els components del citoesquelet, en l'adhesió i desadhesió cel·lular (per la interacció amb les caderines), en el remodelament de la matriu extracel·lular (per interacció amb les metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular), en la proliferació cel·lular (per unió i segrest de la proteïna supressora de tumors p53), etc.

La S100A4 és secretada per les cèl·lules tumorals i les cèl·lules estromals (macròfags, fibroblasts, limfòcits activats en el microambient tumoral) i és una proteïna clau en promoure metastasi perquè altera el potencial metastàtic de les cèl·lules tumorals i actua com a inductor de la motilitat cel·lular, com a factor inductor de l'angiogènesi, i participa en l'increment de l'expressió de metaloproteinases de la matriu. Per tant, la sobreproducció de s100A4 s'associa amb una forta agressivitat tumoral i amb una baixa supervivència en diferents tipus de càncer com ara el pancreàtic, colorectal, prostàtic, mamari, esofàgic, gàstric i hepatocel·lular entre d'altres.

A part de les S100 hi ha moltes altres proteïnes relacionades amb el desenvolupament tumoral i la metastasi. Entre elles hi ha els factors de transcripció bàsics hèlix-loop-hèlix (bHLH). Aquestes proteïnes tenen un motiu comú d'aminoàcids bàsics, adjacent al motiu de dimertització hèlix-loop-hèlix, que s'uneix a seqüències específiques del DNA per activar la transcripció gènica. La família d'inhibidors de DNA o inhibidors de la diferenciació o ID, consta de 4 membres (ID1-ID4) i el més estudiat és el ID1. Són proteïnes que tenen un motiu hèlix-loop-hèlix però els falta el motiu d'unió al DNA. D'aquesta manera interaccionen amb proteïnes bHLH pel motiu HLH formant heterodímers i eviten la interacció dels bHLH amb el DNA. S'ha observat que, en general, les cèl·lules desdiferenciades però amb una taxa de proliferació elevada (és a dir, les cèl·lules tumorals) presenten una alta expressió de IDs. Aquests inhibidors estan implicats en els processos de diferenciació cel·lular, inhibint-la. Durant l'embriogènesi, la deficiència dels gens *ID1* i *ID3* és letal perquè comporta la creació d'una vasculatura i d'una diferenciació neuronal aberrant en l'embrió (Lyden *et al* 1999). Les proteïnes ID estan implicades en molts processos cel·lulars com en la regulació del control del cicle cel·lular ja que, per exemple ID1, inhibeix l'activació del inhibidor de les ciclines dependents de quinases (CDK), el p16/INK4a. Inhibint p16/INK4, les CDKs queden lliures per interaccionar amb les proteïnes quinases i promoure la proliferació cel·lular. ID1 pot afectar també altres proteïnes del cicle cel·lular com p21 i p15.

La família dels inhibidors ID estan presents en molts tipus de tumors primaris, des del càncer de tiroides fins al càncer de pàncrees, passant pel càncer de mama, melanoma, càncer colorrectal, esofàgic, d'endometri, d'ovari, o tumors astrocítics, entre molts altres. En el càncer de mama, s'ha vist que l'expressió exògena de ID1 transforma les cèl·lules tumorals derivades d'un tumor diferenciat en cèl·lules altament agressives i desdiferenciades (Lin *et al.*, 2000). A més, ID1 afavoreix l'angiogènesi tumoral, com ha estat descrit en diversos estudis *in vitro* en

càncer d'ovari (Yajuan Su *et al.*, 2031). A més a més, per tots aquests rols en el desenvolupament tumoral, ID1 s'ha descrit com a proteïna marcador de l'adquisició de la capacitat metastàtica. També, a través de la regulació dels nivells d'expressió gènica de *MMP9*, ID1 s'ha associat a la inducció de la capacitat d'invasió i de migració cel·lular en càncer de mama (Sun *et al.*, 2009).

Les proteïnes ID juguen un paper important en molts processos biològics i també en la regulació de la progressió tumoral. No obstant, no s'han identificat alteracions en els gens *ID1* en els tumors primaris que puguin definir la família ID com a protoncongens, tot i que és una família diana per al tractament del càncer.

1.1.7 Inflamació sostinguda

La inflamació fisiològica és una resposta inespecífica davant les agressions del medi i està generada pels agents inflamatoris. La resposta inflamatòria sorgeix amb l'objectiu defensiu d'aïllar i destruir l'agent nociu, així com reparar el teixit o òrgan malmès. Com a resposta al dany, s'inicia una cascada multifactorial de senyals químiques que es manté fins a la reparació del teixit afectat. La inflamació implica l'activació i reclutament de leucòcits (neutròfils, monòcits i eosinòfils) via sanguínia o limfàtica fins als llocs on s'ha produït el dany. Allà, els fibroblasts, les cèl·lules endotelials i altres tipus cel·lulars proliferen i migren per a reconstruir la matriu extracel·lular malmesa i reparar el microambient normal. Els neutròfils (i a vegades els eosinòfils), són les primeres cèl·lules efectores reclutades com a resposta inflamatòria aguda. Els monòcits, que es diferencien en macròfags quan es troben en els teixits, són els següents en migrar al lloc d'actuació, guiats per un gradient quimiotàctic. Una vegada activats, els macròfags són la font de producció de factors de creixement i citoquines, que afecten les cèl·lules epitelials i mesenquimals del microambient cel·lular local. Però, com influeix la inflamació en el desenvolupament tumoral? Una de les hipòtesis suggerides en la literatura (Kuper *et al* 2000) és que la transformació cel·lular inicial succeiria en zones d'infecció o inflamació, com a procés normal en el nostre organisme. Aquesta premisa està recolzada per l'estadística, que estableix que la causa d'un 15 % dels tumors pot ser atribuïda a situacions perllongades d'infecció ja que les infeccions persistents indueixen una inflamació crònica. Els leucòcits i altres cèl·lules fagocítiques indueixen danys en el DNA de les cèl·lules que estan proliferant mitjançant la generació de la formació d'espècies reactives

d'oxigen i nitrogen, espècies produïdes en condicions normals com a resposta a una infecció. Aquests radicals d'oxigen són, a la llarga, agents mutagènics que alteren el DNA introduint-hi deleccions, mutacions, translocacions entre d'altres elements d'instabilitat genòmica (Cavallo *et al.*, 2011). L'associació entre inflamació crònica i càncer s'ha observat en pacients amb malalties com la colitis ulcerativa crònica o la malaltia de Crohn en càncer de colon, amb infecció per hepatitis C en el càncer de fetge, o amb infecció crònica per *Helicobacter pylori* en càncer d'estómac entre d'altres (Coussens *and* Werb, 2002).

El microambient inflamatori està estretament relacionat amb la carcinogènesi fins i tot en situacions d'absència d'estímuls externs proinflamatoris, és a dir, derivats de les cèl·lules immunitàries reclutades a la zona afectada. Les senyals derivades de l'activació d'oncogens indueixen vies de senyalització intrínseques proinflamatòries que tenen el seu efecte en el moment en què el càncer apareix i inicia la seva progressió. Diversos anàlisis genòmics en ratolins transgènics han permès identificar gens de citoquines, l'increment de l'expressió dels quals es troba en el microambient tumoral. L'origen d'aquestes citoquines és compartit entre les cèl·lules inflamatòries i les mateixes cèl·lules transformades que requereixen aquests factors per al seu propi creixement tumoral (Calogero *et al.*, 2007).

1.1.7.1 Microambient tumoral

Els tumors no són només masses de cèl·lules canceroses sinó que funcionen com a òrgans aberrants, cap als quals són reclutats diferents tipus cel·lulars que poden ser alterats per la senyalització procedent de les cèl·lules tumorals. Les interaccions entre les cèl·lules transformades i les no transformades creen l'anomenat microambient tumoral. Les cèl·lules no tumorals sovint tenen funcions que indirectament promouen el creixement del tumor. Les comunicacions intercel·lulars es donen gràcies a una xarxa complexa de senyalització per citoquines, quimioquines, factors de creixement i enzims proinflamatoris o remodeladors de la matriu extracel·lular. Totes aquestes molècules alteren les propietats físico-químiques dels teixits on es troben. Entre els tipus cel·lulars no transformats presents en el microambient tumoral trobem cèl·lules del sistema immunitari, de la xarxa vascular i limfàtica tumoral, fibroblasts i adipòcits, entre d'altres. En aquest treball de tesi ens centrarem principalment en els macròfags associats a tumors i en els

polimorfonucleats associats a tumors com a tipus cel·lulars implicats en la generació d'un microambient favorable a la progressió tumoral.

1.1.7.2 Macròfags associats a tumor o TAMs

Els macròfags són cèl·lules del sistema immunitari implicades en la resposta immunitària i tenen un paper de defensa de l'hoste i de manteniment de l'homeòstasi tissular. Tant els macròfags residents dels teixits com els inflamatoris s'originen de precursors de monòcits circulants originats a la medul·la espinal. Aquests precursors extravasen fins als teixits diana on es diferencien en macròfags i es polaritzen en diferents tipus i diferents fenotips en resposta als canvis microambientals. Cada macròfag, un cop polaritzat, exhibeix un perfil d'expressió de citoquines, enzims, i marcadors de superfície diferents.

En els tumors, els macròfags són el component estromal majoritari i s'anomenen Macròfags associats a tumor (TAMs). En els estats finals de la progressió tumoral, els TAMs generalment canvien a un fenotip definit per a una expressió baixa d'interleuquines IL-12 i alta de IL-10 que els fa disminuir l'activitat tumoricida. Per tant, els TAMs creen un microambient favorable per a l'angiogènesi, el creixement i la supervivència tumoral a través de l'alliberament de factors antiinflamatoris. Alguns estudis demostren que VEGF-A procedent dels macròfags contribueix en la iniciació de l'angiogènesi tumoral amb un augment de vasos en tumors sòlids. Aquest estudi mostra que en absència de macròfags no es produeix l'angiogènesi tumoral inicial (Bingle *et al* 2002).

Ha estat recentment publicat, també, que l'angiogènesi facilitada per condicions d'hipòxia ve donada per la secreció per part dels monòcits de MMP-9. Les metal·loproteases alliberades segreguen VEGF de la matriu extracel·lular afavorint-ne la interacció amb el seu receptor (VEGFR) i induint l'angiogènesi. Recentment s'ha demostrat que els TAMs produeixen múltiples citoquines pro-inflamatòries com IL-6, que estan implicades en la inducció de gens importants per a la progressió del cicle cel·lular i per a la supressió de l'apoptosi en les cèl·lules tumorals. És per aquest motiu que s'ha descrit que els pacients que presenten majors densitats de TAMs en els tumors tenen pitjor taxa de supervivència.

Els TAMs afecten també indirectament al procés metastàtic ja que altera el microambient tumoral. *Wyckoff* va desenvolupar un sistema per investigar el comportament metastàtic de les cèl·lules tumorals i va

descriure que les cèl·lules s'associen amb TAMs en els tumors de mama en el moment de la intravasació. Mecanísticament, les cèl·lules tumorals sintetitzen el factor estimulador de colònies 1 o CSF-1 per a promoure la migració dels macròfags i EGF per a millorar la capacitat d'invasió de les cèl·lules tumorals. La inhibició de CSF-1 o EGF anul·la la migració d'ambós tipus cel·lulars. Per tant, hi ha un *loop* o regulació paracrina entre aquests factors en el control de la invasió de les cèl·lules tumorals (Boim *et al.*, 2012).

Els components de la matriu extracel·lulars en el microambient tumoral participen en el procés metastàtic ja que modulen la funció dels TAMs en la millora de la supervivència de les cèl·lules tumorals en el microambient tumoral. Els macròfags alliberen un seguit de proteases com metal·loproteases, i serina proteases que degradarien la matriu extracel·lular adjacent a les cèl·lules tumorals i els facilitaria la invasió.

1.1.7.3 Polimorfonucleats o PMNs

EL desenvolupament tumoral i la metàstasi estan influenciades per l'estroma, l'angiogènesi i la resposta immunològica tant innata com adaptativa. El concepte de la supervivència immunitària del tumor va ser descrita en un primer moment per Paul Ehrlich al 1909, postulant que el sistema immunològic pot restringir el creixement espontani de les cèl·lules transformades identificant-les i posteriorment eliminant-les (Ghably *et al.*, 2015). Mig segle després, Burnet i Thomas van proposar antigens associats atumor que poden provocar una resposta immune antitumoral efectiva (Burnet FM, 1968). No obstant, aquesta teoria de la vigilància dels sistema immunitari en els tumors genera controvèrsia ja que, tot i que l'activació immunitària pot erradicar les cèl·lules canceroses, l'activació crònica del sistema immunitari (especialment la resposta innata) que cursa amb d'inflamació crònica, pot promoure el desenvolupament tumoral (Pollard *et al.*, 2004). Els neutròfils o polimorfonucleats (PMN) són de les primeres cèl·lules en arribar als llocs d'infecció, on poden alliberar citoquines i proteases que, alhora, recluten cèl·lules immunitàries efectores específiques i no específiques contra l'antigen detectat. La contribució dels PMNs al creixement del tumor primari i a la metàstasi és un altre tema que genera controvèrsia. Hi ha articles on es descriu que els neutròfils, mitjançant l'alliberament de grànuls tòxics contra les cèl·lules tumorals podrien tenir una activitat potencialment antitumoral (Colombo *et al.*, 1992; Nozawa *et al* 2006). No obstant, també s'ha observat que els PMNs promouen el creixement

del tumor primari en models animals de càncer i que tenen efectes protumorals ja que estimulen l'angiogènesi tumoral incrementant la degradació de la matriu extracel·lular i inhibint la resposta immunitària (Pekarek *et al.*, 1995; Nozawa *et al.*, 2006; Youn and Gabrilavich, 2010). En diversos models *in vivo* s'ha demostrat que els PMNs estimulen l'angiogènesi tumoral a través de la producció de factors proangiogènics, com VEGF i IL-8 i algunes proteases com les MMPs que poden, al seu torn, facilitar la metàstasi. A més, en diversos estudis s'ha vist que l'eliminació dels neutròfils inhibeix l'associació entre VEGF i el seu receptor (VEGFR). Aquestes dades són consistents amb la premissa que els neutròfils són una font inicial imprescindible per a la producció de MMP9. Els neutròfils constitueixen aproximadament un 0.1-0.4% de les cèl·lules presents en els tumors sòlids, i els macròfags un 2-4 %.

1.1.8 Evasió de la resposta immunitària

La vigilància immunològica fa referència a l'habilitat del sistema immunològic per a identificar i destruir els tumors en desenvolupament. No obstant, en el desenvolupament tumoral una de les característiques d'algunes cèl·lules tumorals és la capacitat d'evadir el reconeixement i per tant la resposta immunitària derivada d'aquest. Per a estudiar aquest ítem es van usar ratolins amb alteracions gèniques que no permetien la correcta formació de limfòcits T i/o B. Aquest ratolins, en comparació amb els *wild type*, eren més propensos a formar tumors espontanis després d'un tractament amb agents químics carcinògens (Shankaran *et al.*, 2001). Els mateixos resultats es van obtenir amb ratolins portadors de mutacions per a gens involucrats en la resposta immunitària innata. Els mecanismes de vigilància del sistema immunològic limiten, doncs, la progressió tumoral però no són completament eficients. Els tumors que es desenvolupen acostumen a ser aquells que no són immunògens, és a dir, que no desencadenen una resposta immunitària suficientment agressiva com per ser atacats i eliminats pel sistema immunològic. Aquesta capacitat de les cèl·lules tumorals de passar desapercibudes o d'evadir el reconeixement pel sistema immunitari és una altra característica pròpia de molts tumors. En els últims 10 anys s'ha fet evident que les cèl·lules tumorals generen mecanismes, tant a nivell cel·lular com a nivell molecular per a defensar-se del sistema immunitari. En primer lloc, les cèl·lules precanceroses, amb la inestabilitat genètica que les caracteritza, generen tot un seguit de clons amb propietats immunogèniques diferents que es van seleccionant fins que aquells que ho siguin menys poden progressar per a formar el tumor. Normalment, aquests clons adquireixen aquest fenotip degut a una menor expressió

de les glicoproteïnes de membrana del complex major d'histocompatibilitat (MHC). També redueixen els antígens de membrana que poden ser reconeguts per les cèl·lules T, fet que fa disminuir la intensitat de la fase efectora d'aquests limfòcits contra la cèl·lula tumoral.

En segon lloc, els tumors poden adquirir l'habilitat d'alliberar grans quantitats de factors i citoquines per a neutralitzar o aturar mecanismes de reacció immunitaris. Quan un tumor adquireix aquesta capacitat i comença a alliberar factors estimuladors de colònies (CSFs) o VEGF, causa una expansió de la població de cèl·lules immadures mieloides que no només ajuden als tumors a suprimir la reacció immunitària sinó que també ajuden en la construcció de nous vasos sanguinis per al creixement tumoral (McLean *et al.*, 2008).

Per últim, les cèl·lules tumorals també poden defensar-se de la resposta immunitària actuant sobre les cèl·lules T reguladores (T_{regs}), que són els components del sistema immunitari encarregats de suprimir les respostes immunitàries d'altres cèl·lules mitjançant el reconeixement per alta afinitat d'antígens propis. Aquesta autoregulació de la resposta immunitària prevé les respostes excessives que poden comportar dany tissular. Les cèl·lules tumorals poden adquirir la capacitat de sobreproduir alguns antígens propis que són reconeguts pels T_{regs} . Aquests, inicien el bloqueig de la inducció de l'autoimmunitat i per tant, la reacció immunitària contra les cèl·lules canceroses. Amb aquests mecanismes d'evasió del sistema immunològic, les cèl·lules tumorals tenen més possibilitats de progressar i desenvolupar un tumor.

1.1.9 Reprogramació del metabolisme energètic

La proliferació cel·lular contínua i descontrolada de les cèl·lules tumorals també comporta reajustaments en el metabolisme energètic per a poder satisfer les necessitats derivades d'aquest intens creixement.

Les cèl·lules no transformades, sota condicions aeròbiques, processen la glucosa fins a obtenir piruvat a través de la glucòlisi, al citosol. El piruvat, llavors, entra a mitocondri on mitjançant el cicle de krebs es transforma en CO_2 , ja que és la via metabòlica a través de la qual s'obté més energia. Sota condicions anaeròbiques, la glucòlisi anaeròbica (fermentació) resulta ser la via d'obtenció d'energia majoritària ja que no usa oxigen, però l'energia resultant és molt menor. En les cèl·lules tumorals es dona una reprogramació del metabolisme de la glucosa de

manera que, fins i tot en condicions aeròbiques, les cèl·lules obtenen energia a través de la glucòlisi anaeròbica. Per a incrementar l'obtenció d'energia, les cèl·lules canceroses augmenten la producció de transportadors de glucosa, aconseguint així una major importació de glucosa al citoplasma. Aquest increment en l'ús de la glucosa s'ha observat en molts tumors humans, monitoritzant la importació d'un anàleg de glucosa conjugat amb un element radioactiu marcat (Jones and Thompson, 2009). Aquesta reprogramació del metabolisme energètic pot representar per les cèl·lules tumorals una adaptació a un ambient on freqüentment hi ha condicions d'hipòxia. Aquesta hipòxia, alhora, indueix l'expressió de gens com *HIF-1* que activarà la transcripció dels gens dels transportadors de glucosa, induint així encara més la glicòlisi anaeròbica (Kroemer and Pouyssegur, 2008). L'ús del lactat com a combustible (procedent de la glucòlisi anaeròbica) s'ha associat a l'activació d'oncogens com *MYC* o *RAS* i a la mutació de gens supressors de tumors com *TP53* (Jones and Thompson, 2009), fets que indicarien que el metabolisme energètic és una característica clau del desenvolupament tumoral.

1.2 CÀNCER DE MAMA

Aquest treball de tesi doctoral es centra en el càncer de mama, que és un càncer que s'inicia a les cèl·lules del pit en dones i, més rarament, en homes. A nivell mundial, el càncer de mama és el segon tipus de càncer més freqüent després del càncer de pulmó (10,4 % del total de la incidència de càncer, comptats ambdós sexes) i la cinquena causa més comuna de mort per càncer. El càncer de mama és aproximadament 100 vegades més freqüent en les dones que en els homes, però les taxes de supervivència són iguals en ambdós sexes (World Health Organization. «Fact sheet No. 297: Cancer», February 2006). El càncer de mama no és el càncer més freqüent en dones a nivell mundial però és el primer o segon més comú en totes les regions del món, amb una incidència de 1,4 milions de nous casos anuals que va en augment. La mortalitat és del 31 % però tendeix a anar disminuint gràcies als nous coneixements de la malaltia i a les noves teràpies antitumorals (Boyle *et al.*, 2012).

El càncer de mama es pot classificar a nivell histològic (en funció del teixit afectat), segons el grau del tumor (grau de diferenciació cel·lular), segons l'estadi en què es troba (grau de malignitat) o segons l'expressió gènica/ proteica que expressen les cèl·lules tumorals que els

constitueixen. Aquesta classificació es va modificant constantment a mesura que es van coneixent més marcadors genètics (gens específics per un tipus de tumor) i el perfil molecular dels diferents tipus de càncer. Actualment, en base al perfil molecular, el càncer de mama es divideix en quatre subtipus: els luminals A, que presenten receptors hormonals d'estrògens o de progesterona (ER+ i PR+) però que no tenen receptors pel factor de creixement epidermal o HER2 (HER2-), els luminal B, que tenen tant receptors hormonals com per HER2, els subtipus HER2+, que no presenten receptors hormonals però sí per HER2 i els triple negatiu (TNBC per "*triple negative breast cancer*") que no tenen cap dels receptors anteriorment esmentats (Taula 1) (Wang *et al.*, 2015).

Taula 1. Classificació del càncer de mama en els 4 subtipus segons criteris moleculars i la prevalença aproximada a nivell mundial (*World Health Organization*).

SUBTIPUS DE CÀNCER DE MAMA	CARACTERÍSTIQUES	PREVALENÇA (aprox)
Luminal A	ER+ i/or PR+, HER2-, baix nivell de Ki67	40%
Luminal B	ER+ i/or PR+, HER2+ (o HER2- amb alts nivells de Ki67)	20%
TNBC	ER-, PR-, HER2-	15-20%
HER2	ER-, PR-, HER2+	10-15%

Fa una dècada, el càncer de mama es considerava una malaltia relativament "simple" en molts aspectes. Essencialment quantificaven si el tumor era o no dependent d'estrogen per a poder-hi aplicar una teràpia o una altra. Progressivament es va anar imposant una caracterització del càncer de mama a nivell més molecular que mostra una gran heterogeneïtat de la patologia a nivell clínic. Aquestes caracteritzacions van ser fruit de diversos estudis epidemiològics que van usar grans quantitats de dades d'expressió gènica procedents de treballs amb tècniques avançades com microarrays de cDNA (Perou *et al.*, 2000). Com a resultat d'aquests estudis els carcinomes de mama es van classificar en 5 grups diferents: "luminal A", "luminal B", els que "sobreproduïen HER2", "basal-like", i tumors de tipus "mama normal". Cada subtipus presenta diferents signatures moleculars, pronòstic i resposta a nivell terapèutic.

Des del punt de vista clínic els càncers de mama es poden també dividir en 3 categories basades en l'expressió de receptors hormonals positius (com el receptor d'estrogens (ER) o de progesterona (PR)), l'expressió incrementada del gen del receptor 2 del factor de creixement epidermal (HER2neu) i el triple negatiu o TNBC (ER, PR i Her2/neu negatius). Aquesta és la classificació més actual del càncer de mama que ha introduït el terme de càncers "*triple-negative*" o TNBC que es defineixen com a ER negatius, PR negatius i que no sobreproduïxen HER2. Els TNBC, però, poden ser positius per marcadors de cèl·lules basals i per això erròniament es defineixen a vegades com a basals. També segueixen havent-hi els "luminal A", que es defineixen com a ER positius i/o PR positius i histològicament com a tumors de grau baix o diferenciats (el grau histològic és el nivell de similitud amb el teixit original, essent el grau baix un tumor diferenciats, similar al teixit original). Els luminals B es defineixen com a ER positius però histològicament són tumors d'alt grau (o molt desdiferenciats). Els tumors HER2 positius són càncers que tenen una amplificació del gen *HER2* i per tant sobreproduïxen el receptor HER2.

La classificació dels càncers de mama varia d'uns autors a uns altres i es va modificant constantment a mesura que se'n coneixen més marcadors i s'amplia la caracterització i el número de les mostres. En general, els tractaments tant a nivell quirúrgic com radiològics són similars però el tractament farmacològic és diferent en cada cas (Polyak *et al.*, 2011).

1.2.1 Càncer de mama triple negatiu (TNBC)

Un 20 % dels càncers de mama diagnosticats cada any són de tipus TNBC. És el tipus de càncer més agressiu i que es diagnostica a edat més primerenca (<40 anys). Els TNBCs tenen un pic de recaiguda entre el primer i tercer any després del diagnòstic i tractament. Les metàstasis són freqüents i apareixen sobretot en pulmó i cervell (en os també però menys freqüentment). La quimioteràpia convencional és la base del tractament del TNBC ja que no existeixen fàrmacs específics per aquest tipus de tumor. Els tumors petits són més fàcils de tractar usant mètodes tradicionals com la cirurgia, quimioteràpia o radioteràpia. Quan els tumors són més grans o s'han extès, l'eficiència del tractament sempre es veu molt reduïda. Degut a l'absència de contra dianes moleculars, es considera clau incrementar el coneixement del perfil molecular i les vies de senyalització aberrants implicades en el TNBC per entendre la seva

etiologia i pel desenvolupament de teràpies específiques dirigides a dianes del TNBC (Hudis *et al.*, 2011).

En aquest treball s'usen com a model de càncer triple negatiu les línes cel·lulars MDA-MB-231 i MDA-MB-468 humanes, ambdues metastàtiques i procedents de pacients amb adenocarcinoma mamari. Aquestes cèl·lules deriven de la pleura on es va generar un focus metastàtic.

1.2.2 Via de senyalització de Calcineurina-NFATc

El ió calci (Ca^{2+}) té un paper crucial com a segon missatger en la transducció de senyals a l'interior cel·lular. La unió de lligands als receptors de la superfície cel·lular com els immunoreceptors o receptors associats a proteïna G (GPCR) induïen l'activació de la fosfolipasa C (PLC) i la subseqüent hidròlisi del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat en diacilglicerol (DAG) i inositol trisfosfat (IP3). IP3 s'uneix al seu receptor IP3-1,4,5-trisfosfat (IP3R) permeable al calci, situat a la membrana del reticle endoplasmàtic i estimula l'alliberament de calci del reticle cap al citosol. Com a conseqüència de l'alliberació del calci, STIM1 percep la disminució de calci del reticle i es desplaça a la membrana plasmàtica on contacta amb ORAI1 (ORA1 i STIM1 formen part dels anomenats canals CRAC). La interacció resulta en un canvi conformacional en ORAI1 que crea un influx de calci cap al citosol. L'increment de calci citosòlic activa la calmodulina (CaM) que s'uneix a subunitat catalítica de la fosfatasa calcineurina (CnA), activant la calcineurina (Cn). Un cop activada, Cn desfosforila els seus substrats, inclosos els NFATc, i produeix un canvi conformacional que fa que aquests factors de transcripció exposin una senyal de localització nuclear i transloquin a nucli on, juntament amb d'altres factors de transcripció com l'AP1 regulen la transcripció gènica dels gens diana en diferents programes cel·lulars. Per tant d'aquesta forma s'activa incrementant la concentració intracel·lular de calci la via de senyalització Cn-NFATc (Figura 4).

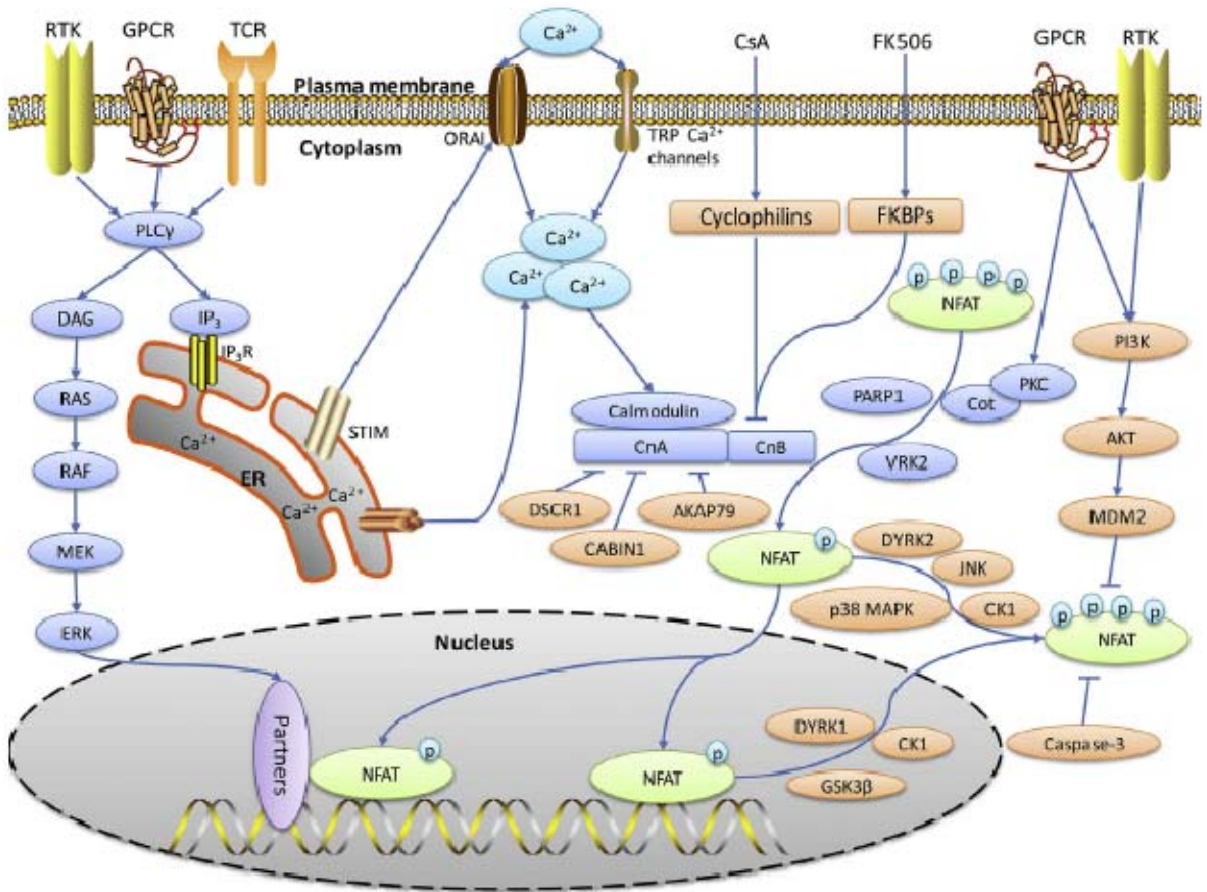


Figura 4. La via de senyalització cel·lular de Cn-NFATc i la seva regulació. Els immunoreceptors, receptors tirosina quinases (RTKs) i els receptors associats a proteïnes G (GPCR) activen la fosfolipasaC (PLC) que hidrolitza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2) en diacilglicerol (DAG) i inositol trifosfat (IP3). IP3 s'uneix al receptor d'IP3 (IP3R), en el reticle endoplasmàtic (ER), que és un canal de calci que quan s'activa per IP3 induïx l'alliberament de calci al citosol. Amb la disminució del calci emmagatzemat al reticle, la molècula d'interacció estromal 1 (STIM1) del ER s'activa, transloca a membrana, oligomeritza i interacciona amb la proteïna ORAI de la membrana plasmàtica. ORAI, llavors, induïx un influx de calci extracel·lular que activarà la calmodulina (CaM) i aquesta a la Cn, que desfosforilarà i activarà els NFATc, permetent la translocació d'aquests a nucli, on coopera amb altres factors de transcripció per iniciar la transcripció dels gens diana. Els NFATc estan regulats per fosforilació per diverses quinases com la GSK 3β, la DYRK, CK1, p38 MAPK, etc. La Cn és la diana dels fàrmacs immunosupressors Ciclosporina A (CsA) i Tacrolimus (FK506). S'han descrit també diversos inhibidors endògens de la Cn com RCAN1 (abans anomenat DSCR1), CABIN1, i AKAP79. (Figura de *Shou et al*, 2015).

1.2.2.1 Calcineurina

La Calcineurina (Cn, formalment denominada com PPP3, abans PP2B) és l'única serina-treonina fosfatasa regulada per Ca^{2+} i per calmodulina (CaM) descrita fins al moment. Cn és un heterodímer format per dues subunitats: la subunitat catalítica A (CnA) amb una massa molecular de 58-69 kDa i la subunitat reguladora B (CnB), amb una massa molecular de 16-19 kDa (Klee *et al.*, 1979). El domini catalític de CnA està connectat a través d'una seqüència *linker* a una regió reguladora que conté els dominis d'unió a la CnB i a la calmodulina (CaM) i també el domini autoinhibidor (AID) (Figura 5).

A mamífers existeixen tres isoformes de la CnA: CnA α , CnA β i CnA γ , que són els productes de tres gens diferents, *PPP3CA*, localitzat al cromosoma 4 humà (4q24) (Giri *et al.*, 1991); *PPP3CB*, localitzat al cromosoma 10 humà (10q22.2) (Muramatsu *and* Kincaid, 1992) i *PPP3CC*, localitzat al cromosoma 8 humà (8p21.3) (Wang *et al.*, 1996a). La conservació d'aminoàcids entre les diferents isoformes, exceptuant els extrems N i C-terminals, mostra entre un 83-89 % d'identitat (Klee *et al.*, 1998). L'expressió de Cn és ubiqua a tots els teixits en mamífers, i està present a concentracions deu cops més altes en cervell i múscul que en altres tipus cel·lulars. Pel que fa a la CnA, la isoforma CnA α predomina a cervell, CnA β sembla ser particularment important a limfòcits i CnA γ en canvi és específica de testicle (Muramatsu *and* Kincaid, 1992). Pel que fa a la CnB, mentre que l'expressió de CnB1 és ubiqua, la de la CnB2 es restringeix a testicle (Wang *et al.*, 1996a).

La CnA α humana conté un domini catalític (residus 70-333), una regió anomenada *linker* localitzada entre el domini catalític i el domini d'unió a la CnB (residus 335-347), un domini d'unió a la CnB (residus 348-373), una regió d'unió a la CaM (residus 390-414) i un motiu autoinhibidor (AID, residus 469-486) (Figura 5). El centre actiu de la Cn es troba en una butxaca del domini catalític que conté dos ions metàl·lics Fe^{3+} i Zn^{2+} .

Pel que fa a la CnB, a mamífers hi han dues isoformes: CnB1 i CnB2, productes proteics de dos gens diferents, *PPP3R1*, localitzat al cromosoma 2 humà (2p15) (Wang *et al.*, 1996a) i *PPP3R2*, localitzat al cromosoma 9 humà (9q31.1). La CnB està formada per dos motius d'unió a Ca^{2+} tipus *EF hand*, el motiu 1 (residus 1-84) i el motiu 2 (residus 86-169). Cada motiu *EF-hand* conté dos llocs d'unió a Ca^{2+} similars als que també estan presents a la CaM. D'aquets 4 llocs d'unió de calci, dos tenen alta afinitat (rang de la constant de dissociació, $k_D=0,3 \mu\text{M}$ i 0,9

μM) i dos baixa afinitat ($k_D = 11 \mu\text{M}$ i $36 \mu\text{M}$). Els motius d'alta afinitat en la CnB es consideren que tenen funcions estructurals, mentre que els de baixa afinitat serveixen com a sensors de calci i promouen canvis conformacionals en la regió d'unió de CaM a la subunitat CnA. Aquesta unió permetrà que el motiu AID marxi del centre actiu de CnA i no bloquegi l'accés als substrats de Cn. El fet que la interacció CaM-CnA depengui de la unió del calci en els motius *EF-hand* de la CaM, també de baixa afinitat, permet regular de manera molt fina l'activitat de CnA. Així, la Cn només s'activarà del tot en presència d'altres concentracions de calci.

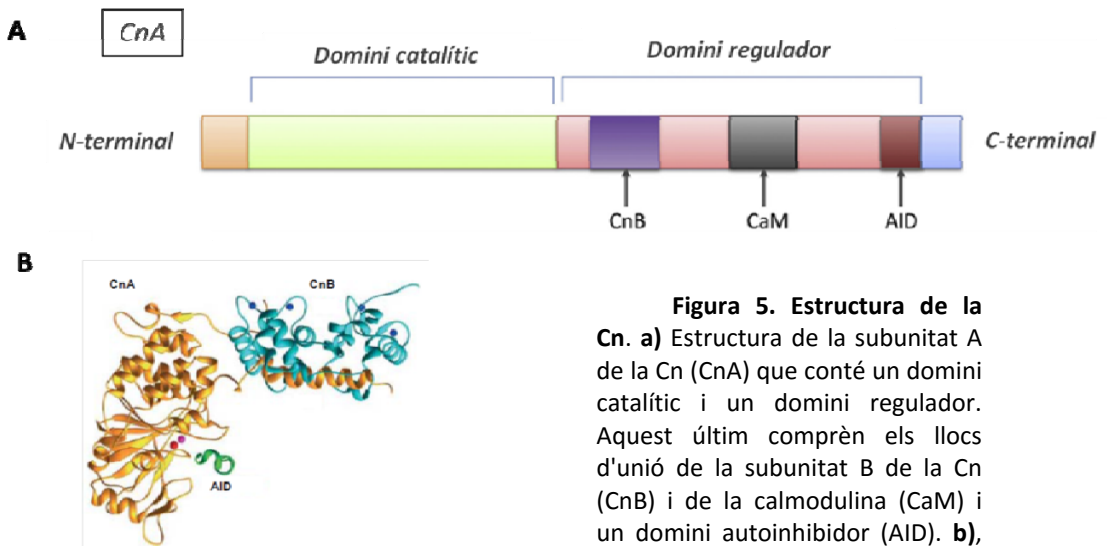


Figura 5. Estructura de la Cn. a) Estructura de la subunitat A de la Cn (CnA) que conté un domini catalític i un domini regulador. Aquest últim comprèn els llocs d'unió de la subunitat B de la Cn (CnB) i de la calmodulina (CaM) i un domini autoinhibidor (AID). b), Estructura tridimensional de l'heterodímer de CnA (en groc)-CnB (en blau) inactiu. En verd, el motiu AID. Els àtoms de Zn^{2+} , Fe^{3+} i Ca^{2+} es mostren en vermell, rosa i blau, respectivament (figura adaptada de Ke and Huai, 2003 i de J Shou et al 2015).

L'activitat fosfatasa de Cn consisteix en la transferència de manera directa d'un grup fosforil d'un residu serina o treonina a l'aigua sense que es formi cap enzim intermediari fosforilat. S'han descrit diversos mecanismes de regulació de l'activitat fosfatasa de Cn però en aquest treball ens focalitzem concretament en la regulació dependent de calci i calmodulina. En aquest cas, l'activació de Cn depèn de la unió de Ca^{2+} a la

CnB. El mateix passa amb la CaM, que necessita unir-se a Ca^{2+} per a activar-se i poder interaccionar amb Cn. L'estimulació cooperativa de la CaM permet a la Cn respondre a increments lleugers en la concentració de Ca^{2+} . Per això l'activació de Cn en cèl·lules es produeix en presència de concentracions de Ca^{2+} dins del rang 0,5-1 μM (Stemmer *and* Klee, 1994).

Respecte a la Cn, en condicions de baixa concentració de calci, el domini autoinhibitori (AID) interacciona amb el loop7 de la regió catalítica i n'inhibeix l'activitat fosfatasa (Wang *et al.*, 2007). Quan incrementa el calci citosòlic, aquest s'uneix a CaM que s'activa i s'uneix a CnA desplaçant el domini AID. Aquest increment de calci també fa que el calci s'uneixi als llocs de baixa afinitat de la CnB. Un cop la CnA s'ha activat, pot desfosforilar els seus substrats, inclosos els NFATcs (Figura 4) (Medyouf *et al.*, 2008).

S'ha descrit que l'especificitat de desfosforilació de substrats per Cn més que deguda al reconeixement d'una determinada seqüència consens, ve definida tant per l'estructura primària, com per la secundària, terciària i quaternària de la proteïna (Donella-Deana *et al.*, 1994).

En els últims 20 anys, s'ha demostrat que la Cn és una proteïna clau en la regulació d'una gran varietat de programes cel·lulars específics de tipus cel·lular i/o de teixit (taula 2). Donada la importància de la via no és d'estranyar que la desregulació de la via de senyalització Cn-NFATc pugui contribuir a una o més de les 3 epidèmies del segle XXI: càncer, alteracions metabòliques i malalties cerebrals degeneratives.

Taula 2. Substrats de la Calcineurina funcions corresponents en diferents processos cel·lulars (figura adaptada de Li *et al.* 2011).

SUBSTRATS DE LA CALCINEURINA (Li <i>et al.</i> 2011)			
Substrat	Funció	Substrat	Funció
NFATc	Regulació transcripcional	Fizzy/Cdc20	Cicle cel·lular i apoptosi
TORC2/CRTC2		BAD	
Elk-1		Drp1	
Rb		AKAP79	Proteïnes diana
MEF2A		Calsarcin-1/2/3	
MAP2	Citoesquelet	MLP	Resposta a l'estrés en llevats
Tau		Crz1	
Slingshot1L		hph1	
Dephosphins		Slm1/2	
TRESK	Receptors i canals iònics	PKA subunitat RII	Proteïnes reguladores
TRVP1		DARPP-32	
Receptor AMPA		Inhibidor-I	
Receptor NMDA		I κ B β	
Receptor GABA(A)		NOS2	
IP3R		RCAN	
kv2.1		Cabin/Cain	
KATP		KSR2	
		RACK1	
		CIB1	

La desregulació de l'activació de Cn deguda a la fluctuació aberrant dels nivells de calci s'ha associat amb canvis en la funció neuronal, i amb una davallada de la funció cognitiva i de la memòria durant l'envelliment (Baumgärtel *et al.*, 2012). La regulació a l'alça de l'activació de la Cn per senyalització excessiva de calci s'ha descrit que produeix neurodegeneració per acumulació citotòxica de glutamat. L'activitat enzimàtica de Cn és important en la regulació de la integritat i remodelació del citoesquelet neuronal perquè desfosforila les proteïnes MAP2 i TAU, entre d'altres, permetent que s'incrementi l'estabilitat dels microtúbuls. Els pacients d'Alzheimer presenten quantitats anormals de proteïna TAU hiperfosforilada que correlaciona amb una disminució de l'activitat fosfatasa de la Cn (Ladner *et al.*, 1996). Aquestes dades han suggerit la participació de Cn en el desenvolupament de processos

neurodegeneratiu, com per exemple la malaltia d'Alzheimer (Winder and Sweatt *et al.*, 2001). També en el cor la Cn hi té un paper important. Hi ha grups que suggereixen que la Cn pot estar directament relacionada amb el correcte funcionament de les funcions bàsiques del cor com el ritme i la contractilitat. Molkenkin *et al.*, van observar que animals amb sobreproducció de CnA desenvolupaven una hipertròfia cardíaca que acabava, finalment, amb infart (Dong D *et al.*, 2003). En el múscul esquelètic, la Cn està implicada en la diferenciació dels mioblasts perquè induïx l'expressió de la miogenina a través de l'activació dels factors de transcripció MEF2 i MyoD (Friday *et al.*, 2003). També, intervé en la regeneració muscular com a resposta al dany tissular (Abbott *et al.*, 1998) i una relació entre la via de senyalització Cn-NFATc i la Diabetis Mellitus tipus II; els pacients amb diabetis tipus II presenten resistència a la insulina en el múscul esquelètic, i s'ha demostrat que l'activació de la Cn augmenta la funció de la insulina a múscul esquelètic, fet que comporta una millora en la Diabetis II (Ryder *et al.*, 2003). En el ronyó, la Cn també hi té importants funcions. Per exemple, la Cn és imprescindible pel creixement, desenvolupament i maduració renal en els primers estadis de desenvolupament (Burn *et al.*, 2011). Donat que la Cn també s'expressa en retina, nervi òptic i còrnea, també podem veure-hi diferents funcions. S'ha demostrat que incrementant la pressió arterial es provoca apoptosi en les cèl·lules tumorals dels ganglis en pacients amb glaucoma, i és un mecanisme molecular mediat per la Cn (Huang *et al.* 2005). En altres teixits s'ha demostrat la participació de Cn en el desenvolupament del sistema vascular permetent la correcte oxigenació i distribució dels vasos sanguinis a l'organisme (Graef *et al.*, 2001b) així com la participació en angiogènesi (Hernandez *et al.*, 2001), activació de la síntesi de surfactants essencials per prevenir el colapse alveolar a pulmó (Dave *et al.*, 2006), regulació dels osteoblasts i osteoclasts necessaris per la formació dels ossos (Winslow *et al.*, 2006), regulació del creixement i funció de les cèl·lules β productores d'insulina al pàncreas (Heit *et al.*, 2006) i modulació del creixement i diferenciació de queratinòcits (Mammucari *et al.*, 2005). En el sistema immunitari la Cn està implicada en la regulació de la proliferació i del desenvolupament de timòcits, diferenciació de cel·lules T *helper* (T_h), inducció de tolerància i activació limfocitària entre d'altres (Feske *et al.*, 2007).

Pel que fa al sistema immunitari, el Ca^{2+} és un missatger secundari que juga un paper crucial en la senyalització dels diversos tipus cel·lulars que formen part del sistema immunitari. El Ca^{2+} promou l'activació i maduració dels limfòcits B (Lewis *et al.*, 2007); en els mastòcits causa la desgranulació i l'alliberament d'histamina (Hoth and Penner, 1992); en

cèl·lules *natural killer* promou l'activitat citolítica en resposta al reconeixement cèl·lula-antigen de membrana; en cèl·lules dendrítiques (DC) estimula la seva maduració a partir de progenitors mieloides, l'expressió de molècules MHC (per *major histocompatibility complex*) de classe II i la migració de DCs immadures a òrgans linfoïdes secundaris; en macròfags estimula l'expressió gènica de citoquines pro-inflamatòries i en els neutròfils estimula la fagocitosi (Feske *et al.*, 2007). Tots aquests processos estan mediatos pel Ca^{2+} i per la Cn activada. A limfòcits T, la senyalització per Cn participa en diversos processos biològics: regulació de la proliferació i desenvolupament de timòcits, diferenciació de les cèl·lules T col·laboradores, inducció de tolerància i activació limfocitària (Lee *and* Park, 2006).

La Cn, doncs, interacciona amb multitud de substrats i regula d'aquesta forma múltiples vies de senyalització cel·lular i programes d'expressió gènica cel·lulars. D'entre el substrats de Cn destacarem, per la seva importància en aquest treball de tesi doctoral, la família de factors de transcripció NFATc (per *nuclear factor of activated T cells*) (Crabtree *and* Clipstone, 1994; Rao *et al.*, 1994).

1.2.2.2 NFATc

La família de factors de transcripció NFAT està formada per cinc membres: NFATc1 (també conegut com NF-ATC, NFATc, NFAT2), NFATc2 (NF-ATP, NFATp, NFAT1), NFATc3 (NFAT4, NFATX), NFATc4 (NFAT3) i NFAT5 (TONEBP). Mentre que els quatre primers (anomenats a partir d'ara com a NFATc) estan regulats per Ca^{2+} via Cn, NFAT5 no té llocs d'unió a Cn i la seva activitat no és dependent de calci. NFAT5 respon a senyals d'estrès osmòtic (Dahl *et al.*, 2001). En aquest treball ens centrarem amb l'estudi dels NFATc.

Els NFATc juguen un paper clau en molts processos biològics mitjançant la regulació de l'expressió de diversos gens com les interleuquines i quimioquines (Mubeccel *et al.*, 2011). Entre les interleuquines regulades pel NFATc trobem (*IL*)-2, *IL*-3, *IL*-4, *IL*-5, factors estimuladors de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF), interferons (IFN), factors de necrosi tumoral (*TNF*)- α , receptors de la superfície cel·lular com *CD40L* i *FasL*, entre altres. Els NFATc, doncs, estan implicats en l'activació i diferenciació de limfocits T (Hogan *et al.*, 2003) però també en la funcionalitat d'altres cèl·lules immunitàries com les cèl·lules dendrítiques, els limfòcits B i els megacariòcits (Zanoni *et al.*,

2009). Els NFATc tenen un paper clau en molts programes del desenvolupament en vertebrats com en cor, múscul esquelètic, vasos sanguinis, neurones, pàncrees o pell (Hogan *et al.*, 2003; Neigishi-Koga and Takayanagi, 2009; Winslow *et al.*, 2006; Heit *et al.*, 2006; Horsley *et al.*, 2008).

A nivell funcional, l'estudi dels NFATc amb models animals que presenten deleccions dels gens *NFATc* (*NFATc^{-/-}*) ha suposat un gran pas endavant molt important en el coneixement de l'efecte funcional d'aquestes proteïnes (Taula 3).

Taula 3. Resum dels fenotips observats en estudis funcionals en els quals es va deleccionar un o més components de la família dels *NFATc*.

Genotip	Fenotip	Referència
NFATc1 ^{-/-}	Letal, errors en la morfogènesi cardíaca	de la Pompea <i>et al.</i> , 1998
NFATc2 ^{-/-}	Hiperactivació immunitària i respostes al·lèrgiques. Supressió de la condrogènesi	Ranger <i>et al.</i> , 1998
NFATc3 ^{-/-}	Defectes en el desenvolupament del timus i hiperproliferació de limfòcits	Oukka <i>et al.</i> 1998
NFATc4 ^{-/-}	Desenvolupament normal, sense defectes aparents	Graef <i>et al.</i> , 2001
NFATc1 i c2 ^{-/-}	Errors en l'activació de les cèl·lules T i de l'activació gènica en la resposta immunitària	Peng <i>et al.</i> , 2001
NFATc2 i c3 ^{-/-}	Diferenciació espontània de limfòcits T helper (TH1) i resposta al·lèrgica excessiva	Ranger <i>et al.</i> , 1998
NFATc3 i c4 ^{-/-}	Letal, defectes en el patró vascular	Graef <i>et al.</i> , 2001

En les cèl·lules del sistema immunitari s'expressen principalment els NFATc1, NFATc2 i NFATc3 on juguen un paper clau en la regulació de gens induïts en la resposta immunitària (Macian *et al.*, 2005). Les proteïnes NFATc s'expressen de forma ubiqua amb algunes excepcions com la NFATc4, que no s'expressa al sistema immunitari. A més, cada gen té variants de *splicing* que generen diferents isoformes. Aquestes isoformes presenten diferències en els extrems amino i carboxi-terminal. Els 4 gens NFAT (NFATc1-NFATc4) van sorgir a l'origen dels vertebrats, fet que implica que han evolucionat per a desenvolupar funcions específiques en vertebrats, tals com un sistema nerviós més complex, un sistema immunològic basat en la recombinació o un sistema vascular amb un cor més complex (Graef *et al.*, 2001).

Tots els NFATcs tenen un domini d'unió al DNA molt conservat que es troba relacionat estructuralment amb el domini d'unió al DNA de la família de factors de transcripció Rel també coneguts com NFκB. Aquesta regió homòloga a la de les proteïnes Rel (RHR), comú a totes les proteïnes NFAT, els proporciona una capacitat específica d'unir-se al DNA. Els NFATc tenen també un domini regulador conegut com la regió d'homologia dels NFATc (NHR). Aquest domini NHR està moderadament conservat en la família i inclou un potent domini de transactivació (TAD) així com varis motius rics amb residus serina (SRR1 i SRR2) i en residus serina prolina (SP1, SP2 i SP3) que es troben fosforilats en cèl·lules no estimulades (Aramburu *et al.*, 2000). A més, també conté els motius d'ancoratge a Cn; el motiu PxlXIT (Aramburu *et al.*, 1998) i el motiu LxVP (Park *et al.*, 2000), conservats entre els NFATc (Figura 6 i 7).

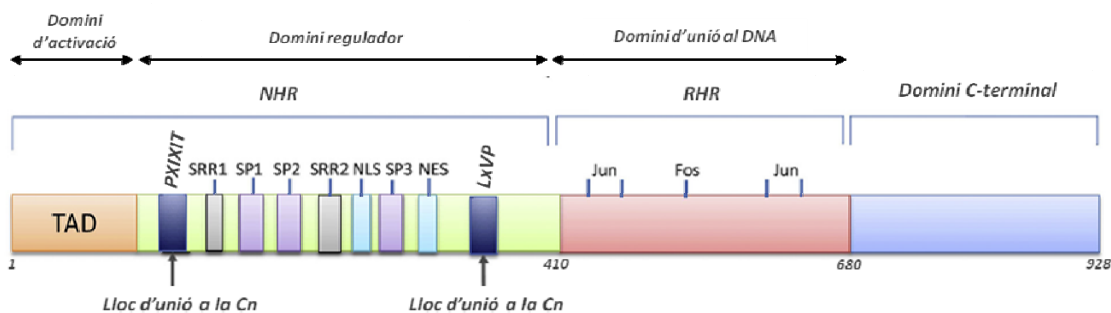


Figura 6. Esquema de les proteïnes NFATc basat en NFATc1, en el qual s'indiquen els diferents motius importants dels NFATc (figura adaptada de Hogan *et al.*, 2003).

El motiu PxlXIT, que és el principal motiu d'ancoratge a la Cn dels NFATcs interacciona amb el domini catalític de la CnA (Li *et al.*, 2007; Takeuchi *et al.*, 2007) i presenta una elevada identitat de seqüència aminoacídica a vertebrats (Auabreda *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2007 i 2009) entre els diversos membres de la família (Figura 7). El motiu LxVP, també lloc d'unió a la CnA, presenta una identitat del 100% dels residus consens del motiu en tota la família a Eukarya (Macian *et al.*, 2005). Mentre que la unió dels NFATc a Cn a través del PxlXIT té lloc tant si Cn està activada com si no, la unió a través del LxVP es produeix preferentment quan Cn està activada (Martinez-Martinez *et al.*, 2009).

NFATc1:	115- LES PRIEIT SCLGLYH-130 ... 384- DQY LAVP QHHPYQWAKP-399
NFATc2:	108- GL SPRIEIT PSHELIQ-123 ... 366- ES LLVP PPTWPKPLVL-381
NFATc3:	106- FE CPSIQIT SISPNCH-121... 390- DQ FLSVP SPFTWSKPK-4C5
NFATc4:	111- LE CPSIRIT SISPTPE-126 ... 375- MDY LAVP SPLAWSKAR- 390

NHR

Figura 7. Conservació dels motius descrits dels NFATcs d'unió a Cn, localitzats en la regió d'homologia dels NFATcs (NHR): motius consens LxVP i PxlxIT. En vermell es mostren els aminoàcids més conservats dels motius LxVP i PxlxIT.

1.2.2.2.1 Interacció Calcineurina-NFATc

Mitjançant l'anàlisi de seqüència dels diferents membres i isoformes de la família NFATc, es va observar que la seqüència PxlxIT estava implicada en la unió a CnA (Aramburu *et al.*, 1998; Garcia-Cozar *et al.*, 1998). Després de determinar la seqüència aminoacídica consens PxlxIT dels NFATc d'unió a Cn, s'optimitzà aquesta seqüència per a millorar l'afinitat d'aquests per la Cn mitjançant l'ús de col·leccions combinatorials de pèptids, i s'identificà el pèptid PVIVIT (motiu PxlxIT) que inhibeix molt marcadament la senyalització de Cn-NFATc (Aramburu *et al.*, 1999). Dos estudis de l'estructura del complex de Cn amb el pèptid PVIVIT, va demostrar que la superfície d'interacció dels NFATc a la Cn es localitza en el domini catalític de la subunitat CnA (Li *et al.*, 2007; Takeuchi *et al.*, 2007). El pèptid PVIVIT interacciona amb el domini catalític de la Cn formant una extensió de la conformació al afegir una cadena β a l'extrem de la fulla β 14 de la CnA (marcades en vermell a la Figura 8). Els residus conservats del pèptid PVIVIT interaccionen també amb residus del marge extern de la cadena β 14 de la Cn; el residu 6 de la seqüència del PVIVIT (MAGPHPVIVITGPHEE), la prolina, queda situada a la butxaca hidrofòbica formada per residus procedents dels *loops* β 11/12 i β 13/14, i les valines i isoleucines formen ponts d'hidrogen amb els aminoàcids de les fulles β (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012 i Takeuchi *et al.*, 2007). S'ha demostrat que mutacions en la seqüència PVIVIT modulen l'afinitat del pèptid per Cn *in vivo* (Muller *et al.*, 2009).

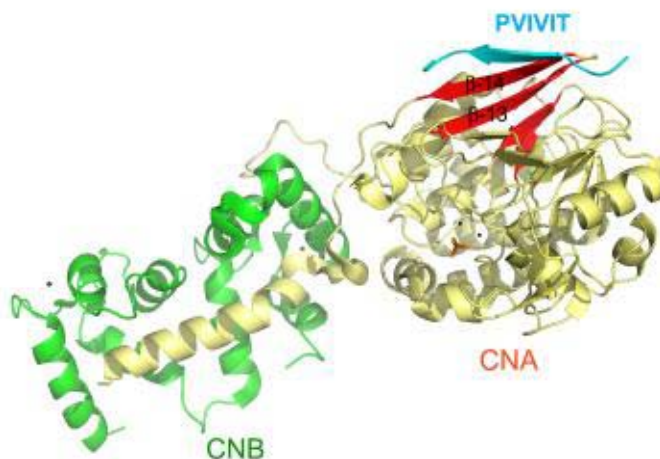


Figura 8. Estructura de la Calcineurina. En verd es mostra la subunitat B de la Cn, CnB, i en groc la subunitat A, CnA. En vermell es mostra la cadenes 14, i en blau es mostra el pèptid sintètic PVIVIT que conté el motiu PxlxIT dels NFATc (Figura adaptada de Li *et al.*, 2011).

D'altra banda, mitjançant assajos bioquímics amb el PVIVIT i Cn van demostrar que el pèptid PVIVIT és un disruptor de la interacció Cn-NFATc i inhibeix la translocació dels NFATc (Aramburu *et al.*, 1999) i la senyalització de Cn-NFATc però sense afectar l'activitat enzimàtica de Cn sobre altres substrats d'aquest enzim.

En quant al motiu LxVP dels NFATc, motiu d'interacció també amb Cn, es va caracteritzar com a pèptid d'unió a Cn en els NFATc1 i NFATc3 (Park *et al.*, 2000). Igual que en el cas del motiu PxlxIT dels NFATc, l'ús de pèptids mutants derivats de LxVP va permetre descriure que LxVP inhibeix l'activitat fosfatasa de la Cn sobre tots els seus substrats que contenen un motiu LxVP, com per exemple el seu substrat model, el pèptid RII derivat de la subunitat reguladora (RII α) de la proteïna quinasa A dependent d'AMPc. Cal destacar que és necessari eliminar l'efecte funcional dels dos motius, PxlxIT i LxVP, per a inhibir completament la desfosforilació dels NFATcs per la Cn. En un primer moment es va descriure que LxVP interacciona amb el centre actiu de CnA i que requereix l'activació prèvia de Cn per tal que aquest lloc quedi exposat, mentre que la seqüència PxlxIT, com s'ha dit anteriorment, s'uneix a un lloc diferent de la CnA que no afecta a la unió dels substrats al centre actiu. En els primers estudis sobre LxVP es va descriure que el lloc d'interacció era pròxim al *linker* que separa les unitats A i B de la Cn. Recentment, i en controvèrsia amb estudis estructurals i bioquímics

anteriorment, Maayan Gal *et al.*, ha suggerit recentment, per estudis de ressonància magnètica nuclear (RMN), que ambdós motius PxlIT i LxVP s'uneixen en dues regions de la CnA que es solapen de forma transitòria. Mitjançant assajos de competició de la interacció CnA-NFATc amb pèptids que contenen les seqüències del PxlIT o del LxVP, a concentracions equimolars, han demostrat que ambdós pèptids s'uneixen a CnA però no s'exclouen l'un a l'altre. Maayan Gal proposa un tipus d'unió conjunta d'ambdós motius a la CnA on els dos motius dels NFATc formen un bucle que permet que els motius PxlIT i LxVP puguin unir-se a CnA de forma solapada en una mateixa regió. A més, aquest bucle acostaria els residus fosforilats del substrat al centre actiu de la Cn de manera que es produiria la desfosforilació més ràpidament (Figura 9, Maayan Gal *et al.*, 2014).

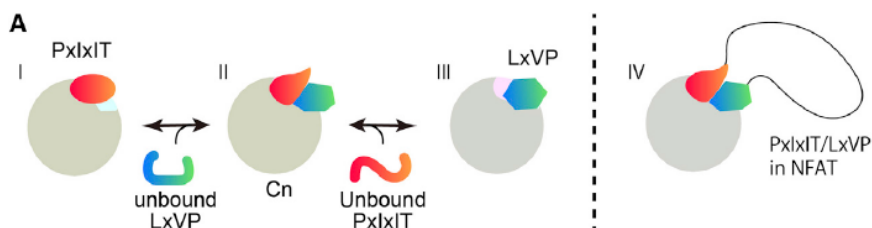


Figura 9. Els pèptids PxlIT i LxVP s'uneixen a epítops solapats en la CnA. a) Model suggerit dels canvis conformationals que tenen lloc durant la interacció de la Cn amb diferents concentracions del pèptid que contenen les seqüències PxlIT i LxVP dels NFATc. LxVP (I) o PxlIT (III) sols s'uneixen en conformacions incompatibles amb la unió de l'altre pèptid. Una situació de concentració equimolar dels dos pèptids (II) generaria una estructura d'unió a Cn diferent. La condició en la qual interaccionen els dos pèptids amb la Cn es creu que seria similar a la conformació que adoptarien els dos motius dels NFATc en la unió entre la proteïna sencera NFATc i la Cn (IV). Figura procedent de Maayan Gal *et al* 2014.

És acceptat per els experts en el tema que les diferents afinitats dels motius PxlIT i LxVP de les proteïnes NFATc contribueixen d'igual o diferent manera a una major afinitat a Cn, regulant l'activació de cada membre dels NFATc segons les condicions d'estimulació a través del calci i el context cel·lular. Per exemple, la seqüència LxVP de NFATc1 s'uneix més fortament a Cn que la de NFATc2, i per tant, es pot produir un augment de sensibilitat a l'activació de Cn major en NFATc1 en comparació amb NFATc2 (Martinez-Martinez *et al.*, 2006). No obstant, l'activació de les proteïnes NFATc podria estar influenciada també per

altres factors com ara l'abundància de cada membre o la presència d'altres proteïnes que continguin motius PxlIT, com els inhibidors Akap79 (seqüència PIAIIT), Cabin1 (seqüència PEITVT), RCAN (PSVVVH), entre d'altres (Maayan Gal *et al.*, 2014). Les RCANs, a més del motiu PxlIT, també presenten el motiu LxVP com a motiu d'interacció amb la Cn.

1.2.2.2.2 Regulació dels NFATc

Els NFATcs són factors de transcripció que, per tant, fan la seva funció a nucli. Els NFATcs tenen un component citoplasmàtic quan la proteïna està inactivada degut a diverses fosforilacions que amaguen la senyal de translocació a nucli. L'activació dels NFATc citoplasmàtics per Cn i posterior translocació a nucli depèn de la mobilització del calci intracel·lular.

L'estat de fosforilació dels NFATcs està finament regulat per diverses proteïna quinases. Aquestes proteïnes poden classificar-se com a proteïna quinases de manteniment o proteïna quinases d'exportació (Gwack *et al.*, 2007). Les primeres s'encarreguen de fosforilar i mantenir els NFATc al citoplasma en cèl·lules no estimulades, mentre que les segones són les responsables de fosforilar els NFATc al nucli per a que puguin retornar al citoplasma. Hi ha tres famílies de proteïna quinases que actuen conjuntament en la fosforilació dels NFATc: *caseïna quinase 1* (CK1), *dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase* (DYRK) i glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3).

Els NFATcs poden formar homodimers i unir-se al DNA o interaccionar amb altres factors de transcripció mitjançant el domini RHR, que és estructuralment homòleg al domini Rel de la família NFκB, per activar l'expressió gènica B (Yang *et al.* 2007). Els NFATc, de manera individual tenen poca afinitat per unir-se al DNA, però en canvi quan cooperen amb altres factors de transcripció donen lloc a heterodimers altament estables amb el DNA com ara la cooperació NFAT-AP1 (formats per homodimers o heterodimers de les proteïnes Jun i Fos principalment). La cooperació NFAT-AP1 s'ha demostrat en les regions promotores o *enhancers* de diversos gens, majoritàriament citoquines, com per exemple en cèl·lules del sistema immunitari en el gen de la *IL2* que conté dos o tres llocs d'unió compostos putatius al seu promotor; la regió *enhancer* de *CSF2* (per *colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)*) en conté tres (Chen *et al.* (2010); la *IL3*, *IL5* i *IFNγ* i *COX-2* tenen com a mínim un (Iñiguez *et al.*, 2000).

En els darrers anys, s'ha caracteritzat també la cooperació entre els NFATc i diferents membres de la família de factors de transcripció GATA. Mentre que la interacció NFATc4-GATA4 és important pel creixement dels cardiomiòcits i el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca (LE *et al.* 2012), la de NFATc1-GATA2 és crucial en el desenvolupament de la hipertròfia del múscul esquelètic (Sakumae *et al.*, 2003). A més, també s'ha descrit que els NFATc poden establir complexos amb altres factors de transcripció com MEF2, FOXP3, entre d'altres, i modular així més finament l'expressió gènica en diferents programes d'expressió gènica cel·lulars.

1.2.2.2.3 NFATc i càncer

Els NFATc són factors de transcripció claus en la regulació de programes d'expressió gènica en diversos processos fisiològics. És per això que, degut al paper crucial que tenen a nivell fisiològic, la seva desregulació s'ha associat de forma clara l'aparició de diverses malalties com la hipertrofia cardíaca, malalties autoimmunes i càncer, entre d'altres. Normalment aquesta desregulació és per alteració en el nivell d'expressió gènica dels gens diana o per nivells aberrants de proteïnes NFATc. No s'han descrit mutacions en els NFATc que s'associïn amb càncer. No obstant, les isoformes dels NFATc tenen diferents funcions en el procés tumoral. L'activació constitutiva de NFATc1 (NFAT2) inhibeix la diferenciació cel·lular dels fibroblasts i indueix una transformació maligna. A més, s'ha observat que l'activació constitutiva de NFATc1 indueix càncers d'ovari i de pell en animals transgènics. Això suggereix que NFATc1 pot tenir una funció oncogènica.

A diferència de NFATc1, la isoforma NFATc2 s'ha considerat com un factor supressor de tumors ja que l'expressió constitutiva de NFATc2 indueix un bloqueig del cicle cel·lular, l'apoptosi i inhibeix la transformació induïda per H-rasV12 (Robbs *et al.* 2008). En controvèrsia amb aquest estudi, es va demostrar que NFATc2 regula l'equilibri entre les senyals proangiogèniques i antiangiogèniques i, per tant, pot presentar funcions oposades en el procés d'angiogènesi segons les condicions cel·lulars que hi hagin (Zaichuck *et al.*, 2004). Aquests resultats suggereixen que NFATc2 és un supressor de tumors i NFATc1 un oncogen. Aquestes diferències es poden explicar pel tipus cel·lular, teixit o entorn ambiental on es produeix la isoforma. Així, els fibroblasts expressen majoritàriament NFATc1 mentre que els queratinòcits expressen majoritàriament NFATc2. S'han descrit també funcions dels

NFATcs com a reguladors de la proliferació cel·lular en mamífers. L'activació de NFATc1 no només s'ha observat com a inductor de la transformació cel·lular sinó també com a promotor de la formació de colònies en fibroblasts (Neal *et al.*, 2003).

NFAT s'ha relacionat també amb oncogens tan coneguts com *MYC*, gen diana de NFATc1 que regulen la transcripció de *MYC* en línies cel·lulars de càncer de pàncrees. Es creu que la interacció entre NFATc1 i *MYC* causa un increment en l'expressió gènica i en la producció de la proteïna ciclina D1 que facilita la capacitat de creixement independent d'ancoratge (Buchholz *et al.* 2006). A més, la inducció seqüencial de NFATc1 i c-myc facilita el creixement cel·lular induït per TGF- β (Singh *et al.* 2010). Respecte al NFATc2, s'ha observat que inhibeix l'expressió de la ciclina dependent de quinasa 4 (*cdk4*) i la ciclina A2 per tal de controlar el cicle cel·lular i la proliferació dels limfòcits (Carvalho *et al.*, 2007). En animals deficientes en els gens *NFATc2* i *NFATc3*, però, les cèl·lules immunitàries són resistents a la inducció de la mort cel·lular, a la producció de lligands Fas i a la hiperactivació d'aquets, cosa que posa en evidència la seva activitat com a supressors de tumors (Ranger *et al.*, 1998). No obstant, NFATc2 induïx la transcripció de *MDM2* i inactiva *TP53* en cèl·lules de càncer de mama (Zhang *et al.*, 2012). De la mateixa manera, Baumgart *et al.* (2012) van descriure que l'expressió gènica del *NFATc2* correlaciona amb un estadi avançat del càncer de pàncrees, ja que silencia el gen supressor de tumors *TP15*. En línies cel·lulars de càncer de pulmó s'ha observat que el *knockdown* de *NFATc2* inhibeix la migració i la invasió cel·lular (Liu *et al.*, 2013). Els NFATc són factors de transcripció que regulen l'expressió de gens associats a la invasió i a la migració, com la ciclooxigenasa 2 (*COX-2*). NFATc2 induïx l'expressió de *COX-2* en cèl·lules de càncer de mama. La inhibició de *COX-2* limita la invasió del càncer de mama; en canvi, la sobreexpressió de *COX-2* millora la capacitat d'invasió (Yiu *et al.*, 2006).

Tenint en compte totes aquestes dades, es creu que NFATc2 és un supressor de tumors en cèl·lules no transformades que pot actuar com a oncogen en cèl·lules tumorals. *NFATc1* podria estar relacionat en l'adquisició per part de les cèl·lules tumorals de característiques similars a les cèl·lules mare, com en la capacitat d'auto-regeneració i de dur a terme la transició epitel·li-mesènquima (EMT).

En el desenvolupament tumoral és inevitable parlar de la metastasi com a procés que pot seguir al creixement del tumor. Tot i que es coneix el procés des del tumor a la formació de nòduls en teixits distants, els mecanismes moleculars pels quals succeeix no ho són tant. Hi ha cada

vegada més autors que atribueixen als NFATc papers importants en el procés metastàtic (Yiu *et al.*, 2006; Jauliac *et al.*, 2002). La via més comú per a la metastasi tumoral és el sistema vascular, que inclou tan els vasos sanguinis com els limfàtics.

Com s'ha mencionat anteriorment, l'activació per desfosforilació dels NFATc pot ser inhibida per inhibidors de la Cn. D'entre aquests, els més coneguts i usats són la Ciclosporina A (CsA) i el Tacrolimus (FK506) i inhibeixen l'activitat de la Cn sobre els seus substrats. L'ús d'aquests fàrmacs (CsA i FK506) en investigació tan *in vitro* com *in vivo* ha demostrat algunes de les funcions dels NFATc, com ara la funció proangiogènica. En aquest cas, el tractament amb CsA en càncer de pàncrees provoca una disminució de l'angiogènesi tant *in vitro* com *in vivo* (Saydjari *et al.*, 1986; Saydjari *et al.*, 1988). D'aquests inhibidors se'n parlarà amb més detall a continuació.

1.2.2.3 Reguladors exògens de la via de senyalització Cn-NFATc

Fins a l'actualitat, la única fosfatasa descrita que desfosforila els factors de transcripció NFATc és la Cn. Els inhibidors de Cn s'utilitzen àmpliament com a inhibidors específics de l'activitat de la Cn. D'entre tots els inhibidors de Cn descrits (resumits en revisions com Sieber and Baumgrass, 2009; i Qin *et al.*, 2014), els més coneguts i usats en teràpia immunosupressora són els fàrmacs Ciclosporina A (CsA) i Tacrolimus (FK506).

La CsA és un undecapèptid (11 residus peptídics) cíclic derivat del fong *Beauveria nivea* i FK506 és una lactona macrocíclica sintetitzada per la bactèria *Streptomyces tsukubaensis*. La CsA es va descriure al 1976 com un agent antilimfocític en models animals (Borel *et al.*, 1976) i ràpidament es va veure que era molt eficaç en la prevenció del rebuig d'òrgans en la teràpia del transplantament i, al 1987 FK506 es va descriure com a fàrmac alternatiu a la CsA (Kino *et al.*, 1987a; 1987b). Tot i el gran ús d'aquests fàrmacs en clínica, el mecanisme d'acció no es va descriure fins el 1991 quan un estudi va identificar la Cn com a diana comú entre CsA i FK506 (Liu *et al.*, 1991). Ambdues molècules són de baixa massa molecular i hidrofòbiques i, per tant, poden travessar la membrana plasmàtica per difusió i un cop al citoplasma interaccionen amb uns receptors intracel·lulars anomenats immunofilines. Així doncs, CsA com FK506 s'uneixen a les immunofilines endògenes ciclofilina A (CypA) i FKBP12, i el complex que formen s'uneix a Cn inhibint la seva

activitat fosfatasa (Ho *et al.*, 1996). La unió dels complexos CsA- i FK506-immunofilines a la Cn evita l'accés d'altres substrats al centre actiu de la Cn.

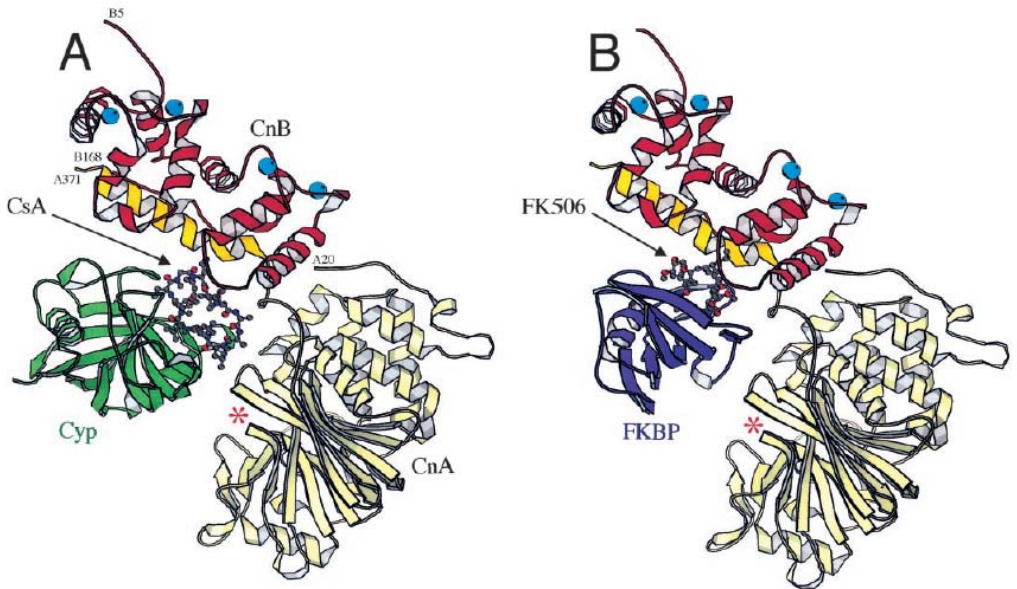


Figura 10. Esquema de l'estructura terciària dels complexos ciclofilines/CsA/Cn (A) i FKBP/FK506/Cn (B). Els fàrmacs CsA i FK506 estan indicats amb una fletxa. La CnA està representada en groc pàlid i la CnB en vermell. En verd, blau i groc intens es mostren la ciclofilina A, la FKBP12 i el domini d'unió de CnB a CnA respectivament. Les boles blaves corresponen a ions de calci. Amb un asterisc s'indica la posició del centre actiu de la Cn (Figura procedent de Jin and Harrison, 2002).

Tot i els beneficis del tractament amb CsA i FK506 en la teràpia immunosupressora, una administració continuada promou l'aparició de severes efectes secundaris, com neurotoxicitat, nefrotoxicitat, pèrdua de l'empelt en el cas del ronyó, augment del risc de patir càncer, hipertensió i diabetis entre d'altres (Maes and Vanrenterghem, 2004; Chapman *et al.*, 2011). La base dels efectes secundaris observats durant el tractament perllongat amb aquests fàrmacs es creu que pot ser conseqüència en part al fet d'impedir les funcions de les immunofilines a la cèl·lula degut al segrest d'aquestes per part dels fàrmacs, però principalment a la inhibició de l'activitat fosfatasa de la Cn sobre tots els seus substrats. En quant al segrest de les immunofilines, s'ha descrit que el de la ciclofilina

D, procedent del complex del porus mitocondrial, quan s'administra CsA té com a conseqüència una inhibició de la mort cel·lular (Halestrap et al., 2002). Altres estudis suggereixen que alguns dels efectes indesitjats del tractament perllongat amb la CsA vénen donats per la regulació de CsA sobre la senyalització de Notch. Aquesta hipòtesi sorgeix de l'estudi publicat recentment en el qual el tractament amb CsA en zebrafish produeix un colapse en el sistema cardiovascular que pot ser parcialment revertit amb inhibidors de Notch (Pandey R et al., 2015).

Hi ha un interès notable també en la cerca de proteïnes, pèptids i/o molècules exògenes amb funció immunosupressora, amb menys efectes secundaris que CsA i FK506, que puguin ser emprades en un futur com a eines alternatives a aquests fàrmacs. A part dels fàrmacs CsA i FK506, altres molècules exògenes que modulen la via de la Cn-NFATc són algunes proteïnes virals, com la proteïna A238L del virus de la febre porcina africana (Miskin et al 1998). Aquesta proteïna s'uneix directament a la Cn i inhibeix l'expressió gènica depedent dels NFATc. La freqüència amb la que els microorganismes afecten l'activitat de la Cn indica que aquesta fosfatasa és una mena de taló d'Aquiles de la resposta immunitària. Això es confirma amb el fet observat en el tractament immunosupressor que mostra que amb només un 50 % de la inhibició de l'activitat fosfatasa de la Cn s'aconsegueix una immunosupressió suficient contra el rebuig d'òrgans (Batiuk et al. 1995). Entre els inhibidors exògens de la Cn, l'any 2004, Roehrl et al. van identificar i caracteritzar un conjunt de compostos anomenats INCA (per inhibitors of NFAT-calcineurin association) responsables d'interaccionar directament amb Cn i desplaçar la interacció VIVIT-Cn in vitro (Roehrl et al., 2004). D'entre ells, l'INCA-6 inhibeix la desfosforilació, la translocació i la transcripció de diverses citoquines dependents de NFATc sense afectar a l'activitat fosfatasa de la Cn. No obstant, la seva elevada citotoxicitat no va fer possible l'ús d'aquesta molècula exògena en assajos *in vivo*.

Estudis sobre altres agents no farmacològics com ara la teràpia peptídica han estat impulsats també en els últims anys per a regular la via Cn-NFATc. Així, el pèptid PVIVIT, que conté la seqüència dels aminoàcids del motiu PxlIT dels NFATc optimitzada en quant a afinitat a Cn, inhibeix específicament la senyalització dels NFATc dependent de Cn sense inhibir l'activitat fosfatasa de la Cn sobre altres substrats (Aramburu et al., 1999). L'afinitat d'aquest pèptid per a unir-se a la Cn és 25 vegades major que la seqüència natural del PxlIT dels NFATc. PVIVIT ha estat usat com a agent terapèutic en estudis sobre el sarcoma de Kaposi associat a Herpesvirus (KSHV). Els resultats demostren que l'ús d'aquest pèptid inhibeix la reactivació del virus en cèl·lules B

anteriorment infectades (línia cel·lular BCBL-1) ja que és un procés dependent de calci i de la via Cn-NFATc (Zoeteweij et al., 2001).

Un altre compost descrit amb potencial immunosupressor és el Dipiridamol (Mulero *et al.*, 2009; Mulero *et al.*, 2010). El Dipiridamol és una molècula desplaça el pèptid CIC de RCAN1 de la seva interacció amb la Cn. Com a conseqüència s'inhibeix la translocació dels NFATc al nucli, l'activitat dels promotors dependents de NFATc i l'expressió gènica de gens dependents de NFATc *in vitro*.

1.2.2.3.1 CsA, FK506 i càncer

La implicació de la via de senyalització Cn-NFAT en el desenvolupament del càncer ja s'ha comentat anteriorment i és, doncs, important la regulació d'aquesta via en aquesta malaltia. Respecte a la recerca oncològica, hi ha un interès creixent en el paper de Cn i dels NFATc en el càncer humà. Moltes de les evidències de la implicació de la senyalització dels NFATc en tumors sòlids humans prové d'estudis de càncer de mama (Jauliac *et al.* 2002; Yiu *et al.*, 2006) o de carcinomes de pàncrees, però també procedents de treballs realitzats en pàncrees, melanomes o carcinomes d'endometri. Per tot això, hi ha un increment creixent en la cerca de possibles agents terapèutics que tinguin la via de Cn-NFATc com a diana. L'ús de la CsA, fàrmac que inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn sobre tots els seus substrats inclosos els NFATc, ha demostrat ser un agent altament efectiu en el tractament de la leucèmia limfoblàstica aguda de cèl·lules T (T-ALL) en models de ratolí (Medyouf *and* Ghysdael, 2008) i en combinació amb imatinib (derivat de la 2-Fenilaminopirimidina, que funciona com un inhibidor específic de la tirosina quinasa, codificada pel gen bcr-abl, permanentment activada en aquesta malaltia, que s'uneix al centre actiu de la tirosina quinasa inhibint-ne l'activitat) en un model animal de leucèmia mieloide crònica (CML) (Gregory *et al.* 2010). Aquests resultats confirmen la idea que la inhibició de Cn pot ser beneficiosa també en càncers de cèl·lules immunitàries. Ara bé, l'ús de tractaments immunosupressors no específics com els esteroides incrementa el desenvolupament del càncer ja que el risc de patir carcinoma, per exemple, incrementa proporcionalment a la quantitat de fàrmac i a la durada del tractament).

1.2.2.4 Reguladors endògens de la via de senyalització Cn-NFATc

Per a disminuir els efectes secundaris que produeixen CsA i FK506, en els darrers anys s'està realitzant un esforç important en identificar i caracteritzar les proteïnes endògenes que regulen l'activitat fosfatasa de la Cn. Fins a l'actualitat, s'han identificat diversos moduladors endògens de la Cn que són capaços de modular la senyalització de Cn vers els NFATc a vegades inhibint-la i a vegades facilitant-la. Entre aquestes proteïnes reguladores de la via s'inclou la proteïna AKAP79 que s'uneix a Cn i evita l'accés als altres substrats de Cn (Klauck *et al.*, 1996). Aquestes proteïnes AKAP, alhora, s'uneixen a la proteïna quinasa A, que fosforila els NFATc i evita l'activació de NFATc1. Una altra proteïna inhibidora de Cn és CAIN o CABIN que s'uneix a Cn i bloqueja directament la seva activitat enzimàtica (Lai *et al.*, 1998). El tercer inhibidor és l'homòleg B de la CnB (CHP), que s'uneix a CnA i no permet l'activació de Cn (Lin *et al.* 1999). Finalment, la família de les proteïnes reguladores de calcineurina (RCAN; anomenades prèviament DSCR, per regió crítica del síndrome de Down, MCIP o calcipressines). En vertebrats hi ha tres membres d'aquesta última família de reguladors endògens de la Cn: RCAN1, RCAN2 i RCAN3. Aquestes proteïnes, que interaccionen amb Cn i inhibeixen la seva activitat sobre els NFATc tenen una seqüència anomenada CIC que és la responsable d'interaccionar amb alta afinitat amb la CnA en la regió corresponent al domini catalític de CnA entre els residus 335 i 347 i inhibir la seva activitat fosfatasa sobre els NFATc (Aubareda *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2007). Aquesta seqüència CIC conté un motiu tipus PxlXIT similar al dels NFATc (seqüència PSVVVH) que no inhibeix altres substrats de Cn apart dels NFATc. Per tant, el pèptid CIC té un clar potencial immunosupressor.

1.2.2.4.1 La família de les RCANs

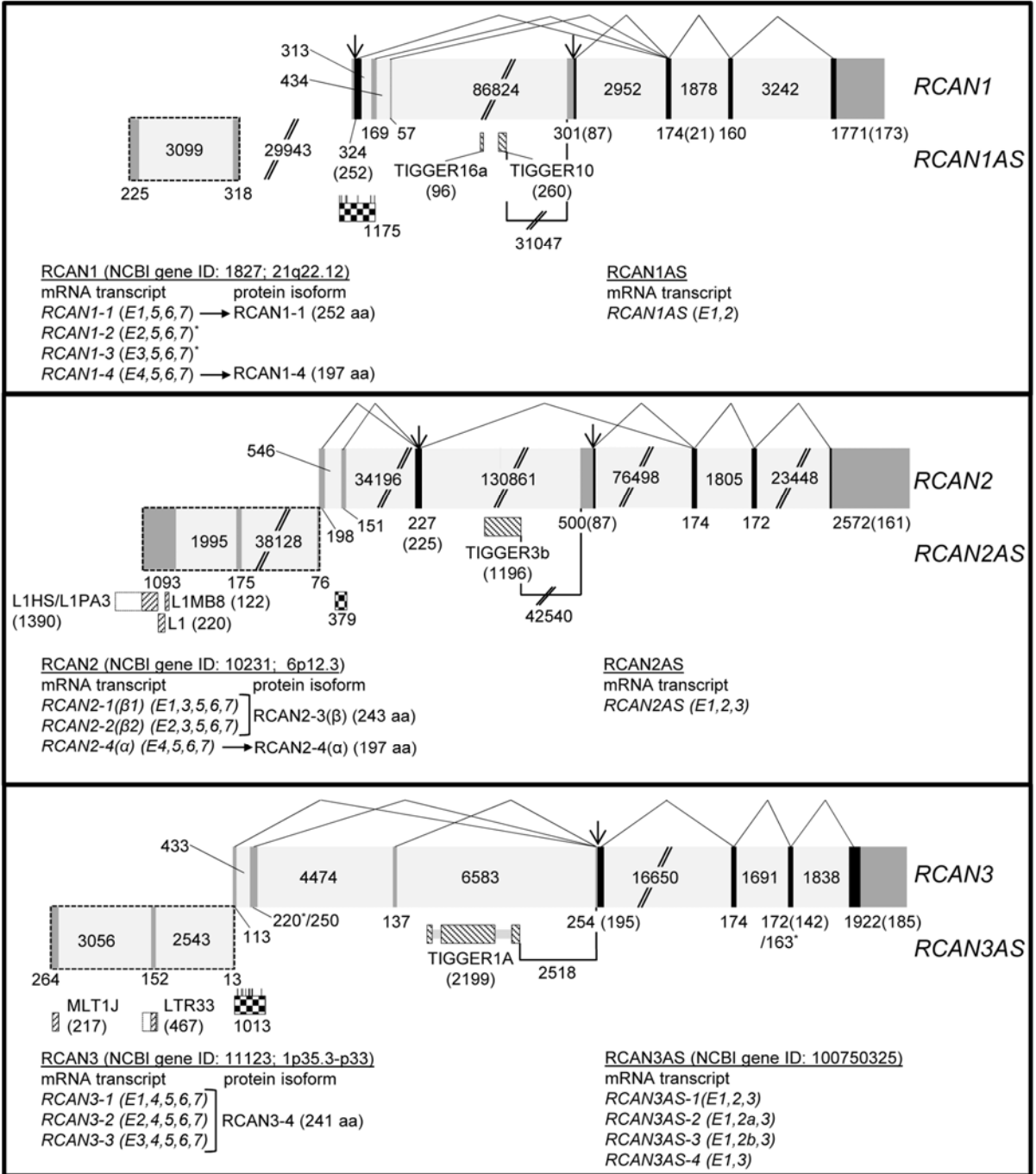
Les RCANs són proteïnes que s'uneixen físicament a Cn i faciliten o inhibeixen la seva activitat fosfatasa depenent dels nivells de proteïna de les RCAN presents en el context cel·lular i de l'afinitat dels diferents llocs d'unió de les RCANs vers la Cn (Martinez-Hoyer S, *et al.*, 2013).

Les proteïnes reguladores de Calcineurina o RCAN (anteriorment conegudes com DSCR, calcipressina, entre d'altres noms) són reguladors importants de molts processos cel·lulars com la resposta immune, el

remodelat de la fibra muscular, i la memòria però també estan implicades en el desenvolupament de diverses patologies com la Síndrome de Down, o patologies neurodegeneratives com l'Alzheimer. Altres estudis *in vivo* usant animals transgènics per *RCAN1* descriuen que la sobreproducció de *RCAN1* té alteracions en els vasos sanguinis (Minami *et al.*, 2004), altera el creixement tumoral (controvèrsia entre la funció de les isoformes *RCAN1-1* i *RCAN1-4*, Baek *et al.*, 2009), incrementa la mort neuronal per apoptosi (si es sobreprodueix *RCAN1* concretament en les neurones *in vitro*), entre d'altres. El coneixement de *RCAN3*, en canvi, és molt limitat.

Com a inhibidors endògens de la Cn, les proteïnes *RCAN* s'uneixen a la Cn i modulen la seva activitat fosfatasa en eucariotes. Mentre en eucariotes no vertebrats es troba un únic gen *RCAN*, en vertebrats la família de les *RCAN* està molt conservada i presenta tres membres: *RCAN1* (també conegut com *DSCR1*, *calcipressina-1*, *MCIP1* o *ADAPT78*), *RCAN2* (o *DSCR1L1*, *calcipressina-2* o *CALP2*, *MCIP2* o *ZAKI-4*) i *RCAN3* (o *DSCR1L2*, *calcipressina-3* o *CALP3*, o *MCIP3*). Cada gen codifica per diversos mRNAs i isoformes proteiques (Figura 11).

INTRODUCCIÓ



Untranslated exon
 Intron
 CpG island UCSC
 Tigger sequences
 1000 pb
 Coding exon
 NATs
 Retroviral sequences

Figura 11. Comparació entre les estructures gèniques dels membres de la família RCAN humana. Els tres membres de la família humana de les RCANs tenen 7 exons, dels quals només els tres últims codifiquen per la seqüència aminoacídica altament conservada entre les proteïnes paràlogues. Els diferents mRNA procedeixen de *splicings* alternatius del primer exó del mRNA de cada isoforma. Les fletxes indiquen l'inici de traducció. Les línies que connecten els exons representen les formes de *splicing* de cada gen RCAN. Les línies dobles en les regions intròniques marquen la longitud dels introns no escalada. Els números indiquen les mides dels introns i exons. Els números entre parèntesis indiquen els nucleòtids dels exons que connecten regions traduïdes i no traduïdes. Les línies verticals sobre les illes CpG associades a *RCAN1* i *RCAN3* corresponen a la posició exacta de les sondes de metilació usades en els *arrays* de metilació. Els asteriscs en alguns mRNA de *RCAN1* indiquen que aquests no s'han detectat a nivell de proteïna. També es mostren els mRNA antisentit relacionats amb cada gen *RCAN* (Figura procedent de Serrano-Candelas *et al.*, 2014).

La primera evidència de l'existència de les RCANs va ser la identificació de la proteïna RCAN1 (abans anomenada com regió crítica 1 del Síndrome de Down (DSCR1, Fuentes *et al.*, 1995)). Cinc anys després es va descriure que DSCR1 s'uneix a Cn (Fuentes *et al.* 2000; Kingsbury and Cuningham, 2000) i es va descobrir un altre membre de la família RCAN, el RCAN3 (Strippoli *et al.*, 2000). Més tard es va identificar RCAN2. Per a uniformar la diversitat de la nomenclatura dels membres i isoformes de la família de les RCANs, diversos autors experts en el tema (Davies *et al.*, 2007) van proposar utilitzar una nomenclatura única, RCAN per a "reguladors de calcineurina", que va aprovar el Comitè de Nomenclatura Gènica HUGO (HGNC). Així, tots els homòlegs, ortòlegs i paràlegs d'aquest gen i els seus productes proteics van passar a anomenar-se RCAN. El locus *DSCR1*, *Adapt78*, *MCIP1* o *Calcipressin 1* original en el cromosoma 21 va passar a ser *RCAN1*, el del *ZAKI-4* o *Calcipressin2* en el cromosoma 6 va passar a anomenar-se *RCAN2* i el del *DSCR1L2* en el cromosoma 1 va passar a ser *RCAN3* (Davies *et al.*, 2007) (Figura 12).

En relació a l'estructura gènica dels gens RCAN a vertebrats, Davis *et al.* (2007) van establir com nombrar els diferents gens, transcrits i proteïnes de la família. Més recentment, Facchin *et al.*, (2011) van demostrar l'existència de nous exons a RCAN3, i el nostre grup després d'analitzar l'evolució de l'estructura gènica de les RCANs a vertebrats va redefinir l'estructura gènica definint que el gens de les RCANs humanes tenen 7 exons, on del 5 a 7 són exons comuns a tots els transcrits i del 1 al 4 són majoritàriament primers exons dels gens, mutualment exclusius entre ells. A més d'aquest 7 exons, els gens de les *RCAN* presenten alguns

seqüències tipus tranposó, illes CpG en la regió 5' promotora del gen, l'existència de transcrits antisentit (NAT) i certes evidències de la presència de promotors bidireccionals (Figura 11)(Serrano-Candelas et al., 2014).

Estructura gènica de *RCAN3* humà

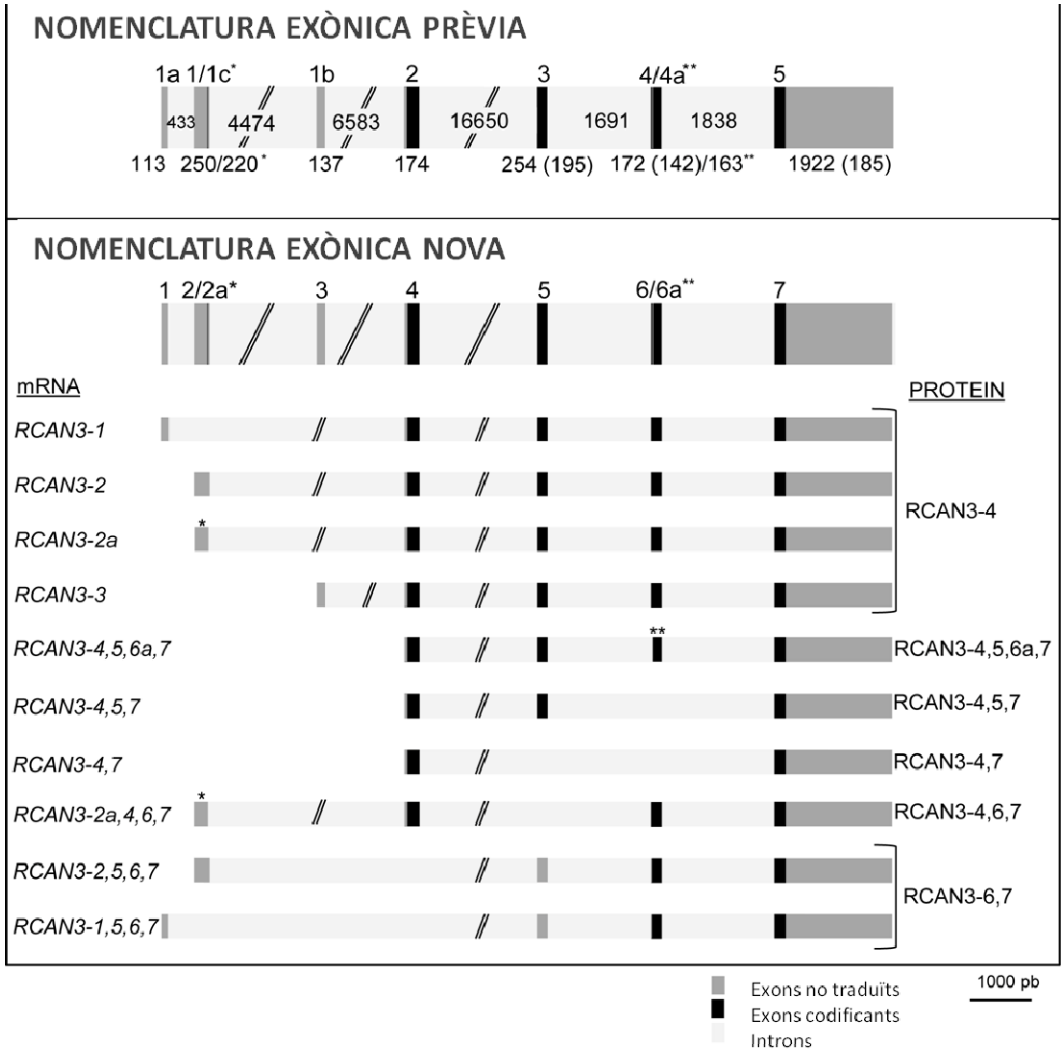


Figura 12. Estructura gènica del gen *RCAN3* humà, transcrits i isoformes de la proteïna segons la nomenclatura de Serrano-Candelas *et al* (2014). L'esquema

mostra la nova nomenclatura dels exons de RCAN3 tenint en compte que el gen de RCAN3 consta de 7 exons (Facchin *et al.*, 2011) respecte la prèvia de Davies *et al.*, (2007), i incorporant els transcripts acceptats per la base de dades RefSeq (Pruitt *et al.*, 2012.). Els rectangles es corresponen amb els exons, on els rectangles grisos son regions exòniques que no es tradueixen a proteïna i els rectangles negres corresponen a les regions exòniques que sí es tradueixen a proteïna. Totes les mides d'exons i introns s'indiquen en parell de bases i estan representades a escala, excepte els introns 2, 3 i 4. La mida de la seqüència codificant d'aquells exons que contenen regions que no es traduiran i regions que es traduiran es mostra entre parèntesi. Les variants de mRNA RCAN3-1, RCAN3-2, RCAN3-2a i RCAN3-3, que inclouen els exons 4, 5, 6 i 7, es tradueixen en una mateixa proteïna: RCAN3-4, que és la única isoforma descrita fins al moment per RCAN3 (241 aminoàcids) i és la única detectada a nivell endogen. Els asteriscs indiquen la presència d'un exó particular: els transcripts RCAN3-2a i el RCAN3-2a,4,6,7 tenen una regió no codificant a l'exó 2a i una variant de l'exó 2 més curta, i el transcript RCAN3-4,5,6a,7 té un exó 6a codificant al qual li falta un segment de 30 nucleòtids de l'exó 6 (Figura adaptada de Serrano-Candelas *et al.*, 2014).

Hi han estudis sobre la regulació dels gens *RCAN1* i *RCAN2* a nivell de promotor però es coneix poc la de *RCAN3*. En el promotor dels tres membres de RCAN hi ha illes CpG que, en el cas de RCAN1 i RCAN3 sembla que estarien sense metilar i per tant, transcripcionalment actives en diverses línies de càncer humanes (Serrano-Candelas *et al.*, 2014). El promotor de RCAN1-4 està regulat per 15 llocs d'unió als NFATc que no estan presents en RCAN-1. Aquest fet pot explicar la diferència en la regulació de l'expressió gènica de les isoformes de RCAN1 (Yang *et al.*, 2000). El promotor de RCAN2 s'ha descrit que respon a la tirosina i el promotor de RCAN3 es creu que ve regulat per la presència de caixes TATA. Anàlisis fets *in silico* prediuen que els mRNA de les isoformes de RCAN3 que comencen amb els exons 1 i 2 estan regulats per promotors sense caixa TATA. En canvi, els mRNA de les isoformes que comencen amb l'exó 3 es creu que són regulades per un promotor amb caixa TATA.

Com s'ha dit anteriorment, els *RCANs* conserven la regió central i C-terminal però difereixen en la regió N-terminal, degut a la presència de promotors alternatius per cada primer exó de cada gen *RCAN* (Serrano-Candelas *et al* 2014). Dels 7 exons presents en els diferents gens *RCAN*, el 5, 6 i el 7 són comuns en tots els mRNAs i codifiquen pràcticament per la mateixa seqüència d'aminoàcids en les diferents proteïnes RCAN.

Pel què fa a *RCAN1*, el membre més conegut de la família, és un gen localitzat al cromosoma 21 i que es transcriu en dos mRNAs majoritàriament i dóna dues proteïnes possibles, RCAN1-1 i RCAN1-4. Ambdues es troben al cor i a múscul esquelètic entre d'altres. En estudis

d'amplificació ràpida de cDNA 5' (RACE 5') en mostres humanes, s'han descrit dos mRNAs més però que no s'ha detectat que es tradueixin a proteïna (Fuentes *et al.*, 1997). La isoforma *RCAN1-1* té una expressió constitutiva i pot ser regulada positivament per glucocorticoides (Hirakawa *et al.* 2009). *RCAN1-4* és una forma induïble, l'expressió de la qual és regulada pels factors de transcripció NFATcs, ja que hi ha 15 llocs d'unió a NFATc en el promotor (Mulero *et al.*, 2007).

RCAN2 és un gen localitzat al cromosoma 6 i que codifica per tres formes de mRNA: *RCAN2-1*, *RCAN2-2*, *RCAN2-4*, però que es tradueixen per a formar una proteïna: *RCAN2-3*. *RCAN2-1* i *RCAN2-2* es detecten en cervell, cor, múscul esquelètic, ronyó, fetge i placenta. El mRNA *RCAN2-4* es detecta exclusivament en el cervell humà. La proteïna *RCAN2* es detecta també també en cervell embrionari (Cao *et al.*, 2002).

Respecte a *RCAN3*, aquest gen es localitza al cromosoma 11 i es transcriu en múltiples mRNAs que s'expressen de forma ubíqua, amb alta presència en el cor, múscul esquelètic, fetge, ronyó, leucòcits de sang perifèrica i en cèl·lules epitelials (Canaider *et al.*, 2006). Tots el mRNAs donen lloc a una mateixa proteïna, *RCAN3*. No obstant, es coneix molt poc sobre la regulació de l'expressió d'aquest gen.

Tot i la complexitat transcripcional dels *RCANs*, l'estructura gènica dels diferents membres d'aquesta família es similar. Pel que fa a la proteïna, com a resultat de múltiples alinaments de seqüència entre les diferents proteïnes *RCAN* presents en els diferents regnes filogenètics i tenint en compte també les seqüències predites *in silico*, es van identificar 4 regions conservades en les proteïnes *RCAN*, separades per seqüències poc o gens conservades (Mehta *et al.*, 2009). Els motius altament conservats són: un motiu de reconeixement del RNA (RMM), amb uns pocs aminoàcids de l'exó 1 i la major part de seqüència en l'exó 5 (primer exó comú a totes les *RCANs*), una regió rica en serines i prolines (SP), que es localitza exó 6 i inclou els motius LxxP i FLISPP, i la regió que conté els motius PxlIT-like i TxxP, localitzats a l'exó 7 (Figura 13) (Serrano-Candelas *et al.*, 2014).

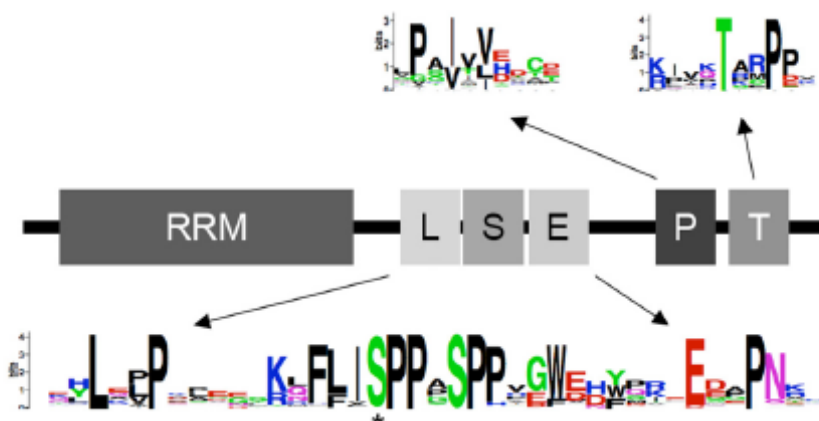


Figura 13. Representació esquemàtica dels motius conservats en les proteïnes RCAN de l'Eukaria (figura adaptada de Mehta *et al.*, 2009). L'alçada de les lletres correspona al nivell de conservació. Es mostren els motius conservats RRM, LxxP, FLISPP, ExxP, PxlXIT i TxxP (RRM, L, S, E, P, T a la figura respectivament).

El motiu RRM és un motiu de reconeixement de RNA codificat per l'exó 5, comú a tots els membres de la família RCAN (Figura 13).

El domini SP és una regió rica en serines i prolines que conté el motiu FLISPP, que és la signatura de la família de les RCANs i està 100% conservat en tota l'Eukarya. Flanquejant al FLISPP, hi ha els motius LxxP i ExxT, procedents de l'exó 6. El motiu LxxP de les RCAN és un motiu similar estructuralment al motiu LxVP d'unió a la Cn present en les proteïnes NFATc. Igual que el LxVP, la sobreexpressió del motiu LxxP de RCAN1 humà en llevats és capaç d'inhibir l'activitat fosfatasa de la Cn sobre tots els substrats (Mehta *et al* 2009; Rodriguez *et al* 2009). A més s'ha demostrat en llevats que a alts nivells de proteïna Rcan1, el motiu LxxP inhibeix parcialment l'activitat de la Cn mentre que a nivells fisiològics l'estimula (Mehta *et al.*, 2009). El motiu ExxP no inhibeix l'activitat fosfatasa de la Cn però és necessari, juntament amb els motius LxxP i TxxP per a l'efecte estimulador de Rcn1 sobre l'activació de la Cn com s'ha observat en llevats (Mehta *et al.*, 2009). Els motius ExxP i TxxP, juntament amb el motiu FLISPP, s'ha proposat que podrien estimular l'activitat Cn a altes concentracions mentre que els motius PxlXIT i LxxP podrien estimular la Cn a baixes concentracions de proteïna, independentment de la funció inhibidora que presenten a alts nivells (Mehta *et al.*, 2009).

El motiu FLISSP (FLISPP[AS]SP) és la signatura de les RCANs ja que presenta identitat de seqüència de llevats a humans. Aquest motiu és la

diana de quinases com GSK3, DYRK1A (Genescà *et al.*, 2003) i p38MAPK (Vega *et al.*, 2002), entre d'altres, que fosforilen les dues serines del motiu FLISPP. Aquestes fosforilacions són importants per a la funció moduladora de les RCANs. Així, la mutació de les dues serines del FLISPP en les isoformes RCAN1-1 i RCAN1-4 per residus d'alanina *in vitro*, no afecta a la unió de RCAN1-4 amb Cn però sí l'activació dels NFATc mediada per Cn i també la degradació via proteasoma de RCAN1-4 ja que n'incrementa la vida mitja (Genescà *et al.*, 2003). No obstant, s'ha descrit que altres proteïnes poden reconèixer els residus fosforilats en el motiu FLISPP i afavorir-ne la degradació per proteasoma. Tot i que la fosforilació no és la única manera de regular la vida mitja de les RCANs, el fet que la fosforilació del FLISPP pugui modular positivament o negativament l'activitat de Cn, en funció del context cel·lular o les condicions experimentals usades, confirma que les RCANs podrien tenir funcions diferents segons el tipus cel·lular i l'ambient específic en el qual es trobin.

Respecte al motiu PxlxIT i TxxP, són motius localitzats a l'exó 7, l'últim exó comú a totes les RCAN. En aquesta regió C-terminal de les RCANs hi han els motius PxlxIT i TxxP. El motiu PxlxIT, és un motiu funcionalment similar al motiu PxlxIT dels NFATcs (Aubareda *et al.*, 2006, Mulero *et al.*, 2007 i 2009, Mehta, *et al.*, 2009 i Martinez-Martinez *et al.*, 2009) que interacciona amb Cn i inhibeix la senyalització Cn-NFATc (Aubareda *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2007, 2009; Mehta *et al.*, 2009 Martinez-Martinez *et al.*, 2009). A les RCAN s'anomena pèptid CIC, per *Calcipressin* (ara RCAN) *Inhibitor of Calcineurin*, a la zona de la proteïna de les RCANs que conté un motiu PxlxIT funcional (PSVVVH) similar al dels NFATcs El motiu CIC està molt conservat en vertebrats però també s'ha identificat a eucariotes inferiors. La seva seqüència es localitza poc abans del motiu TxxP de RCAN1. La seqüència consens del motiu CIC en els mamífers és la següent (Mulero *et al.*, 2007):

LGPGEKYELHA[G/A]T[D/E][S/T]TPSVVVHVC[E/D]S

Un any després de la identificació del del motiu CIC de RCAN1 es va determinar el motiu funcional per a RCAN2 i RCAN3 (Mulero *et al.*, 2007), amb una seqüència idèntica entre la seqüència CIC de RCAN1 i de RCAN2/3 amb només 3 substitucions d'aminoàcids (G189A, E191D i S192T referits a la seqüència de RCAN3). El motiu CIC de RCAN1 comprèn els aminoàcids 193-203 i el de RCAN3 els aminoàcids 178 a 203. Al 2009 es va descriure la seqüència mínima del pèptid CIC amb 21 residus

(RCAN1¹⁹⁸⁻²¹⁸ i RCAN3¹⁸³⁻²⁰³) que inhibien la senyalització de Cn-NFATc (Mulero *et al.*, 2009). Mulero *et al.*, van ser els primers a descriure que el motiu PxlIT del pèptid CIC (PSVVVH) competeix amb el motiu PxlIT dels NFATc per a unir-se a Cn. El més interessant, però, és que la interacció amb Cn no afecta la interacció d'altres substrats amb Cn i, per tant, no afecta a l'activitat fosfatasa de la Cn sobre cap altre substrat diferent dels NFATc (Mulero *et al.*, 2009; Mehta *et al.*, 2009; Martínez-Martínez *et al.*, 2009). Aquest motiu posteriorment CIC es va estendre en RCAN3 per incloure una diana de la proteïna quinasa CK-2 que quan està fosforilada incrementa l'afinitat de la RCAN3 per Cn. El nou pèptid CIC de RCAN3 abarca els residus 178-210 (Martínez-Hoyer *et al.*, 2013).

Per últim, el motiu conservat TxxP a vertebrats és el més situat a l'extrem C-terminal de les proteïnes RCAN, just després del CIC i no se'n coneix massa bé la funció. Tot i que no s'ha descrit cap efecte sobre l'activitat de la Cn, s'ha vist que, juntament amb LxxP i ExxP, serien necessaris per a la fosforilació dependent de GSK3β.

Diversos estudis *in vivo* atribueixen un paper dual a les proteïnes RCAN com a facilitadors o inhibidors de la senyalització de Cn (Kingsbury and Cunningham, 2000). Aquesta funció dual s'associa a la diferent participació dels motius descrits en les RCAN, l'estat de fosforilació i les diferents afinitats per Cn, així com l'abundància de les proteïnes RCANs en cada teixit o tipus cel·lular (Mehta *et al.*, 2009).

1.2.2.4.1.1 RCANs i càncer

En la literatura hi ha diversos articles que relacionen les RCANs amb processos tumorals, sobre tot *RCAN1*, que és el membre de la família més estudiat (Ryeom *et al.*, 2008). Com s'ha dit anteriorment, el rol de les RCANs és dual, ja que depenent del context cel·lular s'ha observat que a vegades les RCANs tenen un rol activador o inhibidor de la via de la Cn-NFATc. En aquest context, s'ha observat que la sobreproducció de *RCAN1 in vivo*, impedeix la progressió tumoral ja que redueix l'angiogènesi tumoral (Minami *et al.*, 2004). D'acord amb aquesta observació, Baek *et al.* (2009), van observar que incrementant la dosis gènica en ratolins amb Síndrome de Down (trisomia del cromosoma 21 on es localitza *Rcan1*) es produïa un efecte inhibitori sobre el creixement tumoral que relacionen amb la inhibició de *RCAN1* sobre la via Cn-NFATc. Com a conseqüència de la deficiència del gen *Rcan1* murí es produeix una hiperactivació dels *Nfatc1*, així com un increment en la translocació de NFATc i en l'expressió de gens dependents dels NFATc com *Cox-2*. No

obstant, altres estudis demostren que la deficiència de *Rcan1* en models animals s'associa a un fenotip d'inhibició del creixement tumoral i de l'angiogènesi degut a un increment en l'apoptosi de les cèl·lules epitelials. De fet, aquesta dualitat s'ha associat a funcions diferents segons la isoforma afectada i les quantitats relatives de cada una d'elles en cada tipus cel·lular. Així, s'ha vist que RCAN1-4 suprimeix la senyalització de Cn-NFATc i com a conseqüència hi ha un bloqueig en la proliferació endotelial. En canvi, la isoforma RCAN1-1 s'ha vist que té un paper que podria promoure l'angiogènesi. Ara bé, s'ha descrit que la inhibició de les dues isoformes *in vivo* provoca una hiperactivació de la Cn i una inducció precoç de l'apoptosi de cèl·lules endotelials que impedeix la formació d'una vasculatura tumoral efectiva (Ryeom *et al.*, 2008). En l'actualitat no hi ha informació sobre l'efecte funcional de RCAN2 i RCAN3 en càncer, el fenotip associat a la deficiència o sobreexpressió d'aquest membre de la família i, el més important, no es coneix el seu efecte sobre la via de senyalització de Cn-NFATc en càncer.

S'ha publicat en diversos estudis la contribució de la proteïna RCAN1 en part del fenotip observat en les persones amb la síndrome de Down, trastorn genètic en el qual hi ha una sobreproducció (per increment de càrrega gènica) de proteïnes codificades pels gens del cromosoma 21 humà, entre els que s'inclou el *RCAN1 (DSCR1)*. S'ha demostrat que en els pacients amb síndrome de Down la freqüència de càncer és molt més baixa del normal. Per a confirmar la relació entre la inhibició de Cn i el creixement tumoral es van realitzar diversos estudis amb animals transgènics i es va veure que RCAN1 bloqueja el creixement tumoral a través de la inhibició de l'angiogènesi, inhibint la via de senyalització VEGF/Cn/NFATc. No obstant, Ryeom *et al* (2008) van descriure que la deleció en homozigosis de *RCAN1 in vivo* inhibeix el creixement tumoral ja que permet mantenir uns nivells elevats d'activació de la via Cn-NFATc que causen un augment en l'apoptosi de les cèl·lules endotelials i una disminució en l'angiogènesi tumoral. Per tant, RCAN1 està implicada en la progressió tumoral.

A grayscale histological micrograph showing a cross-section of tissue. The image displays various cellular structures, including what appears to be a layer of stratified epithelium at the top right, a layer of connective tissue or muscle fibers in the middle, and a dense population of cells in the lower half. The overall texture is fibrous and cellular.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Els objectius d' aquest treball d'investigació són els següents:

- Determinar l'efecte biològic de la sobreproducció de RCAN3 en la progressió tumoral en un model ortotòpic de càncer de mama triple negatiu (TNBC) humà.
- Efecte funcional del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, que conté el motiu PxlxlT-like de RCAN3 d'unió a calcineurina, en la progressió tumoral en el model ortotòpic de TNBC humà.
- Teràpia proteica antitumoral amb el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en el model ortotòpic de TNBC per tal determinar el seu potencial terapèutic.

A grayscale micrograph of biological tissue, likely a histological section. The image shows a dense network of cells and fibers, with a prominent layer of elongated, spindle-shaped cells in the lower half. The overall texture is fibrous and complex.

3. MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DE BACTERIS

3.1.1 Soques bacterianes

En aquest treball de tesis s'han usat les següents soques bacterianes:

3.1.1.1 Genotip de la soca *E. coli* DH5 α

DH5 α (F- Φ 80_{lacZ} Δ M15 Δ (_{lacZYA-argF}) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_K⁻ m_K⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*).

Aquesta soca s'ha usat per a l'amplificació de lentivirus i procediments de tecnologia de DNA recombinant.

3.1.2 Preparació dels bacteris quimiocompetents DH5 α

El protocol seguit per a la preparació de bacteris quimiocompetents ha estat adaptat del *Current Protocols in Molecular biology* i és el següent:

- Després de la incubació de la soca bacteriana seleccionada durant tota la nit (d'ara en endavant passa a denominar-se com O/N (*overnight*)) en 4 ml de medi LB, s'obté un cultiu saturat de bacteris. Es dilueix el cultiu 1:100 en 400 ml de LB i es deixa créixer a 37 °C en agitació (250 rpm).
- Quan la densitat òptica (OD) a 600 nm arriba a 0,4 unitats, centrifugar els bacteris a 4000 g 10 min en tubs de 50 ml a 4 °C. A partir d'aquest punt tots els passos següents s'han de fer a 0-4 °C.
- Fer dos rentats en PBS 1x de cada sediment bacterià resuspenent-los en 10 ml d'una solució de CaCl₂ a 4 °C (veure secció 9) i centrifugar a 4000 g 10 min.
- Mantenir els bacteris en gel durant 30 min després del segon rentat.
- Sedimentar els bacteris i resuspendre'ls en 2 ml de solució de CaCl₂ cada tub.
- Distribuir els bacteris competents en alíquotes de treball (100 μ l-500 μ l) i congelar-les immediatament en neu carbònica. Per a cada reacció de transformació s'utilitzen 100 μ l de cèl·lules transformades.
- Mantenir l'estoc de bacteris a -80°C.

- Calcular l'eficiència de transformació de les cèl·lules competents:
L'eficiència de transformació de les cèl·lules competents es defineix com el nombre d'unitats formadores de colònies (cfu) produïdes per microgram de DNA mesurat mitjançant una reacció de transformació usant una quantitat coneguda d'un DNA plasmidi control (normalment 10 ng) en 100 µl de cèl·lules competents, i sembrant 1, 10 i 25 µl del cultiu, i calculant finalment el nombre de colònies transformades per µl que multiplicat per 10^5 equival al número de transformants per µg de DNA.

3.1.3 Transformació per xoc tèrmic de bacteris quimiocompetents DH5α

El mètode d'elecció per a transformar bacteris quimiocompetents en aquest treball de tesi és mitjançant el xoc tèrmic. Independentment de la soca utilitzada (normalment DH5α) el protocol de transformació per xoc tèrmic és el següent:

- Mesclar DNA a transformar amb 100 µl de bacteris quimiocompetents i deixar-los incubar 10 min en gel.
- Incubar la mescla de DNA-bacteri 1,5 min (45 s si és la soca DH5α) en un bany d'aigua a 42° C.
- Refredar els bacteris en gel durant 2 min.
- Afegir 900 µl de medi LB fresc a cada tub de transformació.
- Incubar els bacteris transformats 1 h a 37°C i a 250 rpm d'agitació.
- Sembrar 10-50 µl del cultiu en una placa de LB amb agar que conté l'antibiòtic de selecció pel plasmidi de DNA plasmídic amplificat. En casos on el DNA a transformar prové de reaccions de lligació de DNA o reaccions de mutagènesi, centrifugar els bacteris a màxima velocitat durant 2 s i resuspendre'ls en 100 µl de medi LB i sembrar-los en la placa amb LB-agar.
- Incubar les plaques O/N a 37°C fins a la visualització de colònies al matí següent.

3.1.4 Producció de proteïnes heteròlogues en bactèries

Per a produir proteïnes heteròlogues cal transformar les bactèries quimiocompetents (DH5α per exemple) amb el corresponent vector d'expressió (pGEX) (apartat 3.1.9.2). Cal realitzar un cribratge a petita

escala dels clons que produeixen més quantitat de proteïna (apartat 3.1.5). Un cop seleccionat, cal produir la proteïna a gran escala (apartat 3.1.6) i purificar la proteïna produïda (apartat 3.1.7).

3.1.5 Cribratge dels clons bacterians per a la producció de proteïnes

El protocol seguit per al cribratge dels clons bacterians per a la producció màxima de proteïna és el següent:

- Inocular una colònia en 2 ml de medi LB amb ampicil·lina (per a seleccionar les bactèries transformades amb el vector. Deixar-la créixer a 37°C en agitació (250 rpm) fins a l'obtenció d'una OD de 0,7 -600 nm
- Recollir 0.5 ml del cultiu, centrifugar les cèl·lules a màxima velocitat i descartar el sobrenadant. Congelar el botó cel·lular.
- Recollir 0,5 ml de cultiu, centrifugar 1 min a la màxima velocitat, descartar el sobrenadant i congelar el botó cel·lular. Aquesta mostra és la no-induïda (NI) pels anàlisis d'expressió proteica amb gels SDS-PAGE.
- Recollir 0,5 ml de cultiu i mantenir-lo a 4°C. Aquesta mostra servirà per inocular medi LB de nou i poder obtenir una producció de proteïnes a gran escala.
- Induir la producció de les proteïnes en la resta de cultiu afegint 0,5 mM de IPTG (veure'n la recepta a la secció 3.9).
- Incubar en agitació (250 rpm) a 37°C durant 2 h.
- Recollir 0,5 ml de cultiu, centrifugar a màxima velocitat 1 min i descartar el sobrenadant. Aquesta mostra correspon a la mostra induïda (IS) en els anàlisis de proteïna per SDS-PAGE.
- Resuspèn el botó de bactèries amb 1 volum de tampó 2x Laemli (veure'n recepta a la secció 3.9) i bullir la mostra durant 20 min.
- Carregar NI i IS en gels SDS-PAGE i detectar les proteïnes mitjançant tinció amb blau de Coomassie (veure'n recepta a la secció 3.9). Les proteïnes induïdes es poden distingir d'entre el total de proteïnes quan es compara el patró de proteïnes NI amb IS.
- Una vegada seleccionades les colònies eficients per a la producció de proteïna, es genera un estoc amb glicerol (veure'n el protocol secció 3.1.8).

3.1.6 Producció de proteïnes recombinants a gran escala

Aquest protocol s'ha usat per a l'obtenció de 250 ml de bacterïes que expressen la proteïna recombinant d'interès. Per altres quantitats caldria escalar les proporcions.

El protocol és el següent:

- Créixer les bacterïes inoculant 250 µl procedent d'un cultiu o d'un estoc de glicerol en 4 ml de medi LB amb cloramfenicol (per a seleccionar les bacterïes) i ampicil·lina (per seleccionar el plàsmid) i incubar O/N en agitació (250 rpm).
- Inocular 4 ml del cultiu O/N en 250 ml de medi LB fresc amb cloramfenicol i ampicil·lina, en agitació (250 rpm) i a 37°C fins a aconseguir entre 0,6-0,8 unitats a una OD de 600 nm.
- Recollir 0,5 ml de cultiu, centrifugar 1 min a màxima velocitat, descartar sobrenedant i congelar el botó bacterià. Aquesta serà la mostra NI per anàlisis de proteïna amb SDS-PAGE.
- Induir la producció de proteïna en el líquid de cultiu remanent afegint 0,5 mM de IPTG. Incubar en agitació (250rpm) a 25-37°C durant 2-5 h (el temps i la temperatura usats varien segons les proteïnes sobreproduïdes en les bacterïes. Un excés de temperatura pot formar agregats de proteïna, fet que dificulta la recuperació de les proteïnes solubles. Es recomana optimitzar les condicions de temps i temperatura abans).
- Centrifugar a 5000 g a 4°C durant 10 min. Descartar el sobrenedant.
- Seguir el protocol de purificació de proteïnes fusionades amb GST (secció 3.1.7). Si es prefereix, el botó bacterià pot ser congelat abans de continuar amb el procés de purificació. En aquest cas, cal resuspendre el botó cel·lular en PBS 1x a 4°C i centrifugar-lo a 1600 g a 4°C durant 10 min. Descartar el sobrenedant i congelar els tubs a -80 °C.

3.1.7 Purificació de proteïnes fusionades a GST

Per a la purificació de proteïnes fusionades a GST cal obtenir un extracte de proteïnes solubles totals. Per això cal procedir de la següent manera:

- Resuspendre completament cada botó bacterià procedent d'un cultiu de 250 rpm en 25 ml de tampó de lisis bacteriana (veure'n recepta a la secció 3.9).

- Incubar 30 min en agitació suau (80 rpm aproximadament) a temperatura ambient.
- Sonicar cèl·lules en gel (per a evitar sobreescalfament de la mostra) i reduir la viscositat produïda pel DNA.
- Afegir Tritó X-100 (Sigma, #X100) a una concentració final de 1 %.
- Incubar 30 min en agitació suau (80 rpm aproximadament) a temperatura ambient.
- Centrifugar a 13000 *g* a 4°C durant 30 min. i recollir el sobrenedant que conté les proteïnes solubles. El botó pot ser resuspès en 2 ml de PBS 1X (veure'n recepta a la secció 3.9) amb 0,5 mM de DTT per a analitzar la presència d'agregats de proteïna.

Una vegada obtingut l'extracte de proteïnes solubles cal purificar la proteïna recombinant fusionada a GST. El protocol a seguir és el següent:

- Preparar les boles "Glutathione Sepharose 4B beads" (GE Healthcare; #17-0756-01) seguint el protocol del fabricant per treure l'etanol que inhibeix la purificació de les proteïnes que ténen GST a una densitat del 50 % (50 % de boles i 50 % de tampó de llisi de bacteries).
- Afegir 250 µl de boles (al 50 % de densitat) a l'extracte soluble.
- Incubar 30 min en agitació suau (80 rpm).
- Rentar les boles 3 vegades amb tampó de llisi bacteriana. Les boles unides a les proteïnes fusionades a GST poden usar-se directament per experiments de *pull down* (veure'n el protocol a la secció 3.1.7) o per a purificar les proteïnes fusionades a GST per elució de les boles, després d'afegir el glutatió reduït. L'elució de la proteïna purificada es pot seguir per anàlisi a 280 nm amb un espectrofotòmetre (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc.). o també, usant vectors pGEX que codifiquen per proteases com la PreScission (pGEX-6P) que tallen en una seqüència específica, entre GST i la proteïna fusionada. Aquesta proteasa específica de seqüència permet purificar la proteïna sense la fusió a GST.

3.1.8 Emmagatzematge de bacteris en estocs de glicerol

Els bacteris transformats poden conservar-se a -80°C en estocs de glicerol afegint, a 400 µl de cultiu bacterià líquid, 800 µl de glicerol estèril 60% (v/v) en medi LB. Es recomana testar la qualitat del DNA refrescant

els estocs de glicerol emmagatzemats durant períodes superiors a un any.

3.1.9 Amplificació i purificació de plasmidis de DNA

Qualsevol colònia cel·lular que contingui un plasmidi de DNA d'interès pot ser amplificada i posteriorment purificada per a obtenir-ne el DNA. Les colònies d'una placa de petri amb LB agar i antibiòtic portadores de DNA plasmídic es piquen i s'inoculen en 5 ml de medi LB fresc que conté el corresponent antibiòtic de selecció per al plasmidi de DNA que porta. El cultiu s'incuba O/N a 37°C i 250 rpm. Al dia següent es purifica el plasmidi a partir del cultiu bacterià mitjançant un kit d'extracció (*Quiaprep Plasmid Purification Kit (Quiagen)* o *PureLink HiPure Plasmid Purification Kit (Invitrogen)*) seguint les instruccions del fabricant. Depenent de la concentració de DNA desitjada, s'utilitzarà un kit de miniprep/midiprep/maxiprep/megaprep (20 µg, 100 µg, 500 µg o 2,5 mg de DNA respectivament). Els plasmidis de DNA usats en aquest treball de tesis són els següents:

3.1.9.1 HA-NFAT1(1-460)-EGFP

És un vector cedit pel laboratori de la Dra. Anjana Rao (*Addgene* 11107) que expressa EGFP i la proteïna de fusió HANFATc2 de ratolí. El tag HA permet detectar els clons transfectats amb aquest plasmidi. És un vector d'expressió transitòria usat en transfeccions amb lipofectamina sobre cèl·lules MDA-MB-231 estimulades amb ionomicina i calci o tractades prèviament amb CsA amb la finalitat de detectar la translocació de NFATc2 exògen.

3.1.9.2 pGEX-6P-1

pGEX-6P-1 (GE healthcare) és un plasmidi d'unes 5kb que conté la seqüència de la Glutatió S-transferasa (GST) just abans del MCS, on hi ha diverses dianes de restricció per a poder inserir el cDNA d'interès. Entre la GST i el MCS, el vector inclou la seqüència diana d'una proteasa PreScission que, en cas d'afegir-la a la suspensió de proteïnes, tallarà la proteïna de fusió amb GST. És un vector seleccionable en procarïotes per ampicil·lina. En aquest treball de tesi doctoral s'ha usat per als assajos de *pull down* en els quals es va verificar la funció de PxlIT en la unió de RCAN3 a Cn (apartat 3.4.4). Amb aquesta finalitat es van clonar els cDNAs de RCAN3 i RCAN3 AAQ generant els plasmidis pGEX-GST-RCAN3 i pGEX-GST-RCAN3 AAQ que codifiquen per les proteïnes de fusió GST-RCAN3 i GST-RCAN3 AAQ respectivament.

3.1.9.3 CMV-Renilla i pRLNull

Són vectors usats en els assajos de l'activitat promotora de luciferasa (veure'n protocol a la secció 3.5.7). El CMV-Renilla (cedit per la Dra. Carme Calvis de la Universitat de León), és un vector que expressa de forma constitutiva la Renilla, que serveix com a control positiu de l'assaig luciferasa ja que, a l'interaccionar amb la luciferina (substrat de la lucifera), emet lluminiscència que pot ser detectada per un lluminòmetre. En canvi, el vector pRLNull no conté luciferasa i s'usa, per tant, com a control negatiu en aquests assajos ja que l'addició de la luciferina no genera cap reacció lluminosa.

3.2 PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DE LENTIVIRUS

3.2.1 Sistemes d'empaquetament de lentiviris de segona generació

L'expressió gènica de cDNAs en vectors d'expressió lentivirals és una eina magnífica per a estudiar efectes de guany o pèrdua de funció de proteïnes i els conseqüents fenotips cel·lulars. Els vectors d'expressió lentivirals són a més els millors vehicles per a transduir de forma estable diferents molècules efectores (shRNA, cDNA, fragments de DNA etc.) en quasi qualsevol cèl·lula de mamífer, incloent tant cèl·lules en proliferació com que no es divideixin (Cann, 2000). Com en el cas de vectors plasmídics estàndard, és possible introduir en cèl·lules els vectors per formar partícules lentivirals amb elevada eficiència i obtenir expressió dels efectors utilitzant protocols de transfecció convencionals com el del fosfat càlcic entre d'altres.

Els sistemes d'empaquetament per a formar partícules lentivirals poden ser de segona o tercera generació en funció del nombre de vectors necessaris per a formar les partícules. En ambdós casos, els vectors a transfectar, a part del vector que codifica per la molècula efectora (vector de transferència), són aquells que expressen els gens necessaris per a la formació de partícules lentivirals com ara els gens de l'envolta *env* i els gens d'empaquetament *gag*, *pol*, *rev*, *tat* que donaran estructura a les partícules. El motiu pel qual s'usen diferents vectors en l'empaquetament de partícules és per seguretat del manipulador ja que el DNA que codifica per l'empaquetament de les partícules no pot autoreplicar-se dins les cèl·lules diana degut a que aquests vectors presenten grans deletions dels 3'LTR. Per això, quan les partícules no poden auto-replicar-se soles es parla de transducció. En canvi, en casos en els que s'introdueix un únic vector lentiviral que conté tota la

informació necessària per a la formació de partícules i, per tant, és capaç d'auto-replicar-se per ell mateix, es parla d'infecció.

A diferència dels adenovirus, la utilització de lentivirus sembla que no produeix respostes cel·lulars no específiques (Gold *et al.*, 2003; Cann *et al.*, 2000). Les partícules lentivirals es transdueixen en les cèl·lules i aquestes integren el vector en el DNA genòmic proveint a la cèl·lula d'una expressió estable i perllongada del shRNA, cDNA o gen *reporter*. Després de la transducció, les partícules lentivirals en les cèl·lules diana, l'expressió del cDNA lentiviral es retrotranscriu i s'integra en el genoma de la cèl·lula. Una vegada integrat, el *cassette* d'expressió produeix de forma estable i contínua alts nivells de molècula efectora. Les cèl·lules diana que expressen la molècula efectora poden aïllar-se usant un marcador de selecció present en el vector d'expressió mateix (per exemple la resistència a la puomicina o l'expressió de la proteïna verda fluorescent o EGFP).

Per a produir partícules lentivirals de segona generació es requereix, doncs, un vector que conté el gen marcador de la EGFP i el cDNA o shRNA d'interès, un plasmidi amb els gens d'empaquetament i un plasmidi amb els gens de l'envolta. Pels lentivirus de tercera generació, més segurs, es fan servir 4 plasmidis diferents: el vector de transferència de gens, el plasmidi de l'envolta i dos plasmidis d'empaquetament. Els lentivirus de tercera generació presenten una menor eficiència en la formació de partícules. En aquest treball només s'han emprat lentivirus de segona generació.

3.2.1.1 Vectors de transferència

El vector de transferència gènica conté el shRNA o transgen d'interès i les seqüències de recombinació.

Els vectors de transferència de segona generació usats en aquest treball de tesi doctoral són el pWPT-EGFP i el pWPI.

3.2.1.1.1 pWPI-EGFP-IRES-HA

El plasmidi (ref. 12254, *Addgene*) pot ser amplificat en les soques bacterianes Stbl3, DH5 α i HB101 a 37°C. En aquest treball de tesi s'ha usat DH5 α en tots els procediments de clonació. El vector pWPI-EGFP-IRES-HA, així com els que es presentaran a continuació, contenen el gen de resistència a ampicil·lina, per tant, els bacteris transformats amb aquest plasmidi poden créixer en un medi LB agar amb ampicil·lina. No

obstant, el plasmidi no inclou gens de selecció per a cèl·lules eucariotes i conté la seqüència de la proteïna verda fluorescent (EGFP) per a facilitar la detecció i seguiment de les cèl·lules transduïdes. En el plasmidi es troba també el tag de l'Haemaglutinina (HA) repetit 3 vegades. Aquesta seqüència codifica per una molècula de menys de 8 kDa que s'utilitza per a detectar les cèl·lules transfectades.

Aquest vector de transferència s'ha usat per a clonar el cDNA de RCAN3 (pWPI-EGFP-IRES-HARCAN3) i el mutant RCAN3 AAQ (pWPI-EGFP-IRES-HARCAN3 AAQ). El vector buit, simplement amb EGFP (pWPI-EGFP-IRES-HA) s'ha usat com a control. L'expressió dels gens d'interès està regulada pel promotor derivat del virus SV40, altament actiu. Per tal d'aconseguir les proteïnes RCAN3 i EGFP no com a proteïna de fusió sinó independents, es va incorporar una seqüència IRES entre els cDNA de EGFP i el de de RCAN3 o RCAN3 AAQ. Aquesta seqüència s'inclou juntament amb alguns nucleòtids random per a separar les seqüències codificants i la traducció de les corresponents proteïnes.

3.2.1.1.2 pWPT-EGFP

El plasmidi pWPT-EGFP (ref.12255, *Addgene*) té el gen de resistència a ampicil·lina per a la selecció en procarïotes i també expressa EGFP. Aquest plasmidi no conté cap marcador de selecció per a cèl·lules eucariotes. Donat que és un vector de transferència conté algunes seqüències necessàries per a la formació de partícules lentivirals com els LTRs, etc i estabilitzadors de mRNA com la seqüència RRE. A part del promotor derivat del virus SV40 com a promotor constitutiu i molt actiu, té diverses dianes de restricció que poden ser usades per al disseny i clonació del cDNA o shRNA d'interès. Aquest vector es va usar per a generar les construccions pWPT-EGFP3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i PWPT-EGFP3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ, que codifiquen per una seqüència peptídica derivada de la proteïna RCAN3 wt, concretament la seqüència del motiu CIC (residus 178-210) o una seqüència del motiu CIC mutada, concretament en els residus 197-199, inclosos en el motiu PxlIT del motiu CIC.

3.2.1.2 Vector d'empaquetament

El plasmidi d'empaquetament psPAX2 conté un protomor CAG (conté una part del element potenciador primerenc del Citomegalovirus (CMV), el primer exó i intró del promotor del gen de la *beta-actina* de pollastre (A), i el lloc acceptor de *splicing* del gen de la beta-globina de conill (G)) que regula l'expressió dels gens d'empaquetament (*gag*, *pol*, *rev*, *tat*) necessaris per a la producció de partícules lentivirals. En aquest

treball s'ha utilitzat el plasmidi psPAX2 (*Addgene*, ref. 12260), com a plasmidi d'empaquetament. El vector conté el gen de resistència a ampil·lina, dianes de restricció i també el cDNA per a la producció de les proteïnes Tat/Rev/Gag/Pol, necessàries per a la construcció de les partícules lentivirals en sistemes de producció de lentivirus i no té marcadors de selecció per a eucariotes.

3.2.1.3 Vector de l'envolta

El vector usat en aquest treball com a vector de l'envolta és el pMD2.g, que conté totes les proteïnes (per exemple, VSV-G) que formaran l'envolta del lentivirus a l'hora de formar les partícules. El plasmidi correspon també al sistema de producció de lentivirus de segona generació. El vector que s'ha usat en aquest treball ha estat el pMD2.g (*Addgene*, ref. 12259), que a més conté el gen de resistència a l'ampil·lina, dianes de restricció, un promotor CMV i no té marcador de selecció per eucariotes.

3.2.2. Producció i purificació de lentivirus

Les partícules lentivirals es formen com a resultat de la transfecció de cèl·lules amb tres plasmidis diferents (en sistemes de producció de lentivirus de segona generació), que contenen els gens essencials per a generar partícules lentivirals. En aquest treball de tesis, la línia cel·lular usada per a la producció de lentivirus ha estat la línia cel·lular humana de ronyó embrionari HEK 293, concretament la HEK 293T, que es diferencia de l'anterior perquè conté la seqüència de l'antigen T del virus SV40. Aquesta seqüència permet la replicació en episomes dels plàsmids transfectats que contenen l'origen de replicació procedent del virus SV40.

Breument, els diferents plasmidids s'han produït i purificat a gran escala emprant els kits de purificació del DNA maxiprep (*Qiagen*, ref. 12165). A continuació, el vector de transferència és cotransfecta juntament amb el vector d'empaquetament psPAX.2 i el vector de l'envolta pMD2.g en HEK 293T. El plasmidi psPAX.2, com s'ha dit anteriorment, conté els gens *gag* i *pol* que són essencials per l'estructura viral. pMD2.g completa la formació de la partícula lentiviral aportant la informació de l'envolta a través del gen *env*.

El mètode de transfecció escollit en aquest treball per a la formació de partícules víriques és el mètode del fosfat càlcic. L'alta eficiència de transfecció d'aquest protocol assegura una més gran

producció de partícules ja que el títol d'aquestes depèn directament del número de cèl·lules transfectades. El protocol per a la producció de partícules lentivirals usat en aquest treball és:

- HEK 293T en creixement exponencial subconfluent es tripsinitzen i es passen en tres plaques de 150 mm de diàmetre (p150) al 50 % de confluència i s'incuben a 37°C tota la nit (16 h-20 h o O/N).
- Tripsinitzar i sembrar les cèl·lules de cada placa de p150 per a obtenir un total de 18 plaques. D'aquestes, 15 seran per transfectar amb els plasmidis i les altres 3 s'usaran per a l'amplificació de la línia i producció de noves partícules víriques. Incubem les cèl·lules a 37°C O/N.
- Transfectar les 15 plaques de p150 amb els tres vectors per produir les partícules víriques usant el mètode del fosfat càlcic. Per a aquest mètode de transfecció de DNA es necessiten preparar dues solucions:

- Solució A: els plasmidis de DNA per produir les partícules de lentivirus (provinents d'una maxiprep per assegurar una qualitat del DNA adient per a la seva transfecció a cèl·lules) es dilueixen a una concentració de 500 ng/ µl. Es prepara una solució a temperatura ambient que conté els plasmidis :

- 675 µl of pWPI/pWPT (vector de transferència)
- 438 µl of psPAX2 (vector d'empaquetament)
- 237 µl of pMD2.g (vector de l'envolta)

S'afegeix 1,695 ml de CaCl₂ 2,5 M a la barreja.

S'afegeix aigua estèril fins a un volum final de 17,1 ml.

- Solució B: és la solució de fosfat càlcic.

- 17,1 ml de tampó HeBs (per *Hepes Buffer Saline*), pH 7,01 (el pH del HeBS és crític per l'eficiència de la transfecció i pot variar en un rang des de 6,9 a 7,14). Cal provar diferents pH per a trobar l'òptim per a transfectar DNA amb el mètode del fosfat càlcic sobre la línia HEK 293T.
- S'afegeix, sota agitació constant amb vòrtex, la solució A sobre la solució B (i no al revés) gota a gota.

- S'incuba la solució de transfecció 20 min a temperatura ambient. Es formarà un precipitat fi en suspensió després de la incubació.
- S'afegeixen 2,25 ml de la solució de transfecció a cada placa de 150 mm de diàmetre gota a gota on hi ha les cèl·lules HEK 293T en cultiu, movent la placa però sense crear discontinuïtats en la monocapa cel·lular (les cèl·lules HEK 293T es desadhereixen amb facilitat de la placa de cultiu).
- S'incuben les cèl·lules entre 16 h-18 h a 37°C.
- Es retira el medi de cultiu (14 ml/placa) que es guarda a 4 °C i se n'afegeix de fresc. S'incuben les cèl·lules 24 h més amb el medi fresc.
- Es recullen els medis de 24 h i 48 h post transfecció i es centrifuguen a 500 g per a descartar qualsevol resta o remanent cel·lular.
- Es filtren els sobrenedants amb un filtre de 45 µm estèril (*Millipore*).
- Es distribueixen els sobrenedants en tubs d'ultracentrífuga (*Beckman*) i es col·loquen en les cistelles o *buckets* corresponents de la ultracentrífuga.
- S'equilibren acuradament amb PBS 1x els *buckets*, incloent la tapa.
- Es centrifuguen a la ultracentrífuga (*Beckman*) usant el rotor SW-28 a 20000 rpm i 4 °C durant 1,5 h.
- Immediatament quan acaba la centrífuga, es treuen els tubs i es descarten amb compte els sobrenedants. Des d'aquest punt els tubs cal que es mantinguin constantment a 4 °C.
- Es resuspenen les partícules virals del fons de cada tub amb 250 µl de PBS 1x estèril. Per a la resuspensió de les partícules lentivirals, es pipeteja amunt i avall 30 vegades cada pellet (es recomana que la resuspensió es repeteixi cada hora).
- Al cap de 2 h, es distribueix la suspensió de partícules víriques en alíquotes de treball de 50 µl. Cal preparar una alíquota de 5 µl per a la titulació del virus.
- Es congelen les alíquotes en neu carbònica i es mantenen a -80°C fins a ser utilitzades.

3.2.3. Titulació de l'estoc de lentivirus

Les construccions lentivirals usades en aquest treball de tesis expressen EGFP, de manera que es pot calcular fàcilment el títol de lentivirus per citometria de flux. El protocol és el següent:

- Es sembren 50000 cèl·lules MDA-MB-231 en cada un dels pouets d'una placa de 6 pouets en medi DMEM 10 % FBS amb alta concentració de glucosa i antibiòtic (medi complet) i es deixen créixer 24 h a 37 °C.
- Es canvia el medi de la placa de 6 pouets a DMEM complet suplementat amb 8 µg/ml de polibrè (per incrementar l'eficiència de la transducció dels virus). Per titular l'estoc de lentivirus, es dilueix l'alíquota de 5 µl 50 vegades en DMEM sense FBS i s'incuba O/N a 37 °C. S'usa un pouet de la placa de 6 pouets com a control negatiu de la transducció (sense virus). Generalment s'assagen 5 volums diferents en una placa de 6 pouets en els quals hi ha sembrades 10⁵ cel·lules/pouet en el moment de la transducció dels virus. La quantitat d'estoc viral usat depèn del títol que esperem obtenir en funció de l'eficiència de transfecció, mètode del fosfat càlcic, viabilitat per microscopia de fluorescència etc.
- Es canvia el medi amb medi complet fresc i es deixen créixer les cèl·lules 24 h més.
- 48 h després de la transducció, es tripsinitzen les cèl·lules i es passen a un tub de 1,5 ml.
- Es centrifuguen les cèl·lules a 500 g durant 5 min a 4°C i es resuspenen en 200 µl de PBS 1x a 4 °C.
- S'afegeixen 800 µl de 1,25 % paraformaldehid (PFA) a cada tub gota a gota sota agitació al vórtex.
- Les cèl·lules fixades es mantenen a 4°C i en fosc (durant un màxim de 2 dies) fins que el percentatge de cèl·lules EGFP positives sigui analitzat per citometria de flux.
- El títol final de l'estoc es calcula usant la següent fórmula:

$$\text{Títol de l'estoc viral (TU*/ml)} = \left[\frac{\text{n}^\circ \text{ cèl transduïdes (\% cèl·lules EGFP}^+ / 100)}{\text{Volum de l'estoc usat per la transducció (ml)}} \right]$$

*TU: Unitats de transducció (*transducing units*)

Es mantenen les partícules lentivirals a -80°C. Es descongelen en gel i es transdueixen cèl·lules humanes amb una MOI determinada que dependrà de la quantitat de proteïna de cada partícula lentiviral sobre cada línia cel·lular.

3.3 PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DEL DNA

3.3.1. Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR)

3.3.1.1 Amplificació de DNA per PCR per a clonatges

Per obtenir fragments de DNA o inserts per als procediments de clonatge s'utilitza, entre d'altres, la tècnica de la PCR. A partir d'un motlle de DNA es generen còpies del fragment d'interès per a la seva amplificació. Per això s'usen encebadors o *primers* específics per la regió que es vol amplificar. Per tal de clonar els inserts en un plasmidi, caldrà afegir a la seqüència, les seqüències diana d'enzims de restricció específiques per a que les còpies o fragments amplificats puguin tallar-se usant aquests enzims. Finalment, per la reacció de PCR es necessita preparar una barreja dels següents components a les concentracions indicades i en un volum final de 25 µl:

- 10-50 ng de DNA motlle (concentració final: 0,4-2 ng/µl)
- Mescla de dNTP (concentració final: 0,2 µM de cada dNTP)
- Tampó de PCR 10X (Roche, inclou magnesi. Concentració final: 1X)
- Encebador directe (concentració final: 0,2 µM)
- Encebador indirecte (concentració final: 0,2 µM)
- Taq Polimerasa 1,25 U (Roche. Concentració final 0,05 U/ µl)
- Aigua fins a 25 µl

L'amplificació té lloc en un termociclador seguint aquest programa:

94°C 1,5 min	}	25-30 cicles
94°C 30 s		
55°C 30 s		
72°C 1 min/Kb		
72°C 4,5 min		

Una vegada finalitzada l'amplificació per PCR, el fragment de DNA amplificat cal que sigui digerit amb els enzims de restricció i/o purificat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa (veure l'apartat 3.3.2.1).

3.3.1.2 PCR de cribratge de presència de DNA específic en colònies bacterianes

Aquesta tècnica s'aplica per detectar quines colònies bacterianes de la placa de LB agar contenen el plasmidi d'interès després d'una reacció de lligació de DNAs (veure l'apartat 3.3.7) i d'una transformació en bacteris. Les colònies d'interès es fan créixer, una en cada pouet d'una placa de 96 pouets, aïllada en 100 µl de medi LB (amb l'antibiòtic apropiat per a seleccionar els clons d'interès) durant 1 h temperatura a ambient (RT). Finalment es realitza l'assaig de cribratge per PCR i per a fer-ho es prepara la barreja següent:

- 2 µl de cultiu bacterià
- 1,25 µl de tampó de Taq polimerasa 10X (Roche)
- Mescla de 0,5 µl dNTPs (concentració inicial: 10 mM)
- 0,5 µl Encebador directe (concentració inicial: 10 µM)
- 0,5 µl Encebador indirecte (concentració inicial: 10 µM)
- 1 U de Taq polimerasa (Roche)
- Aigua fins a 12.5 µl

En aquest cas s'usa un termociclador amb el mateix programa anterior de PCR però incrementant el número de cicles fins a **35** per tal de detectar fàcilment el producte de DNA amplificat. A l'hora de dissenyar els encebadors per a la PCR de cribratge cal usar-ne un que hibridi a la regió del DNA motlle d'interès i l'altre que hibridi fora de la zona d'interès, en una altra seqüència del plasmidi que no conté el fragment a amplificar. D'aquesta manera es podrà confirmar la presència d'amplificació del DNA només quan la orientació del producte amplificat sigui la correcta.

3.3.1.3 PCR de seqüenciació del DNA

Després del procediment de clonatge s'obté finalment la nova contrucció i és necessari verificar la correcció de la seqüència nucleotídica per tal de detectar l'absència de possibles mutacions en la seqüència d'interès que invalidin o modifiquin la proteïna codificada pel nou vector. Per aquest motiu s'usa la tècnica de la PCR de seqüenciació en la qual s'han de barrejar els següents components:

- Plasmidi de DNA purificat (100 ng/ kb plasmidi)

- 1 µl tampó de l'enzim *Big Dye* (Applied Biosystems)
- 1 µl enzim *Big Dye 3.1* (Applied Biosystems)
- 0,5 µl encebador de seqüenciació (concentració inicial 10 µM)
- Aigua fins a un volum final de 10 µl

El programa de PCR per aquesta reacció és:

94°C 1,5 min	} 30 cicles
94°C 15 s	
55°C 15 s	
60°C 1 min/Kb	
60°C 4,5 min	

El producte de la reacció de PCR és enviat a un servei extern de seqüenciació del DNA.

3.3.1.4 PCR de genotipació

En aquest treball de tesis s'usa el model de ratolí transgènic C57/BL6 RCAN1 TgPACC77, el qual sobreexpressa el gen humà *RCAN1*. Per a determinar-ne el genotip de les cries en cada creuament realitzat es procedeix a extraure el DNA genòmic del teixit de la cua dels ratolins i a continuació s'usa la tècnica d'amplificació del DNA per PCR amb encebadors específics (veure l'apartat 3.1.1.1).

El protocol per a l'extracció del DNA és el següent:

- Es tallen els 5 mm distals de la cua del ratolí.
- Es desnatura el teixit tractant-lo amb 300 µl de 50 mM NaOH a 98°C (30 min com a mínim i tant de temps com sigui necessari fins que la cua estigui totalment desnaturada).
- Es neutralitza amb 5 µl Tris 50 mM pH 7,5.
- Es centrifuga 10 min a 13000 g.
- Es recullen els sobrenedants i se'n quantifica la concentració del DNA obtingut a una densitat òptica (OD) de 280 nm en un espectrofotòmetre (Nanodrop).

Per al programa de PCR de genotipació es prepara la següent mescla de components:

- DNA genòmic (300 ng)
- Mescla d'encebadors (1:1:1:1 a 25 µM cada un)*

- dNTP mix (2,5 mM cada tipus)
- Tampó de la Taq polimerasa 10X (Roche)
- Taq Polimerasa (Roche 1,25 U)
- Aigua fins a un volum final de 25 µl

Els encebadors usats eren sempre els mateixos en cada genotipació (veure'n la seqüència a la taula 7).

El programa emprat per a amplifica el DNA fou:

95°C 2 min	} 30 cicles
95°C 30 s	
62°C 30 s	
72°C 1 min/Kb	
72°C 10 min	

El producte de PCR amplificat es fa córrer en un gel d'agarosa al 1,5 % (consultar la secció 3.2.1 per a la seva preparació) i es tenyeix amb Syber Safe (0,8 %, *Life Technologies*, ref. S33102) per a poder detectar la migració del material genètic en el gel. Com a control intern, s'amplifica DNA genòmic del locus precursor de la interleukina 2 de ratolí (*IL2p*). La relació entre el transgen del *RCAN1* humà i el locus de ratolí de la *IL2p* ens permet discriminar entre els animals heterozigots i homozigots.

3.3.1.5 PCR a temps real per a la determinació dels nivells de mRNA

La PCR a temps real és un mètode que permet determinar els nivells de mRNA d'un gen d'interès de forma quantitativa. En el nostre cas hem realitzat l'amplificació de cada gen mitjançant dos encebadors específics i una sonda *Universal Probe Library* (UPL), conjugada amb FAM, de *Roche* que té 8 nucleòtids de longitud i i hibrida a la zona intermèdia del fragment a amplificar, entre l'encebador directe i l'indirecte, és a dir, l'amplicó. La sonda conté 2 fluorocroms, un a cada extrem, que emeten poca fluorescència degut a la seva proximitat. Quan la sonda hibrida amb el cDNA, l'activitat 5' nucleasa de la Taq polimerasa talla l'extrem 5' de la sonda on hi ha un dels fluorocroms i aquest queda lliure i pot emetre una fluorescència més intensa que n'és quantificada. Quan s'allibera el fluorocrom, la sonda es desenganxa del cDNA i la Taq polimerasa pot seguir amplificant-lo a partir de l'encebador hibridat. L'amplificació de DNA es segueix a temps real i permet quantificar la quantitat de producte i calcular l'abundància relativa respecte un gen

d'expressió constitutiva com *HPRT1* present en la nostra mostra (teixit o cèl·lules). Per obtenir el cDNA a partir del RNAm de les mostres s'utilitza el mètode d'extracció de RNA amb TRIzol (*Life Technologies* ref. 11596-018). El protocol a seguir varia lleugerament en el primer pas en funció de la naturalesa de la mostra (teixit o cèl·lules).

- Extracció del RNA

Extracció de RNAm a partir de teixit:

- Afegir 1ml de TRIzol per cada 50-100 mg de teixit.
- Homogeneitzar la mostra usant una ma de morter o un homogeneïtzador de tipus *Dounce*. Immediatament després cal congelar les mostres o processar-les.

Extracció del RNAm a partir de cèl·lules en cultiu (cèl·lules adherents):

- Treure el medi de cultiu de les plaques de Petri.
 - Per a plaques de cultiu de diàmetres de 35 mm, 60 mm o 100 mm afegir 1ml, 3 ml o 8 ml respectivament de TRIzol directament sobre les cèl·lules.
- Llisar les cèl·lules directament en la placa amb l'ajut mecànic de la pipeta.

- Purificació del RNA

- Incubar les mostres 5 min a temperatura ambient per permetre la dissociació dels complexos nucleoproteics.
- Afegir 200 µl de cloroform per cada ml d'homogenat obtingut en l'anterior pas..
- Agitar vigorosament amb la mà durant 15 s.
- Incubar durant 2-3 min a temperatura ambient.
- Centrifugar la mostra a 12000 g durant 15 min a 4°C. En aquest moment es fan visibles dues fases: el RNA es troba a la fase aquosa superior del tub mentre que en la part inferior es localitza la fase vermella que conté fenol-cloroform i l'indicador de pH vermell de fenol.
- Recollir la fase aquosa en un tub estèril sense agafar la fase intermitja on hi ha les proteïnes.
- Afegir 0,5 ml d'isopropanol 100% per cada ml de fase aquosa recollida en l'anterior pas.
- Incubar a temperatura ambient durant 10 min.
- Centrifugar a 12000 g durant 10 min a 4 °C.
- Descartar el sobrenedant i rentar el botó de RNA amb 1 ml d'etanol 75 % per cada ml de fase aquosa de l'homogeneïtzat.

- Agitar la mostra amb vòrtex uns segons i centrifugar el tub a 7500 g durant 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant.
- Deixar assecar el botó de RNA amb un sistema de buit o a l'aire durant 5-10 min.
- Resuspendre el botó de RNA parcialment sec amb aigua lliure de RNAses (20-50 µl).
- Incubar en un bany o un bloc sec a 55-60 °C durant 15 min. El RNA purificat es congela a -80 °C fins a la seva utilització.

A partir del RNA extret es fa una retrotranscripció amb la retrotranscriptasa reversa per tal d'obtenir el cDNA corresponent després es fa una amplificació del cDNA d'interès a temps real mitjançant PCR. Per a la síntesi de cDNA es parteix de 1 - 2 µg de RNA purificat i es segueix el protocol de la transcriptasa reversa Superscript III (*Invitrogen*). S'utilitza la mateixa reacció de RT-PCR sense la polimerasa com a control negatiu. Per estudiar l'expressió dels gens, en el nostre cas *VEGF*, *COX-2*, *IL-8*, *CCL2* i *CSF1*, es realitza una PCR a temps real a partir del cDNA prèviament sintetitzat. Aquest tipus de PCR a temps real es prepara en una placa de 384 pouets, amb cada condició testada per triplicat i es segueix el protocol següent:

- 1 µl cDNA (pot estar diluït més o menys depenent del nivell d'expressió esperat del gen d'interès)
- 5 µl PCR Master Mix
- 0,4 µl encebador directe (concentració final: 0.4 µM)
- 0,4 µl encebador indirecte (concentració final: 0.4 µM)
- 0,2 µl sonda UPL específica del gen
- Aigua fins a un volum final de 10 µl

Les sondes UPL s'han de mantenir entre 0-4 °C i protegides de la llum en tot moment perquè estàn marcades amb els fluorocroms. Els controls negatius de la PCR a temps real són:

- Control negatiu de DNA en la barreja de la PCR: aigua com a substitut del cDNA.
- Control negatiu d'especificitat de l'amplificació del cDNA per la Taq polimerasa : aigua com a substitut de la Taq polimerasa.

Una vegada carregada la PCR a la placa, es segella amb film de plàstic i es centrifuga 5 min a 1500 g. Deprés, la PCR es fa en l'aparell Lightcycler 480 System (Roche) seguint aquest programa:

95°C 10min
 95°C 10 s
 62°C 30 s
 72°C 1 s } 45 cicles

L'emissió de fluorescència de les sondes UPL marcades amb FAM (és a dir, que tenen la fluoresceïna com a marcador a 5' de la sonda) es detecta usant un filtre d'emissió a 533 nm. Les dades s'analitzen amb el programari LC480 (*Roche*), i els resultats es calculen seguint el mètode $2^{-\Delta\Delta^{Ct}}$ (assumint una eficiència d'encebador de 2; Livak and Schmittgen, 2001). Els resultats es representen com a percentatge d'inhibició de l'expressió gènica, considerant el 100 % la inhibició obtinguda en el grup que expressa com a control la EGFP. L'expressió de cada gen es relativitza als gens d'expressió constitutiva humans *HPRT* i *GAPDH*. La desviació estàndard de cada triplicat ha de ser sempre menor que 0,21. Els encebadors de la PCR a temps real usats en aquest treball de tesis són els següents:

Taula 1. Encebadors i sondes UPL usades en la qPCR a temps real. "Fw" fa referència a l'encebador directe i "Rv" a l'indirecte.

Encebadors i sondes UPL per usats en la PCR quantitativa a temps real		
Encebador	Seqüència 5'-3'	Sonda UPL
qPCR UPL hCOX2 Fw	CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG	23
qPCR UPL hCOX2 Rv	TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC	23
qPCR UPL hVEGF Fw	CCTTGCTGCTCTACCTCCAC	29
qPCR UPL hVEGF Rv	CCACTTCGTGATGATTCTGC	29
qPCR UPL hIL-8 Fw	AGACAGCAGAGCACACAAGC	72
qPCR UPL hIL-8 Rv	ATGGTTCCTTCCGGTGGT	72
qPCR UPL hIL-2 Fw	AAGTTTTACATGCCAAGAAGG	65
qPCR UPL hIL-2 Rv	AAGTGAAAGTTTTGCTTTGAGCTA	65
qPCR UPL hR1-4 Fw	TGTGGCAAACAGTGATATCTTCA	81
qPCR UPL hR1-4 Rv	ACGTCCTAAAGAGGGACTCAA	81
qPCR UPL hIFNg Fw	GGCATTGGAAGAATTGGAAAG	21
qPCR UPL hIFNg Rv	TTTGGATGCTCTGGTCATCTT	21
hCCL2 qPCR UPL Fw	AGTCTCTGCCGCCCTTCT	40
hCCL2 qPCR UPL Rv	GTGACTGGGGCATTGATTG	40
hCSF2 qPCR UPL Fw	GTCGGAGGCCTCTTGTCT	39
hCSF2 qPCR UPL Rv	CGCTCTGAGGCTCTTGAT	39
hHPR1 qPCR UPL Fw	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	73
hHPR1 qPCR UPL Rv	CGAGCAAGACGTTCACTCCT	73
hGAPDH qPCR UPL Fw	AGCCACATCGCTCAGACAC	60
hGAPDH qPCR UPL Rv	GCCAATACGACCAATCC	60

3.3.2 Electroforesi del DNA

L'electroforesi del DNA permet separar fragments lineals del DNA en funció de la seva mida. L'electroforesi crea dos camps o pols que permeten la migració del DNA, degut a les seves característiques de càrrega negativa, cap al pol positiu. L'electroforesi de DNA es realitza normalment en gels d'agarosa (secció 3.3.2.1).

Per a visualitzar la progressió de l'electroforesi, s'afegeix un tampó de càrrega (veure'n la recepta de preparació a 6x en la secció 3.9) que formarà un front de color i la funció del qual és ser una referència de la velocitat de migració del material genètic en el gel d'agarosa.

3.3.2.1 Gels d'agarosa

En l'electroforesi en gel d'agarosa s'usa un percentatge d'agarosa específic en funció de la longitud o mida del fragment del DNA d'interès:

- >5kb DNA: 0,8 % agarosa
- 1- 5kb DNA: 1 % agarosa
- 0.5- 1kb DNA: 1,5 % agarosa
- <0.5 kb DNA: 2 % agarosa

Els gels d'agarosa es preparen en tampó TBE 1x (secció 3.9), bullint la mescla i deixant-la solidificar en un motlle. Per a la detecció del DNA en el gel, sota il·luminació d'UV, s'afegeix al gel el reactiu SYBRSafe (*Life Technologies* ref. 33102). Les mostres es barregen amb el tampó de mostres de DNA que conté un colorant per seguir la progressió de l'electroforesi i glicerol per augmentar la densitat de les mostres. A continuació s'afegeix tampó TBE 1x a la cubeta d'electroforesi, es carreguen les mostres al pou corresponent i s'inicia l'electroforesi a una intensitat de corrent de 35 mA. En cas de tenir fragments de DNA menors a 100 pb, es corre molt poc temps per a evitar la difusió de la banda en el gel o es corre més ràpid si es vol purificar el fragment.

3.3.3 Quantificació del DNA

En solució, els àcids nucleics (DNA/ RNA) absorbeixen llum ultravioleta amb un pic màxim d'absorbància a 260 nm. La determinació de la concentració dels àcids nucleics en solució es pot realitzar mitjançant un espectrofotòmetre com el Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific Inc.*), que pot mesurar mostres a altes concentracions (OD₂₆₀ de

0 a 2) i usant molt poca quantitat de mostra (1-2 μ l). La concentració dels àcids nucleics es calcula directament usant la llei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$), essent A l'absorbància a 260 nm; ϵ el coeficient d'extinció molar; c la concentració del DNA i l la longitud de la cubeta.

Usant aquesta equació s'ha calculat que 1 OD és, aproximadament, 50 μ g/ml per a les mostres de doble cadena de DNA (dsDNA), 40 μ g/ml per RNA o DNA de cadena senzilla (ssDNA) i 33 μ g/ml pels oligonucleòtids.

Per a obtenir una estimació de la qualitat de les mostres d'àcids nucleics, es realitza una sèrie de mesures en el rang de longitud d'ona de 220 - 350 nm. El valor de la proporció de les absorbàncies a 260 i 280 nm (260/280) i a 260 i 230 nm (260/230) és un indicador de la puresa de les mostres d'àcid nucleics. Un valor 260/280 de 1,8 o 2 s'accepta com a mostres de DNA o RNA pures, respectivament. Valors més baixos indiquen la presència de proteïnes o grups aromàtics en la mostra. És important recordar que el Trizol, reactiu comú usat en l'extracció de RNA, és un reactiu que al contenir fenol, pot absorbir a 230 nm i fins a 260 nm. Per tant, si no és degudament eliminat de la mostra, pot contaminar-la i disminuir-ne la puresa.

3.3.4 Digestió amb enzims de restricció

La digestió enzimàtica s'usa com a estratègia per a clonar un fragment de DNA en un vector d'interès o per confirmar que un vector conté un insert de DNA específic.

L'activitat dels enzims de restricció es mesura en unitats d'activitat (U) per μ g del DNA: 1 U digereix 1 μ g de DNA en 1 h a 37°C. Per tant, la quantitat d'enzim de restricció s'ajustarà en funció de la concentració de DNA.

El protocol estàndard de la digestió del DNA amb enzims de restricció és el següent:

- Mesclar en un tub de 1,5 ml:
 - DNA substrat (d'1 a 6 μ g de plasmidi de DNA purificat)
 - Tampó de l'enzim de restricció a 10X
 - Albúmina de sèrum boví (BSA) (concentració final de 0,1 mg/ml) si és necessari per l'activitat de l'enzim
 - Enzim de restricció (1U/ μ g DNA)
 - Aigua destil·lada fins a un volum final de 20-50 μ l

- Incubar en un bany a la temperatura idònia per l'enzim de restricció (normalment 37°C) tant de temps com sigui necessari.
- Inactivar l'enzim incubant la reacció de digestió a 65°C durant 20 min.

3.3.5 Purificació del fragment del DNA en gel d'agarosa

Un cop el DNA es separa per electroforesi en el gel d'agarosa, cal extraure la banda del DNA d'interès d'aquest usant una fulla de bisturí estèril. Per a localitzar les bandes s'il·lumina el gel sota llum UV i ràpidament, amb el bisturí, s'extrauen les bandes de DNA i es posen en un tub de 1.5 ml estèril. Una exposició perllongada del DNA sota la llum UV causa mutacions en el material genètic. El DNA es talla i es purifica amb un kit com el *Quiaquick Gel Extraction kit* (Quiagen, ref. 28704) seguint els protocols del fabricant.

3.3.6 Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina de gamba

Amb l'objectiu de millorar el protocol de clonatge i prevenir el soroll de fons en el posterior cribratge de colònies bacterianes positives, els plasmidis digerits amb enzims de restricció es desfosforilen, a diferència dels inserts del DNA a subclonar. D'aquesta manera, es redueix la possibilitat de que el vector per ell mateix recircularitzi en el pas de lligació sense incorporar el fragment de DNA d'interès.

Per a desfosforilar un plasmidi de DNA, s'afegeix 1 U de fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (*Fermentas*, ref. EF0511) a la reacció de digestió, es mescla bé (vortex 2 s) i es centrifuga de 3 a 5 s a màxima velocitat.

Totes les reaccions de desfosforilació es duen a terme en un bany a 37°C per assegurar una homogeneïtat en la temperatura durant 2 h. Per a inactivar l'enzim SAP, la digestió s'ha d'incubar durant 20 min a 65°C. És convenient determinar experimentalment, sembrant en plaques de Petri amb el vector digerit no desfosforilat, que la desfosforilació ha tingut lloc de forma satisfactòria.

3.3.7 Reacció de lligació de DNA

El pas final en un procediment de clonatge és la lligació dels fragments purificats de DNA en el vector escollit. Per a realitzar una reacció de lligació es prepara una reacció de 15 µl de volum amb els següents components:

- x ng d'insert de DNA o fragment a inserir *
- 50 ng DNA del vector digerit i desfosforilat (plasmidi)
- 1,5 U de T4 DNA lligasa d'*E.coli* (Roche)
- 1,5 µl tampó de la T4 DNA lligasa 10X (Roche)

*Els ng d'insert per a la recció de lligació es van calcular usant la fórmula $(50 \text{ ng vector} \times \text{Kb insert} / \text{Kb vector}) \times 6$.

Les reaccions de lligació s'incuben O/N a 4°C. Cal incloure un control negatiu que no contingui el fragment del DNA a inserir per establir el soroll de fons de la reacció de lligació.

3.3.8 PCR de cribratge de bacteris portadors d'insert del DNA

Un mètode ràpid per a detectar d'entre totes les colònies de bacteris, aquells que han incorporat el fragment de DNA d'interès és el següent:

- S'inocula una colònia en 100 µl de medi LB (veure'n la recepta a la secció 3.9) suplementat amb l'antibiòtic corresponent.
- S'incuba a 37°C durant 2 h.
- Es realitza una PCR de cribratge de colònies positives (veure'n les característiques i el programa a la secció 3.3.1.2).
- Es corre el producte amplificat en un gel d'agarosa. Les colònies positives s'identifiquen perquè contindran el DNA d'interès. Un cop identificades les colònies positives per al fragment de DNA d'interès, es fa créixer la colònia i es purifica el plasmidi.

3.3.9 Seqüenciació del DNA

Les colònies portadores dels plasmidis amb el DNA d'interès es fan créixer i se'ls extreu el material genètic per a purificar-lo. Cal confirmar que el DNA obtingut és el d'interès i que conté la seqüència intacta. Per aquest motiu es procedeix a fer digestions amb els enzims de restricció que correspongui i determinar en gel d'agarosa que la mida del insert del DNA correspon a l'esperat.

L'últim pas en el procés de verificació és la seqüenciació del DNA mitjançant PCR de seqüenciació (veure'n la secció 3.3.1.3). La reacció resultant s'envia a un servei extern de seqüenciació del DNA i la seqüència que es rep s'analitza amb l'ajuda de programaris d'anàlisi de seqüències com ara BLAST o FinchTV.

3.4 PROTOCOLS DE MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES

3.4.1 Preparació d'extractes totals de cèl·lules eucariotes

Per a treballar amb proteïnes cal primer fer una extracció de proteïnes, ja sigui a partir d'un cultiu cel·lular o d'un teixit. També es poden fer extraccions de proteïnes localitzades únicament al citoplasma o a nucli. El més habitual, però, és treballar a partir de les proteïnes totals, sense discernir entre les localitzacions subcel·lulars. En aquest treball s'han usat tècniques d'extracció de proteïnes totals tant a partir de cèl·lules humanes com a partir de teixits de mamífer (ratolí).

A continuació se'n detallen els protocols usats.

3.4.1.1 A partir de cultius de línies cel·lulars humanes

El protocol seguit per a la lisi cel·lular és el següent:

- Es renten les cèl·lules amb PBS 1x fred (4°C) dues vegades. Per cèl·lules adherents, el rentat es pot realitzar directament sobre la placa, amb PBS suplementat amb 0,1 mg/ml CaCl_2 i 0,1 mg/ml MgCl_2 (per evitar que les cèl·lules es desenganxin de la placa). En cas d'usar cèl·lules no adherents, aquestes es sedimenten a 500 g a 4°C durant 5 min prèviament al rentat.
- S'afegeix 1 ml de PBS 1x fred (4°C) i es transfeixen les cèl·lules a un tub net de 1,5 ml. En cas d'usar cèl·lules adherents cal desenganxar-les usant un rascador o *scraper*.
- Es centrifuguen les cèl·lules a 500 g a 4°C durant 5 min.
- Es descarta el sobrenedant i s'afegeix el volum¹ adequat segons el *tampó* de lisi² que es necessiti.
- Es barreja la mostra en un agitador orbital a 4°C 10 min o més (el temps dependrà de la viscositat de la mostra). Per reduir la viscositat de la mostra degut a la quantitat present de DNA es pot sonicar la mostra, submergida en un bany de gel, amb polsos sònics curts per evitar el sobrecalfament de la mostra o passar el llisat cel·lular diverses vegades a través d'una agulla 23 G.
- Es centrifuga el llisat cel·lular a 13000 g, a 4°C durant 5 min.
- Es recull el sobrenedant on hi ha les proteïnes solubles i es transfereix a un tub net. Cal mantenir les proteïnes en gel per evitar-ne la degradació.
- Es quantifica la concentració de proteïna (Veure la secció 3.4.2).
- Per a la separació i anàlisi de proteïnes per electroforesi en gel d'acrilamida, s'afegeix el *tampó Laemmli* (veure'n la recepta 6x a la secció 3.9) i es bull la mostra 10 min a 98°C.

¹ El volum del tampó de lisi s'ajusta en funció de la quantitat de mostra. Per llisar una placa de 100 mm de diàmetre subconfluent de cèl·lules HEK 293T s'usa 1 ml de tampó de lisi.

² L'elecció del tipus de tampó de lisi (pH, concentració de sals,...) dependrà de la naturalesa de la proteïna (localització nuclear, membrana, citosol...) i de l'assaig a realitzar (immunoprecipitació, transferència de *western*, cristal·lografia...). En el nostre cas, per obtenir extractes cel·lulars i separar les proteïnes per electroforesi en gel de poliacrilamida s'usa el tampó de lisi tipus RIPA (consultar-ne la recepta a la secció 3.9).

3.4.1.2 A partir de teixits de mamífer

L'obtenció d'extractes de proteïnes a partir de mostres de teixits de mamífer fresques o congelades requereix un pas d'homogeneïtzació previ a 4 °C en presència del tampó de lisi escollit, per trencar millor el teixit i evitar un sobrecalfament excessiu de la mostra en el pas de sonicació. Les mostres s'han homogeneïtzat en aquest treball usant un politron (*Kinematica*). El protocol seguit és el següent:

- En les mostres de teixit tumoral congelades en trossos de 3-4 mm³, aquestes s'han pulveritzat emprant un morter de porcelana. Per a evitar la degradació de les proteïnes, tot el material a emprar durant l'homogeneïtzació ha d'estar refredat sobre neu carbònica. El teixit no ha de descongelar-se en cap moment. En el cas d'emprar teixit fresc, aquest s'ha triturat en un primer pas amb l'ús del politron en presència de tampó de lisi RIPA. En ambdós casos, teixit congelat i fresc, el volum del tampó de lisi RIPA emprat fou de 150 a 500 µl per cada 200 mg de teixit. Posar l'homogeneïtzat en gel.
- Sonicar les mostres durant 10 s (repetir-ho 6 vegades), 1 cicle i la màxima amplificació d'ona (100 W).

Per la neteja del morter i de tot el material entre una mostra i una altra s'usa metanol 100% i aigua destil·lada.

3.4.2 Quantificació de proteïna mitjançant l'assaig colorimètric de l'àcid bicinconínic

La quantificació de la concentració de proteïna total dels extractes solubles a partir de cultius cel·lulars o de teixit (veure secció 3.4.1) es quantifica generalment amb tècniques colorimètriques. En els assajos recollits en aquesta memòria s'ha utilitzat el kit de l'àcid bicinconínic (BCA) (*Pierce*, ref. 23227). L'assaig es basa en la reducció del Cu^{2+} al Cu^+ que fan les proteïnes en medi alcalí amb la subseqüent quelació dels cations Cu^+ per l'àcid bicinconínic. La reacció té un pic d'absorbància a 470-490 nm i un pic d'emissió a 562 nm, que pot ser detectat en una placa de 96 pous per un espectròmetre. L'estructura de la proteïna, el número d'enllaços peptídics i la presència de les cadenes laterals dels aminoàcids cisteïna, cistina, triptòfan i tirosina influeixen en la formació de color en aquest assaig. Per a aquesta tècnica s'utilitza el mateix tampó usat per a la lisi cel·lular per a realitzar la corba estàndard amb albúmina sèrica bobina (BSA) a partir de la qual quantificarem les mostres. Abans de l'assaig, cal confirmar que els components del tampó no creen interferències en l'assaig del BCA.

3.4.3 Gels d'electroforesi SDS-PAGE desnaturalitzants.

Els extractes de proteïna o les proteïnes purificades es separen en camps elèctrics desnaturalitzant-les i separant-les per la seva massa molecular mitjançant electroforesi en SDS (SDS-PAGE, per *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*). El SDS present en el tampó de mostres de proteïnes desnaturalitza les proteïnes i afegeix una càrrega negativa a les molècules, que les farà migrar cap al pol positiu en l'electroforesi. A més, els agents reductors com ara el ditriotretol (DTT) o el β - mercaptoethanol redueixen els ponts disulfur de les proteïnes. Els minigels de poliacrilamida discontinus de Tris-Glicina consten de dues parts:

a) Part inferior "ressolutiva" de percentatge variable d'acrilamida/bisacrilamida, que depèn de la massa molecular de la proteïna a analitzar (en el nostre cas del 10 % o 12 %). La recepta per a fer 2 minigels és la següent:

- 5,25 ml (per minigels al 10 %) i 6,3 ml (per minigels al 12 %) de solució d'acrilamida/bisacrilamida al 30% (37,5: 1 ratio) (*BioRad*, ref. 161-0158).
- 4 ml de solució 4xTris-HCl/SDS, pH 8,8.

- 200 µl de solució de persulfat d'amoni (APS) al 10 % en aigua.
- 13 µl de TEMED.
- Ajustar amb aigua destil·lada fins a un volum final de 6 ml.
- Barrejar vigorosament i usar immediatament.

b) Part superior de "concentració" de les mostres. La recepta per 2 gels és la següent:

2 gels (1,5 mm gruix):

- 0,65 ml de solució al 30 % d'acrilamida/bisacrilamida (37,5: 1) (*BioRad*, ref. 161-0158), que correspon a un 4 % final d'acrilamida/bisacrilamida.
- 1,66 ml de solució de 4xTris-HCl/SDS, pH 6,8 (veure'n la recepta a la secció 3.9).
- 50 µl d'APS al 10 % en aigua
- 5 µl de TEMED
- Ajustar amb aigua destil·lada fins a un volum final de 6,5 ml
- Barrejar vigorosament i usar immediatament

En aquests gels es pot carregar generalment entre 10 µg i 80 µg de proteïna. El gel es fa córrer en una cubeta (Mini-Protean II) a 130 V i submergit en solució 1x tampó d'electroforesi (veure'n la recepta a la secció 3.9) fins que el front del marcador de proteïnes surti del gel (aproximadament 1 h).

3.4.3.1 Gels SDS-PAGE de gradient

Hi ha casos en què interessa separar dues proteïnes de massa molecular molt diferenciada en un mateix minigel. En aquesta situació es poden usar gels SDS-PAGE de gradient de percentatge d'acrilamida/bisacrilamida. Tots els passos es desenvolupen a temperatura ambient si no s'indica el contrari.

Preparació del gel de gradient:

- Usar el cassette de gel Mini-Protean II per a la fabricació dels mingels.
- Seleccionar les solucions de gradient adequades per a separar les proteïnes d'interès. Els volums dels reactius necessaris per un minigel de gradient (dimensions: 8 cm x 8 cm; espaiadors: 1,5 mm de gruix) del 3-15 % de poliacrilamida són els següents:

Taula 2. Composició SDS-PAGE de gradient al 3-15 %.

COMPOSICIÓ DEL GEL PER A UN GRADIENT DEL 3-15%	3%	15%
3 M Tris-acetat pH 7,0 (15x) (ml)	0,47	0,27
40% Solució de poliacrilamida (ml) (37,5: 1)	0,53	1,5
Aigua Milli-Q (ml)	6	2,23
Volum total (ml)	7	4
TEMED (μ l)	8,75	5
APS 10% (μ l)	33,25	19

- Barrejar les solucions per separat abans de posar-ho en les dos cambres del fabricant de gels de gradient. Afegir 4 ml de la solució del percentatge menor de poliacrilamida (3 %) en la cambra de reserva (cambra esquerra del fabricant del gradient). Afegir 4 ml de la solució de major percentatge de poliacrilamida (15 %) en la cambra que ha d'estar equipada amb un iman (cambra dreta del fabricant de gradient). Les vàlvules han d'estar tancades quan s'introdueixen les solucions de poliacrilamida en el fabricant de gradient. El volum que sobra (3 ml) de la solució al 3 % de poliacrilamida es guarda per usar més tard.
- Per iniciar la barreja de les solucions en el *sandwich* de vidre on es solidificarà el gen de gradient, s'obre la vàlvula de pas i es deixa que la solució de major percentatge de poliacrilamida quedi al fons del vidre i, a continuació, s'obre immediatament l'altra vàlvula i s'afegeixen els 3 ml de solució de poliacrilamida al 3 %. Es deixa que la solució de percentatge de poliacrilamida menor es barregi amb el de percentatge major formant un gradient. El flux ha de ser constant. Un flux massa ràpid causa torbulència i es trenca el gradient, mentre que un flux massa lent pot fer que la solució polimeritzi en el conducte de càrrega i interrompre la fabricació completa del gel.
- Rentar el fabricant de gradient, immediatament després d'haver-lo usat amb aigua en abundància per evitar la polimerització de la solució d'acrilamida sobrant.
- Deixar polimeritzar el gel.

Preparació de les mostres i càrrega de proteïnes en el gel:

- Lisar les mostres
- Centrifugar les mostres a 16,000 g durant 20 min a 4°C. Recollir els sobrenedants i determinar la concentració de proteïna mitjançant l'assaig del BCA. Afegir el tampó de mostres de

proteïnes 4x sense DTT. En aquest moment es poden usar les mostres o guardar-les a -20°C.

- Afegir DTT (concentració final: 100 mM, estoc a 1 M DTT a -20 °C).
- Escalfar les mostres 10 min a 95°C i carregar-les en els pous.

Condicions d'Electroforesi:

- Córrer a 130 V. El temps estimat per fer córrer un gel de gradient al 3-15 % és d'aproximadament 1 h. S'utilitzen estàndards de diferent massa molecular com a control de la separació de proteïnes en l'electroforesi.

3.4.4 Detecció d'interacció de proteïnes per Pull down

El pull down es una tècnica usada per analitzar la interacció d'una proteïna expressada en bacteries fusionada amb Glutatió S-transferasa (GST) amb proteïnes dins d'un cotext cel·lular (calcineurina en aquest cas) . El protocol a seguir és el següent:

- Generar una proteïna de fusió amb Glutatió-S-transferasa (GST)ST (en aquest cas es van clonar les seqüències d'interès en el plasmidi pGEX-6P (GE Healthcare) d'expressió transitòria que codifica per la GST. Els cDNAs clonats com a proteïnes de fusió amb la GST van GST-RCAN3 i GST-RCAN3 AAQ). La proteïna fusionada a GST s'uneix a continuació a boles de Sepharose degut a la formació de l'enllaç sulfhidril entre GST i GST reduït (o GSH).
- Llisar les cèl·lules Jurkat T (25 x10⁶ en el nostre cas) amb tampó de lisi amb IGEPAL (veure'n recepta a la secció 3.9) per a extraure'n la proteïna soluble, que serveix com a font de Cn endògena.
- Incubar els extractes solubles procedents de les cèl·lules Jurkat T amb les boles de *Sepharose* de GST-RCAN3 i GST-RCAN3 AAQ durant 3 h a 4°C en agitació orbital. Rentar abundantment les boles de *Sepharose* de GST-RCAN3 i GST-RCAN3 AAQ amb tampó de lisi amb IGEPAL, afegir el tampó Laemmli i bullir les mostres a 98°C durant 10 min. D'aquesta manera es separen les proteïnes de les boles de *Sepharose*.
- Carregar les mostres en un gel d'acrilamida SDS-PAGE al 10%, transferir a una membrana de nitrocel·lulosa i immunodetectar les proteïnes d'interès amb anticossos específics.

3.4.5 Transferència de western

Quan és necessari, les proteïnes presents en els gels d'acrilamida es transfereixen a una membrana (de polifluorur de vinilidè o PVDF, o de nitrocel·lulosa) per a una posterior detecció de proteïnes mitjançant anàlisi amb anticossos específics. Per visualitzar que la transferència ha funcionat es tenyeix la membrana amb Ponceau S (veure'n la recepta de preparació del tint i del procediment de tinció de la membrana a la secció 3.4.6.1). En quant al procediment d'immunodetecció de proteïnes en la membrana, aquest s'especifica a la secció 3.4.6.2. La transferència de western a membranes de nitrocel·lulosa o PVDF es realitza a través d'un camp elèctric en un tampó de transferència (veure la recepta del tampó de transferència 10x a la secció 3.9) i usant l'equip *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, ref. 170-3930) seguint les instruccions d'ús i el protocol del fabricant. És important assegurar la correcta col·locació de la membrana i del gel per a evitar la pèrdua de proteïnes i la formació de bombolles d'aire. La transferència es realitza a 100 V durant 2 h. Les transferències més llargues (per exemple O/N) cal fer-les a 4°C per evitar el sobreescalfament del gel de poliacrilamida.

El protocol detallat de la transferència de western és el següent:

- Submergir les esponges de fibra i el paper Whatman en tampó de transferència. Col·locar els gels de PAGE-SDS en el tampó de transferència i deixar equilibrar-ho tot un parell de minuts.
- Si la membrana és de PVDF cal activar-la submergint-la en metanol 2 min, rentar amb aigua desionitzada i després en tampó de transferència. Les membranes de nitrocel·lulosa es submergeixen directament en aigua.
- Com a marcador del front d'avançament de l'electroforesi el tampó de mostres inclou el colorant blau de bromofenol. Quan el marcador surt del SDS-PAGE, apagar la font d'alimentació de l'electroforesi. Desmuntar el *sandwich* de vidre i treure'n el minigel.
- Muntar el *sandwich* de transferència amb els components en l'ordre següent: esponja de fibra, 2 papers de cromatografia *Whatman 3 MM*, el minigel, la membrana de nitrocel·lulosa, 2 papers de *Whatman 3 MM*, esponja de fibra.
- Col·locar el *sandwich* de transferència en els *cassettes* de plàstic del Mini Trans-Blot. Passar el curró per evitar la possible presència de bombolles d'aire. Tancar el *sandwich* i col·locar-lo dins del contenidor de l'equip per procedir a l'electroforesi. Afegir el tampó de transferència i connectar la font elèctrica.
- Fer la transferència durant 2 h a 100 V o O/N a 20 V.

3.4.6 Detecció de proteïnes en les membranes de nitrocel·lulosa o PVDF

3.4.6.1 Tinció amb Ponceau-S

La tinció amb Ponceau S d'una membrana de nitrocel·lulosa o PDVF (prèviament a la tinció aquesta s'ha d'activar equilibrant la membrana en metanol) confirma que la transferència de proteïnes s'ha realitzat amb èxit. Aquesta tinció presenta una baixa sensibilitat a la detecció proteica (detecta uns 500 ng per banda de mobilitat electroforètica, Yonan *et al.*, 2005). És un mètode de tinció reversible.

Les membranes es submergeixen en la solució de Ponceau S (secció 3.9) i seguidament se'n treu l'excés amb rentats d'aigua destil·lada fins que apareixen clarament les bandes de mobilitat electroforètica de proteïnes, tenyides de vermell, presents als diferents carrils. Per a decolorar la membrana es renta amb TBS-T 0.1 % (veure'n la recepta a la secció 3.9).

3.4.6.2 Immunodetecció de proteïnes

Per la tècnica de transferència de western s'obté una membrana amb totes les proteïnes separades segons la seva massa molecular de les diferents mostres. La immunodetecció assegura la detecció de proteïnes específiques usant anticossos específics (consultar la taula 3).

La immunodetecció de proteïnes es realitza de la següent manera:

- Bloquejar la membrana de nitrocel·lulosa durant 1 h a temperatura ambient amb la solució de bloqueig (6 % llet descremada en TBS 1x, veure'n la preparació a la secció 9) en agitació orbital suau constant.
- Incubar la membrana amb l'anticòs primari específic diluït en solució de bloqueig durant 2h a temperatura ambient o O/N a 4 °C en agitació.
- Rentar la membrana amb TBS 0,1 % Tween 20 (TBS-T 0,1%) durant 10 min en agitació, 3 vegades.
- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa de rave picant (HRP, per *horseradish peroxidase*) diluït en TBS-T 0,1 % a temperatura ambient durant 1 h.
- Rentar la membrana amb TBS-T 0.1 % durant 10 min en agitació, 3 vegades.

- Revelar la membrana mitjançant una reacció de quimioluminiscència per detectar la HRP incubant amb 1 ml de solució de Luminol (veure'n recepta a la secció 3.9) o de reactiu ECL Plus (*GE Healthcare*, ref. RPN2132) seguint les instruccions del fabricant. S'usa un reactiu o un altre en funció de la sensibilitat que calgui per a la detecció de la proteïna d'interès. Els temps d'incubació també varien en funció tant de la concentració de proteïna en les mostres com de la dificultat en la seva detecció. Cal detectar la senyal quimioluminiscent exposant la membrana a un film (*CL-Xposure film, Pierce*; ref. 34090) o mitjançant un sistema d'imatge digital (*VersaDoc 5000 Imager, Bio-Rad*). Posteriorment, s'analitza el resultat amb programaris com *Quantity One* o *Image J*. És important no sobreexposar les proteïnes a la reacció quimioluminiscent per evitar les bandes saturades i per tant no quantificables.

Els anticossos utilitzats en aquest treball de tesi en els assajos de transferència de western (WB) són els següents:

Taula 3. Anticossos usats en els experiments de transferència de western per a la detecció de proteïnes a partir d'extractes cel·lulars tant de cultiu cel·lular com de teixit tumoral. RT es refereix a temperatura ambient.

ANTICOSSOS PRIMARIS USATS EN TRASFERÈNCIA DE WESTERN (WB)

ANTICÒS	TÈCNICA	FONT	# REF.	DILUCIÓ	INCUBACIÓ
HA	WB	policlonal de conill	Santa Cruz sc-805	1:1000	1h RT
EGFP	WB	policlonal de conill	Abcam A6455	1:2000	1h RT
COX-2	WB	policlonal de ratolí	Cayman 160126	1:1000	O/N 4°C
NFATc2 (NFAT1)	WB	monoclonal de ratolí	Abcam ab2722	1:500	O/N 4°C
PSF	WB	Monoclonal de ratolí	Santa Cruz sc-374502	1:4000	1h RT
Cn	Pull down	Monoclonal de ratolí	BD-Pharmigen 556350	1: 2000	1h RT
GST	Pull down	Policlonal conill	GE Healthcare 27-4577-01	1:2000	1h RT
α -Tubulina	WB	monoclonal de ratolí	Sigma T6074	1:10000	1h RT
Actina	WB	policlonal de conill	Sigma A2066	1:10000	1h RT
IL-8	WB	policlonal de conill	Biosource MBS711346	1:500	O/N 4°C

ANTICOSSOS SECUNDARIS USATS EN TRANSFERÈNCIA DE WESTERN (WB)

ANTICÒS	TÈCNICA	FONT	# REF.	DILUCIÓ	INCUBACIÓ
IgGs de ratolí /HRP	WB	policlonal de conill	DakoCytomation P0260	1:2000	45 min RT
IgG de conill /HRP	WB	policlonal de porc	DakoCytomation P0399	1:2000	45 min RT

3.4.7 Immunodetecció de proteïnes en mostres de teixit**3.4.7.1 Immunodetecció de proteïnes per immunohistoquímica i immunofluorescència en teixit inclòs en parafina**

Per a detectar proteïnes sobre talls histològics de teixits prèviament fixats i inclosos en parafina (consultar el protocol d'inclusió de mostres en parafina a l'apartat 3.7.1) es poden usar diverses tècniques com la IHC o la IF. L'elecció de la tècnica a usar normalment es fa en funció dels anticossos a usar o dels antígens a detectar, ja que alguns anticossos poden detectar els antígens amb més facilitat en una tècnica que en una altra. Tot i que el protocol d'ambdues tècniques és molt similar a continuació n'expliquem els passos remarcant-ne les diferències.

El protocol estàndard usat per a la immunodetecció de proteïnes en teixits inclosos en parafina (tant per IHC com per IF) és el següent:

- Escalfar els talls de parafina durant 10 min a 55 °C.
- **Desparafinat:** 10 min en xilol absolut (4 vegades), 3 rentats de 5 min en etanol absolut, 3 en etanol al 96 % i 1 en etanol al 70 %.
- Rentar 5 min en aigua destil·lada per acabar d'hidratar el teixit.
- **Desemmascament de l'antigen en olla a pressió.** L'objectiu del desemmascament de l'antigen és trencar, mitjançant l'aplicació de calor, els enllaços formats en el procés de fixació de la mostra previ a la inclusió en parafina (el protocol d'inclusió de mostres en parafina està detallat a l'apartat 8).
 - Preparar una solució de 250 ml de citrat sòdic, pH 6 (secció 3.9).
 - Escalfar les mostres amb la solució de citrat sòdic en una olla a pressió de 5 l de capacitat durant 3 min a màxima temperatura.
 - Treure l'olla del punt d'escalfor, deixar que es redueixi la pressió i obrir-la per deixar atemperar les mostres 20 min a temperatura ambient en la mateixa solució de citrat sòdic.

- Rentat de 5 min en aigua destil·lada.
- **Inactivació de les peroxidases endògenes** (només en els assajos d'immunohistoquímica ja que incrementen el soroll de fons donat que reaccionen amb el substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). En assajos d'immunofluorescència no és necessari realitzar aquest pas perquè no s'usa DAB sinó que es detecten les proteïnes per fluorescència). Incubar les mostres 15 min amb peròxid d'hidrogen al 3 % en aigua destil·lada a temperatura ambient.
- Rentat de 5 min en aigua bidestil·lada.
- Rentat i permeabilització durant 10 min en PBS 1x + 0.1 % tween-20 (PBS-T 0,1%)
- **Bloqueig** de la mostra, per minimitzar unions inespecífiques entre l'anticòs i les proteïnes del teixit, incubant la mostra en una solució de bloqueig que conté sèrum de cabra al 10 % en PBS-T 0,1% durant 1 h a temperatura ambient en una cambra humida.
- **Incubació de l'anticòs primari.** L'anticòs primari s'usa a una concentració que varia de 1:75 fins a 1:200 en funció de l'anticòs i de la proteïna a detectar. Per a diluir l'anticòs s'usa la solució de bloqueig.
- 3 Rentats de 5 min cada un amb PBS-T 0,1%.
- **Incubació de l'anticòs secundari.** En assajos d'immunohistoquímica s'incuba la mostra durant 45-60 min amb el reactiu *EnVision+System-HRP* IgGs de conill o de ratolí (*Dako*, ref. K4003 o K4001 respectivament), que amplifiquen la senyal d'interacció entre antigen i anticòs per a millorar la detecció de la proteïna. En assajos d'immunofluorescència s'incuba amb un anticòs secundari conjugat amb un fluoròfor en la foscor durant 1h.
- 3 Rentats amb PBS-T 0,1% de 5 min cada un.
- **REVELAT:** En immunohistoquímica s'usa el sistema de revel·lat **DAB + cromogen** (20 µl/ teixit, kit *Vector*, sk-4100). El cromogen es barreja amb el DAB, que actua de substrat de la peroxidasa conjugada a l'anticòs secundari. Aquesta barreja HRP-cromogen s'incuba de 5 a 20 min amb la mostra de teixit a temperatura ambient fins que apareix un precipitat marró en les zones on es troba la proteïna d'interès. En assajos d'immunofluorescència la presència de proteïnes es detecta en **excitar els fluoròfors** conjugats a l'anticòs secundari present en el teixit.
- Aturar la reacció de DAB amb aigua de l'aixeta (només en protocols d'immunohistoquímica).

- **Contratinció** amb hematoxilina-eosina (en assajos d'immunohistoquímica) o amb DAPI (en assajos d'immunofluorescència).
- **Deshidratació.** En immunohistoquímica és necessari la deshidratació de les mostres en etanol (5 min cada etanol: 1 rentat en etanol 70 %, 3 en etanol 96 %, 1 en etanol absolut) seguit de entats en xilol (4 banys de 10 min). En immunofluorescència no es realitza deshidratació de les mostres perquè per a que es produeixi l'excitació dels fluoròfors es necessita un medi aquós.
- **Muntatge.** En immunohistoquímica cal muntar els cubreobjectes amb medi **DPX** (*Thermo scientific* ref. 10050080, un parell de gotes per portaobjectes, posar cubreobjecte, treure bombolles d'aire i deixar assecar O/N a temperatura ambient). En immunofluorescència es necessita un medi aquós com el **Mowiol** (*Sigma-Aldrich*, ref. 81381) pel muntatge del cubreobjectes. Es posen un parell de gotes, s'afegeix el cubreobjectes, es treuen les bombolles d'aire i es deixa assecar. Les mostres d'immunofluorescència, un cop muntades, es mantenen a 4°C i en l'fosc.

Els anticossos usats en els assajos d'immunodetecció sobre mostres incloses en parafina, independentment de si la tècnica usada és immunohistoquímica (IHC) o immunofluorescència (IF), són els següents:

Taula 4. Llistat d'anticossos usats sobre teixit parafinat. S'inclouen tant els anticossos usats en tècniques d'IHC com de IF o tunel. A part dels anticossos llistats, s'ha usat el reactiu DAB (*Vector*, SK-4100) com a cromogen en la tècnica de IHC. Per a l'amplificació de la senyal de l'anticòs secundari contra IgGs de conill o de ratolí s'usa el reactiu *EnVision+System-HRP* (*Dako* ref. K4003 o K4001 respectivament). Per a l'amplificació de senyal en els casos en els que s'ha usat un secundari conjugat amb biotina s'ha utilitzat el kit ABC VECTASTAIN (*Vector*, Pk 6100). RT es refereix a temperatura ambient.

ANTICOSSOS PRIMARIS USATS EN TEIXITS INCLOSOS EN PARAFINA

ANTICÒS	TÈCNICA	FONT	# REF.	DILUCIÓ	INCUBACIÓ
NFATc2 (NFAT1)	IHC	monoclonal de ratolí	Abcam ab2722	1:50	O/N 4°C
Ki67	IHC	monoclonal de conill	Neomarkers RM-9106	Sense diluir	O/N 4°C
Vimentina	IHC	monoclonal de ratolí	Invitrogen 18-0052	1:50	O/N 4°C
E-caderina	IHC	Monoclonal de ratolí	BD Pharmigen 610182	1:50	O/N 4°C
S100A4	IHC	ratolí	PLoS One. 2013 Sep 4;8(9)	1:500	O/N 4°C
ID1	IHC	policlonal de cabra	Santa Cruz sc-488	1:75	O/N 4°C
F4/80 de ratolí	IF	monoclonal de rata	Serotec MCA497R	1:50	O/N 4°C
EGFP	IF	Monoclonal de ratolí	Santa Cruz sc-9996	1:2000	1h RT

ANTICOSSOS SECUNDARIS USATS EN TEIXITS INCLOSOS EN PARAFINA

ANTICÒS	TÈCNICA	FONT	# REF.	DILUCIÓ	INCUBACIÓ
IgG de cabra-biotina	IHC	Policlonal de conill	Dako E0466	1:200	1 h RT
IgG de rata- biotina	IHC	Policlonal de conill	Dako E0468	1:200	1 h RT
IgG de ratolí-biotina	IHC	policlonal de cabra	Vector BA-9200	1:200	1 h RT
IgG de rata-Alexa568	IF	policlonal de cabra	Life technologies A-11077	1:200	1h RT en fosc

3.4.7.2 Immunodetecció de proteïnes en mostres de teixit congelades incloses en medi OCT per IHC o IF.

El teixit fresc pot ser inclòs en un medi o resina anomenat *Optimal Cutting Temperature (OCT)* que, un cop congelat, manté les proteïnes intactes. De les mostres se'n preparen talls histològics de 4 µm de gruix usant un criostat per a evitar la descongelació de les mostres. Els talls, així com les mostres originals incloses en OCT, es mantenen a -80°C fins al moment de ser utilitzats. Per a realitzar una immunodetecció d'una proteïna específica a partir de mostres congelades incloses en OCT (mitjançant assajos d'immunohistoquímica o immunofluorescència), no es necessita tractar les mostres amb calor per a desemascarar els antigens sempre i quan les mostres no s'hagin fixat abans de la inclusió en OCT.

El protocol usat per a la immunodetecció de proteïnes en OCT és el següent:

- Atemperar i deixar assecar els talls a temperatura ambient de 5 a 30 min per a descongelar-los (el temps d'assecat varia en funció del gruix del teixit).
- Refredar els fixadors a -20°C durant 30 min (es pot usar acetona, metanol, etanol, etc, segons l'anticòs primari a usar; cal fer una optimització prèvia del fixador a emprar)
- Fixar els talls amb el fixador a -20°C durant 5-10 min a temperatura ambient.
- Rentar durant 3-4 min amb PBS 1x.
- **Inactivació de les peroxidases endògenes.** Incubar 15 min amb solució de peròxid d'hidrogen al 3 % diluït en aigua destil·lada en els assajos d'immunohistoquímica. En assajos d'immunofluorescència no és necessari perquè la peroxidasa endògena present en el teixit no interfereix en la detecció per fluorescència.
- Rentar 3-4 min en PBS 1x (2 vegades).
- **Bloqueig d'unions inespecífiques.** Incubar amb sèrum de cabra al 10 % en PBS-T 0,1 % durant 1 h a temperatura ambient en una cambra humida per evitar l'evaporació.
- **Incubació de l'anticòs primari.** L'anticòs primari s'usa a dilucions compreses entre 1:75 i 1:200 en funció de l'anticòs. Com a diluent s'usa la solució de bloqueig i s'incuba O/N a 4°C en cambra humida.
- 3 Rentats amb PBS-T 0,1 % durant 5 min cada un.
- **Incubació de l'anticòs secundari.** Incubar durant 45-60 min a temperatura ambient amb el kit d'amplificació de senyal "*EnVision kit HRP antimouse or antirabbit (Dako)*" en assajos d'IHC. En assajos d'IF

s'incuba l'anticòs secundari conjugat amb un fluoròfor durant 1 h, a temperatura ambient i protegit de la llum. En ambdós tècniques s'usen 30-40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de teixit.

- 3 Rentats en PBS-T 0,1 % durant 5 min cada un
- **REVELAT:** En immunohistoquímica s'usa el sistema de revel·lat DAB + cromogen (20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de teixit, Dako). El cromogen es barreja amb el DAB, substrat de la peroxidasa, conjugada a l'anticòs secundari. Aquesta barreja s'incuba de 5 a 20 min a temperatura ambient fins que es dona la reacció HRP-Cromogen i un precipitat marró apareix en les zones on hi ha la proteïna d'interès. En assajos d'immunofluorescència la proteïna es detecta per l'excitació dels fluoròfors conjugats a l'anticòs secundari.
- Aturar la reacció de DAB amb aigua de l'aixeta (només en protocols d'immunohistoquímica).
- **Contratinció** amb Hematoxilina- Eosina en assajos d'immunohistoquímica) o amb DAPI per tenyir els nuclis de la cèl·lula (en assajos d'immunofluorescència).
- **Deshidratació.** En immunohistoquímica és necessari la deshidratació de les mostres en etanol (5 min cada etanol: 1 en etanol 70 %, 3 en etanol 96 %, 1 en etanol absolut) seguit de rentats en xilol (4 banys cadascun de 10 min). En immunofluorescència no es realitza deshidratació de la mostra ja que es necessita un medi aquós per a que els fluoròfors s'excitin.
- **Muntatge.** En immunohistoquímica cal muntar els cubreobjectes amb medi DPX (un parell de gotes per portaobjectes, posar cubreobjecte, treure bombolles d'aire i deixar assecar O/N a temperatura ambient). En immunofluorescència es necessita un medi aquós com el **Mowiol** (*Sigma-Aldrich*, ref. 10852) pel muntatge de cubreobjectes. Es posen un parell de gotes, s'afegeix el cubreobjectes, es treuen les bombolles d'aire i es deixa assecar la mostra. Les mostres d'immunofluorescència, un cop muntades, es mantenen a 4°C i en fosc.

Els anticossos usats en els assajos d'immunodetecció sobre mostres incloses en OCT independentment de si la tècnica usada és IHC o IF, són els següents:

Taula 5. Llistat d'anticossos usats sobre teixit inclòs en OCT. S'ha usat el kit *TUNEL Apoptosis Detection Kit (Gene script, L00300)* per a la tècnica de tunel i el reactiu DAB (*Vector, SK-4100*) com a cromogen en la tècnica de IHC. Per a l'amplificació de la senyal de l'anticòs secundari contra IgGs de conill o de ratolí s'usa el reactiu *EnVision+System-HRP (Dako ref. K4003 o K4001 respectivament)*. Per a l'amplificació de senyal en els casos en els quals s'ha usat un secundari conjugat amb biotina s'ha utilitzat el kit *ABC VECTASTAIN (Vector, Pk 6100)*. RT es refereix a temperatura ambient.

ANTICOSSOS PRIMARIS USATS EN TEIXITS INCLOSOS EN OCT

ANTICÒS	MOSTRA	TÈCNICA	FONT	# REF.	DILUCIÓ	INCUBACIÓ
CD31	OCT	IHC	monoclonal de rata	BD Pharmigen 550274	1:20	O/N 4°C

ANTICOSSOS PRIMARIS USATS EN TEIXITS INCLOSOS EN OCT

ANTICÒS	MOSTRA	TÈCNICA	FONT	# REF.	DILUCIÓ	INCUBACIÓ
IgGs de rata-biotina	OCT	IHC	policonals de conill	Dako E0413	1:200	1 h RT

3.4.8 Immunodetecció de proteïnes en cèl·lules en cultiu: Immunocitofluorescència (ICF)

Per a la immunodetecció de proteïnes en cèl·lules en cultiu no és necessari el pas de desemmascament de l'antigen ni la inhibició de les peroxidases endògenes. Es treballa amb fluorescència amb les cèl·lules prèviament fixades. El protocol usat és el següent:

- Col·locar 1 cubreobjectes rodó (*Thermo scientific*, 6- 8 mm de diàmetre) a cada pou d'una placa de 24 pous submergits en etanol 70%, s'elimina el etanol, fer dos rentats amb PBS 1x i esterilitzar-los sota llum UV durant 20 min a la campana de flux. Seguidament cobrir els cubreobjectes amb 100 µl de solució de poli-L-lisina (1 mg/ml) esterilitzada per filtració (0,22 µm). Incubar 1 h a 37°C. Treure la solució de poli-L-lisina i fer 2 rentats amb PBS 1x estèril. La poli-L-lisina s'usa per a crear una matriu carregada positivament sobre la qual les cèl·lules a usar s'adhereixen millor. Conservar la placa amb els cubreobjectes tractats a 4°C i segellada amb parafilm per mantenir les condicions d'esterilitat.
- Sembrar 75000 cèl·lules MDA-MB-231 per cada pou de la placa de 24 pous amb cubreobjectes poli-L-lisinats (el nombre de cèl·lules depèn de la mida cel·lular; es recomana optimitzar-ne el protocol) en medi DMEM amb 10 % FBS O/N.

- Rentar els pous amb PBS 1x sense Ca^{++} ni Mg^{++} per evitar la desadhesió cel·lular.
- Fixar les cèl·lules amb solució atemperada (15- 20 °C) al 4 % de paraformaldehid durant 30 min a temperatura ambient.
- Rentar 2 vegades amb PBS 1x.
- **Bloquejar** les cèl·lules amb una solució al 10 % FBS en TBS-T 0,1 % durant 1 h a temperatura ambient.
- Rentar amb PBS 1x durant 5 min.
- **Incubació de l'anticòs primari.** Incubar les cèl·lules amb la solució d'anticòs primari. El diluent és PBS 1x i el rang de dilució de l'anticòs varia de 1:50 a 1:200 en funció de l'anticòs (consultar taula 4 per fluorescència).
- Rentar amb PBS 1x durant 5 min.
- **Incubació de l'anticòs secundari.** Incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluoròfor a una concentració de 1:500 durant 1 h a temperatura ambient i protegit de la llum. Amb la incidència d'una longitud d'ona adequada procedent d'un làser d'un microscopi de fluorescència, el fluoròfor de l'anticòs secundari que s'ha unit al primari s'excita i emet una longitud d'ona que permet identificar la localització subcel·lular de l'antigen
- Rentar amb PBS 1x.
- Incubar amb DAPI durant 5 min a temperatura ambient.
- **Muntatge** dels cubreobjectes. Posar una gota de medi de muntatge aquós Mowiol en un portaobjectes i col·locar el cubreobjectes a sobre, amb les cèl·lules en contacte amb el mowiol. És important treure les bombolles d'aire entre el Mowiol i el cubreobjectes per tal que no s'assequi la mostra i així mantenir els fluoròfors en medi aquós. Cal deixar assecar el Mowiol a temperatura ambient i en foscor per a segellar l'espai entre el cubreobjectes i el portaobjectes i evitar l'entrada d'aire. L'observació òptima de les mostres és 24 h després del muntatge.

Per a la localització subcel·lular de l'antigen d'interès es recomana l'ús de microscopia confocal.

La característica principal de la microscopia confocal és que recull i detecta la llum emesa per molècules fluorescents situades en un mateix pla de l'espai tridimensional. Això és possible gràcies a que la font d'il·luminació usada és un làser (es manté perfectament lineal quan es propaga). Aquesta llum monocromàtica il·lumina les mostres de forma específica amb una intensitat molt alta i estable. Aquesta disposició permet aconseguir resolucions microscòpiques subcel·lulars. Però, a més a més, en els microscopis confocals hi ha una peça anomenada

diafragma de detecció confocal o *pinhole*, que consisteix en un orifici petit en el filtre detector de la llum, que impedeix el pas de la llum procedent de plans no enfocats de la mostra. d'aquesta manera s'obté només la informació de la regió enfocada i s'incrementa la resolució subcel·lular.

3.4.9 Anticossos anti-NFATc

Per a la realització d'aquest treball de tesi de caracterització de l'efecte funcional de RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sobre la via de Cn-NFAT i la seva implicació en càncer de mama humana calia disposar d'anticossos contra NFATc. Malauradament els anticossos comercials usats no han funcionat. En paral·lel vam rebre des d'AVIVA una sol·licitud d'analitzar els anticossos amb anti-NFATc de què disposaven. Ens van enviar un grup d'anticossos anti-NFATc per a provar i optimitzar en les diferents tècniques immunològiques (IHC, IF, ICF, WB). No obstant, els resultats que es mostren en aquest treball d'investigació s'han realitzat exclusivament amb l'anticòs contra el NFATc2 humana (ref. ARP38988_P050). Aquest anticòs és un anticòs policlonal de conill que detecta concretament la regió C-terminal (aminoàcids 861 a 890 del NFATc2, de 925 aminoàcids, ref. Q13469-1 de UniProtKB/Swiss-Prot) i exactament aquesta seqüència aminoacídica:

PTVIQQNATSQRAAKNGPPVSDQKEVLPAGVTIKQEQLDQTYLDDVNE

3.5 CULTIU CEL·LULAR I MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES DE MAMÍFER

3.5.1 Cultiu i manteniment de línies cel·lulars humanes

Les línies de mamífer usades durant el desenvolupament d'aquest treball són:

- HEK 293T, cèl·lules humanes embrionàries de ronyó, comprades a ECACC (European Collection of Cell Culture). La línia cel·lular 293T és una línia cel·lular en la qual es va inserir l'antigen T procedent del virus SV40 per a incrementar l'eficiència de transfecció i la producció de retrovirus o lentivirus.
- Jurkat T cells E6.1 clone, acute leukemia human T cells, obtained from ECACC. Aquesta línia es va usar per als assajos de Pull down ja que un cop estimulades amb ionomicina i calci, aquestes cèl·lules contenen grans quantitats de calcineurina.

- MDA-MB-231 (ECACC; European Collection of Cell Cultures), adenocarcinoma mamari humà classificat com a càncer de mama triple negatiu (TNBC), obtingudes de la Divisió Biomèdica del Centre tecnològic LEITAT (Parc Científic de Barcelona). La línia MDA-MB-231 és una línia cel·lular humana procedent d'una pacient de 51 anys caucàsica. Les cèl·lules tenen de 59 a 66 cromosomes per metafase i moltes anormalitats estructurals que representen més del 60% dels 22 cromosomes autosòmics i del cromosoma sexual X. Fenotípicament les cèl·lules són epitelials i adherents (*Cailleau R, Young R et al, 1974*).
- MDA-MB-468 (ATCC-HTB-132). és una línia cel·lular humana procedent d'una pacient negra de 51 anys amb adenocarcinoma metastàtic classificat com a TNBC amb metastasi. Les cèl·lules tenen una mitja de 60 cromosomes per metafase i moltes anormalitats estructurals. Fenotípicament les cèl·lules són epitelials i adherents.

La línia cel·lulars MDA-MB 231 es fa créixer amb DMEM amb alta concentració de glucosa (4500 mg/l) (*Invitrogen*, ref. 61965-026) suplementat amb 10 % de sèrum boví fetal (FBS) (*Invitrogen*, ref. 10270-106), prèviament inactivat a 55 °C durant 35 min per desactivar les proteïnes del complement. En el cas de les cèl·lules MDA-MB-468 s'utilitza un medi RPMI 1640 amb alta concentració de glucosa i suplementat amb 10% FBS, prèviament inactivat a 55 °C durant 35 min. Per evitar contaminacions, les cèl·lules es cultiven en presència de solució de penicil·lina a 100 U/ml i d'estreptomicina a 100 µg/ml (*Invitrogen*, ref. 15070-063). Les cèl·lules es fan créixer en un incubador a 37°C, 5% CO₂ i un 95% d'humitat relativa.

Les cèl·lules es tripsinitzen cada 2- 3 dies depenent de la velocitat de creixement de les línies cel·lulars en estudi i s'ha d'intentar treballar a ser possible amb passatges no superiors al 20 després de comprar-les. Cal fer control rutinari d'absència de contaminació amb micoplasma de les cèl·lules.

3.5.2 Estimulació cel·lular per a l'activació de la via Cn-NFATc

Per a l'activació de la via Cn-NFATc s'utilitza un estímul format per 1 µM de Ionomicina (Io) i 10 mM de CaCl₂. El temps de tractament amb calci i ionomicina depèn del pas de la via que es vulgui analitzar. Quan el què es pretén és analitzar els nivells d'expressió gènica regulats pels NFATcs, cal estimular les cèl·lules no tan sols amb calci i ionomicina sinó també amb 10 nM de forbol 12-miristat 13- acetat (PMA), que activa la

via de senyalització que activa el factor de transcripció AP-1. Això és degut a que la inducció de l'expressió gènica requereix una acció coordinada de diversos factors de transcripció, regulats per diferents vies de senyalització. Com a control negatiu de l'activació de la via Cn-NFATc en els experiments realitzats en aquest treball, es va aplicar un tractament de 30 min amb CsA (1 μ M) previ a l'adició de l'estímul de calci per tal d'inhibir l'activitat fosfatasa de la Cn.

3.5.3 Criopreservació de les cèl·lules de mamífer

Les cèl·lules de mamífer es poden mantenir llargs períodes de temps en nitrogen líquid. Per mantenir bé les cèl·lules, cal congelar-les en un passatge el més baix possible. Per a congelar-les es segueix el següent protocol:

- Tripsinitzar les cèl·lules el mínim temps possible i centrifugar-les a 500 g per a obtenir un sediment cel·lular.
- Resuspendre les cèl·lules en una barreja que conté 40% de medi de cultiu (DMEM per a les MDA-MB-231 i RPMI 1640 per a les MDA-MB-468, suplementat amb 10 % de FBS), 50 % de FBS i 10 % de DMSO (*Sigma*, ref. D8418).
- Repartir la barreja anterior que conté les cèl·lules en criotubs i posar-los en un contenidor que disminueix la temperatura 1°C/min fins aconseguir una temperatura de -80°C (3 h aproximadament).
- Posar els criotubs en un contenidor de nitrogen líquid (-190°C).

Per recuperar les cèl·lules congelades, posar el vial congelat ràpidament (< 1 min) en un bany a 37°C. Diluir la suspensió cel·lular amb 10-15 ml de medi atemperat i centrifugar a 400 g durant 5 min per tal d'eliminar al màxim el DMSO present a la mostra. Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment cel·lular amb el medi de cultiu apropiat.

3.5.4 Test de micoplasma en línies cel·lulars eucariotes

La contaminació cel·lular amb micoplasma en cultius de línies cel·lulars modifica la fisiologia normal de la cèl·lula i dóna lloc a resultats erronis i heterogenis.

El test del micoplasma s'ha de realitzar de forma rutinària per a testar les línies cel·lulars que s'han d'utilitzar. El test del micoplasma és

capaç de detectar contaminació per *M. fermentans*, *M. capricolum*, *M. orale*, *M. arginini*, *M. penetrans*, *M. hyorhinis*, *M. salivarium*, *M. hyorhinis*.

Per a l'obtenció de mostres es procedeix de la següent manera:

- Sembrar les cèl·lules de la línia cel·lular a testar en medi fresc i sense antibiòtics.
- Deixar créixer les cèl·lules fins a confluència i mantenir el cultiu en creixement 2 dies més.
- Recollir 200 µl del sobrenedant del cultiu i analitzar la presència de micoplasma per amplificació per PCR.

La detecció del DNA dels micoplasmes per PCR es fa usant els encebadors (taula 6) específics per amplificar el gen del 16S rRNA ja que és una seqüència conservada en els micoplasmes però diferent de la seqüència del gen en bacteries, fongs o altres possibles organismes contaminants cel·lulars.

Taula 6. Encebadors usats pel test de detecció de DNA de micoplasma.

Encebador o primer	Seqüència 5'-3'	Tm (°C)
Mycoplasma_Fw	GGCGAATGGGTGAGTAACACG	62° C
Mycoplasma_Rv	CGGATAACGCTTGCGACTATG	59 °C

3.5.5 Transfecció de cèl·lules de mamífer

El protocol de transfecció de cèl·lules de mamífer varia en funció de la línia cel·lular estudiada i de l'experiment a realitzar:

- Transfecció pel mètode del fosfat càlcic. S'ha usat per a la transfecció de cèl·lules HEK 293T en la producció de partícules lentivirals ja que permet una alta eficiència de transfecció, al voltant del 99 % (descriu a la secció 3.2.2).
- La lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) s'ha utilitzat per a la transfecció de cèl·lules MDA-MB-231 amb el gen reporter de la luciferasa, entre d'altres, per determinar l'activitat dels NFATc. Per una placa de 12 pouets el protocol usat en la transfecció amb lipofectamina és el següent:

- Sembrar 75000 cèl·lules MDA-MB-231 per pou (1,5 ml finals/ pou).
 - En un tub A barrejar 2 µg de DNA en medi Opti-MEM (*Invitrogen*) en un volum final de 150 µl.
 - En un tub B barrejar 2,5 µl de lipofectamina 2000 en Opti-MEM en un volum final de 150 µl. Ambdós tubs, A i B, han de tenir un mateix volum final (1:1) i serveixen per a la transfecció d'un pou.
 - Barrejar el tub A en el tub B i deixar reposar 20 min a temperatura ambient.
 - Afegir la barreja final de 300 µl al pou corresponent i incubar O/N a 37°C (veure instruccions del fabricant per a més informació).
- Transfecció amb polietilenimida lienal (PEI, Polysciences). Normalment es transfecten cèl·lules HEK 293T amb l'objectiu d'expressar proteïnes recombinants codificades en plasmidis de DNA.

El PEI és un polímer lineal amb càrrega positiva capaç d'acomplexar-se amb partícules de DNA que són incorporades en les cèl·lules en cultiu de mamífer. El protocol descrit a continuació està dissenyat per a la transfecció d'una placa de 100 mm de diàmetre. Normalment s'usen 200 ng de DNA/ cm² en una transfecció, tot i que les quantitats poden variar en funció de les necessitats de l'experiment. El més important, però, és que les cèl·lules estiguin entre el 30 i el 40 % de confluència el dia de la transfecció.

La proporció òptima de DNA:PEI per a transfectar les cèl·lules HEK 293T és 1:2,5 (w/w). Les cèl·lules MDA-MB-231 o MDA-MB-468 es poden transfectar amb PEI però l'eficiència és molt baixa. Per a la transfecció d'aquesta línia s'usa la lipofectamina.

Cal preparar dues solucions diferents per la transfecció de cèl·lules amb PEI:

- Solution A: 8 µg DNA en 500 µl de NaCl 150 mM estèril.
- Solution B: 15 µl de PEI (estoc congelat preparat a 1mg/ml) en 500 µl de NaCl 150 mM.

La solució B s'ha d'afegir sobre la solució A, pipetejant en la solució i sense tocar les parets del tub per tal d'evitar l'adherència de la solució B al plàstic. Immediatament després el tub ha d'agitar-se vigorosament. Tot seguit el tub s'incuba 20 min a temperatura ambient i finalment la barreja s'afegeix gota a gota al cultiu cel·lular.

Les cèl·lules s'incuben O/N a 37°C. Tot i que la toxicitat del PEI està considerada com a molt baixa, es recomana que el medi de cultiu es canviï a les 12-16 h.

3.5.6 Transducció de cultius de cèl·lules eucariotes amb partícules lentivirals

Una vegada es disposa de les partícules lentivirals produïdes i titulades en les cèl·lules HEK 293T (consultar la secció 3.2.2), cal calcular quantes partícules es necessiten per a transduir un cultiu cel·lular. Amb la titulació sabem el nombre de partícules viríques funcionals en una solució que poden transduir una cèl·lula i expressar el transgen, o unitats de transducció (TU). De forma habitual s'usa de el concepte de multiplicitat de la infecció o MOI (*Multiplicity of Infection*) és el nombre de genomes o partícules virals funcionals que transdueixen una mateixa cèl·lula. Si sabem la MOI que es desitja es pot calcular fàcilment el nombre de TU totals que necessitem per transduir les cèl·lules multiplicant el nombre de cèl·lules totals a transduir per la MOI desitjada en l'experiment. Per a transduir les cèl·lules MDA-MB-231 en l'experiment de formació de tumors ortotòpics de càncer mama es va usar una MOI de 20 per assegurar que els cDNAs d'interès s'expressin en les cèl·lules. La transducció cel·lular es realitza en presència de polibrè 8 µg/ml per a incrementar-ne l'eficiència del procediment. Per a la injecció de cèl·lules en l'experiment *in vivo*, 24 h després de transduir les cèl·lules MDA-MB-231 és millor separar-les per citometria de fluxe en base a l'expressió de la EGFP per tal de treballar amb una població més homogènia de cèl·lules transduïdes. Normalment la incubació de les partícules virals es fa O/N.

3.5.7 Assaig de l'activitat transcripcional dels NFATc mitjançant el gen reporter de la *luciferasa*

En els experiments per determinar l'activitat transcripcional dels factors de transcripció NFATc s'empra un vector amb el gen de la *luciferasa* de la cuca de llum (*Firefly luciferase*) sota el control d'un promotor regulat pels NFATc. Per aquest assaig, es sembren 50000 cèl·lules per pou en plaques de 24 pous. Les diferents condicions assajades es testen per triplicat. El protocol descrit a continuació està adaptat per al format de plaques de 24 pous (1,88 cm² d'àrea per pou) però es pot adaptar en base a l'àrea de la placa a transfectar.

- Transfectar les cèl·lules HEK 293T amb PEI amb les següents quantitats de DNA plasmídic (en un volum final de 100 µl per pou):
 - Plasmidi reporter de la luciferasa de la cuca de llum (a partir d'aquest punt s'anomenarà com luciferasa): 9xNFAT-luc 100 ng.
 - Plasmidi del reporter de la luciferasa renilla, CMV-Renilla (a partir d'aquest punt s'anomenarà com a renilla; s'empra com a control intern de la transfecció): 0,9 ng.
 - Plasmidi que porta el cDNA que codifica per la proteïna d'interès: 200 ng dels plasmidis HA, HARCAN3 o HARCAN3 AAQ; o 500 ng dels plasmidis EGFP, EGFP¹⁷⁸⁻²¹⁰ o EGFP¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ.
 - Tot i testar diferents concentracions de DNA de cada construcció a transfectar (dilucions seriades 1:10), la quantitat final de DNA a transfectar es manté constant usant un plasmidi de DNA buit (pot ser HA o EGFP per exemple, sense el cDNA d'interès).

- El dia següent es canvia el medi per medi fresc DMEM complet suplementat amb inomicina (10; 1 µM), 13-Phorbol 12-Myristate Acetate (PMA; 10 nM) i clorur de calci (CaCl₂; 10 mM). Com a control de la inhibició de calcineurina s'afegeix ciclosporina A (CsA, 1 µM) al medi i 30 minuts abans d'afegir la resta d'estímul.
- Estimular les cèl·lules durant 6 h. Treure el medi i rentar les cèl·lules amb PBS fred (0- 4°C) suplementat amb CaCl₂ i MgCl₂, ambdós a una concentració de 0,1 mg/ml (per prevenir la desadhesió cel·lular). Les plaques de cultiu amb les cèl·lules adherides i sense medi de cultiu poden congelar-se a -20°C directament fins a la realització de l'assaig.
- Llisar les cèl·lules en fresc o a partir d'una placa congelada usant el tampó *Passive Lysis Buffer* de (Promega) durant 15 min a temperatura ambient en un agitador oscil·lant. Si la lisi és sobre placa congelada, no s'ha de descongelar la placa abans d'afegir la solució de lisi, simplement s'afegeix a sobre.
- Recollir amb un rascador cel·lular el producte lisat i quantificar l'activitat luciferasa i l'activitat renilla seguint les instruccions del fabricant per luminiscència en un lector de plaques *VICTOR X multilabel Plate Readers (Perkin Elmer)*.
- Normalitzar les unitats de luciferasa a les de l'activitat renilla. En aquest treball es presenten les dades com a percentatge d'activació dels NFATc considerant el 100% d'activació quan les

cèl·lules estan estimulades amb $Io/PMA/Ca^{2+}$ en presència de plasmidis control (o buits).

- Pels assajos luciferasa amb la línia cel·lular MDA-MB-231 o MDA-MB-468 es procedeix tal i com s'ha explicat anteriorment però amb alguns detalls diferents:
 - Transduir 25000 cèl·lules MDA-MB-231 o MDA-MB-468 en plaques de 48 pous amb les construccions lentivirals que interessin.
 - a les 24 h es transfecten les cèl·lules amb lipofectamina 2000 i els plasmidis:
 - 9xNFAT-luc: 400 ng
 - *Renilla Null*, *pRLNull* (control intern de la transfecció): 0,25 ng
 - Passades 12 h, estimular les cèl·lules durant 8 h amb calci i ionomicina.
 - Quantificar l'activitat luciferasa en un lector de plaques.

3.5.8 Assajos de tancament de ferides i migració cel·lular (*wound healing*)

Els assajos de tancament de ferides (*wound healing*) *in vivo* són una bona manera d'estudiar la migració cel·lular. La capacitat de migrar és una habilitat característica de les cèl·lules tumorals que desenvolupen a mesura que van adquirint un estat de desdiferenciació i malignitat progressius.

El procediment és:

Dia 1: sembrar 350000 cèl·lules MDA-MB-231/ pou de placa de 6 pous.

Dies 2-4: Esperar fins que les cèl·lules formin una monocapa confluent.

Dia 5:

- Rentar 2 vegades amb PBS 1x sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} a temperatura ambient. No treure el PBS en el segon rentat.
- Rascar la monocapa cel·lular amb una punta estèril de 200 μ l per a simular una ferida en el cultiu. Les cèl·lules migraran per a "tancar" o "curar" la ferida ocupant l'espai lliure generat amb la punta. És important que el cultiu estigui en confluència abans de començar per assegurar-nos que la migració cel·lular sigui en direcció a la ferida generada i per tant comparable entre les condicions assajades.

- Rentar 2 vegades amb PBS 1x sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} a temperatura ambient. Afegir medi nou amb estímuls (0,5 μM CsA (en els pous control negatiu d'activitat de la Cn) i 0,5 μM ionomicina, 0,5 mM CaCl_2 , 0,005 μM PMA).
- Configurar les posicions X i Y de cada pou amb la platina motoritzada del microscopi confocal per a capturar les imatges cada 20 min fins a un temps final de 20 h (depenent de la velocitat de creixement de la línia cel·lular usada). El microscopi ha de tenir un incubador associat per tal que les cèl·lules puguin créixer en condicions òptimes de temperatura i CO_2 al llarg de tot l'experiment.
- Analitzar els resultats usant el programari Image J. Per a cada condició s'analitzen 40 posicions.

3.5.9 Assaig de creixement cel·lular independent d'ancoratge

Els assajos de detecció de transformació cel·lular *in vitro* són assajos semiquantitatius. Aquests mesuren l'efecte de compostos químics en la transformació de la morfologia de les colònies cel·lulars. Aquesta transformació s'associa amb certs canvis fenotípics com la pèrdua de la inhibició per contacte i el creixement cel·lular independent d'ancoratge (les cèl·lules transformades són capaces de créixer en agar tou).

Algunes línies cel·lulars fibroblàstiques necessiten ancorar-se a una superfície sòlida abans de dividir-se, procés que s'anomena creixement dependent d'ancoratge. En el medi d'agar tou, en canvi, aquestes cèl·lules no es poden dividir. No obstant, durant el procés de transformació, adquireixen la capacitat de poder créixer independentment d'ancoratge i formar colònies.

Els processos relacionats amb la transformació cel·lular acostumen a associar-se a processos carcinogènics *in vivo*. Així es considera que la capacitat de creixement en medi fluid és un bon marcador per a detectar el potencial tumorogènic de les cèl·lules.

En els assajos d'agar tou, les cèl·lules es cultiven durant 15-20 dies (es pot allargar el temps si és necessari). En acabat, les colònies formades es poden analitzar morfològicament usant una tinció cel·lular i quantificant el nombre i mida de les colònies formades.

El protocol usat per aquest assaig és el següent:

- **Dia 1: Preparació de la base d'agar al 0,6%.** Barrejar agar (BD, ref.214220) en aigua al 0,6% i fondre'l en un microones. Esterilitzar-lo durant 15 min a 50 °C i mantenir-lo entre 42°C-44°C

al bany per evitar que solidifiqui. Si es vol es pot preparar una solució estoc d'agar 10x que cal esterilitzar amb autoclau pel seu ús en cultius cel·lulars. La solució d'agar 10x es dilueix a una concentració final de 0,6% agar en medi complet (DMEM 10% FBS) a 42-44°C per a mantenir-la en estat líquid. Finalment, s'afegeixen 4 ml de la barreja al 0,6 % a cada pou d'una placa de 6 pous i es deixa solidificar a temperatura ambient durant 40 min. Les plaques sobrants poden guardar-se a 4°C fins el moment d'us segellades amb parafilm per a mantenir-ne l'esterilitat.

- **Dia 2. Preparació de la fase superior d'agar al 0,3-0,4%** (el percentatge dependrà de la capacitat de creixement de la línia). Les plaques de 6 pous presenten la fase inferior d'agar tou solidificat al 0,6% i atemperades a 37 °C. Seguidament es fon agarosa al 3-4 % en un microones durant 15 min a 50 °C. Les cèl·lules es tripsinitzen i es compten. Es sembren 5000 cèl·lules per pou ressuspeses en medi complet (DMEM 10% FBS) i amb 0,3-0,4 % d'agar tou recién preparat en un volum final de 2 ml per pou i s'afegeix sobre la capa d'agar al 0,6%.

Deixar solidificar a temperatura ambient durant 30 minuts i posar la placa a l'incubador a 37°C.

- **Dia 3. Canviar el medi** (0,5- 1 ml DMEM 10% FBS)/pou decantant la placa i afegint el medi fresc a sobre de la capa del 0,3-0,4% d'agar on hi ha les cèl·lules. Es recomana canviar el medi cada 3 dies fins a la formació de colònies cel·lulars per tal d'evitar que l'agar s'assequi. Al final de l'experiment s'afegeixen 500 µl/ pou (1 mg/ ml) del nitroblau de tetrazolium, NAT o NBT, (*SIGMA*), solució incolora que quan es redueix pren un color blau-negrós que tenyeix les colònies en creixement cel·lular. El colorant cal que es mantingui durant 8 h a 37 °C per a la correcta visualització de les colònies en les plaques i pel posterior escanejat d'aquestes. Les imatges s'analitzen amb el programa Image J.

3.6 MANIPULACIÓ D'ANIMALS

3.6.1 Models de ratolí

Alguns dels resultats exposats en aquest treball de tesi s'han realitzat en un model de ratolí transgènic de sobreexpressió del gen *RCAN1* humà.

3.6.1.1 Model de ratolí transgènic de sobreproducció de la proteïna *RCAN1* humana,(PACC77tghRCAN1)

El model animal transgènic PAC77 TghRCAN1 generat en la soca C57BL/6 va ser cedit per la Dra. Melanie Pritchard (PhD, Monash University, Australia). El clon del PAC introduït en l'animal transgènic conté 135 kb on es troben tots els exons del *RCAN1* humà (també conegut per altres noms com *DSCR1*, *ADPT78* o *MCIP1*) i s'extén aproximadament 35 Kb a 5' de l'exó 1, i 600 bp a 3' de la cua polyA del *RCAN1*. La seqüència de l'insert del PAC sencera va ser analitzada mitjançant el programari NIX procedent dels serveis de computació del Projecte de Mapatge del Genoma Humà del Regne Unit (UK HGMP) (Bishop, 1995). De l'anàlisi del NIX, se'n deriva la informació que *RCAN1*, probablement, és l'únic gen present en el PAC. Tal i com s'esperava degut a la mida del transgen, el genoma del ratolí ha integrat poques còpies de l'insert *RCAN1* PAC77 (entre 5 i 10 còpies). La manipulació dels animals, així com els procediments realitzats s'han dut a terme d'acord amb les recomanacions i les pautes aprovades pel Comitè ètic CCEA 86/609/CEE (Comitè ètic de l'IDIBELL).

3.6.1.2 Genotipat del model de ratolí tghRCAN1

La genotipació dels animals *tghRCAN1* es fa mitjançant PCR, usant encebadors específics del gen humà *RCAN1* per a determinar si l'animal és homozigot o heterozigot per l'al·lel transgènic i encebadors interns que hibriden al locus del gen precursor de la *Interleukina 2 (IL2p)* de ratolí com a control. El material de partida és DNA de l'animal extret a partir d'un tros de teixit del trosset distal de la cua o d'un trosset d'orella (per a més detall consultar la secció 3.3.1.4).

La informació dels encebadors usats es resumeix en la següent taula:

Taula 7. Llistat d'encebadors per a la genotipació del model de ratolí que sobreexpressa la proteïna RCAN1 humana C57 Bl/6 PACC77tg RCAN1.

Aplicació/ ús	Encebador o primer	Seqüència 5'-3'
Genotipat TghRCAN1 PACC77	wt-Cre Fw TgPACC77	CTAGGCCACGAATTGAAAGATCT
Genotipat TghRCAN1 PACC77	wt-Cre Rv TgPACC77	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
Genotipat TghRCAN1 PACC77	DSCR1-3UTR F3 TgPACC77	GCACAAGGACATTTGGGACTG
Genotipat TghRCAN1 PACC77	DSCR1-3UTR R4 TgPACC77	GTTGGGGATGCTGAGTGAATG

3.6.1.3 Ratolins atímics BALB/c (nude mice)

Els animals nude atímics (BALB/c Nude) es van comprar a Harlan per a usar-los com a receptors en els experiments de formació de tumors de mama humans ortotòpics. Aquests animals no tenen timus, per tant són incapaços de produir cèl·lules T funcionals i com a conseqüència són immunodeficients.

3.6.1.4 Model de xenograft de càncer de mama humà

Per a desenvolupar aquest treball de tesi doctoral s'ha generat un model ortotòpic de càncer de mama triple negatiu humà gràcies a la injecció de cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb diferents lentivirus per tal que sobreexpressin el gen *RCAN3* o pèptids derivats d'aquesta proteïna. El model animal s'ha dut a terme en la soca de ratolins immunodeprimits BALB/c al Centre Tecnològic LEITAT, Divisió Biomèdica (Parc Científic de Barcelona), en col·laboració amb el Dr. Ramon Messeguer.

Concretament, per a la generació del model ortotòpic de càncer de mama humà, s'injecten cèl·lules MDA-MB-231 prèviament transduïdes amb les construccions lentivirals pWPI (control)/ pWPI-RCAN3/ pWPI-RCAN3 AAQ al greix associat al teixit mamari de la glàndula engonal dreta. Respecte al model ortotòpic de càncer de mama humà usant el pèptid derivat de RCAN3, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, es procedeix de la mateixa manera amb les construccions lentivirals pWPT (control)/ pWPT-EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰/pWPT-EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ.

A cada animal s'injecten 2x10⁶ cèl·lules en medi DMEM ric amb glucosa i amb glutamax per animal a una concentració d'1x10⁶ cèl·lules en un volum final de 100 µl. És important que el medi no tingui traces de sèrum fetal boví ni d'antibiòtic per tal d'evitar agregats cel·lulars que podrien ocasionar danys vasculars o fins i tot la mort a l'animal.

Les cèl·lules tumorals injectades produiran les proteïnes exògenes EGFP (control), RCAN3/ RCAN3 AAQ/ EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰/ EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ i depenent del efecte funcional d'aquestes s'en derivarà el nivell de creixement i/o activitat cel·lular i en conseqüència el grau de desenvolupament dels tumors ortotòpics. A partir d'ara els tumors es denominaran com a EGFP, RCAN3, RCAN3 AAQ, EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ per a facilitar-ne la descripció.

Els tumors es deixen créixer 35 dies i es mesuren les seves dimensions de forma precisa bisetmanalment. Al final de l'experiment es fotografien els animals abans de sacrificar-los, es sacrifiquen per dislocació cervical i s'extrauen els tumors, que també es fotografien.

En canvi, en el model ortotòpic de càncer de mama humà generat per a observar els possibles efectes de l'administració intratumoral del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, es procedeix de manera diferent. En primer lloc s'injecten les cèl·lules MBA-MB-231, en aquest cas sense transduïr, també al greix associat a la glàndula mamària engonal dreta.. Quan els tumors tenen una mida d'uns 150-200 mm³, s'inicia el tractament per injecció intratumoral amb el pèptid (seqüència d'aminoàcids del pèptid corresponent al motiu CIC de RCAN3 (LGPGEKYELHAGTESTPSVVHVCESETEEEEE). En aquest model s'ha usat un tractament amb el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sol (anomenat com a MP1) i un tractament amb el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ conjugat amb un àcid gras (anomenat com a MP2) per a facilitar l'entrada d'aquest a les cèl·lules tumorals.

3.6.1.5 Transducció de cèl·lules MDA-MB-231 amb lentivirus.

Es transdueixen les cèl·lules MDA-MB-231 en creixement exponencial amb les construccions lentivirals d'interès a una MOI de 20 en medi DMEM amb alta concentració de glucosa (4500 g/l) i glutamax suplementat amb 10 % FBS, i 8 µg/ml polibrè. Després d'una incubació O/N, es canvia el medi i es deixen créixer les cèl·lules 24 h més a l'incubador. L'eficiència de transducció es monitoritza per microscopia de fluorescència ja que les cèl·lules transduïdes són EGFP positives. Després es mira l'eficiència de la transducció per citometria i es separen per FACS les cèl·lules que expressen EGFP per tal d'injectar una població homogènia al ratolí.

3.6.1.6 Injecció de la línia cel·lular MDA-MB-231

Passades 48 h després de la transducció de les cèl·lules, aquestes es tripsinitzen, es renten, es sedimenten i es ressuspenen per a obtenir una concentració de 10^7 cèl·lules/ml en PBS. Després de separar les cèl·lules EGFP⁺ per FACS, per tal d'injectar posteriorment una població homogènia al ratolí, n'injectem 10^6 cèl·lules (en un volum de 100 μ l) al greix associat a la glàndula mamària engonal dreta de femelles *BALB/c Nude*, immunodeprimides, de 6-8 setmanes d'edat. Els animals es supervisen diàriament per a identificar qualsevol problema secundari al procediment.

3.6.1.7 Mesura dels tumors

El seguiment del creixement tumoral es fa dos cops per setmana mesurant els diàmetres del tumor. El volum tumoral es calcula usant una aproximació de la fórmula de l'elipsoide:

$$\text{volum} = (D \times d^2) / 2$$

on *D* és l'eix més llarg del tumor i *d* el més curt.

3.6.1.8 Assaig de metastasi experimental per injecció de cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb RCAN3 a la vena de la cua dels ratolins BALB/c immunodeprimits

Per a l'estudi de l'efecte de RCAN3 sobre el procés de la metastasi cal transduir les cèl·lules de càncer de mama MDA-MB-231 amb els lentivirus que codifiquen per les proteïnes d'interès i EGFP. Després, les cèl·lules que sobreexpressen EGFP es separen per FACS per a tenir una població el més homogènia possible pel que fa a l'expressió del transgen introduït. Després aquestes cèl·lules s'injecten en els animals per la vena de la cua en un volum de 100 μ l per injecció i s'espera un temps per a la formació de nòduls metastàsics en els pulmons. Més detalladament, el protocol seguit és el següent:

- Separar les cèl·lules que expressen EGFP mitjançant citometria de flux. Amplificar-les amb medi DMEM amb 10 % de FBS, glutamax i alta concentració de glucosa.
- Preparar les cèl·lules transduïdes cultivant-les amb medi de cultiu DMEM sense antibiòtic dos dies abans de l'experiment.

- Rentar-les amb PBS 1x i tripsinitzar-les. Després de bloquejar la tripsina amb DMEM 10% FBS, centrifugar-les a 500 g 5 min a temperatura ambient.
- Resuspendre les cèl·lules en DMEM sense FBS ni antibiòtic i centrifugar-les altra vegada. Repetir aquest pas dues vegades més. És important que no quedin traces de FBS en la suspensió cel·lular ja que el FBS provoca agregats cel·lulars que poden obturar vasos sanguinis i causar la mort de l'animal un cop injectades.
- Comptar les cèl·lules amb càmera de Neubauer i preparar-les a una concentració de 20×10^6 cèl·lules/ml en DMEM sense FBS ni antibiòtic. Mantenir la suspensió cel·lular desagregada completament.
- Immobilitzar l'animal introduint-lo en una càmera específica per a la immobilització de l'animal i injectar 100 μ l de suspensió cel·lular per animal (2×10^6 cèl·lules/ animal). Com a càmera d'immobilització pot usar-se un tub de 50 ml de polipropilè amb un forat a l'extrem i un forat a la tapa. El forat de l'extrem facilita la respiració a l'animal i el forat de la tapa és per a poder tenir la cua quieta i evitar el moviment i el gir natural de l'animal.
- Supervisar la pèrdua de pes dels animals i el seu benestar diàriament.
- El dia del sacrifici depèn de la línia cel·lular injectada i de la formació de nòduls metastàsics. En el cas de les MDA-MD-231 s'esperen observar els nòduls entre 2-3 setmanes després del dia de la injecció.

3.6.2 Sacrifici dels animals i extracció de mostres

El punt final de l'experiment ve donat pel creixement del tumor més gran. Generalment quan alguns tumors arriben als 1000-2000 mm³ volum, l'experiment s'atura.

Els animals es pesen, es fotografien i es sacrifiquen per dislocació cervical o per cambra de CO₂. Els tumors s'extreuen dels animals, es pesen, es fotografien i es processen per a posteriors aplicacions. El procediment habitual és el següent:

- Una part del tumor es fixa en solució al 4 % de formol (3 h) i posteriorment les mostres es deshidraten amb una bateria d'alcohols i xilols i s'inclouen els teixits en parafina (veure'n el protocol detallat a la secció 3.7.1).
- Una part del tumor s'inclou en fresc en OCT i es congela immediatament a -80°C (veure'n la secció 3.7.2).

- La resta del tumor o mostra es talla en petits trossos (2-6 mm³) i es congela immediatament en gel sec a -80°C per a fer posteriorment l'anàlisi del RNA i de les proteïnes d'interès.

3.6.3. Manteniment de la colònia de ratolins

La colònia dels animals C57 Bl/6 PACC77tgRCAN1 es pot mantenir per creuament entre els mateixos individus ja que el transgen incorporat no afecta a la fertilitat dels animals. Per al creuament dels individus el protocol seguit és el següent:

- **Dia 1:** Posar virutes impregnades d'orina de mascle en les gàbies de les femelles durant un dia.
- **Dia 2:** Col·locar les femelles al dia següent a la gàbia del mascle (i no al revés).
- **Dia 3:** Identificació del tap vaginal en les femelles com a signe d'ejaculat positiu (es recomana revisar-ho abans de les 9 am per a evitar falsos negatius degut a la reabsorció del tap). Mantenir els animals en creuament si no cal saber amb precisió la data de naixement. En cas contrari, separar les femelles del mascle.
- **Dia 8:** Si el creuament ha sigut exitós la femella augmentarà 1 g de pes per setmana. Si la femella no està prenyada cal repetir el protocol de creuament una segona vegada.
- **Dia 15:** Control de pes.
- **Dia 19-21:** Vigilar possible part. No tocar les cries ni la viruta fins que portin 15 dies mínim de lactància per a evitar el que la mare es mengi les cries.
- **Dia 21 postpart:** Registrar i marcar les cries mitjançant perforació de les orelles per a futura identificació de l'individu a partir dels 10-15 després del naixement. El teixit extret es congela per a ser genotipat si és necessari juntament amb un tros distal de la cua. Separar mascles de femelles per evitar creuament continuat i aparició de malalties relacionades amb consanguinitat.

3.7 PROTOCOLS ESTÀNDARDS D'HISTOLOGIA

3.7.1 Inclusió de les mostres en parafina

La parafina és una resina molt útil en els procediments d'histologia perquè permet que els teixits puguin ser tallats en làmines de micròmetres de gruix. El protocol usat per al parafinat de les mostres és el següent:

- Rentar el teixit en sèrum fisiològic per a treure els residus sanguinis.
- Tallar-la en diferents trossos de 2 cm x 2 cm x 0,5 cm de gruix màxim.
- Posar els trossos de mostra en *cassettes* de plàstic especials per la inclusió de mostres en parafina. Aquests *cassettes* ténen forats per a facilitar el contacte de les diferents solucions amb la mostra sense que la mostra surti del recipient o es perdi.
- Fixar les mostres en solució 4 % formaldehid O/N a 4°C.
- Submergir els *cassettes* en diferents solucions per a deshidratar les mostres:
 - 70 % etanol durant 1 h
 - 95 % etanol durant 1 h
 - Etanol absolut durant 1 h
 - Etanol absolut durant 30 min
 - Etanol absolut durant 30 min
 - Etanol absolut durant 2 h
- Submergir els *cassettes* en solució de xilol durant 1 h i repetir en solució de xilol 1 h més.
- Submergir els *cassettes* en solució de parafina líquida a 65 °C O/N.
- Obrir els *cassettes* i triar un motlle metàl·lic adequat a la seva mida tenint en compte que cal deixar un marge de 2 mm de parafina per costat per a evitar que s'esquerdi en ser tallat pel micròtom. El *cassette* de plàstic pot guardar-se per a reutilitzar-lo.
- Posar parafina líquida a la base del motlle, que està sobre una superfície calenta.
- Amb ajuda de pinces, transferir la mostra al motlle i orientar-la el millor possible.
- Transferir el motlle d'alumini sobre una superfície a 0-4 °C i deixar-lo solidificar mirant que la mostra estigui ben orientada

quan es comenci a formar la fina capa de parafina que contacta amb la base per tal que la posició del teixit quedi fixada.

- Esperar que tot el motlle quedi solidificat per a poder separar el bloc de parafina del motlle (la parafina solidifica generalment entre 20 i 30 minuts en la placa freda). Si el bloc de parafina té algun defecte o està esquerdat, es col·loca sobre una placa calenta i s'espera a que la parafina es torni líquida i el bloc es desfaci. A continuació, repetir el procediment de formació del bloc.
- Els blocs de parafina es seccionen usant un micròtom. Cal encendre un bany i posar la temperatura a 35-37°C. Es recomana usar en el bany aigua desionitzada per evitar que quedin residus en les mostres. Els blocs es col·loquen sobre gel 10 min abans de tallar. Es col·loca una ganiveta en el micròtom i s'ajusta l'aparell per tal de fer talls de 4 µm. El bloc cal que s'orienti per a que el tall sigui recte i precís. Si apareixen imperfeccions en el tall, canviar la ganiveta.
- Els talls aniran quedant sobre el suport del micròtom i es recullen amb un punxó i es col·loquen al bany. A l'aigua quedaran flotant ben estirats i es poden separar uns dels altres amb el punxó. Amb un portaobjectes, col·locar els teixits sobre el vidre. Si hi ha bombolles, desfer-les amb el punxó amb cura de no trencar el teixit.
- Col·locar els portaobjectes en una placa calenta o incubador a 65°C durant 20 min (la parafina començarà a fondre's) per tal d'adherir el teixit al vidre. Els portaobjectes poden mantenir-se O/N a temperatura ambient. Si cal conservar els talls més temps, es recomana sucari-los en parafina líquida per tal de protegir els teixits dels cops i les ratllades. Una vegada solidificada la parafina, emmagatzemar en caixes de portaobjectes a temperatura ambient.

3.7.2 Inclusió i congelació de mostres en OCT

En alguns experiments, la inclusió en parafina no és recomanable degut a que el pas previ de fixació amb formaldehid crea forts enllaços entre estructures cel·lulars. Durant el desemmascament de l'antigen es pretén trencar aquests enllaços però hi ha un risc elevat d'alterar estructures cel·lulars i/o antigens sensibles, cosa que n'impedeix el reconeixement a través d'un anticòs específic. Per aquest motiu, hi ha un altre compost, *Optimal Cutting Temperature (OCT)*, en el qual es poden incloure les mostres en fresc i mantenir-les congelades sense fixar-les. En

aquest cas no caldrà desemascar l'antigen. El protocol a seguir per a la inclusió de mostres en OCT és el següent:

- Mantenir el teixit a incloure en OCT entre 0- 4 °C. Si cal, rentar amb PBS 1x per a treure les restes de sang que hi pugin haver. Treure l'excés de PBS amb un paper.
- Posar una gota d'OCT a la base del motlle de plàstic on es col·locarà el teixit. El teixit queda enganxat a la gota i es pot fixar així la seva orientació. La mostra ha de quedar enganxada al fons del motlle.
- Posar més OCT fins a cobrir la mostra.
- Deixar el motlle sobre neu carbònica per a que progressivament es vagi congelant tot el motlle (si el bloc es congela massa ràpid hi ha el risc de trencar-se).
- Les mostres es tallen en un aparell anomenat criostat. Cal assegurar-se que la cambra del criostat està com a mínim a -0°C. Sempre cal mantenir les mostres en neu carbònica.
- Col·locar la ganiveta al lloc de tall i deixar-la refredar 10 min. Ajustar l'angle de tall al bloc i ajustar el gruix de tall (5 µm).
- Posar el teixit d'interès en la platina de fixació del criostat per a obtenir seccions de 5 µm. Posar una base d'OCT, afegir a sobre la mostra i deixar refredar fins que es congela i la mostra queda fixa en la platina. Comprovar l'angle de tall abans de començar a tallar la mostra.
- Quan una secció s'ha tallat, cal aguantar el tall amb un pinzell o punxó (prèviament refredats a -20 °C) per a que no s'enrotlli i posar el portaobjectes a sobre. La diferència entre la temperatura del vidre del portaobjectes i la mostra farà que el teixit s'adhereixi al vidre.
- Guardar els portaobjectes amb els talls adherits a -20° C fins que es necessitin. Si cal mantenir-los guardats més d'un mes, es recomana guardar-los a -80° C.

3.7.3 Detecció d'apoptosi amb la tècnica de tunel

En aquest treball hem emprat el kit de detecció d'apoptosi *TUNEL Apoptosis Detection Kit (Gene script, L00300)* per a la detecció de cèl·lules apoptòtiques en seccions de teixits inclosos en parafina. El kit detecta DNA fragmentat en el nucli que és un procés característic de l'apoptosi. En aquest kit, s'usen nucleòtids marcats amb biotina, que s'uneixen als grup hidroxil del 3' del DNA mitjançant la desoxinucleotidil transferasa nativa o recombinant (TdT or rTdT). Tot seguit, s'usa

l'estreptavidina-HRP per a unir-se als nucleòtids marcats amb biotina que es poden detectar usant el substrat de la peroxidasa, el peròxid d'hidrogen i la solució de 3,3'-diaminobenzidine (DAB), que és un cromògen estable. Usant aquest procediment, el nucli en apoptosi es teyeix de marró. El protocol usat per a la detecció de l'apoptosi en talls de teixits inclosos en parafina és el següent:

- Desparafinar i rehidratar les seccions de teixit seguint els protocols estàndards (veure'n la secció 3.4.7.1).
- Rentar les mostres amb PBS 1x durant 5 min dues vegades.
- Incubar les seccions de teixit durant 15- 30 min a 21- 37°C amb solució de proteinasa K (20 µg/ ml en PBS 1x). Per a fer la tècnica de TUNEL sobre talls de mostres congelades en OCT es recomana incubar-los en una solució de PBS- Tween-20 amb 0,2 % Tritó durant 30 min a temperatura ambient.
- Rentar els talls dues vegades amb PBS 1x durant 5 min.
- Incubar amb solució de bloqueig durant 10 min a 15- 25°C (la solució de bloqueig conté 3 % de H₂O₂ en PBS 1x).
- Rentar els talls dues vegades amb PBS 1x durant 5 min.
- Incubar es talls amb el tampó de reacció de la TdT durant 10 min a temperatura ambient.
- Incubar els talls amb 50 µl de la barreja de reacció de tunel (Roche), 45 µl de tampó, més 1 µl biotina-11-dUTP i 4 µl de TdT, per cada secció de teixit i preparada al moment, durant 60- 90 min a 37-40°C en cambra humida i protegits de la llum.
- Rentar els talls histològics amb PBS 1x tres vegades durant 5 min.
- Incubar els talls amb 50 µl/ tall histològic d'una solució d'estreptavidina/ HRP en PBS1x durant 20 min a temperatura ambient.
- Rentar les mostres amb PBS 1x tres vegades durant 5 min.
- Afegir 50 µl totals de solució de DAB (barreja v/v de 25 µl de solució A i 25 µl de solució B incloses en el kit de DAB, Dako) i incubar les mostres entre 1- 2 min a 15-25°C. Aturar la reacció fent un rentat de 5 min amb aigua de l'aixeta.
- Contratenyir les mostres amb hematoxilina durant 15-30 s.
- Rentar durant 3 min amb aigua de l'aixeta.
- Deshidratar les mostres amb incubacions de 5 min en alcohols de dilució decreixent (una incubació en etanol 70 %, una en etanol 96 % i una en etanol absolut). Afegir dues incubacions de xilol de 5 min cada una.
- Treure l'excés de líquid al voltant de les mostres amb paper de filtre sense eixugar el teixit.

- Muntar les mostres amb el cubreobjectes afegint una gota de medi de muntatge DPX a cada mostra, treure'n les bombolles d'aire i deixar assecat a temperatura ambient O/N.
- Analitzar-ne els resultats sota el microscopi de camp clar.

3.8 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Per a determinar si els resultats obtinguts en l'elaboració d'aquest treball de tesi són significatius s'han analitzat estadísticament emprant el programa SPSS, versió 21. El procediment seguit consisteix, en primer lloc, en quantificar la variable (per exemple perímetre de vasos, volum tumoral,...) i calcular-ne diversos estadístics (mitjana, mediana, desviació típica...) de cada duplicat/triplicat de cada mostra. A continuació es determina si les mostres segueixen una distribució normal en cadascuna de les condicions assajades (control, sobreexpressió de RCAN3, RCAN3-AAQ, etc) mitjançant els test de normalitat de Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov. Si ambdós tests de normalitat donen un resultat de $p > 0,05$, s'assumeix una distribució normal de les mostres i s'apliquen tests paramètrics: t-Student si comparem dues mostres o ANOVA si comparem tres o més mostres i el test de Levene per a comprovar si la homogeneïtat de variàncies és $p > 0,05$. En cas que l'ANOVA doni un resultat significatiu, l'anàlisi estadístic es continua amb tests de comparacions de mostres dos a dos com ara Student-Newman-Keuls o Tamhane en cas d'existir un grup control. El criteri de significança usat en aquest treball per a totes les proves estadístiques ha estat: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$.

Si qualsevol dels test de normalitat és de $p < 0,05$ o el test de Levene és de $p < 0,05$ significa que les mostres no segueixen una distribució normal o no es pot assumir una homogeneïtat de variàncies. Per tant caldrà aplicar un test no paramètric per determinar si hi ha diferències significatives en el comportament entre grups. El tests no paramètrics que s'han usat en aquesta tesi han estat el test U de Mann-Whitney per a comparacions entre dues mostres o el test de Kruskal-Wallis per a comparacions de tres o més mostres. Al igual que en el cas de l'ANOVA, és necessari fer comparacions de mostres dos a dos mitjançant el test de U de Mann-Whitney i penalitzar la significació amb el mètode de Bonferroni quan el resultat del test de Kruskal Wallis és de $p < 0,05$.

3.9 PREPARACIÓ DE SOLUCIONS DE LABORATORI

- **Antibiòtics** (diluits en H₂O per a la preparació de l'estoc a 1000x): 100 µg/ml per l'estoc 1000x d'ampicil·lina, 170 µg/ml pel de cloramfenicol, 50 µg/ml pel de kanamicina. Guardar a -20°C.
- **Blau de Coomassie**: 40% MeOH i 10% Àcid Acètic en H₂O.
- **Citrat sòdic** per la reacció de desemmacament de l'antigen en protocols d'histologia per a mostres incloses en parafina: 10 mM citrat sòdic deshidratat a pH 6,0 i ajustar el pH amb àcid cítric.
- **Clorur de calci** per a la preparació de bactèries competents: 10 mM PIPES, 60 mM CaCl₂ i 15 % Glicerol (v/v). Cal preparar aquesta solució amb aigua Milli-Q i filtrar-la amb filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus per a esterilitzar-la. Guardar a 4°C.
- **Clorur de calci 2,5 M** per a la transfecció per fosfat càlcic: 367,5 g de CaCl₂·2H₂O en 1 l H₂O. Filtrar i aliquotar. Guardar a -20.
- **Gel d'agarosa** per a electroforesi de DNA: de 0,8 % a 2 % agarosa en medi TBE (tris-borate-EDTA).
- **Gel de concentració** (*stacking*) per minigels SDS-PAGE: 0,65 ml 30 % acrilamida/bis-acrilamida (37,5:0,8), 1,66 ml 0,5 % Tris-Cl/ 0,4 % SDS pH 6,8, 0,05 ml 10 % amoni persulfat i 0,005 ml TEMED i afegir aigua fins als 6,5 ml de volum final. Barrejar bé i usar immediatament.
- **Gel de separació** (*running*) per minigels al 10 % SDS-PAGE (2 gels): 6,5 ml 30 % acrilamide/bis-acrilamida (37,5:0,8), 4 ml 0,5 % Tris-Cl/ 0,4 % SDS pH 8,8, 0,2 ml 10 % persulfat d'amoni i 0,013 ml TEMED i afegir aigua fins als 16 ml. Barrejar bé i usar immediatament.
- **HeBBs 2x** per transfectar cèl·lules de mamífer: 16,4 g NaCl, 11,9 g d'àcid HEPES, 0,21 g Na₂HPO₄ i H₂O fins 1 l. Ajustar el pH a 7,01 i esterilitzar per filtració. Normalment es prepara un rang de pH d'entre 6,95 i 7,05 i es testen per a optimitzar la transfecció de cèl·lules humanes HEK 293T. Guardar l'estoc a -20°C i les alíquotes en ús a 4°C.
- **Àcid Isopropanol**: barrejar isopropanol i HCl 1N en una proporció 96:4.
- **IPTG**: Dissoldre 1,2 g de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiran (Sigma; #I5502) en 50 ml d'aigua destil·lada. Esterilitzar amb un filtre de 0,22 µm. Guardar a -20 °C.
- **IGEPAL**: Barrejar 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM Sodium Orthovanadate, 1% (v/v) NP-40 (IGEPAL. CA-630. Sigma; # I3021), còctail d'inhibidors de proteases i fosfatases (Roche). Ajustar el volum amb aigua Milli-Q. Preparar just abans del seu us i mantenir en gel.
- **Tampó Laemmli 6x**: 7 ml 0,5 % Tris-Cl/ 0,4,% SDS pH 6.8, 3 ml Glicerol, 1 g SDS, 0,93 g DTT, 1,2 mg blau de bromofenol i H₂O fins a 10 ml. Aliquotar i guardar a -20°C.
- **Luminol**: 32,25 ml of 1.5 M Tris-Cl pH 8,8; 125 mg sal de luminol de sodi (*Sigma Aldrich A4685*); 0,155 ml 30 % H₂O₂ i aigua fins a 500 ml. Guardar a 4°C protegit de la llum.

- **Luria Bertani (medi LB):** 1 % Triptona (w/v), 0.5% extracte de llevat (w/v), 1 % NaCl i 0,1 % NaOH en aigua. Autoclavar i guardar a 4°C. Quan es preparin les plaques d'agar, afegir 1,5 % (w/v) agar a la mescla abans d'autoclavar.
- **Paraformaldehid (PFA) al 4 % (500ml):** Els vapors del PFA són molt tòxics. Quan s'escalfa cal usar campana d'extracció de gasos. Afegir 20 g de PFA a 300 ml PBS. Escalfar a 55 °C - 60 °C. Un cop atemperada la barreja, afegir gota a gota una solució de 1 N de NaOH per ajustar el pH a 7.2.
- **Tampó de mostres RIPA:** 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0,5 % deoxicolat sòdic, 0,1 % SDS, 1 mM PMSF, còctel d'inhibidors de fosfatases i proteases. Afegir els tres últims components just abans d'utilitzar el medi ja que la seva vida mitja és només d'hores.
- **Solució de dilució d'anticossos primaris per transferència de western:** 1 % serum d'albúmina fetal i 0.05% NaN₃ en medi TBS si no s'indica el contrari.
- **Solució de dilució de l'anticòs secundari per a immunofluorescència:** 0,2 % gelatina; 0,1 % TX-100; 5 % sèrum fetal boví en PBS.
- **Solució de bloqueig per a immunofluorescència:** 0,2% gelatina; 0,1% TX-100; 10 % sèrum fetal boví en PBS 1x.
- **Solució de bloqueig per a immunohistoquímica:** 10 % de sèrum de cabra (GS) en PBS- 0,1 % Tween 20 en aigua.
- **Solució quimoluminiscent (*enhancer solution*):** 27,5 mg p-àcid cumàric; 25 ml DMSO i aigua fins a 25 ml. Guardar a temperatura ambient i protegit de la llum.
- **Ponceau S:** 0,5 g Ponceau Red en un 1 % d'àcid acètic.
- **Tampó d'electroforesi 5x:** 15,1 g Tris base, 72 g glicina, 5 g SDS en 1 l H₂O. Es recomana afegir el SDS (*sodium dodecyl sulphate*) procedent d'una solució estoc al 20 %.
- **Tampó fosfat salí (PBS) 10x:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 11.5 g Na₂HPO₄·7H₂O, 2g KH₂PO₄ in 1 l H₂O.
- **Tampó per separar cèl·lules per FACS:** 0.5% BSA, 0,2 mM EDTA en PBS 1x.
- **Tampó de transferència 10X:** 250 mM Tris-Cl pH 8,3, 1920 mM glicina. Afegir al moment de fer el tampó de transferència etanol al 20% final.
- **TBE 10x** per electroforesi de DNA: 108 g Tris base (890 mM), 55 g àcid bòric (890 mM), 40 ml de 0,5 M EDTA, pH 8 en 1 l H₂O.
- **TBS 1x (*Tris buffer saline*):** 50 mM Tris i 150 mM NaCl, ajustar el pH a 7,6.
- **TBS-T (*Tris Buffer saline- Tween*):** 100 mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl i 0,1% Tween.
- **4xTris-HCl/SDS pH 6.8:** 0.5 M Tris-HCl amb 0.4% SDS (preparació de 500 ml): Dissoldre 30,3 g de Tris base en 300 ml d'aigua destil·lada. Ajustar el pH a 6.8 amb 1 N HCl. Enrasar amb aigua destil·lada. Guardar a temperatura ambient.
- **4xTris-HCl/SDS, pH 8.8:** 1.5 M Tris-HCl amb 0.4% SDS (preparació de 500 ml): Dissoldre 91 g de Tris base en 300 ml d'aigua destil·lada. Ajustar el pH a 8.8 amb 1 N HCl. Enrasar amb aigua destil·lada. Afegir 2 g de SDS. Guardar a temperatura ambient.

A grayscale histological micrograph showing a cross-section of tissue. The image displays various cellular structures, including what appears to be a layer of stratified epithelium on the right side, transitioning into a more cellular, possibly connective tissue or muscle layer. The overall texture is fibrous and granular.

4. RESULTATS

4. RESULTATS

La via de senyalització de la Cn-NFATc s'ha estudiat extensament en el sistema immunològic i els inhibidors de calcineurina, CsA i FK506, són la base del tractament immunosupressor actual. A part de la importància de la via Cn-NFATc en l'activació de la resposta immune, aquesta via també regula diversos programes del desenvolupament a vertebrats. La desregulació d'aquests programes pot comportar, entre d'altres, el creixement tumoral i el càncer. En aquest context, diverses isoformes dels NFATc són funcionals tant en les cèl·lules tumorals com en múltiples compartiments cel·lulars del microambient tumoral com ara fibroblasts, cèl·lules endotelials i cèl·lules immunitàries infiltrades en el tumor (Mancini *et al.*, 2009). L'activació dels NFATc és essencial en el creixement cel·lular, supervivència, invasió i angiogènesi, processos claus en càncer. No s'han descrit fins el moment mutacions o alteracions genòmiques dels gens *NFATc* en càncer sinó una alteració dels nivells de proteïna dels NFATc, normalment per sobreexpressió dels gens dels *NFATc* i sobreproducció de la proteïna, amb la qual cosa la via de senyalització Cn-NFATc està molt activa. No obstant, la manera com les diferents isoformes dels NFATc afecten la interrelació entre les cèl·lules i el microambient tumoral durant la progressió tumoral no es coneix, així com tampoc els mecanismes moleculars implicats en la progressió tumoral. És per això que és important conèixer millor aquests mecanismes moleculars amb la finalitat de desenvolupar noves eines terapèutiques per a regular la progressió tumoral.

Un mecanisme d'inhibició de la progressió tumoral podria ser la utilització d'inhibidors específics de la senyalització de la via de Cn-NFATc. Els inhibidors exògens de Cn com la ciclosporina A (CsA) i el tacrolimus (FK506) s'uneixen a immunofilines intracel·lulars i el complex que formen inhibeix l'activitat fosfatasa d'aquest enzim sobre qualsevol dels seus substrats. Malgrat que la CsA i el FK506 són actualment fàrmacs àmpliament utilitzats en la teràpia immunosupressora, la inhibició de l'activitat fosfatasa de la Cn sobre tots els seus substrats en un tractament perllongat amb aquests fàrmacs deriva en tot un seguit d'efectes no desitjats com nefrotoxicitat, neurotoxicitat, i hipertensió, entre d'altres (Maes and Vanrenterghem, 2004; Borel *et al.*, 1996). Tot i que la CsA i la FK506 s'han emprat satisfactòriament per inhibir el creixement tumoral en alguns tipus de càncer (Kawahara *et al.*, 2015 a i b), s'han iniciat estudis per tal de conèixer els mecanismes moleculars que empren els inhibidors endògens de la Cn per inhibir la seva activitat vers els NFATc per tal de desenvolupar fàrmacs inhibidors específics de la via de Cn-NFATc. En aquest context, s'han descrit diversos moduladors

endògens de la Cn, entre el quals es troben les proteïnes de la família de reguladors de la Cn o RCAN (abans DSCR/calciressin or CALP (Davies *et al.*, 2007). Les RCANs interaccionen de forma directa amb la Cn i inhibeixen l'activitat fosfatasa d'aquest enzim sobre els NFATc. Aquesta inhibició és deguda a que les RCANs comparteixen amb els NFATc un motiu PxlIT-like d'unió a la Cn i per tant competeixen pel mateix lloc d'unió (a l'esquerra o butxaca formada entre les cadenes $\beta 11$ i $\beta 14$ de la Cn: Li *et al.*, 2007; Takeuchi *et al.*, 2007). A part del motiu PxlIT-like hi ha altres motius en les RCAN implicats tant en la unió a Cn com en la inhibició de l'activitat de Cn (com ara el motiu LxVP, el ELHA i el motiu TxxP; Aubareda *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2007, Mehta *et al.*, 2009, i Martinez-Martinez *et al.*, 2009). L'efecte global dels diferents motius de les RCAN en cada context cel·lular determinarà la funció dual descrita per les RCANs com a facilitadora o inhibidora de l'activitat de Cn.

Les proteïnes RCANs (abans conegudes com DSCR, calciressines, entre d'altres) a vertebrats consten de 3 membres: RCAN1, RCAN2 i RCAN3. Aquestes proteïnes estan codificades per tres gens que comparteixen una estructura gènica similar amb 7 exons, dels quals el 5, 6 i 7 són comuns a totes les RCANs i la seqüència aminoacídica per la que codifiquen està totalment conservada a vertebrats (Mehta *et al.*, 2009; Serrano-Candelas *et al.*, 2014). La capacitat d'unió de les RCANs amb la Cn ve donada pel motiu CIC (per *calciressin inhibitor of Cn*), que conté el motiu PxlIT-like d'unió a Cn, codificat en l'exó 7 (Aubareda *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2007 i 2009). Les RCANs, com s'ha dit anteriorment, modulen la senyalització dels NFATc depenent de Cn a través de la competició entre el propi motiu PxlIT-like i el motiu PxlIT dels NFATc per a unir-se a Cn. El motiu CIC no inhibeix l'activitat fosfatasa de la Cn en cèl·lules T ja que no afecta al centre actiu o catalític de l'enzim. Per tant, les RCANs tenen capacitat immunosupressora. En base a tot el què s'ha exposat fins ara, i donat que les RCANs regulen la via de Cn-NFATc en diversos tipus cel·lulars diferents al de les cèl·lules T, en aquest treball de tesi doctoral es va considerar rellevant determinar el possible ús terapèutic de les RCANs per inhibir la progressió tumoral en el càncer humà. Com a model d' estudi es va decidir centrar el treball en el càncer de mama triple negatiu (TNBC) perquè és un càncer molt agressiu pel qual no es coneix cap diana terapèutica (Hudis *et al.*, 2011). Existeixen diversos treballs que demostren que l'activació de la via de Cn-NFATc indueix la migració i invasió cel·lular en línies cel·lulars de càncer de mama (Jauliac *et al.*, 2002; Yiu *et al.*, 2011). Com a possible eina terapèutica per inhibir la via de Cn-NFATc en la progressió del càncer TNBC es va escollir un membre de les RCANs humanes, la RCAN3, que

com totes les RCAN contenen un motiu CIC (residus 178-210 en RCAN3) que inclou un motiu PxlIT-like (PSVVVH en residus 194-199 en RCAN3) (Mulero et al., 2007 i 2009). Per tal de determinar l'efecte funcional de RCAN3 sobre Cn en la progressió tumoral es va procedir a obtenir una proteïna mutant que no s'unís a la Cn. La proteïna RCAN3 es va mutar en els tres residus V197A, V198A i H199Q del motiu PxlIT-like (a partir d'ara anomenada com a proteïna RCAN3 AAQ). Posteriorment es va realitzar un assaig de pull down amb GST-RCAN3, GST-RCAN3 AAQ o GST (control) i extracte cel·lular de cèl·lules T Jurkat humanes com a font de Cn (veure'n protocol a l'apartat 3.4.4 de materials i mètodes). Seguidament es va analitzar la presència de Cn mitjançant transferència de western i utilitzant un anticòs contra CnA.

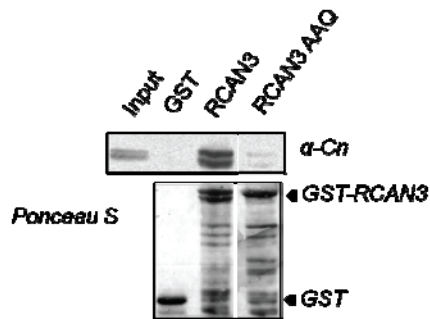


Figura 1. La proteïna RCAN3 interacciona marcadament amb Cn però la proteïna mutant RCAN3 AAQ ho fa molt dèbilment. Transferència de western d'un pull down amb GST (control), GST-RCAN3 o a GST-RCAN3 AAQ (RCAN3 i RCAN3 AAQ respectivament a la Figura) i extractes cel·lulars de cèl·lules Jurkat T com a font de Cn. La quantitat de Cn unida a les diferents proteïnes de fusió GST-RCAN3 i anàlisi de la membrana amb un anticòs específic anti-CnA (BD, Pharmingen). Les bandes de mobilitat electroforètica corresponen a les proteïnes emprades en l'assaig de pull down (GST-RCAN3, GST-RCAN3 AAQ i GST) es detectaren mitjançant tinció amb *Ponceau S*.

Els resultats obtinguts mostren que la GST-RCAN3 sí que interacciona amb CnA (Figura 1, carril 3 anti-CnA) mentre que la RCAN3 AAQ ho fa però de manera pràcticament indetectable (Figura 1, carril 4, RCAN3 wt, anti-CnA). La banda tènue detectada en el carril RCAN3 AAQ podria correspondre a la unió de Cn a RCAN3 degut a altres motius conservats en les RCANs, com el LxxP, diferents del PxlIT-like. Per a determinar si aquesta diferència en la unió de la Cn per la GST-RCAN3 o GST-RCAN3 AAQ era deguda a diferències en la concentració de proteïna, es realitzà una tinció amb *Ponceau S*, que revela les bandes de proteïnes transferides a la membrana durant la transferència de western. Degut a l'elevada expressió de les proteïnes de fusió amb GST en

procariotes es poden detectar les proteïnes expressades sense necessitat d'usar un anticòs específic. Analitzant les proteïnes de fusió GST-RCAN3 i GST (control), es pot confirmar que els nivells de proteïna de GST-RCAN3 i GST-RCAN3 AAQ en el *pull down* eren similars. El *pull down* amb la GST sola és el control de l'especificitat de la interacció de RCAN3 amb Cn ja que la GST no uneix Cn. Per tant, aquests resultats demostren que la mutació dels residus 197-199 (V197A, V198A, H199Q) en el motiu PxlIT-like de RCAN3 disminueix en més d'un 96 % la unió a Cn.

Verificada la importància i funció dels residus del motiu PxlIT-like en la unió a Cn i per determinar l'efecte de RCAN3 sobre la via de Cn-NFATc en la progressió tumoral, es va procedir en primer lloc, a analitzar l'efecte de la sobreproducció de RCAN3 sobre la via de Cn-NFATc en línies cel·lulars de TNBC humà, MDA-MB-231 i MDA-MB-468 (veure'n característiques a l'apartat 3.5.1 de Materials i Mètodes). Donat que en aquestes línies cel·lulars els plasmidis de DNA no es transfecten amb alta eficiència (independentment del mètode usat), l'estratègia escollida per a incrementar els nivells de producció de RCAN3 va ser la generació de lentivirus que codifiquen per la proteïna d'interès en cèl·lules eucariotes. Les construccions lentivirals que es van generar són les següents:

- pWPI-EGFP-IRES-HARCAN3 (d'ara en endavant anomenat lentivirus RCAN3): lentivirus que expressa EGFP i RCAN3. A l'extrem N-terminal la RCAN3 té fusionada el *tag* de la hemaglutinina (HA), de 2 kDa, que s'usa per a identificar la proteïna recombinant produïda per les partícules víriques en cèl·lules transduïdes. Els cDNA de EGFP i de HA-RCAN3 es tradueixen de forma independent degut a que contenen una seqüència IRES entre elles.

- pWPI-EGFP-IRES-HARCAN3 AAQ (d'ara en endavant anomenat lentivirus RCAN3 AAQ): és el lentivirus que expressa EGFP i RCAN3 AAQ, que no té un PxlIT-like funcional i no pot unir-se a la Cn. S'espera que l'efecte de la sobreproducció de RCAN3 AAQ no afecti la via de senyalització de Cn-NFATc i es comporti de forma similar a la proteïna EGFP produïda pel lentivirus EGFP.

- pWPI-EGFP-IRES-HA (d'ara en endavant anomenat lentivirus EGFP): és el lentivirus que s'usa com a control que expressa la proteïna verda fluorescent (EGFP) i té el *tag* HA.

Per a transduir les cèl·lules TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468 es va emprar una multiplicitat d'infecció (MOI) de 20, ja que estudis previs en el laboratori havien indicat que amb aquesta MOI les cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 produïen a nivell intracel·lular proteïna RCAN3 suficient per inhibir la via de senyalització Cn-NFATc quan les cèl·lules eren estimulades amb ionomicina i calci. Com a conseqüència de l'increment de calci, i per tant de l'activació de la via Cn-NFATc, NFATc es desfosforila i s'activa. L'activació dels NFATc produeix un canvi conformacional en aquests factors de transcripció que deixen exposats una seqüència de localització nuclear o NLS, fet que permet la seva translocació de citosol a nucli on s'unirà al DNA per activar l'expressió gènica de diferents programes cel·lulars en cooperació amb altres factors de transcripció.

4.1 RCAN3 INHIBEIX LA TRANSLOCACIÓ NUCLEAR DE NFATc2 ENDÒGENA EN LA LÍNIA CEL·LULAR HUMANA DE CÀNCER DE MAMA TNBC MDA-MB-231

4.1.1 Caracterització d'un anticòs anti-NFATc2 per a ICF.

En aquest treball de recerca es va decidir estudiar concretament NFATc2 perquè és el membre de la família NFAT més abundant en TNBC (Quang *et al.*, 2015). Per tal d'analitzar l'efecte de RCAN3 en la via de Cn-NFATc en cèl·lules TNBC, es va decidir analitzar primerament l'efecte de la RCAN3 sobre la localització subcel·lular dels NFATc en cèl·lules HEK 293T humanes. Per això es va procedir a la transfecció de les cèl·lules HEK 293T amb un vector d'expressió transitòria de NFATc2 (NFAT1) de ratolí (vector HA-NFAT1(1-460)-EGFP procedent del laboratori de la Dra. Anjana Rao). Aquest vector produïa una proteïna NFATc2 fusionada a l'extrem N-terminal al *tag* HA i a l'extrem C-terminal a la EGFP. La línia HEK 293T va ser escollida per la seva facilitat en l'obtenció d'alts nivells de producció de proteïna i alta eficiència de transfecció amb diversos protocols, a diferència de les línies cel·lulars humanes TNBC. Posteriorment a la transfecció, es van estimular les cèl·lules amb calci i ionomicina (Io) durant 1 h i es va procedir a la detecció de NFATc2-EGFP de ratolí exògena usant un anticòs específic per EGFP (en vermell).

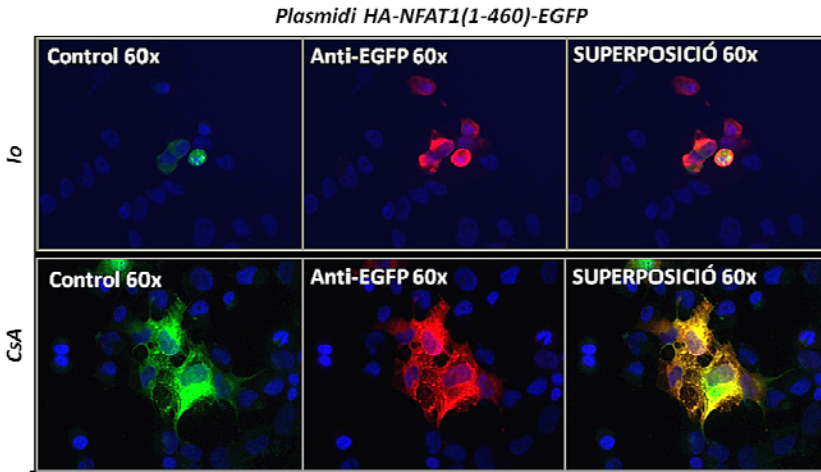


Figura 2. L'estimulació de la via Cn-NFAT amb Ionomicina i calci provoquen la translocació de NFATc2 de ratolí en cèl·lules HEK 293T. ICF anti-EGFP (1:500) en cèl·lules HEK 293T transfectades amb el plasmidi HA-NFAT1(1-460)-EGFP, i després de 24 h de la transfecció, es van estimular amb ionomicina (Io, 1 μ M) i CaCl_2 (10 mM) durant 1 h. Com a control d'inhibició de l'activitat de Cn, les cèl·lules es van tractar amb CsA (1 μ M) 30 min abans de l'estímul de calci. La imatge combinada correspon a la superposició entre la senyal derivada de la fluorescència de la EGFP (en verd) i del reconeixement específic de l'anticòs anti-EGFP (en vermell).

Els resultats mostren que la proteïna de fusió NFATc2-EGFP de ratolí és reconeguda amb l'anticòs anti-EGFP (Figura 2). Aquesta fusió permet veure la translocació de NFATc2 (en vermell) de citoplasma a nucli després d'estimular les cèl·lules HEK 293T amb ionomicina i calci. Això permet comprovar que les condicions d'estimulació són suficients per a activar la via ja que NFATc s'activa i transloca a nucli. En canvi, en les cèl·lules tractades amb CsA previ a l'estimulació amb calci i ionomicina, la via Cn-NFATc està inhibida i la detecció de NFATc2 exogen (en vermell) de ratolí es limita únicament al citoplasma. El marcatge en verd a la Figura representa la detecció de la pròpia fluorescència de la proteïna EGFP fusionada a NFATc2 en la línia cel·lular HEK 293T. La superposició de les imatges obtingudes procedents de la fluorescència i de l'anticòs anti-EGFP demostren l'especificitat de l'anticòs anti-EGFP i la manca de rerefons inespecífic d'aquest. Per tant, valida l'ús d'aquest anticòs per a detectar NFATc2 exogen de ratolí en condicions de sobreproducció. No obstant, per a l'estudi de l'efecte dels inhibidors endògens de la Cn, concretament RCAN3 sobre NFATc2 endogen en TNBC era necessari l'ús d'anticòs contra NFATc2 humà en cèl·lules

TNBC en comptes de HEK 293T. Actualment hi ha molts anticossos anti-NFATc al mercat però no tots presenten una alta especificitat per aquestes proteïnes. Per tant, va caldre caracteritzar i provar diferents anticossos per a triar-ne el més adient. Per aquest motiu, es van provar diversos anticossos disponibles a nivell comercial i alguns de nous obtinguts de l'empresa AVIVA (Aviva Systems Biology, Corp.; San Diego, CA) que ens havia contactat per provar-los. En concret, AVIVA ens van demanar caracteritzar 7 anticossos anti-NFATc1, anti-NFATc2 o anti-NFATc3.

Cap dels anticossos comercials provats era prou específic per la ICF amb anti-NFATc2 humà. Dels anticossos d'AVIVA testats tan sols un anticòs policlonal generat en conill contra el NFATc2 humà (anti-NFATc2) és específic per detectar per ICF i IHC aquesta proteïna en cèl·lules HEK 293T estimulades: el ARP38988. Aquest anticòs reconeix el domini C-terminal de la proteïna NFATc2 humana. En primer lloc es va demostrar que aquest anticòs reconeixia NFATc2 de forma específica emprant HEK 293T transfectades amb NFATc2-EGFP en condicions d'estimulació o d'inhibició de la via. A continuació, es va procedir a determinar si l'anticòs reconeixia la proteïna endògena en cèl·lules HEK 293T i a optimitzar la concentració de treball de l'anticòs en immunocitofluorescència (ICF) per a la detecció del NFATc2 endogen (1:200, consultar-ne el protocol detallat a la secció 3.4.8 de materials i mètodes).

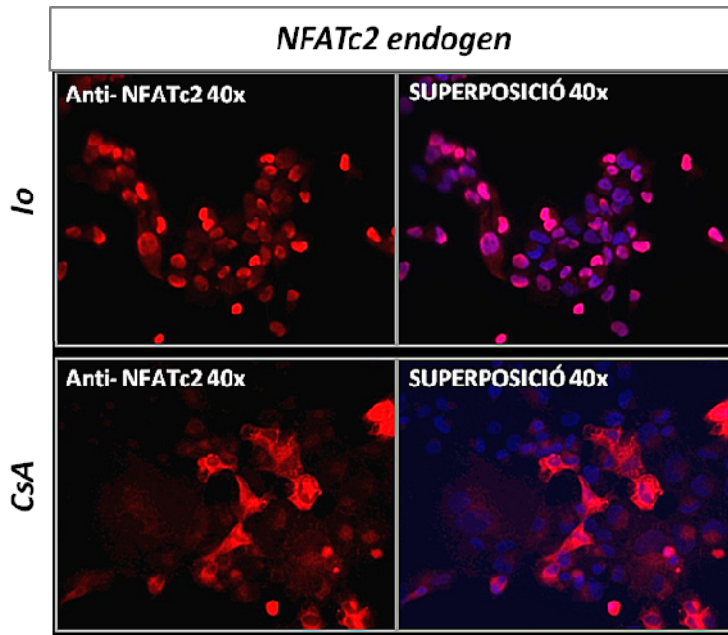


Figura 3. L'anticòs anti-NFATc2 humà detecta de forma específica la proteïna NFATc2 humana endògena present en cèl·lules HEK 293T *in vitro*. ICF amb anti-NFATc2 (1:200) en cèl·lules HEK 293T estimulades amb ionomicina (Io, 1 μ M) i CaCl₂ (10 mM) durant 1 h per a detectar la proteïna humana NFATc2 endògena. La superposició combina el marcatge NFATc2 (en vermell) amb el DAPI (blau) que tenyeix els nuclis cel·lulars. Totes les imatges s'han capturat amb un microscopi d'epifluorescència (a 40 augments (40x) i a 60 augments (60x) respectivament). Com a control d'inhibició de l'activitat de Cn, les cèl·lules es van tractar amb CsA (1 μ M) 30 min abans de ser estimulades.

Tal i com es pot observar a la Figura 3, l'anticòs procedent d'AVIVA és capaç de reconèixer la proteïna NFATc2 humana endògena (en vermell) en les cèl·lules HEK 293T. Es pot comprovar que l'ús d'aquest anticòs permet veure la translocació de NFATc2 de citoplasma a nucli degut a l'estimulació de les cèl·lules amb ionomicina (Io) i calci. Les cèl·lules HEK 293T tractades amb la CsA durant 30 min abans de rebre l'estimulació amb Io i calci tenen la via Cn-NFATc inhibida, per la qual el NFATc2 endogen es detecta en el citoplasma. Aquests resultats confirmen que l'anticòs ARP38988 reconeix de forma específica la proteïna NFATc2 endògena i humana en cèl·lules HEK 293T emprant la tècnica d'ICF.

El següent pas fou comprovar si aquest anticòs anti-NFATc2, a més de reconèixer de forma específica la proteïna NFATc2 humana endògena en les cèl·lules HEK 293T, també era capaç de reconèixer els nivells de NFATc2 presents en la línia cel·lular TNBC MDA-MB-231.

4.1.2 RCAN3 inhibeix la translocació nuclear de NFATc2 en cèl·lules TNBC MDA-MB-231

Resultats previs del nostre grup de recerca han demostrat que RCAN3 desplaça NFATc de la interacció amb Cn (Figura 1; Mulero *et al.*, 2009, Martinez-Hoyer *et al.*, 2013, Matsoukas *et al.*, 2015). Això te com a conseqüència la inhibició de la senyalització dels NFATcs. Per tal de determinar l'efecte de RCAN3 sobre aquesta via de senyalització en cèl·lules TNBC es va procedir a estudiar l'efecte de la sobreproducció de RCAN3 en la translocació nuclear de NFATc2 per ICF (Figura 4) en cèl·lules MDA-MB-231. Les cèl·lules es van transduir amb els lentivirus EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ a una MOI de 20, i es van estimular amb ionomicina i calci 1 h en presència o absència de CsA (afegit 30 min abans de l'estímul de calci). Finalment es va detectar NFATc2 endogen en les diferents condicions assajades usant l'anticòs específic antiNFATc2 humà.

Per a la localització subcel·lular de les proteïnes d'interès (NFATc2 en aquest cas) es va optar per la microscopia confocal, que permet seccionar la cèl·lula en diferents talls virtuals i analitzar-ne el marcatge d'un de sol. D'aquesta manera ni el soroll de fons ni el marcatge procedent de la superposició de diverses seccions impedeixen o dificulten la localització subcel·lular de l'antigen. Els resultats obtinguts amb les cèl·lules estimulades amb calci es mostren a la Figura 4. Tal i com es pot observar, les cèl·lules transduïdes amb el lentivirus control (EGFP) presenten un marcatge de NFATc2 heterogeni, nuclear però també citosòlic. En canvi, en les cèl·lules transduïdes amb el lentivirus RCAN3 presenten una localització de NFATc2 majoritàriament citosòlica, amb absència de marcatge de NFATc2 (indicat a la Figura amb fletxes) en el nucli cel·lular (nuclis tenyits en blau pel DAPI). Per últim, l'efecte de la sobreproducció de RCAN3 AAQ en les cèl·lules no coincideix amb l'observat amb el lentivirus RCAN3 sinó que és més similar a l'observat al de les cèl·lules transduïdes amb els lentivirus EGFP ja que NFATc2 és detectat majoritàriament al nucli.

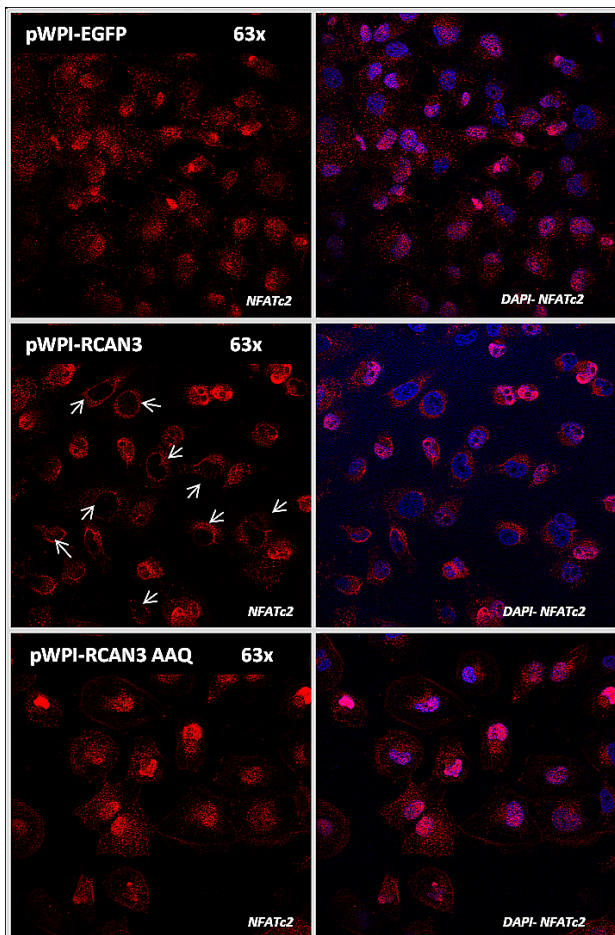


Figura 4. La sobreproducció de RCAN3, però no la de RCAN3 AAQ, inhibeix la translocació de NFATc2 endogen de citosol a nucli. ICF anti-NFATc2 (1:200; **ARP38988**) (en vermell) en cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb lentivirus que codifiquen per EGFP control, RCAN3 i RCAN3 AAQ (pWPI-EGFP, pWPI-RCAN3 i pWPI-RCAN3 AAQ respectivament a la Figura), i estimulades amb calci. Les fletxes assenyalen l'absència de marcatge de NFATc2 en el nucli cel·lular (tenyit amb DAPI, en blau). Les imatges s'han capturat a 63x en microscopia confocal (LEICA TCS SP5).

Els resultats, doncs, demostren que la sobreproducció de RCAN3 en cèl·lules MDA-MB-231 inhibeix la translocació del NFATc2 endogen a nucli en condicions d'estimulació amb ionomicina i clorur càlcic, al contrari del què succeeix amb les cèl·lules tractades amb CsA. A més, es posa en evidència que els aminoàcids 197-199 del motiu PxlIT-like, de la seqüència CIC de RCAN3, són essencials per a inhibir la translocació nuclear del NFATc2 i això es degut a que el PxlIT-like mutat de RCAN3 AAQ no pot unir-se a Cn. Per tant, RCAN3 inhibeix l'activació dels NFATcs i per això no transloquen a nucli.

4.2 RCAN3 INHIBEIX L'ACTIVACIÓ DELS NFATc EN CÈL·LULES MDA-MB-231 *in vitro*

Un cop establert que la sobreproducció de RCAN3 inhibeix la translocació dels NFATc a nucli, una altra aproximació per determinar l'efecte funcional de la RCAN3 sobre la via de Cn-NFATc és determinar si la sobreproducció de RCAN3 inhibeix també l'activació transcripcional de promotors regulats pels NFATc en les línies cel·lulars de TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468. Això es va dur a terme mitjançant assajos amb un plasmidi que conté el gen reporter de la luciferasa regulat per un promotor que conté 9 caixes d'unió específica per als NFATc, 9xNFAT-luc, de manera que l'expressió gènica de la luciferasa està regulada per aquests factors de transcripció. Es van transduir cèl·lules TNBC amb els lentivirus que expressen RCAN3, RCAN3 AAQ o EGFP control a MOIs creixents (concretament s'han usat les MOIs de 2,5, 5, 10 i 20) per tal de determinar si l'activació dels NFATc observada era dependent de la quantitat de RCAN3 produïda en la cèl·lula, i posteriorment les cèl·lules es van transfectar amb el vector 9xNFAT-luc. En funció de l'estat d'activació dels NFATc en la cèl·lula transfectada, els NFATc s'uneixen o no al promotor que regula l'expressió gènica de la luciferasa. Després de 6 h d'estimulació amb I_o, CaCl₂ i PMA, es van preparar els llisats cel·lulars i es va detectar l'activitat luciferasa dels NFATc afegint el seu substrat luciferina als llisats cel·lulars, reacció que allibera llum i que pot ser quantificada amb un luminòmetre (Victor X5 multiplate- Perkin Elmer,

Waltham, MA). Com a control de màxima intensitat de llum en l'assaig es van emprar cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb el lentivirus EGFP, transfectades amb 9xNFAT-luc i estimulades amb ionomicina, calci i PMA. Com a control negatiu d'activació molt reduïda dels NFATc es van emprar cèl·lules MDA-MB-231/ MDA-MB-468 transduïdes amb el lentivirus EGFP i transfectades amb 9xNFAT-luc sense estimular (control de l'estímul) o estimulades amb CsA per inhibir la via de senyalització Cn-NFATc. Finalment com a control de la transfecció, les cèl·lules MDA-MB-231/ MDA-MB-468 van ser cotransfectades, juntament amb el plasmidi 9xNFAT-luc, amb un vector, pRLNull (cedit per la Dra. Carmen Calvis, Universitat de León), que conté el cDNA que codifica per la luciferasa renilla però se n'ha eliminat el seu promotor. La luminescència de la Renilla es va usar per a normalitzar els valors d'activitat obtinguts amb la luciferasa de la cuca de llum (luciferasa *firefly* amb el 9xNFATc-luc).

Els resultats obtinguts en l'assaig reporter de la luciferasa mostren que nivells alts de RCAN3 correlacionen amb nivells baixos d'activitat dels NFATc i a la inversa tant en cèl·lules MDA-MB-231 com en MDA-MB-468 (Figura 5 **a** i **b** respectivament). En concret, l'activitat del NFATc augmenta de manera inversament proporcional a la MOI del lentivirus usat per a sobreproduir RCAN3. Pel contrari, quan s'infecten les cèl·lules amb el lentivirus RCAN3 AAQ, l'activació dels NFATc es manté elevada indiferentment de la MOI usada, fet que confirma de nou la importància del motiu CIC en la funció inhibidòria de la via de senyalització Cn-NFATc ja que, al mutar el PxlIT-like, RCAN3 AAQ no pot unir-se a Cn i inhibir l'activitat promotora dels NFATc. Per tal de confirmar que l'activació dels NFATc és inversament proporcional a la concentració de proteïna RCAN3 present a les cèl·lules, els extractes cel·lulars es van analitzar per determinar l'abundància de RCAN3 i RCAN3 AAQ mitjançant transferència de western i posterior anàlisi amb anti-EGFP i anti-HA. Els resultats d'aquest anàlisi són similars per a les dues línies TNBC i indiquen que a major concentració de proteïna de RCAN3 menor activitat transcripcional dels NFATc. No obstant, l'activitat dels NFATc no s'altera amb l'increment de proteïna RCAN3 AAQ produïda. D'aquests resultats es pot concloure, doncs, que la sobreproducció de RCAN3 inhibeix l'activitat transcripcional dels NFATc tant en les cèl·lules MDA-MB-231 com en les MDA-MB-468 *in vitro*.

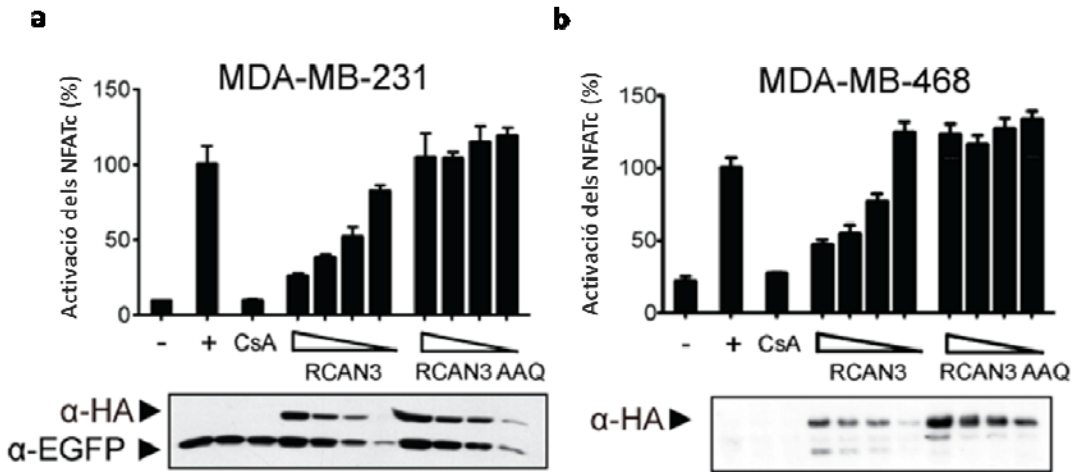


Figura 5. La sobreproducció de RCAN3 inhibeix l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules de TNBC humanes MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*.

Assaig del gen reporter de la luciferasa 9xNFAT-luc sota el control d'un promotor regulat pels NFATc en cèl·lules humanes de càncer de mama MDA-MB-231 (a) i MDA-MB-468 (b). Es van transduir les cèl·lules amb els lentivirus RCAN3 i RCAN3 AAQ a MOIs decreixents (20, 10, 5 i 2,5), es van transfectar amb el plasmidi reporter 9xNFATc-luc i CMV-Renilla i es van estimular amb calci, ionomicina i PMA. (-) sense estimulació; (+) estimulades amb Ionomicina/PMA/CaCl₂; (CsA) estimulades amb Ionomicina/PMA/ CaCl₂/CsA. Les unitats de luciferasa van normalitzar-se respecte als valors de luciferasa renilla. Les dades es presenten com a mitjana del percentatge de l'activació transcripcional dels NFATc on el 100% és l'activació assolida per cèl·lules sense transduir amb RCAN3 o RCAN3 AAQ i estimulades amb Ionomicina/PMA/CaCl₂. Els resultats són representatius de tres assajos independents i per triplicat. La concentració de RCAN3 i RCAN3 AAQ en cada condició assajada es va analitzar per transferència de western amb anti-EGFP i/o anti-HA (panells inferiors). Aquest experiment es va fer per triplicat i els resultats mostrats es representen com a mitjana ± SEM.

Per a assegurar que les diferències en els nivells de proteïna observats no són deguts a una major quantitat de proteïna total carregada en el gel d'acrilamida, els nivells de tubulina de cada mostra, proteïna del citoesquelet d'expressió constitutiva que s'utilitza com a control de càrrega, s'analitzà per transferència de western obtenint-ne valors similars (resultats no mostrats). Tant en la línia cel·lular MDA-MB-231 com en la MDA-MB-468 (panells inferiors de la Figura 5 a i b respectivament), el primer carril correspon a les cèl·lules transduïdes amb el lentivirus EGFP i sense estimular. Els carrils 2 corresponen a cèl·lules transduïdes amb el lentivirus EGFP control i estimulades (+), que

correspon al 100% d'activació dels NFATcs. El carril 3 presenta les mateixes condicions que el 2 però, a més, s'hi va afegir un tractament previ de 30 min amb CsA com a control d'inhibició de l'activació dels NFATc. Els carrils 4-7 corresponen a cèl·lules transduïdes amb el lentivirus RCAN3 a MOIs decreixents (20, 10, 5 i 2,5 respectivament) i estimulades. La detecció tant de EGFP com de HARCAN3 en cada carril és molt similar ja que ambdues proteïnes es produeixen de forma independent a partir de cada lentivirus. No obstant, el nivell de proteïna de EGFP o de HARCAN3 disminueix de forma proporcional a la MOI usada. El mateix succeeix en els carrils 8-11 que corresponen a cèl·lules transduïdes amb el lentivirus RCAN3 AAQ. Aquests resultats demostren que els canvis en l'activitat transcripcional dels NFATc degut a la sobreproducció de RCAN3 no poden atribuir-se a la variabilitat en la producció de RCAN3 sinó que segueixen un patró de dosi-dependència inversament proporcional a la producció de RCAN3. En canvi, tot hi haver-hi el mateix patró d'increment de la concentració de proteïna de RCAN3 AAQ, aquest no té cap efecte sobre l'activació dels NFATc.

Els resultats demostren, doncs, que RCAN3 no només inhibeix la translocació dels NFATc a nucli sinó que també inhibeix l'activitat promotora dels NFATc d'una forma dosi-dependent.

4.3 LA SOBREPRODUCCIÓ DE RCAN3 INHIBIEIX L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE GENS DEPENDENTS DE NFATc COM COX-2 EN MDA-MB-231 *in vitro*

Els efectes inhibidors de RCAN3 en línies cel·lulars de TNBC sobre l'activació i translocació a nucli dels NFATc indiquen que RCAN3 regula la via de Cn-NFATc en cèl·lules MDA-MB-231. Per a seguir en la caracterització de l'efecte de RCAN3 en aquesta via de senyalització es va decidir analitzar l'expressió de gens dependents dels NFATc, com per exemple la COX-2, molt implicat en el desenvolupament del càncer (Liu *et al.*, 2001; Yiu *et al.*, 2006). Amb aquest objectiu es van transduir cèl·lules MDA-MB-231 amb els lentivirus RCAN3 i RCAN3 AAQ amb MOI creixents (2,5, 5, 10 i 20) i amb el lentivirus EGFP com a control a MOI 20, es van estimular les cèl·lules amb ionomicina, calci i PMA durant 8 h i les mostres s'analitzaren per transferència de western usant anticossos específics. Cal apuntar que en els assajos en què s'indueix expressió gènica cal afegir a les cèl·lules a més de l'estímul de calci el PMA ja que aquest induïx l'activació dels factors de transcripció AP1 (format per moltes proteïnes, principalment Fos i Jun), que cooperen amb els NFATc

per activar l'expressió. Per a la detecció de COX-2 en les diferents mostres es va usar un anticòs específic contra aquesta proteïna i per a detectar les proteïnes codificades pels lentivirus els anticossos anti-EGFP i anti-HA. Per a comprovar que la quantitat de proteïna total procedent de cada mostra és similar, es van analitzar els nivells proteics de la tubulina (Figura 6).

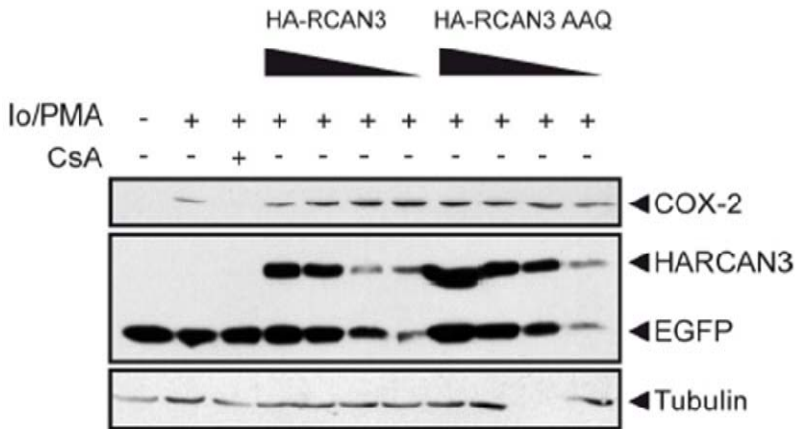


Figura 6. RCAN3 inhibeix la producció de proteïna COX-2 de forma dosi-dependent en cèl·lules MDA-MB-231 TNBC *in vitro*. Les cèl·lules es van transduir amb els lentivirus que codifiquen per RCAN3 i RCAN3 AAQ a concentracions de virus decreixents (MOIs de 20, 10, 5 i 2,5 respectivament). Els dos virus codifiquen per EGFP de forma independent de RCAN3 i RCAN3 AAQ. El lentivirus EGFP es va transduir a una MOI de 20 i es va usar com a control (carrils 1 a 3). Les cèl·lules es van estimular amb ionomicina (Io), calci i PMA. Com a control negatiu es van tractar cèl·lules EGFP amb CsA durant 30 min abans d'afegir l'estímul (CsA). La inducció de la proteïna COX-2 es va analitzar per transferència de western usant un anticòs específic contra COX-2. Els nivells de proteïna RCAN3, RCAN3 AAQ i EGFP control es van analitzar amb anti-HA i anti-EGFP. (-) sense estimulació, (+) amb estimulació. La tubulina es va usar com a control per normalitzar la proteïna total carregada en cada carril.

Els tres primers carrils corresponen a cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb el lentivirus EGFP, sense tractament/estímul (Figura 6, carril 1, -) amb tractament/estímul (Figura 6, carril 2,+) o amb estímul més CsA (Figura 6, carril 3, ++). Aquests carrils tenen una quantitat d'EGFP similar (Figura 6, carrils 1-3, anti-EGFP). En canvi, en el segon carril s'observa una inducció en la producció de COX-2, que correspon a les cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb el lentivirus EGFP i estimulades amb ionomicina, calci i PMA. Els carrils 1 i 3 corresponen a cèl·lules transduïdes amb EGFP sense estimulació o tractades amb CsA

respectivament, per tant, no tenen la via Cn-NFATc activada. Tal i com es pot observar, ni en el carril 1 ni en el carril 3 es detecta la proteïna COX-2. Els carrils 4-7 corresponen a mostres de cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb el lentivirus RCAN3 a diferents concentracions de lentivirus i posteriorment estimulades. La quantitat de proteïna total és similar en aquests carrils ja que presenten nivells similars de tubulina. No obstant, amb una mateixa quantitat de proteïna total, es detecten nivells diferents d'EGFP i de HRCAN3 degut a les diferents MOI emprades per a transduir les cèl·lules. Això confirma que, tal i com s'espera, a menor concentració de lentivirus per cèl·lula (menor MOI), menor producció de RCAN3 es detecta. En canvi, es pot observar que els nivells de COX-2 són inversament proporcionals als nivells de RCAN3 detectats. És a dir, que com més RCAN3 hi ha a les cèl·lules, menor és el nivell de proteïna detectada de COX-2. Pel què fa a les cèl·lules transduïdes amb el lentivirus RCAN3 AAQ, els resultats són completament diferents. En aquest cas, les mostres transduïdes amb RCAN3 AAQ a diferents MOIs ocupen els carrils 8-11 i també estan estimulades. Com en la condició anterior, la detecció de RCAN3 AAQ mitjançant l'anticòs específic anti-HA indica que la transducció a diferents concentracions de lentivirus produeix quantitats de RCAN3 AAQ diferents, seguint una relació proporcional. El mateix s'observa si s'utilitza l'anticòs anti-EGFP. Respecte a COX-2, es pot observar com el nivell de proteïna no varia significativament entre les diferents MOIs assajades per RCAN3 AAQ.

Aquests resultats demostren que l'estimulació de la via Cn-NFATc és necessària per a la inducció de la COX-2 i, a més, que la sobreproducció de RCAN3, però no de RCAN3 AAQ, inhibeix la inducció de COX-2 en les cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*.

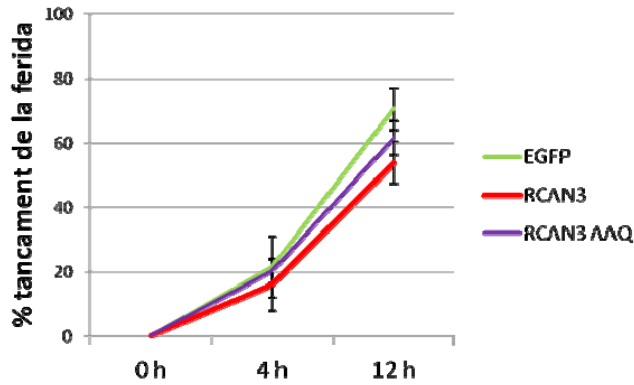
4.4 LA SOBREPRODUCCIÓ DE RCAN3 NO SEMBLA AFECTAR LA CAPACITAT DE MIGRACIÓ DE LA LÍNIA CEL·LULAR DE CÀNCER DE MAMA TNBC HUMÀ MDA-MB-231

Hi ha diversos estudis focalitzats en el rol dels NFATc en la regulació de l'expressió gènica de la COX-2 i de la implicació de la proteïna COX-2 en la progressió tumoral. S'ha publicat recentment que el silenciament dels transcrits de la COX-2 mitjançant shRNA específics en cèl·lules de càncer de mama (MCF-7) *in vitro* limita la migració i invasió tumoral (Sheng Yang and Hui Han, 2014). En aquest mateix estudi es mostra com la inhibició de la COX-2 disminueix significativament la capacitat de migració de les cèl·lules de càncer de mama *in vitro*. En

canvi, la sobreexpressió gènica de *COX-2 in vitro* en millora la capacitat d'invasió (Yiu *et al.*, 2006).

Els resultats obtinguts en aquest treball fins al moment indiquen que la sobreproducció d'inhibidors endògens com RCAN3 en cèl·lules MDA-MB-231 inhibeix la senyalització de la via Cn-NFATc i, com a conseqüència, es produeix una disminució no només de l'activitat promotora dels NFATc sinó també en la inducció de l'expressió de gens diana com la *COX-2*. Amb aquesta informació es va decidir estudiar possibles efectes de RCAN3 sobre aspectes fenotípics com la capacitat de migració en cèl·lules MDA-MB-231. Amb aquest propòsit es va dissenyar un experiment preliminar de cura de ferides o "wound healing". Aquest assaig de migració consisteix en què, a partir d'un cultiu cel·lular subconfluent (més del 90% de confluència) en monocapa, es realitza una "ferida" amb una punta estèril aixecant les cèl·lules que hi ha adherides. Aquesta "ferida" representa un alliberament d'espai que permet a les cèl·lules migrar per "tancar la ferida". Per a fer aquests assaigs es van transduir cèl·lules MDA-MB-231 al 90 % de confluència amb els lentivirus EGFP/ RCAN3/ RCAN3 AAQ a una MOI de 20. En cada condició es van generar dues ferides i es van escollir dues zones d'observació de la capacitat migratòria en cada una. Seguidament es va procedir a l'estimulació amb ionomicina, calci i PMA (per una informació més detallada, consultar la secció 3.5.2 als Materials i Mètodes) i a la captura manual de les imatges a 4 h i 12 h després de la generació de la ferida. Els resultats de la quantificació del percentatge de tancament en cada condició assajada (EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ) s'ha obtingut amb el software ImageJ (Figura 7).

a



b

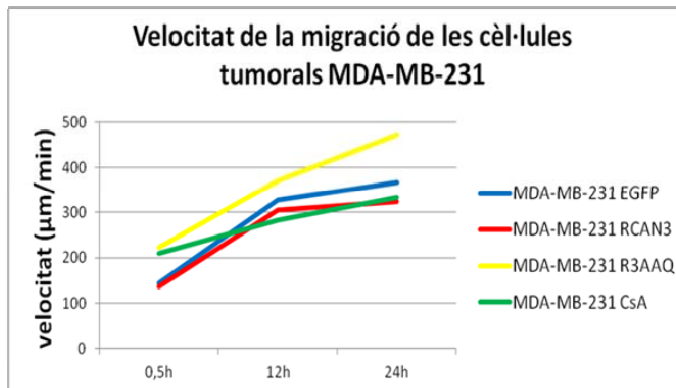


Figura 7. La sobreproducció de RCAN3 no sembla afectar la capacitat de migració de les cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*. a) Percentatge de tancament de la ferida a temps 0, 4 i 12 h després de produir la ferida. Les cèl·lules MDA-MB-231 es van transduir amb els lentivirus EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ a una MOI de 20 i es van aïllar per FACS (per "Fluorescence Activated Cell Sorting"). Amb els cultius subconfluents, estimulats amb ionomicina, calci i PMA, es va procedir a la realització de la ferida. Les imatges van ser capturades manualment amb un microscopi de fluorescència. Per a la quantificació es va usar el software ImageJ. Els resultats corresponen a dos experiments independents i es mostren com la mitjana \pm SEM. b) Velocitat mitjana de migració de cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb lentivirus (EGFP control, RCAN3 o RCAN3 AAQ) i estimulades durant 24 h amb ionomicina/CaCl₂/PMA (més CsA en el cas del control d'inhibició de l'activitat de la Cn). El càlcul de la velocitat mitjana es va realitzar amb el programa d'anàlisi d'imatge ImageJ.

Tal i com es pot veure en la Figura 7 **a**, el percentatge de tancament 4 h després de la generació de la ferida és d'un 20 % en les tres condicions (EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ) i al voltant del 60 % a les 12 h. Aquest experiment preliminar suggereix que la sobreproducció cel·lular de RCAN3 no té un efecte en la capacitat de migració de les cèl·lules MDA-MB-231.

Per a comprovar que els resultats no són deguts a una manipulació excessiva de les cèl·lules o de les condicions particulars de l'assaig durant l'experiment (canvis de temperatura durant l'adquisició d'imatges, moviment de la placa en el trasllat, quantificació manual de les imatges), es va decidir repetir l'experiment afegint una condició de control corresponent a les cèl·lules transduïdes amb EGFP però tractades amb CsA. Les ferides es van realitzar de la mateixa manera però se'n va canviar la forma de captura i de manipulació. Aquesta vegada la placa es va col·locar a l'incubador associat al microscopi confocal (LEICA TCS SP5) i es va usar un software de captura automàtica d'imatges gràcies a una platina mòbil. D'aquesta manera l'experiment es va poder monitorar durant 24 h. L'anàlisi dels resultats es pot veure a la Figura 7 **b**. En aquest cas es va quantificar la velocitat mitjana de migració de les cèl·lules després de 30 min, 12 h i 24 h de la generació de la ferida. La velocitat mitjana de la migració de les cèl·lules està calculada com la distància recorreguda per les cèl·lules en l'interval de temps corresponent. Com es pot veure a la Figura 7 **b**, totes les cèl·lules inicien l'experiment amb una acceleració forta, ja que aconsegueixen arribar a migrar entre 150 i 240 $\mu\text{m}/\text{min}$ en la primera mitja hora d'assaig. Arribat a aquest punt, les cèl·lules RCAN3 tenen una velocitat de migració similar a les EGFP fins a les 12 h d'experiment. A partir d'aquest moment, les cèl·lules RCAN3 mantenen una velocitat de creixement similar a la de les cèl·lules EGFP control. Pel què fa a les cèl·lules RCAN3 AAQ, presenten la major velocitat de migració i incrementa gradualment durant tot l'assaig. Per últim, les cèl·lules EGFP tractades amb CsA dibuixen la gràfica amb la menor pendent, que correspon a una menor velocitat de migració. En aquest cas la velocitat augmenta també de forma gradual al llarg de tot l'experiment però es manté en els valors més baixos d'entre les condicions assajades.

Els resultats obtinguts (Figura 7 **a** i **b**) suggereixen, de forma preliminar ja que calen més anàlisis per concloure-ho de forma contundent, que la sobreproducció de RCAN3 no sembla afectar la capacitat ni la velocitat de migració de les cèl·lules MDA-MB-231 de forma significativa en les condicions assajades *in vitro*.

4.5 RCAN3 NO SEMBLA AFECTAR LA CAPACITAT DE CREIXEMENT INDEPENDENT D'ANCORATGE EN CÈL·LULES MDA-MB-231 *in vitro*

Com s'ha comentat en la introducció, entre les característiques de les cèl·lules tumorals hi ha la capacitat d'invasió, que acostuma a anar acompanyada de la capacitat de sobreviure i créixer en suspensió, sense cap matriu on ancorar-se. D'aquesta manera la cèl·lula tumoral és capaç d'entrar en el corrent circulatori o limfàtic i colonitzar altres teixits o òrgans llunyans. La capacitat d'invasió o de créixer sense ancoratge ve donada per una transició epiteli-mesenquial (EMT) durant el qual les cèl·lules passen de tenir un fenotip epitelial a un de mesenquimal. La EMT és un fenomen associat a la progressió tumoral. Les vies de senyalització associades i els mecanismes moleculars no es coneixen completament. Hi ha articles que descriuen que l'estimulació perllongada de les cèl·lules MDA-MB-231 amb TGF β indueix EMT i que, com a conseqüència, hi ha un increment en l'activació dels NFATc i en la seva translocació a nucli. A més, aquests autors demostren que silenciant NFATc s'inhibeix la EMT induïda per TGF β , disminuint els nivells proteics de N-caderina, marcador mesenquimal àmpliament usat per a l'estudi de EMT (Sengupta *et al.*, 2013). Donat que els resultats obtinguts anteriorment en aquest treball demostren que la RCAN3 inhibeix la via Cn-NFATc, i en particular, el nivell d'activació dels NFATc, tot i que no afecti ni els nivells proteics de NFATc2 ni la migració cel·lular, es va decidir estudiar els efectes de la sobreproducció de RCAN3 sobre la EMT *in vitro*.

Una de les maneres d'analitzar la EMT és a través de la capacitat de proliferació de les cèl·lules en situacions d'absència de matriu. Per a fer-ho es realitza l'assaig de creixement de colònies en agar tou. Aquesta base d'agar serveix per aïllar les cèl·lules tumorals sembrades de forma que es veuen forçades a créixer sense matriu biològica on ancorar-se. Tot i que la base de l'experiment és simple, l'execució tècnica presenta algunes dificultats ja que requereix una alta precisió en el manteniment de les condicions de cultiu per a obtenir resultats reproduïbles.

En primer lloc es va preparar una solució d'agar al 0.6 % que es col·locà en la part inferior de la placa desitjada. Un cop solidificada, se li va afegir a sobre una solució d'agar al 0.3-0.4 % i, sense que es solidifiqui, se li van mesclar 5000 cèl·lules MDA-MB-231 resuspeses amb medi DMEM complet. En aquests assajos les cèl·lules van ser prèviament

transduïdes amb els lentivirus EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ. És important que, donat que les cèl·lules estan en contacte amb la solució d'agar tou al 0,3-0,4 %, la temperatura d'aquesta no ha de superar els 37°C, però tampoc ha de massa baixa, per a evitar la solidificació de l'agar. Un altre punt a tenir en compte és l'estimulació necessària per tal d'activar la via de Cn-NFATc. El medi de cultiu amb els estímuls (calci, ionomicina, PMA) es va canviar una vegada per setmana per evitar que la capa superficial d'agar tou al 0.3-0.4% s'assequés. Les cèl·lules es van deixar créixer fins a la visualització de colònies (3 setmanes en aquest cas). Una vegada donat per finalitzat l'experiment, es va fer una tinció amb nitroblau de tetrazolium que tenyeix les colònies de blau fosc per a ser quantificades i analitzades.

Els resultats dels assajos de creixement independent d'ancoratge sobre agar tou que es mostren a continuació són preliminars i requereixen ser contrastats amb altres de nous ja que només s'han realitzat dos experiments. La Figura 8 mostra el resultat d'un dels dos assajos que es van fer. Els resultats mostren que la sobreproducció de RCAN3 sembla afavorir el creixement independent d'ancoratge. Les cèl·lules MDA-MB-231 tenen la capacitat de créixer independentment d'ancoratge en el pou de les cèl·lules control (Figura 8), no obstant, s'esperava un creixement més acusat donada la seva tumorigenèicitat intrínseca. La variabilitat en els resultats pot venir donada per l'eficiència en les condicions d'estimulació utilitzades. L'estímul de calci, ionomicina i PMA ha estat present en el medi durant tot l'experiment tot i que la freqüència amb la qual s'ha refrescat el medi potser no està encara del tot optimitzada per aquest tipus d'experiment *in vitro*. Aquestes qüestions estan essent revisades per a optimitzar-ne el protocol i les condicions d'estimulació del pròxims experiments.

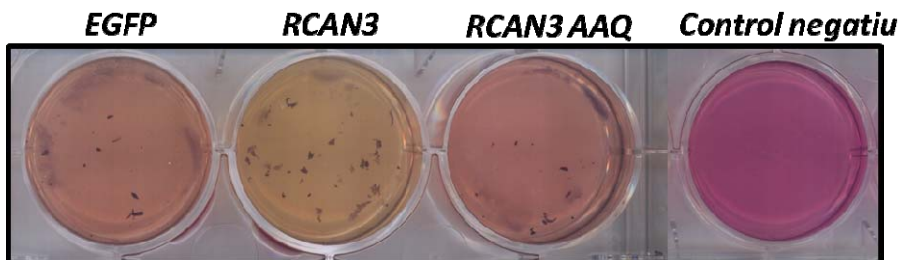


Figura 8. Efecte de RCAN3 sobre la migració de cèl·lules MDA-MB-231 mitjançant l'assaig de formació de colònies en agar tou. Es van transduir cèl·lules MDA-MB-231 amb els lentivirus EGFP/RCAN3 / RCAN3 AAQ i se'n van sembrar 5000 per cada condició (excepte en el control negatiu que no conté cèl·lules) en medi d'agar tou (veure'n el procediment a l'apartat 3.5.9 dels

materials i mètodes). S'ha afegit medi fresc cada 3-5 dies per tal de mantenir l'agar hidratat. Per a la inducció de la via de Cn-NFATc s'afegeix al medi (DMEM amb alta concentració de glucosa i 10% FBS) 1 μ M de Ionomicina, 10 mM de CaCl₂ i 10 mM PMA. Les colònies es van tenyir amb nitroblau de tretrazolium a raó de 1 mg/ml en un volum de 500 μ l per pou després de 3 setmanes de cultiu. Les imatges es van obtenir escanejant les plaques amb un escàner HP Scanjet G450.

Aquest experiment preliminar sembla indicar que la sobreproducció de RCAN3 induiria migració cel·lular enlloc d'inhibir-la però cal ampliar el número d'assajos per a poder concloure de forma clara aquest efecte de RCAN3 sobre la migració cel·lular.

4.6 LA SOBREPRODUCCIÓ DE RCAN3 INHIBEIX LA PROGRESSIÓ TUMORAL EN TUMORS ORTOTÒPICS TNBC HUMÀ MITJANÇANT LA INHIBICIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ Cn-NFATc

En la literatura hi ha descrit que fàrmacs inhibidors de Cn com el Tacrolimus (FK506) i la ciclosporina A (CsA), a part de ser fàrmacs eficaços i usats en la teràpia immunosupressora, presenten alguns efectes *in vivo* sobre el creixement tumoral inhibint-lo, com per exemple en càncer de mama (Siamakpour-Reihani *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012), fet que posa la via Cn-NFATc en el punt de mira de molts estudis relacionats amb teràpia anti-tumoral. Els resultats presentats anteriorment en aquest treball demostren que en situacions de sobreproducció de la proteïna RCAN3 en cèl·lules TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468 humanes, RCAN3 inhibeix la senyalització de Cn vers els NFATc que comporta una inhibició de l'activació dels NFATc, de la seva translocació a nucli i una disminució marcada de l'expressió gènica dependent dels NFATc com la de la *COX-2*, fet que té com a conseqüència una marcada davallada en la producció d'aquesta proteïna, essencial pel mecanisme d'angiogènesi tumoral.

Per estudiar l'efecte de la sobreproducció de RCAN3 en la progressió tumoral, es va decidir generar un model ortotòpic de càncer de mama triple negatiu (TNBC). Per a crear aquest model es van emprar ratolins immunodeprimits (BALB/c nude), als quals se'ls van injectar 2 milions de cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes a MOI 20 amb els lentivirus control EGFP, RCAN3 o RCAN3 AAQ, en el teixit adipós associat a les glàndules mamàries inguinals (veure secció 3.6.1.4 de Materials i Mètodes). Per tal d'injectar una població el més homogènia possible, les

cèl·lules transduïdes van ser prèviament seleccionades per FACS pel nivell alt d'expressió de l'EGFP. En la preparació de la suspensió cel·lular a injectar és important treure qualsevol traça de sèrum i antibiòtic present en el medi per tal d'evitar agregats cel·lulars que podrien ocasionar danys vasculars i/o la mort de l'animal. Les cèl·lules TNBC MDA-MB-231 injectades en ratolí formen els tumors ortotòpics que, a partir d'ara, es denominaran com a EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ per a facilitar-ne la descripció (EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ en la Figura 9) i es sobreentendrà que sobreprodueixen la proteïna que els hi dóna nom. Com a tumors control s'han generat els tumors que produeixen EGFP; els RCAN3 AAQ produeixen la proteïna RCAN3 mutant que no pot unir-se a Cn i per tant, al comparar els tumors RCAN3 i RCAN3 AAQ, es poden analitzar els efectes funcionals de RCAN3 quan s'uneix o no a la fosfatasa. La mutació present en les cèl·lules dels tumors RCAN3 AAQ correspon al canvi de tres residus aminoacídics presents en el motiu d'unió a Cn, el motiu PxlxIT-like de RCAN3 (V197A, V198A, H199Q). Per tant, l'ús del model ortotòpic de càncer de mama és una eina per determinar si l'efecte inhibidor de la sobreproducció de RCAN3 sobre la via de senyalització Cn-NFATc observat *in vitro* es reflecteix en el model ortotòpic de TNBC, és a dir, en un ambient molt més complex amb nombrosos tipus cel·lulars implicats i multitud de vies de senyalització que s'inter-relacionen.

4.6.1 Els tumors ortotòpics de càncer de mama triple negatiu humà que sobreprodueixen RCAN3 presenten una disminució significativa en el pes i el volum tumoral respecte els tumors control

Els animals amb tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ es van deixar créixer 35 dies i es van mesurar de forma precisa mesurant-ne les dimensions del tumor i registrant el pes dels animals (veure l'apartat 3.6.1.7 de materials i mètodes). El final de l'experiment ve donat per la mida assolida dels tumors més grans (entre 1000-2000 mm³). En aquest moment els animals es van sacrificar per dislocació cervical i se'n van extreure mostres per als posteriors anàlisis.

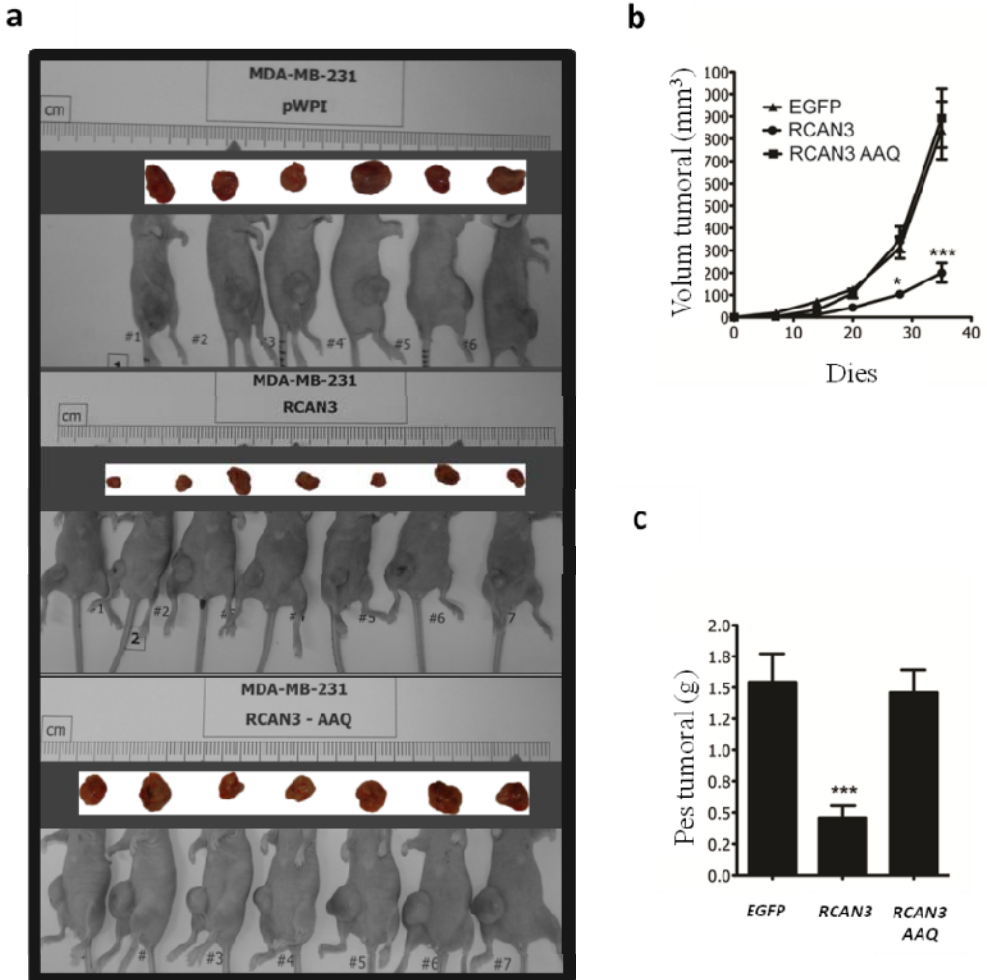


Figura 9. La sobreproducció de RCAN3 en cèl·lules TNBC MDA-MB-231 inhibeix marcadament el creixement de tumors ortotòpics de TNBC *in vivo*. Es van injectar 2×10^6 cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb els lentivirus EGFP/RCAN3 / RCAN3 AAQ al greix associat a la glàndula mamària engonal dreta de cada ratolí BALB/c, a una concentració de 1×10^6 cèl·lules en 0.1 ml DMEM amb alta concentració de glucosa i sense sèrum ni antibiòtic. Al final de l'experiment els animals es van sacrificar i es va procedir a l'extracció dels tumors per a la posterior anàlisi (EGFP n=6, RCAN3 n=7 and RCAN3 AAQ n=7). **a)** Imatge dels ratolins on s'observen els tumors ortotòpics formats en ratolins BALB/c abans de extreure'ls i fotografia dels tumors un cop extrets dels animals. **b)** Corbes de creixement tumoral en volum a diferents dies després de la injecció cel·lular representats com la mitjana \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$. **c)** Quantificació del pes tumoral per condició assajada representat com a la mitjana \pm SEM. El test estadístic aplicat fou ANOVA amb *** $p < 0.005$.

La mesura bisetmanal de les dimensions dels tumors formats mostra clares diferències en les dimensions dels tumors entre les tres condicions assajades (Figura 9). Pel que fa als tumors RCAN3 tenen un volum tumoral significativament menor als tumors EGFP o RCAN3 AAQ (Figura 9 a i b). Entre els tumors EGFP i RCAN3 AAQ les diferències són quasi inexistent igual que la variabilitat tumoral intragrup. Dins del que s'espera per un experiment d'aquestes característiques, la variabilitat entre animals és més que acceptable. Si es representa el creixement tumoral com a volum en funció del temps (Figura 9 b) s'obté com a resultat que els tumors RCAN3 inhibeixen de forma marcada el creixement tumoral. Pel què fa a les corbes de creixement de les condicions EGFP i RCAN3 AAQ són pràcticament paral·leles. Respecte al pes tumoral (Figura 9 c), els resultats segueixen el mateix patró i s'obtenen diferències significatives comparant les condicions EGFP i RCAN3 AAQ respecte els tumors RCAN3. La sobreproducció de RCAN3 en les cèl·lules MDA-MB-231 té com a conseqüència la formació de tumors de menor volum i menor pes que en la resta de condicions assajades. El fet que els tumors EGFP i RCAN3 AAQ presentin pràcticament el mateix pes tumoral confirma que les mutacions en els aminoàcids 197-199 del motiu CIC (i concretament en el motiu PxlXIT del motiu CIC) de la proteïna RCAN3 impedeixen la interacció de RCAN3 amb la calcineurina i, per tant, el seu efecte sobre la inhibició de la via de senyalització Cn-NFATc esdevé nul. Per tant, els tumors RCAN3 AAQ mostren que les diferències observades amb els tumors RCAN3 són degudes específicament a RCAN3 i a l'efecte inhibitori d'aquest sobre l'activitat de Cn.

Aquests resultats són importants i cal comprovar si les cèl·lules tumorals que sobreprodueixen RCAN3 inhibeixen la senyalització dels NFATc. Del contrari, els efectes observats poden ser deguts a altres factors indirectes desconeguts.

4.6.2 La sobreproducció de RCAN3 en cèl·lules tumorals inhibeix la translocació dels NFATc a nucli *in vivo*

La calcineurina activa els NFATc desfosforilant residus presents en la regió reguladora de la proteïna (regions riques en serines prolines (SP) i riques en serines (SRR)). Aquesta desfosforilació de residus serina genera un canvi de conformació en la proteïna Cn que deixen al descobert la seqüència de localització nuclear o NLS i amaga la seqüència

d'exportació nuclear o NES. En aquest moment, els NFATc desfosforilats (actius) són reconeguts per les proteïnes d'importació nuclear i són translocats al nucli on s'uneixen als gens diana regulats pels NFATc per a promoure'n l'expressió gènica.

En els anteriors experiments realitzats *in vitro* amb cèl·lules MDA-MB-231 s'ha observat que la sobreproducció de RCAN3 inhibeix la translocació de NFATc2 a nucli. En canvi, en les cèl·lules control EGFP el NFATc2 és localitzat majoritàriament a citosol, igual que en les cèl·lules que sobreproduïen RCAN3 AAQ (Figura 4).

En els experiments *in vivo*, es va decidir analitzar si els NFATcs estaven activats en les cèl·lules tumorals. Per a caracteritzar *in vivo* la translocació de NFATc2 a nucli en les diferents condicions experimentals, es va realitzar un assaig d'immunohistoquímica (IHC) amb l'anti-NFATc2 humà, prèviament caracteritzat en aquest treball, en mostres tumorals incloses en parafina (veure'n apartat 3.4.7.1). Per determinar l'especificitat del marcatge de NFATc2 i no confondre'l amb un marcatge de rerefons degut a l'anticòs secundari, van afegir-se controls de la tinció que es van incubar amb anticòs secundari i en substitució de l'anticòs primari es van tractar amb PBS 1x. Els controls són nets i per tant qualsevol marcatge detectat amb anti-NFATc2 en les mostres és específic de NFATc2 (veure els quadrats petits al racó inferior dret de cada imatge en la Figura 10 a). Els resultats de la IHC mostren molta heterogeneïtat en la localització dels NFATcs, no obstant els tumors que sobreproduïen RCAN3 presenten regions amb una distribució subcel·lular de NFATc2 tènue al nucli en comparació amb el marcatge nuclear observat en les cèl·lules dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ (RCAN3 AAQ a la Figura 10 a). Respecte al marcatge de NFATc2 inactiu, citosòlic, és present en totes les condicions però cal destacar que la relació d'intensitats entre el marcatge citosòlic i nuclear és molt diferent entre els tumors RCAN3 i els tumors EGFP i RCAN3 AAQ. En els tumors RCAN3 hi ha quasi la mateixa intensitat de marcatge al citosol que a nucli, mentre que en els tumors EGFP i RCAN3 AAQ, el NFATc2 es localitza molt preferentment a nucli. A més, s'observa que l'abundància del NFATc2 és menor en RCAN3 que en tumors EGFP i RCAN3 AAQ per IHC (Figura 10 a).

Per a determinar si l'abundància del NFATc2 en els tumors RCAN3 diferia dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ de forma global es decidí analitzar les diferents mostres tumorals per transferència de western i posterior anàlisi amb un anticòs anti-NFATc2 diferent a l'emprat per IHC (PA5-19164, ThermoFisher Scientific). Com a control de la detecció específica

del NFATc2 es van usar cèl·lules Jurkat T, estimulades amb clorur de calci i ionomicina durant 45 min en absència (Io) o en presència de CsA (-). Els resultats mostren que, en cèl·lules T humanes de la línia Jurkat, es detecta NFATc2 (Figura 10 **b**, carrils 1 i 2). En les cèl·lules no estimulades s'observa una banda de mobilitat electroforètica que correspon al NFATc2 fosforilat. Pel contrari, en les cèl·lules estimulades apareixen varies bandes de mobilitat electroforètica diferent amb una massa inferior a la del NFATc2 fosforilat, que corresponen al NFATc2 defosforilat (actiu). Com a control de càrrega de la mostra s'ha emprat el factor de splicing associat a la proteïna d'unió a repeticions de polipirimidines (PSF). Pel què fa als tumors, l'anàlisi de la membrana de nitrocel·lulosa amb anti-NFATc2 mostra que en els tumors RCAN3 els nivells detectats de proteïna NFATc2 són clarament inferiors als d'EGFP i RCAN3 AAQ (Figura 10 **b**, carrils 3, 4 i 5). Aquesta diferència en els nivells de NFATc2 en els tumors RCAN3 no es corresponen amb canvis en la quantitat de proteïna total carregada en el gel (Figura 10 **b**, anti-PSF, carrils 3, 4 i 5). Aquest resultat indica que hi ha menys producció de proteïna NFATc2 en els tumors RCAN3 tal i com s'havia observat per IHC. En quant al nivell d'activació dels NFATc, no s'observen diferències clares entre els tumors de RCAN3 respecte els RCAN3 AAQ i EGFP. Aquest resultat pot ser degut a que, en el moment d'analitzar els tumors, en aquests hi ha una barreja de zones necròtiques, teixit adipós i diferències en el nivell d'angiogènesi present a la mostra, entre altres.

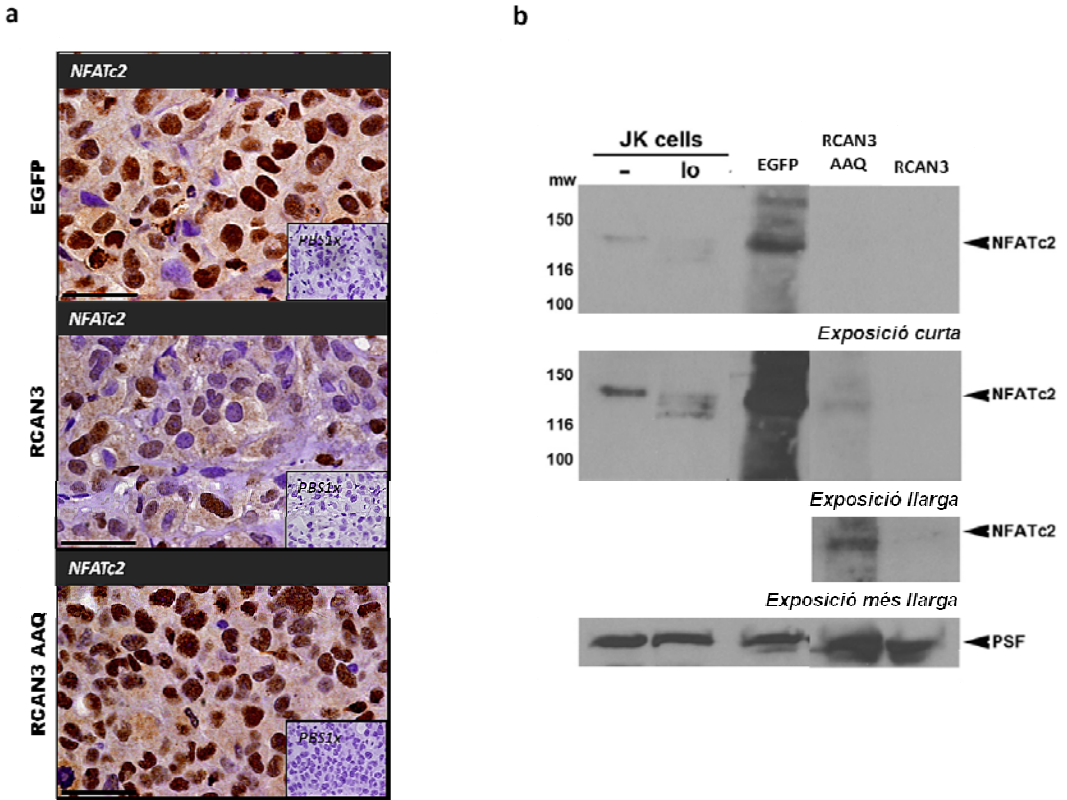


Figura 10. La sobreproducció de RCAN3 en les cèl·lules tumorals produeix una reducció marcada dels nivells proteics de NFATc2 i de manera focalitzada la inhibició de la translocació nuclear de NFATc2. a) Assaig d'Immunohistoquímica amb anti-NFATc2 humà (AVIVA #38988) sobre mostres incloses en parafina de tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ. Les imatges que es presenten són representatives dels tumors control EGFP, RCAN3, i RCAN3 AAQ analitzats. En la part inferior dreta de cada imatge s'inclou un control de l'anticòs secundari per a mostrar l'especificitat del marcatge amb anti-NFATc2 (en color marró a la imatge). L'escala representa 50 μ m en el teixit real. Les imatges s'han capturat amb un microscopi Olympus Bx51 amb un objectiu de 60x i usant el programa Cell^B. **b)** Transferència de western analitzada amb anti-NFATc2 (PA5-19164, *ThermoFisher Scientific*) per a determinar els nivells de proteïna de NFATc2 i el seu estat d'activació, fosforilat i defosforilat, en extractes solubles de tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ. Com a control positiu de detecció de NFATc2 s'han estimulat cèl·lules Jurkat T amb calci i inomicina durant 45 min en absència (lo) o en presència de CsA(-). S'ha usat un anticòs anti- PSF com a control de càrrega de proteïna total. Els panells superior, mig i inferior analitzats amb anti-NFATc2 corresponen a temps d'exposició curt, llarg i més llarg de la membrana de nitrocel·lulosa. El marcador de massa molecular es presenta com a Mw, i els valors corresponen a kDa.

Els resultats obtinguts permeten concloure que els tumors RCAN3 presenten nivells inferiors de proteïna NFATc2 als dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ. En quant al nivell d'activació del NFATc2, els tumors RCAN3 presenten diverses zones on les cèl·lules tumorals tenen el NFATc2 majoritàriament inactiu mentre que això no s'observa en tumors EGFP i RCAN3 AAQ per IHC. No obstant, no s'observen canvis en el nivell d'activació dels NFATc2 a nivell global entre els tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ quan s'analitza per transferència de western.

4.6.3 La sobreproducció de RCAN3 no modula l'expressió gènica de NFATc2 en cèl·lules MDA-MB-231 ni MDA-MB-468 *in vitro*

Donat que l'anàlisi de transferència de western i d'IHC amb anti-NFATc2 mostrava que l'abundància de NFATc2 en tumors RCAN3 era molt inferior a la dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ, es va decidir determinar si la sobreexpressió de *RCAN3* en cèl·lules TNBC afectava els nivells d'expressió gènica de *NFATc2*. Com ja s'ha dit anteriorment, el motiu PxlIT present a les RCAN competeix amb el PxlIT present als NFATc per a la interacció amb Cn, i per tant, les RCAN actuen com a moduladors endògens de la senyalització Cn-NFATc, i per tant a l'expressió gènica regulada pels NFATc. En aquest sentit, s'ha descrit que només el gen de la família dels NFATc que codifica per la isoforma NFATc1 està regulat transcripcionalment pels NFATc i, per tant, NFATc2 no està regulat pels NFATc (Zhou *et al.*, 2002). Sabent això, i per tal de determinar si RCAN3 pot modular directa o indirectament l'expressió gènica de *NFATc2*, es va realitzar una RT-qPCR a temps real a partir del RNA total de línies cel·lulars TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468 transduïdes amb EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ a una MOI de 20 i estimulades amb ionomicina, calci i PMA durant 8 h. Per a la PCR a temps real es van usar encebadors específics i sondes UPL per a l'amplificació del *NFATc2* humà. Com a control intern de la reacció de PCR es va usar l'amplificació del gen humà d'expressió constitutiva *HPRT1*.

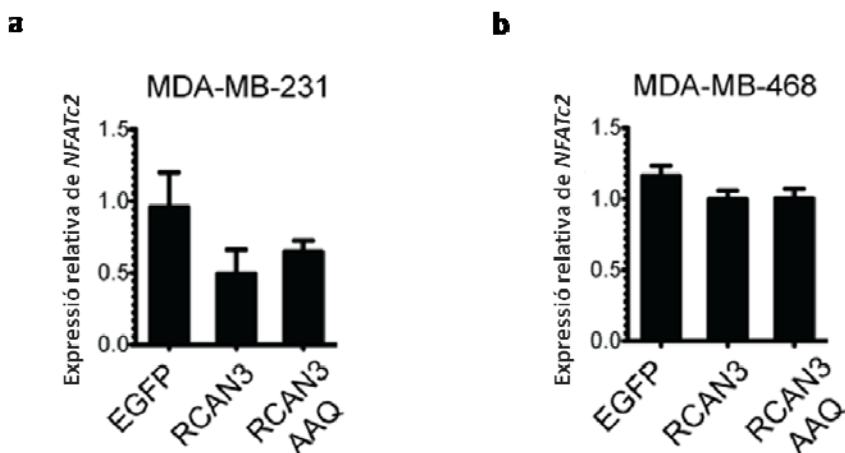


Figura 11. L'expressió gènica de *NFATc2* no està regulada per *RCAN3* en cultius de cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468. Quantificació de l'expressió gènica de *NFATc2* en cèl·lules MDA-MB-231 (a) i MDA-MB-468 (b) transduïdes amb els lentivirus EGFP, *RCAN3* i *RCAN3 AAQ* a una MOI de 20 i estimulades amb ionomicina, calci i PMA. Es va extraure el RNA total, es generà el cDNA i es realitzà una PCR quantitativa usant sondes UPL (banc de sondes universals o UPL; Roche) i encebadors específics per amplificar els gens *NFATc2* i *HPRT*. Aquest darrer és un gen d'expressió constitutiva que s'usa com a control intern de la reacció. Aquest experiment es va fer per triplicat i els resultats mostrats es representen com a mitjana \pm SEM. Per al nivell de significança es va aplicar el test estadístic de Kruskal-Wallis.

Els nivells d'expressió gènica de *NFATc2*, tal i com s'observa en la Figura 11, no són significativament diferents entre les condicions assajades en cultius cel·lulars TNBC (EGFP, *RCAN3* i *RCAN3 AAQ*). Els resultats són similars tan per a la línia cel·lular MDA-MB-231 com per a la MDA-MB-468. Per tant, es pot concloure que, tot i l'efecte observat en la disminució dels nivells proteics de *NFATc2* en els tumors *RCAN3*, en cultius cel·lulars de TNBC la sobreexpressió de *RCAN3* no altera l'expressió gènica de *NFATc2*. No obstant, no es pot descartar que en el tumor hi hagin altres factors i tipus cel·lulars, que puguin afectar directa o indirectament a la disminució observada en l'abundància proteica de *NFATc2* en els tumors *RCAN3*.

4.6.4 L'expressió gènica regulada pels NFATc està inhibida en els tumors RCAN3.

Un dels efectes de la sobreproducció de RCAN3 *in vitro* és la inhibició de l'expressió de gens regulats pels NFATc, com la ciclooxigenasa 2 (*COX-2*). En les mostres dels tumors ortotòpics, es va decidir analitzar l'expressió gènica regulada pels NFATc de diversos gens, inclosos els de *COX-2* i interleuquina 8 (*IL-8*), per les seves nombroses implicacions en la progressió tumoral i la seva elevada expressió en càncers de mama ER negatiu (Hu *et al.*, 2007; Chen Yao *et al.*, 2007) o TNBC (Penson *et al.*, 2000).

El primer pas fou determinar si la inhibició de la via Cn-NFATc afectava l'expressió gènica de gens diana pels NFATc. Per a abordar aquesta qüestió es va quantificar, per RT-qPCR, el nivell d'expressió de gens dependents dels NFATc a partir de RNA total de les mostres dels tumors ortotòpics. Com a control intern de la reacció de PCR es van usar els gens d'expressió constitutiva *Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transferase 1 (HPRT1)* i *Glyceralehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPDH)*. Donat que amb ambdós gens es van obtenir resultats similars es mostren només els valors de l'expressió gènica dels gens analitzats referits al gen *HPRT1*. L'anàlisi de l'expressió gènica de *IL-8* i del factor estimulador de colònies 2 (*CSF-2*) en els tumors mostra que els tumors RCAN3 presenten una marcada davallada de l'expressió gènica de *IL-8* i de *CSF-2* (Figura 12, a i b) en comparació als nivells observats en tumors EGFP i EGFP AAQ. A més, tot i que no hi ha una diferència significativa entre els tumors EGFP i RCAN3 AAQ s'observa una tendència clara a presentar menys expressió dels gens *IL-8* i *CSF-2* en els tumors RCAN3 AAQ respecte els tumors EGFP.

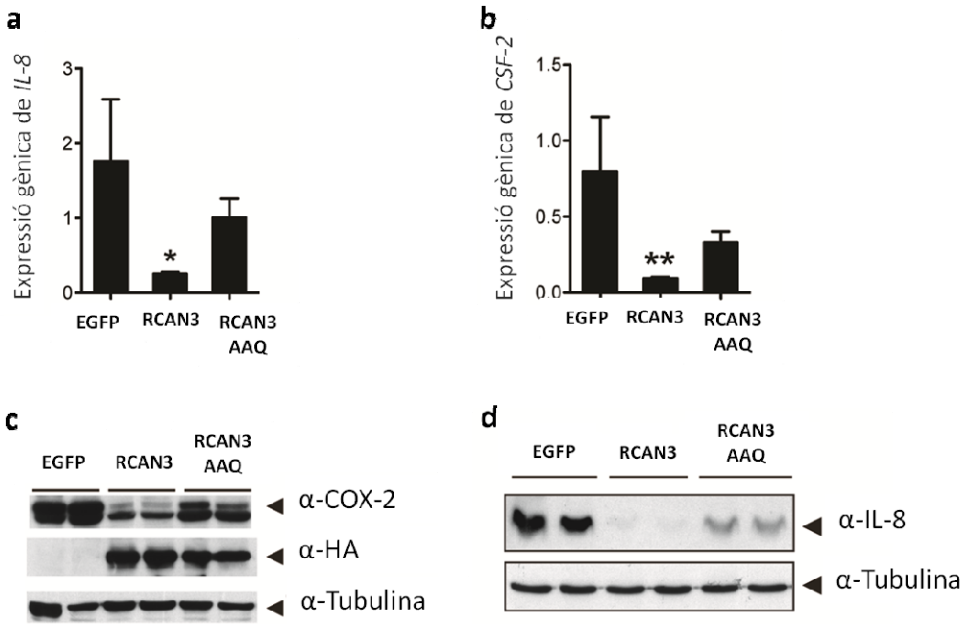


Figura 12. La sobreproducció de RCAN3 en tumors ortotòpics disminueix significativament l'expressió gènica de gens dependents de NFATc com *IL-8* i *CSF-2* així com els nivells de proteïna COX-2 i IL-8. **a i b**) Anàlisi de l'expressió gènica de *IL-8* (**a**) i *CSF-2* (**b**) per qPCR. Els resultats van normalitzar-se emprant el gen d'expressió constitutiva *HPRT1*. Les dades es presenten com \pm SEM. L'anàlisi estadístic va realitzar-se per ANOVA i posterior test de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). **c i d**) Transferència de western dels tumors ortotòpics EGFP, RCAN3, RCAN3 AAQ i posterior anàlisi amb anticossos anti-COX-2 i anti-HA (els tumors RCAN3 i RCAN3 AAQ tenen un epítot HA en l'extem N-terminal de la proteïna per facilitar la seva identificació) (**c**) i anti-IL-8 (**d**). La tubulina i l'actina es van usar com a control de càrrega en c i d respectivament.

El següent pas fou comprovar si aquestes alteracions de l'expressió gènica de *IL-8* i *CSF-2* es corresponien amb canvis en l'abundància de les proteïnes que codifiquen. En aquest cas es va decidir analitzar primer els nivells de proteïna de COX-2 i també els de IL-8, ja que el gen *IL-8* està també regulat per els NFATc. Amb aquesta finalitat, extractes de proteïna amb tampó RIPA dels tumors ortotòpics EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa que va ser analitzada posteriorment amb anticossos específics per a detectar aquests proteïnes (Figura 12). L'anàlisi de les proteïnes COX-2 i IL-8 mostrà que en tumors RCAN3 s'inhibeix dràsticament la producció d'ambdues proteïnes (Figura 12 **c**, panell anti-COX-2, i **d**, panell anti-IL-8), respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ. Pel què fa als tumors RCAN3 AAQ, es pot

observar que hi ha una certa inhibició de la IL-8 respecte els tumors EGFP tot i que és menor que la que s'observa en els tumors RCAN3. Això indicava que altres regions de RCAN3 diferents a la del motiu PxlIT mutat en RCAN3 AAQ també estan implicades en la regulació de la quantitat de proteïna produïda de COX-2 i IL8. Com a control de càrrega de proteïna en cada carril es van analitzar els nivells de la proteïna tubulina o de l'actina, ambdós d'expressió ubiqua i constitutiva, i es va observar que no hi havien diferències significatives en la quantitat de proteïna total carregada entre les diferents condicions assajades. També es va analitzar amb anti-HA els nivells de proteïna EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ observant-se'n nivells similars de les proteïnes RCAN3 i RCAN3 AAQ (Figura 12 c). En la condició control EGFP no s'observa cap banda electroforètica corresponent a l'anàlisi amb anti-HA ja que aquest pèptid té 2 kDa de massa molecular i la membrana de nitrocel·lulosa no és capaç de retenir fragments peptídics inferiors als 4 kDa.

En resum, tots els resultats anteriors mostren de forma clara que la sobreproducció de RCAN3 en tumors ortotòpics de TNBC humans inhibeix de forma significativa l'expressió gènica dependent dels NFATc de *IL-8* i *CSF-2* així com la producció de les proteïnes COX-2 i IL-8.

4.6.5 Els tumors RCAN3 presenten un increment de la proliferació cel·lular i de l'apoptosi però no afecten la necrosi tumoral

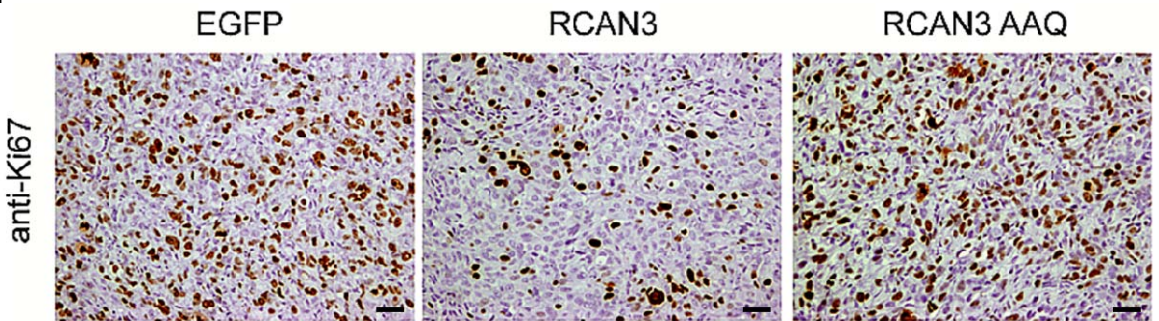
La sobreproducció de RCAN3 en els tumors RCAN3 causa una disminució en el creixement tumoral com ja s'ha vist anteriorment (Figura 9). La hipòtesi que es va formular en un primer moment derivada d'aquests resultats és que la disminució del volum tumoral observada en els tumors RCAN3 pot ser deguda, entre d'altres factors, a la disminució de la proliferació de les cèl·lules tumorals. Una davallada en la freqüència de les divisions cel·lulars podria explicar el retard observat en el creixement tumoral.

La recerca realitzada sobre l'efecte funcional de les diferents isoformes dels NFATc sobre la proliferació cel·lular mostra resultats contradictoris que potser degut a diferències experimentals i/o al tipus cel·lular i/o de teixit emprat en l'anàlisi. Per exemple, s'ha descrit que animals deficients en les isoformes NFATc2 i NFATc3 en cèl·lules immunitàries són resistents a la inducció de l'apoptosi i per tant aquests NFATcs actuarien com a gens supressors tumorals (Ranger *et al.*, 1998).

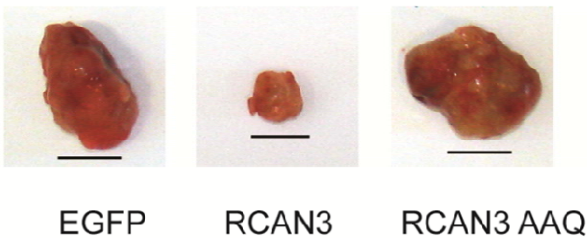
Ara bé, altres articles (Zhang *et al.*, 2012) demostren que NFATc2 indueix la transcripció de *Mdm2* i inactiva TP53 en cèl·lules de càncer de mama i per tant no pot activar l'apoptosi, amb la qual cosa, tindria més aviat un rol propi d'un oncogen.

En aquest punt es va decidir estudiar en els tumors RCAN3 la proliferació cel·lular comparació amb els tumors ortotòpics de TNBC EGFP i RCAN3 AAQ. Hi ha moltes maneres d'analitzar la proliferació cel·lular *in vivo*, però en aquest cas es va realitzar mitjançant un assaig d'IHC contra la proteïna Ki67, que és un marcador de proliferació cel·lular, sobre talls histològics dels tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ inclosos en parafina. La tinció per Ki67 és positiva en totes aquelles cèl·lules que han iniciat la divisió cel·lular, indiferentment de la fase del cicle en la qual es trobin. No obstant, en funció de la fase de la divisió cel·lular, la intensitat de Ki67 varia i per tant, per a minimitzar errors, el criteri per a la quantificació d'aquest marcador és de positiu/negatiu, sense tenir en compte la intensitat de marcatge.

a



b



c

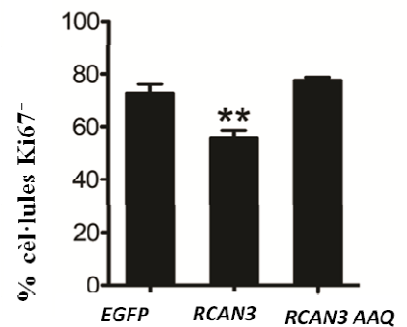


Figura 13. La sobreproducció de RCAN3 disminueix la proliferació de les cèl·lules tumorals *in vivo*. a) Imatges representatives de l'assaig d'immunohistoquímica amb anti-Ki67, marcador de proliferació cel·lular, sobre seccions histològiques dels tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ incloses en parafina. El segment d'escala representa 50 μm . S'usa hematoxilina com a contrast nuclear. Les imatges van ser capturades en un objectiu de 40x en un microscopi Olympus BX51. b) Imatges representatives dels tumors ortotòpics EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ. c) Quantificació del percentatge de cèl·lules Ki67 positives en les condicions control EGFP/ RCAN3 / RCAN3 AAQ. Els tumors RCAN3 mostren una inhibició significativa de la proliferació cel·lular (**) amb $p < 0.01$. Les barres mostren la mitjana \pm SEM. c) Selecció representativa de tumors ortotòpics de TNBC humà de cada condició assajada (control o EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ). El segment d'escala representen 1 cm.

De la quantificació del número de cèl·lules positives per Ki67 en cada camp de gran augment, se'n deriva que les cèl·lules tumorals que sobreproduïen RCAN3 presenten una menor taxa de divisió cel·lular que les cèl·lules control o RCAN3 AAQ (Figura 13 c). Això significa que probablement la inhibició de Cn respecte els NFATcs en les cèl·lules tumorals té unes conseqüències notables en el nivell de proliferació cel·lular i que, per tant, podria en conseqüència causar en part la disminució del volum tumoral observada en els tumors RCAN3 (Figura 13 b). No es coneix encara el mecanisme molecular que produeix aquesta davallada significativa en el percentatge de cèl·lules en proliferació en els tumors RCAN3.

Les cèl·lules tumorals creixen descontroladament i els seus requeriments nutricionals i d'oxigen són essencials per a poder-se mantenir vives. En la progressió tumoral, moltes de les zones de ràpid creixement esdevenen necròtiques degut a l'anòxia que pateixen algunes cèl·lules tumorals. En aquestes condicions desfavorables s'activen tant la via de mort cel·lular programada o apoptosi com la mort cel·lular per necrosi. Vist que els tumors RCAN3 presenten una inhibició de la proliferació cel·lular respecte els tumors RCAN3 AAQ i els EGFP, no seria estrany que les vies de mort cel·lular com l'apoptosi i la necrosi estiguin també afectades i, conjuntament amb els resultats de proliferació cel·lular, permetin explicar les diferències observades entre els volums tumorals de les condicions assajades (EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ).

Una cèl·lula que inicia la mort programada o apoptosi mor sense malmetre les cèl·lules que l'envolten. La cèl·lula es deshidrata, el citoesquelet es col·lapsa, la cromatina es condensa i l'envolta i el DNA nuclear es fragmenta i s'inclou en vesícules apoptòtiques. La superfície cel·lular també s'altera, presentant antígens de superfície que provoquen

que la cèl·lula apoptòtica sigui fagocitada ràpidament per una cèl·lula inflammatòria, abans que el seu contingut sigui alliberat. D'aquesta manera, no només s'eviten les conseqüències perjudicials de la necrosi cel·lular sobre altres cèl·lules sinó que, a més, hi ha la possibilitat de reciclar els components orgànics de la cèl·lula morta.

Per a estudiar si l'apoptosi resulta afectada en tumors RCAN3 de forma diferencial als tumors EGFP i RCAN3 AAQ es va realitzar una tinció de TUNEL sobre seccions histològiques de teixit dels tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ inclosos en parafina. El TUNEL és una tècnica basada en la immunodetecció de zones de fragmentació del DNA nuclear i, per tant, les cèl·lules que han iniciat l'apoptosi apareixen positives en aquest assaig (per a més informació consultar la secció 3.7.3 de Materials i Mètodes).

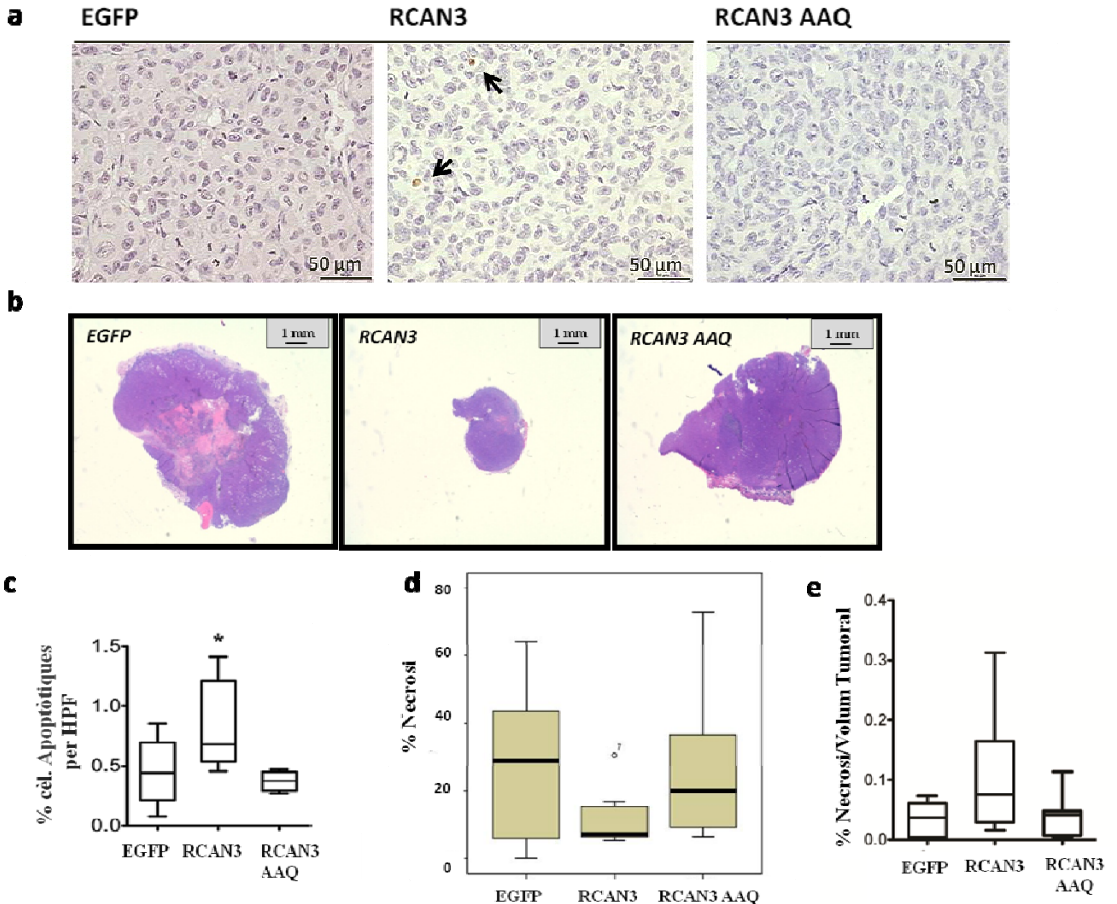


Figura 14. Els tumors RCAN3 presenten una reducció marcada de l'apoptosi cel·lular respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ mentre que la necrosi cel·lular és similar en tots els casos. Anàlisi de tumors EGFP RCAN3/ RCAN3 AAQ (n= 6, 7 i 7 tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ respectivament). a) Imatges representatives de l'assaig de TUNEL sobre mostres de tumors inclosos en parafina. Les imatges van ser capturades usant el microscopi Olympus BX51. El segment d'escala representa 50 µm. **b)** Tinció histològica d'hematoxilina-eosina per detectar regions necròtiques. Les imatges representatives de les diferents condicions assajades van ser capturades usant una lupa. El segment d'escala representa 1 mm. **c)** Quantificació del número de cèl·lules tumorals apoptòtiques per camp de gran augment en els tumors detectades per TUNEL. Es mostra la desviació estàndard i els *outliers* per a cada condició. **d)** Quantificació en percentatge de l'àrea necròtica tumoral basada en les imatges realitzades amb una lupa i amb el corresponent anàlisi manual d'imatge usant el programa Image J. El box plot va ser creat a partir del programa SPSS. **e)** Box plot de la relació entre el percentatge de l'àrea necròtica tumoral i el volum tumoral per a cada condició assajada.

Com s'observa en les imatges d'histologia i en la quantificació de l'apoptosi, el percentatge de cèl·lules apoptòtiques presents per camp en l'àrea tumoral és significativament major en els tumors RCAN3 que en els EGFP i RCAN3 AAQ (Figura 14 **a** i **c**). Per tant, es pot afirmar l'efecte de RCAN3 en la inhibició de la senyalització de Cn-NFATc en els tumors RCAN3 té com a conseqüència un increment en l'apoptosi cel·lular en aquests tumors. La disminució de la fracció cel·lular que prolifera, juntament amb l'increment de les cèl·lules apoptòtiques en tumors RCAN3 són factors claus que poden explicar, almenys en part, la disminució en el volum tumoral observat en els tumors RCAN3. No obstant, faltava determinar si la necrosi cel·lular en els tumors podia ser un factor que contribuís a les diferències de volum tumoral observats entre els diferents grups tumorals.

La necrosi apareix en els tumors de gran volum i en zones on no arriben suficients nutrients o oxigen per a mantenir les cèl·lules vives, normalment al cor del tumor. Les cèl·lules que moren, s'inflen i trenquen la membrana plasmàtica i alliberen tot el seu contingut sobre les cèl·lules adjacents. Immediatament s'inicia una resposta inflamatòria potencialment perjudicial per les cèl·lules circumdants. Les mostres que presenten necrosi cel·lular si es tenyeixen amb hematoxilina-eosina, s'observa que en la zona la tinció amb hematoxilina està poc representada mentre que amb l'eosina es tenyeixen la majoria de restes cel·lulars que encara no han estat fagocitades (Figura 14 **b**). L'hematoxilina és un colorant blau i bàsic que s'uneix a les estructures àcides de la cèl·lula com per exemple el DNA. L'eosina, en canvi, és un

colorant rosaci i àcid que s'uneix a proteïnes bàsiques com ara les proteïnes del citoesquelet i de la membrana plasmàtica.

Per a analitzar si la necrosi tumoral també estava relacionada amb les diferències de volum tumoral detectat en els diferents grups de tumors, es va realitzar una tinció amb hematoxilina/eosina de talls histològics de mostres dels tumors EGFP/ RCAN3/ RCAN3 AAQ incloses en parafina. Amb la col·laboració del Dr. A. Vidal del Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Bellvitge es van realitzar fotografies amb lupa que es van analitzar amb el programa d'anàlisi d'imatges ImageJ per a quantificar l'àrea necròtica tumoral relativa a l'àrea tumoral total. Els resultats mostren que no hi han diferències significatives en el nivell de necrosi per volum tumoral entre els tumors RCAN3, RCAN3 AAQ i EGFP (Figura 14 d) però, en el cas de RCAN3, el volum tumoral és menor que en els altres tumors, per tant cal tenir en compte el volum tumoral ja que varia en cada condició. Per a relativitzar el percentatge ocupat per àrea necròtica al volum tumoral i, per tant, per veure si l'àrea necròtica tumoral és proporcional al volum tumoral, es va calcular la relació entre els dos paràmetres (Figura 14 e). Els resultats obtinguts mostren que no hi han diferències significatives entre la relació àrea de necrosi/ volum tumoral entre els diferents tipus de tumors, fet que implica que a més volum, més percentatge ocupat per la necrosi.

En resum, les cèl·lules tumorals dels tumors RCAN3 presenten una disminució significativa de la proliferació cel·lular i un increment de l'apoptosi respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ mentre que en cap dels tres grups de tumors s'afecta el grau de necrosi tumoral present. Aquests resultats permeten concloure que el menor volum tumoral que presenten els tumors RCAN3 podria ser degut en part a la disminució de la proliferació cel·lular i l'increment de l'apoptosi de les cèl·lules tumorals.

4.6.6 La sobreproducció de RCAN3 inhibeix l'angiogènesi tumoral in vivo

La importància de la via Cn-NFATc és clara i ha estat àmpliament descrita tant en el desenvolupament embrionari com en la progressió tumoral, inclosos els TNBC (Freund et al., 2003; Chen Yao et al., 2007; Koch et al., 1992; Strieter et al, 1992; Hu et al., 2007). La inhibició específica de la via de Cn-NFATc en els tumors ortotòpics per sobreproducció de RCAN3 té com a conseqüència la generació de tumors

de menor volum i pes. Les cèl·lules tumorals que els formen presenten una taxa de proliferació cel·lular significativament menor que els tumors control o RCAN3 AAQ i a més, els tumors RCAN3 tenen un major índex de cèl·lules apoptòtiques. Sembla a ser, per tant, que la inhibició de NFATc altera el cicle cel·lular. Donat que RCAN3 inhibeix l'expressió gènica regulada dels NFATc del gen COX-2 tant en cèl·lules en cultiu com en els tumors RCAN3 es va creure oportú analitzar l'angiogènesi en els diferents grups de tumors ortotòpics. Cal fer constar que en el moment de l'extracció dels tumors ortotòpics, es va observar a nivell macroscòpic que els tumors RCAN3 no són tan sanguinolents com els control (EGFP) o RCAN3 AAQ. Una de les formes per a mesurar la disponibilitat de nutrients i d'oxigen de les cèl·lules tumorals és l'estudi de l'angiogènesi tumoral, ja que és a través de la xarxa vascular per on obtenen energia i nutrients aquestes cèl·lules. Per a saber si la sobreproducció de RCAN3 en les cèl·lules tumorals afecta a l'angiogènesi tumoral es van teyir seccions histològiques incloses en OCT amb anti-CD31 dels diferents grups tumorals. L'anticòs contra CD31 reconeix una glicoproteïna de la família de les immunoglobulines presents en la membrana plasmàtica i és el marcador per excel·lència de les cèl·lules endotelials vasculares però també està present a les cèl·lules mieloides, limfòcits T i B. Aquesta glicoproteïna intervé en les unions d'adhesió cèl·lula- cèl·lula homofíliques i/o heterofíliques. Tal com s'observa en la Figura 15 la IHC amb anti-CD31 mostra una inhibició dràstica de l'angiogènesi en els tumors RCAN3 respecte els EGFP i RCAN3 AAQ. Més concretament, s'observa que la densitat de vasos formats per cèl·lules endotelials presents en els tumors control EGFP i RCAN3 AAQ és clarament superior als presents en els tumors RCAN3 (Figura 15 **a**). A continuació, es va realitzar manualment la quantificació dels vasos intratumorals presents a cada grup tumoral de les preparacions histològiques analitzades amb anti-CD31 i mesurant-ne diferents paràmetres per buscar diferències fenotípiques quantificables. La quantificació de l'àrea de vasos per camp visual de gran augment (HPF) dona un resultat contundent: hi ha una inhibició d'aproximadament el 40 % en l'àrea mitjana dels vasos en els tumors RCAN3, en comparació amb els tumors control o RCAN3 AAQ (Figura 15 **b**). Per tant, dels resultats se'n conclou que RCAN3 inhibeix l'activitat de Cn vers els NFATc i com a resultat es produeix la inhibició de la senyalització dels NFATcs. En concret, la inhibició de l'expressió gènica del COX-2 i altres gens s'han relacionat de forma directa amb la inhibició de l'angiogènesi tumoral que s'observa en els tumors RCAN3.

Les cèl·lules tumorals estimulen l'angiogènesi secretant factors proangiogènics en el microambient tumoral, i entre ells majoritàriament

el VEGF (factor de creixement de les cèl·lules endotelials vasculars) (Hanahan *et al.*, 2011). Per a confirmar que l'efecte de la inhibició de l'angiogènesi observat en els resultats és intrínsec, és a dir, que es deu a la sobreproducció de RCAN3 en les cèl·lules tumorals i no al microambient tumoral, es va realitzar la quantificació per qPCR de l'expressió del gen *VEGF* en els tumors ortotòpics EGFP/ RCAN3/ RCAN3 AAQ. Com a control de la qPCR es va usar l'amplificació del gen constitutiu *HPRT1*. Els resultats demostren que la sobreproducció de RCAN3 té com a conseqüència una davallada significativa en l'expressió gènica de *VEGF* en els tumors RCAN3 respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ (Figura 15 c). Els resultats, doncs, corroboren els obtinguts anteriorment amb anti-CD31 en tumors RCAN3.

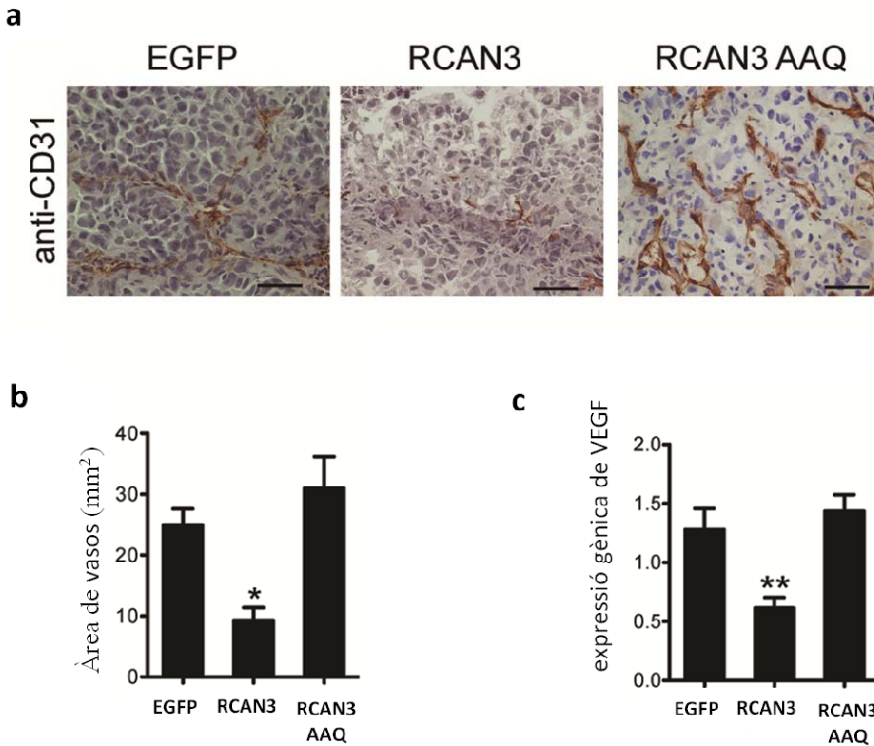


Figura 15. RCAN3 inhibeix l'angiogènesi tumoral en els tumors RCAN3. a) Imatges representatives de l'assaig d'immunohistoquímica amb anti-CD31, marcador de vasos sanguinis de cèl·lules endotelials, sobre mostres tumorals incloses en OCT. Les imatges s'han capturat amb el microscopi Olympus BX51 amb l'objectiu de 40x. El segment d'escala representa 100 μ m. Com a contrast nuclear s'ha usat hematoxilina. **b)** Quantificació manual de l'àrea tumoral de vasos en cada condició assajada (n=6, 7 i 7 en els tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ respectivament). RCAN3 produeix una davallada dràstica significativa en

l'àrea tumoral dels vasos en tumors RCAN3, amb $p \leq 0.05$ (*). c) qPCR per a la quantificació de l'expressió del gen proangiogènic *VEGF* en tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ. El gen constitutiu *HPRT1* s'ha usat com a control intern de la reacció de PCR. Hi ha una disminució significativa en l'expressió del *VEGF* en les cèl·lules que sobreproduïxen RCAN3, amb $p \leq 0.01$ (**).

El fet que RCAN3 afecti l'expressió gènica regulada pels NFATcs del COX-2 i del VEGF en les cèl·lules tumorals té com a conseqüència una afectació en una de les característiques pròpies de la progressió tumoral com és l'angiogènesi que pot ajudar a explicar les diferències observades en el creixement dels tumors RCAN3 respecte els EGFP i RCAN3 AAQ i que reafirma la importància de RCAN3 en la regulació de la via de senyalització Cn-NFATc en el TNBC.

4.6.7 La sobreproducció de RCAN3 disminueix la infiltració tumoral de cèl·lules polimorfonuclears inflamatòries en els tumors ortotòpics TNBC

La inhibició de l'angiogènesi tumoral observada en els tumors RCAN3 va desencadenar l'estudi d'altres característiques pròpies de la progressió tumoral. Una d'elles és la infiltració tumoral de cèl·lules immunitàries procedents de l'hoste, en aquest cas cèl·lules immunitàries del ratolí, com a resposta immunològica a la proliferació de les cèl·lules canceroses humanes transduïdes amb els lentivirus EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ. En funció de l'origen, la localització o la malignitat de les cèl·lules tumorals, aquesta infiltració de cèl·lules immunitàries pot estimular el creixement o la capacitat d'invasió del tumor ja que la presència en excés de factors proinflamatoris derivats de les cèl·lules immunes pot esdevenir contraproductiu i participar en la generació un microambient tumoral més propici per la progressió tumoral. D'entre les cèl·lules que formen part de l'infiltrat cel·lular immunitari hi ha els polimorfonuclears (PMN) que comprenen neutròfils, eosinòfils i basòfils. Més del 60% dels PMN correspon als neutròfils que, quan estan associats a una massa tumoral s'anomenen neutròfils associats a tumors (TAN). Altres tipus cel·lulars presents en l'infiltrat cel·lular són els macròfags (també anomenats macròfags associats a tumors (TAM)) entre d'altres.

Recentment s'han publicat diferents estudis que relacionen la infiltració de cèl·lules immunitàries amb l'angiogènesi, la progressió tumoral i la capacitat de metastasi (Bingle *et al.*, 2006; Coffelt *et al.*, 2015). Altres articles demostren que els PMNs, que són majoritàriament TANs, promouen el creixement del tumor primari en models animals de

càncer i que tenen efectes protumorals ja que estimulen l'angiogènesi tumoral incrementant la degradació de la matriu extracel·lular i inhibint la resposta immunitària (Pekarek *et al.*, 1995; Nozawa *et al.*, 2006; Youn and Gabrilovich, 2010). En el microambient tumoral, els PMNs constitueixen aproximadament un 0.1-0.4% de les cèl·lules presents en els tumors sòlids i els TAMs un 2-4 %. A més, s'ha descrit també que la IL-8 humana és capaç d'actuar de factor quimioattractiu per als PMN de ratolí (Asfaha *et al.*, 2013). Els TAM, degut a la participació en la secreció de factors de creixement tumoral com TNF- α i altres interleuquines pro-inflamatòries com IL-8 també estan implicats en la generació d'un microambient tumoral òptim per al creixement i desenvolupament del tumor, com ha estat descrit en diverses publicacions (Ono *et al.*, 1999; Varney *et al.*, 2002).

Per a estudiar l'infiltrat de cèl·lules immunes, concretament la població de PMN, en els diferents tipus de tumors es va realitzar una tinció amb hematoxilina-eosina de talls histològics dels tumors ortotòpics EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ inclosos en parafina. Aquesta tinció permet distingir fàcilment els nuclis cel·lulars ja que la càrrega negativa procedent del caràcter àcid del DNA nuclear adquireix un to blau fosc per interacció amb la hematoxilina. A més, gràcies a la peculiar morfologia nuclear multilobulada, és fàcil identificar les cèl·lules polimorfonucleades (PMN). La quantificació es va realitzar manualment comptant el nombre de cèl·lules PMN per HPF, evitant zones hemorràgiques i també zones necròtiques on hi ha una acumulació d'aquestes cèl·lules immunitàries. Les zones analitzades són les zones de massa tumoral on els PMN s'infiltra.

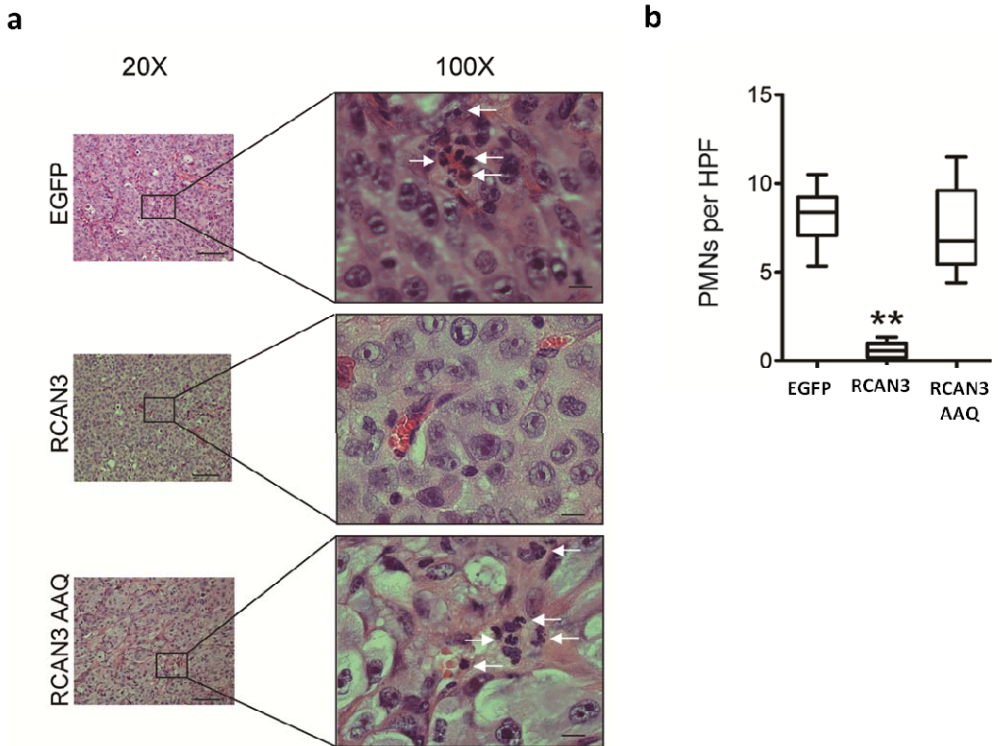


Figura 16. RCAN3 bloqueja de forma significativa la infiltració de cèl·lules polimorfonucleades en tumors RCAN3 en comparació amb els tumors EGFP i RCAN3 AAQ. **a)** Imatges representatives de mostres incloses en parafina tenyides amb hematoxilina- eosina. Les fletxes blanques assenyalen les cèl·lules polimorfonucleades infiltrades en la massa tumoral. Les imatges van ser capturades a 20x i 100x (imatges esquerra i dreta respectivament). Els segments d'escala corresponen a 50 μm (20x) i 5 μm (100x), respectivament. **b)** Quantificació de PMN per HPF en cada condició tumoral: control EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ representada en un *box plot* (n=6, 7, 7 tumors EGFP, RCAN3, RCAN3 AAQ respectivament). Els tumors que sobreprodueixen RCAN3 mostren una disminució significativa de PMN amb $p \leq 0.01$ (**).

Els resultats obtinguts evidencien que hi ha una presència de PMN diferencial entre els tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ. Així, en els tumors EGFP i RCAN3 AAQ hi ha múltiples PMN infiltrats (Figura 16 **a**) mentre que en les mostres dels tumors RCAN3 no se n'observen pràcticament (Figura 16 **a** i **b**). Per tant, RCAN3 afecta a la infiltració de PMN en la massa tumoral.

S'ha descrit que els TANs modulen el microambient tumoral i promouen la progressió tumoral induint la migració i la invasió de les cèl·lules tumorals (Tabaries *et al.*, 2015). A més, s'ha demostrat que la capacitat migratòria (o de reclutament) dels TANs depèn, entre d'altres factors, dels nivells de IL-8 secretats per cèl·lules tumorals de càncer de mama TNBC (Kaunisto *et al.*, 2015), fet que representa un nexa d'unió amb l'angiogènesi.

La dràstica reducció en l'angiogènesi tumoral i en el reclutament de PMN observada en els tumors RCAN3 permet suggerir que RCAN3 inhibeix la via de senyalització Cn-NFATc afectant d'aquesta forma el microambient tumoral. Vist que alguns tipus cel·lulars que constitueixen l'infiltrat cel·lular de PMN de ratolí són sensibles a l'alteració d'aquesta via i que els TAMs també s'han associat amb un increment de la progressió tumoral de les cèl·lules tumorals i també amb un mal pronòstic de la malaltia, es va decidir analitzar la població de TAMs en les mostres dels tumors ortotòpics TNBC. Per a la detecció dels TAM es va fer una primera tinció amb H-E que va mostrar clarament que no hi havien diferències significatives entre els diferents grups de tumors. Posteriorment, es va analitzar el nombre de TAMs per immunofluorescència (IF) amb anticossos contra la proteïna marcador de TAMs F4/80 de ratolí (Figura 17) en talls histològics dels tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ inclosos en parafina. F4/80 és un antigen localitzat en els macròfags de l'hoste que s'infiltra en els tumors formats per cèl·lules humanes com a resposta immunitària a la presència de les cèl·lules tumorals.

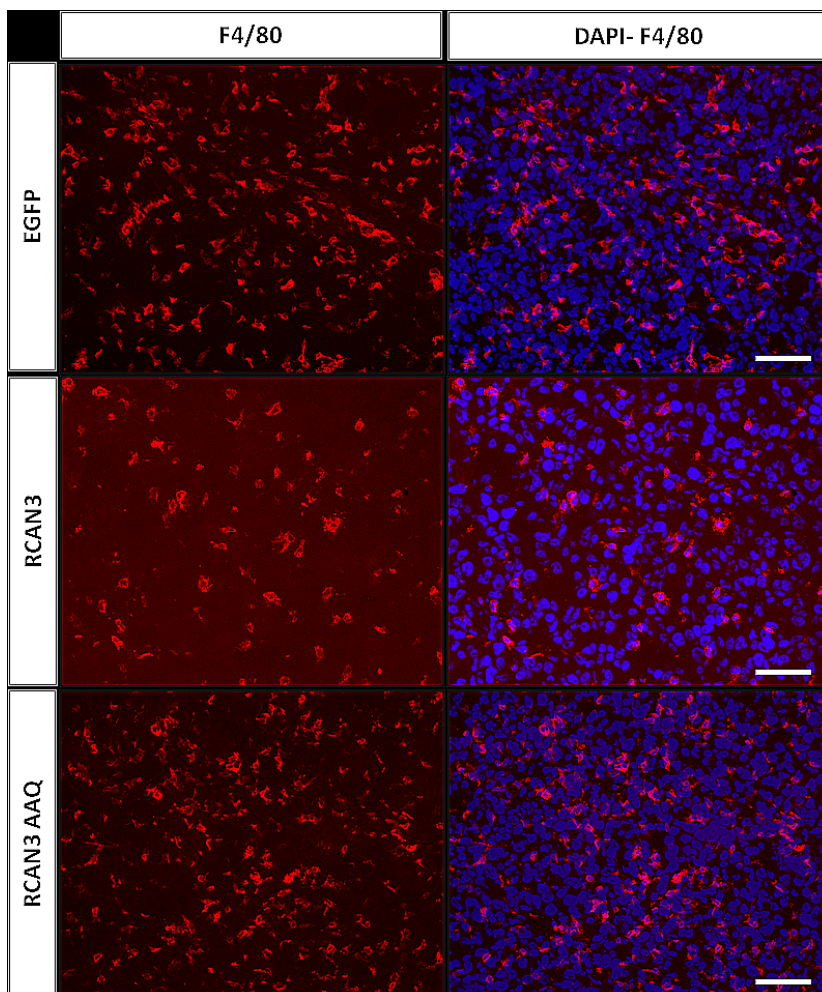


Figura 17. La inhibició de la via de Cn-NFATc no disminueix la presència de TAMs en la massa tumoral. Immunofluorescència anti-F4/80 de sobre mostres tumorals incloses en parafina en les condicions control (EGFP), RCAN3 i RCAN3 AAQ. Les mostres s'han tenyit amb DAPI i posterior muntatge amb Mowiol. Les imatges s'han adquirit amb el microscopi Olympus BX51 a 20x augments. Per a la captura d'aquestes imatges s'han evitat zones hemorràgiques i necròtiques. Els segments d'escala corresponen a 50 μ m. Aquesta Figura mostra els resultats obtinguts d'un experiment en el qual es van analitzar n=2, 3, 2 mostres per als tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ respectivament.

Les imatges de fluorescència suggereixen que no hi ha diferències en el infiltrat de TAMs entre els tumors que sobreproduïxen la proteïna RCAN3 i els grups control EGFP i RCAN3 AAQ (Figura 17) en les condicions assajades.

4.6.8 RCAN3 no sembla afectar la transició mesenquimo-epitelial (MET) en tumors ortotòpics TNBC *in vivo*.

La progressió tumoral cursa freqüentment amb un canvi fenotípic de les cèl·lules anomenat transició epiteli-mesenquimal (EMT). Això implica un canvi en l'expressió de marcadors epitelials (E-caderina per exemple) per marcadors de cèl·lules mesenquimals (Vimentina, Snail, Slug, N-cadherina, etc) associats a un estat més indiferenciat de les cèl·lules i a l'adquisició de noves capacitats com la migració cel·lular, la intravasació, la metàstasi i el creixement independent d'ancoratge entre d'altres (Yee *et al.*, 2010). L'adquisició de fenotips EMT està relacionat amb la carcinogènesi, invasió, metàstasi i mal pronòstic o baixa supervivència i un augment del risc de càncer recurrent en pacients amb diferents tipus de tumors sòlids com els tumors de mama, bufeta o colorectal (Hwajin Son *and* Aree Moon, 2010). El procés invers s'anomena transició mesenquima-epitelial (MET) i normalment en càncer succeeix quan la cèl·lula que ha aconseguit passar a corrent circulatori i via limfàtica arriba a un òrgan secundari on pot sobreviure. En aquest moment la cèl·lula requereix un fenotip més epitelial per a adherir-se al teixit i desenvolupar un focus metastàtic. La MET, doncs, es dona quan una cèl·lula amb un fenotip mesenquimal passa a tenir característiques epitelials expressant marcadors propis del fenotip epitelial com la E-cadherina.

Vist que la sobreproducció de RCAN3 sembla tenir efectes antitumorals, es va decidir analitzar el fenotip d' EMT i MET en les cèl·lules tumorals. Prèviament s'havia observat que les cèl·lules TNBC, de característiques altament indiferenciades i amb fenotip mesenquimal *per se*, no presentaven *in vitro* canvis en el fenotip cel·lular quan es sobreproduïa *EGFP*, *RCAN3* o *RCAN3 AAQ*. Ara es pretenia fer el mateix anàlisi però emprant les mostres tumorals. Amb aquesta finalitat, es van realitzar un seguit d'anàlisis per IHC i IF sobre talls histològics de les mostres de tumors *EGFP*, *RCAN3* i *RCAN3 AAQ* incloses en parafina per a detectar les proteïnes E-cadherina (marcador epitelial), Vimentina i N-cadherina (marcadors mesenquimals).

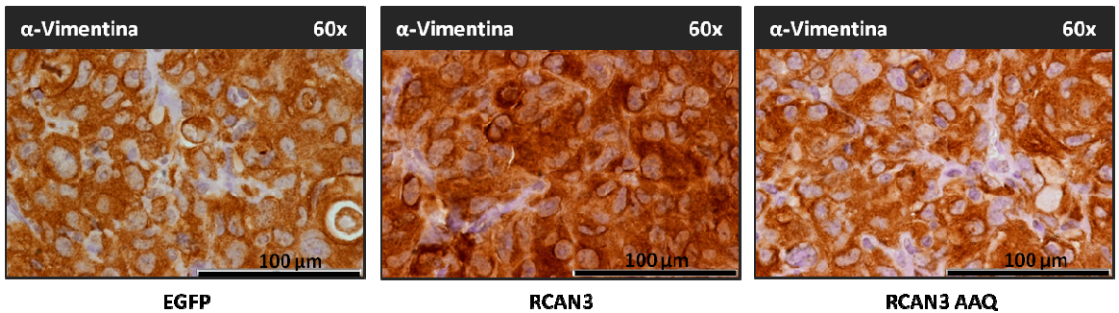


Figura 18. RCAN3 no sembla afectar la transició mesenquimo-epitelial en els tumors ortotòpics RCAN3 de TNBC humans. Imatges representatives de l'assaig d'IHC sobre mostres dels tumors (n= 3, 3, 3 per tumors EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ respectivament) incloses en parafina i analitzades amb anti-vimentina. Les imatges es van capturar a 60x i es va usar l'hematoxilina com a contrast nuclear. Els canvis en intensitat s'atribueixen a variabilitats inherents a la tècnica. El segment d'escala representa 100 μm .

Els resultats indiquen que no hi ha marcatge en les cèl·lules tumorals de la E-caderina i N-caderina (imatges no mostrades). Respecte a la vimentina, el marcatge en tots els casos és de membrana i intens (Figura 18). El criteri d'avaluació de l'expressió de la vimentina per IHC és qualitativa, és a dir, s'observa si hi ha presència o no de la proteïna independentment de la intensitat observada. Per tant, no s'observen canvis significatius en l'expressió d'aquestes proteïnes entre les diferents condicions tumorals assajades (control o GFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ) en les nostres condicions experimentals. Tot i la funció descrita pels NFATcs com a factors que promouen la migració cel·lular en càncer de mama (Jauliac *et al.*, 2002), els resultats preliminars obtinguts per sobreproducció de RCAN3 suggereixen que no afecten a la transició mesenquimo-epitelial de les cèl·lules MDA-MB-231 en les diferents condicions tumorals *in vivo*.

4.6.9 Els tumors RCAN3 presenten una disminució dels marcadors premetastàtics ID1 i/o S100A4

Els resultats obtinguts fins el moment suggereixen que els tumors RCAN3 inhibeixen la progressió tumoral inhibint característiques pròpies dels tumors com la proliferació, l'apoptosi cel·lular, l'angiogènesi i el reclutament de cel·lular de TANS. A continuació, tot i que no es van observar canvis en els tumors RCAN3 respecte els EGFP i RCAN3 AAQ en els estudis preliminars fets en transició mesenquimo-epitelial, es va decidir

analitzar altres marcadors relacionats amb la capacitat tumorigènica intrínseca de les cèl·lules tumorals com ara S100A4 i ID1.

La família dels inhibidors d'unió al DNA (ID) és una família de proteïnes que tenen en la seva seqüència aminoacídica una regió amb un domini de dimerització hèlix-loop-hèlix (HLH) però, a diferència de les proteïnes HLH, les ID no contenen el domini d'unió al DNA i per tant s'uneixen a altres proteïnes com les HLH inhibint-ne la seva unió al DNA i la seva activitat transcripcional. Les proteïnes ID, doncs, actuen com a reguladores negatives de l'expressió gènica de proteïnes diana. S'han descrit diferents processos cel·lulars en els quals intervenen activament com en la diferenciació i destí cel·lular. També s'han implicat en la metastasi en càncer de pulmó i de mama i s'ha suggerit usar aquestes proteïnes com a dianes terapèutiques en les teràpies antitumorals (Fong *et al.*, 2004). Concretament, s'ha descrit que la sobreexpressió de *ID1* incrementa la capacitat de metastasi i en canvi, la seva inhibició, la disminueix (Gupta *et al.*, 2007).

Pel què fa a la família de les proteïnes S100, són proteïnes de baixa massa molecular que s'han identificat a vertebrats i que presenten dos llocs d'unió al calci que tenen conformació tipus *EF hand*. Tot i ser estructuralment molt similars, els 21 membres, com a mínim, de la família no tenen la mateixa funció (no son intercanviables) i s'expressen en diferent proporció depenent del tipus cel·lular i condicions cel·lulars. Aquesta és una família que s'ha associat com a marcador en molts tipus de càncer. La desregulació de múltiples membres de la família S100 és una característica comuna dels càncers humans i on cada tipus de càncer mostra un únic perfil i signatura de proteïnes S100 (Bresnik *et al.*, 2015). D'entre elles, la proteïna S100A4 és la que s'ha relacionat més amb el càncer de mama i s'ha descrit com a proteïna que incrementa la capacitat de migració cel·lular i metastàtica quan s'expressa en les cèl·lules tumorals (Davies *et al.*, 1996). També cal destacar que l'expressió gènica del *S100A4* està regulada pels NFATc.

Per a l'estudi d'aquestes proteïnes en les mostres dels tumors ortotòpics EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ s'ha optat per a fer IHC sobre les mateixes mostres tumorals incloses en parafina amb anticossos específics contra ID1 i S100A4. Ambdues proteïnes s'espera trobar-les en grans quantitats en cèl·lules tumorals agressives i potencialment metastàtiques, característiques molt habituals en TNBC. Els resultats de la IHC mostren una reducció significativa en l'abundància d'ID1 i de S100A4 en els tumors RCAN3 en comparació a la dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ (Figura 19).

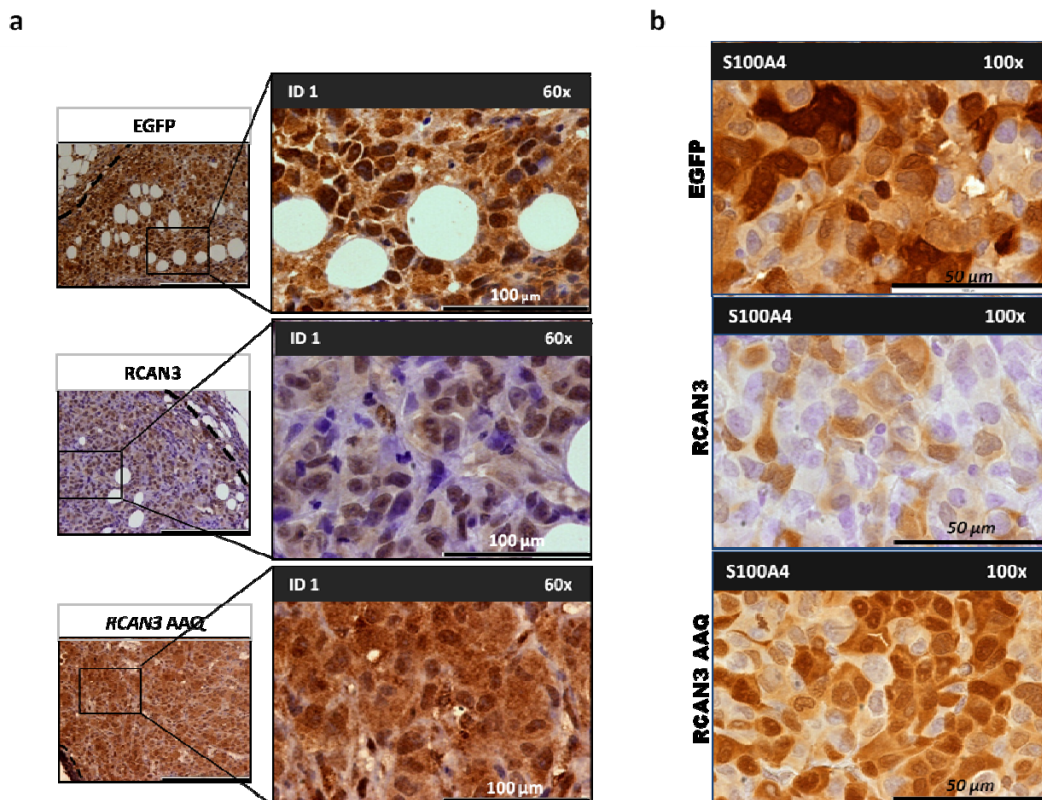


Figura 19. Els tumors RCAN3 presenten una disminució significativa de la producció dels marcadors metastàtics com ID1 i S100A4 respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ. Imatges representatives d'IHC de seccions histològiques de mostres dels tumors EGFP/RCAN3 RCAN3 AAQ incloses en parafina analitzades amb anti-ID1 (a) o anti-S100A4 (b). Totes les imatges es van capturar a 60x en un microscopi de camp clar (Olympus BX51). a) Les línies discontinües limiten el marge tumoral en la glàndula mamària. Els segments d'escala corresponen a 500 μm i a 100 μm respectivament b) Els segments d'escala corresponen a 50 μm.

D'aquests resultats se'n pot concloure que la sobreproducció de RCAN3 en tumors ortotòpics TNBC inhibeix la producció dels marcadors de metastasi ID1 i S100A4 *in vivo*. A més, també es pot concloure que aquest efecte observat en RCAN3, que no es detecta en RCAN3 AAQ, és resultat de la mutació del motiu PxlXIT-like de la RCAN3 que competeix amb el PxlXIT dels NFATc per interaccionar amb Cn. Per tant, les RCAN3 tenen un clar efecte metastàtic mediat per la inhibició de la senyalització de Cn-NFATc.

Per aprofundir en l'efecte de les RCANs en la metastasi, es va dissenyar un experiment de metastasi experimental en el qual cèl·lules MDA-MB-231 de càncer de mama humana eren transduïdes amb les construccions lentivirals que codifiquen per la sobreproducció de *EGFP*, *RCAN3*, o *RCAN AAQ*. Per a obtenir una població cel·lular homogènia es van seleccionar les cèl·lules segons la fluorescència de la EGFP per citometria de flux i es van deixar créixer per incrementar el nombre de cèl·lules. Posteriorment es van injectar 2 milions de cèl·lules/animal a través de la vena de la cua (veure'n protocol a l'apartat 3.6.1.8 de Materials i Mètodes). D'aquesta manera les cèl·lules arriben directament al cor i seguidament als pulmons on poden quedar-se retingudes i formar nòduls metastàtics que poden veure's macroscòpicament amb una lupa adequada al cap de varies setmanes. Per aquest experiment es va comptar amb l'ajuda de la doctora Àngels Fabra (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, Barcelona). Malauradament, els resultats obtinguts no mostraven producció de focus metastàtics en les cèl·lules MDA-MB-231 fet que indica que les cèl·lules presentaven algun problema de deriva gènica i calia iniciar de nou el procediment amb una línia MDA-MB-231 per tal d'obtenir resultats sobre la capacitat inhibidora de la metastasi per sobreproducció de RCAN3. Per tant, resta pendent acabar de concloure aquest aspecte del treball.

4.7 EL PÈPTID DE RCAN3 QUE INCLOU EL SEU MOTIU PxlxIT, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, INHIBEIX LA SENYALITZACIÓ DE Cn-NFATc *in vitro*

Una de les conclusions principals derivada dels resultats obtinguts prèviament de la sobreproducció de la proteïna RCAN3 tant *in vitro* (en cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468), com *in vivo* (en el model ortotòpic de TNBC humana) és que la capacitat del motiu PxlxIT-like de RCAN3 per competir amb el PxlxIT dels NFATc per unir-se a la Cn és la responsable de la inhibició de la senyalització de Cn-NFATc demostrada *in vitro*, així com també dels efectes antitumorals observats en els tumors RCAN3 respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ, ja que la mutació de tres aminoàcids conservats en el motiu PxlxIT-like en la proteïna mutant RCAN3 AAQ fa que no es reproduïxin els efectes funcionals de RCAN3. En aquest moment, doncs, es va hipotetitzar que la sobreproducció d'un pèptid que tingués el motiu PxlxIT, el pèptid CIC de RCAN3, hauria de ser suficient per a reproduir l'efecte antitumoral de RCAN3.

Per tal de determinar el potencial terapèutic del pèptid CIC de RCAN3, de 25 aminoàcids, es va dissenyar un lentivirus que codifiqués per a la proteïna EGFP fusionada al pèptid CIC de RCAN3 que correspon als residus aminoacídics 178-210 de RCAN3, LGPGEKYELHAGTESTPSV¹⁷⁸⁻²¹⁰VHVCESETEEEEE, i al què anomenarem a partir d'ara com a EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figura 20). Com a control s'utilitzà un vector amb la EGPF sola.

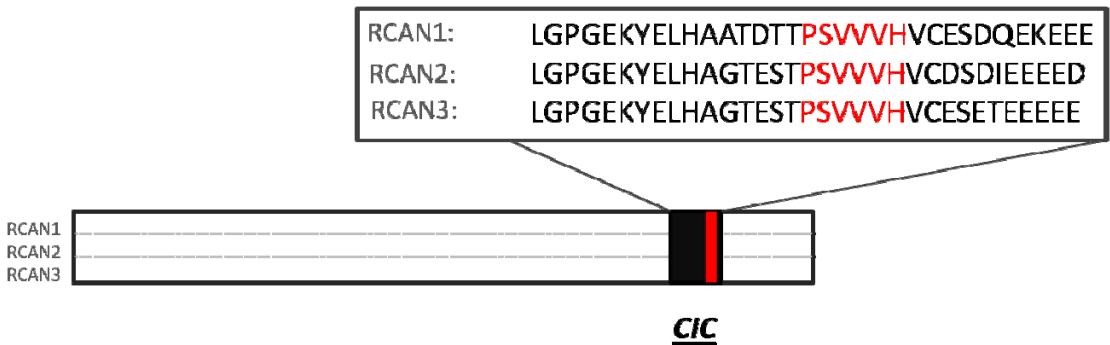


Figura 20. Conservació de la seqüència del pèptid CIC de les proteïnes RCAN humanes. En vermell es mostra el motiu PxlIT-like funcional de les RCAN d'unió a Cn (Aubareda et al., 2006; Mulero et al., 2007, Mulero et al., 2009). La seqüència subratllada correspon als aminoàcids inclosos en el pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.

Per a poder associar els possibles efectes fenotípics de la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ a la inhibició de la senyalització de Cn-NFATc es va dissenyar també un lentivirus que codifica per a la EGFP fusionada al pèptid CIC però que incorpora les mateixes mutacions del motiu PxlIT-like presents en RCAN3 AAQ (V197A V198A H199Q) i que s'anomenarà a partir d'ara com a EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ. Aquesta proteïna mutant, com s'ha mostrat anteriorment en assajos de *pull down* (Figura 1), impedeix quasi completament la interacció de RCAN3 amb Cn. En principi, la hipòtesi de treball plantejada era que el pèptid CIC tindrà activitat antitumoral en tumors TNBC mentre que EGFP i RCAN3 AAQ no. Amb aquesta aproximació experimental s'espera analitzar l'efecte antitumoral de només la seqüència aminoacídica del pèptid CIC limitant l'efecte de la presència d'altres seqüències presents en la proteïna RCAN3 que també participen en la modulació de la interacció de RCAN3 a Cn.

L'ús de la proteïna EGFP per a fusionar-la amb el pèptid, a part de facilitar-ne la detecció per fluorescència, respon a un motiu simple i és donar un major volum i mida al pèptid per a que aquest pugui adoptar una conformació terciària adequada per a la interacció amb altres proteïnes.

Una vegada obtinguts els lentivirus (veure'n el protocol a l'apartat 3.2.2 de Materials i Mètodes), es va analitzar en cultius cel·lulars si el pèptid CIC inhibia la senyalització de Cn-NFATc en les línies de TNBC humà MDA-MB-231 i MDA-MB-468 i comprovar si els resultats obtinguts reproduïen aquells obtinguts amb els lentivirus EGFP, RCAN3 i RCAN3 AAQ *in vitro*.

4.7.1 La sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ disminueix la translocació nuclear de NFATC2 en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*

El primer anàlisi que es va fer del pèptid EGFP-R3178-210 en cèl·lules TNBC per determinar el seu efecte sobre la via Cn-NFATc fou concretament l'anàlisi de la capacitat d'inhibir la translocació dels NFATc de citosol a nucli. Per a això es van transduir cèl·lules MDA-MB-231 amb els lentivirus EGFP, EGFP-R3178-210 i de EGFP-R3178-210AAQ i es van estimular amb ionomicina i calci per activar la via de senyalització Cn-NFATc. Seguidament es va realitzar una immunocitofluorescència (ICF) amb un anticòs específic anti-NFATc2 humà per a detectar-ne la seva localització subcel·lular.

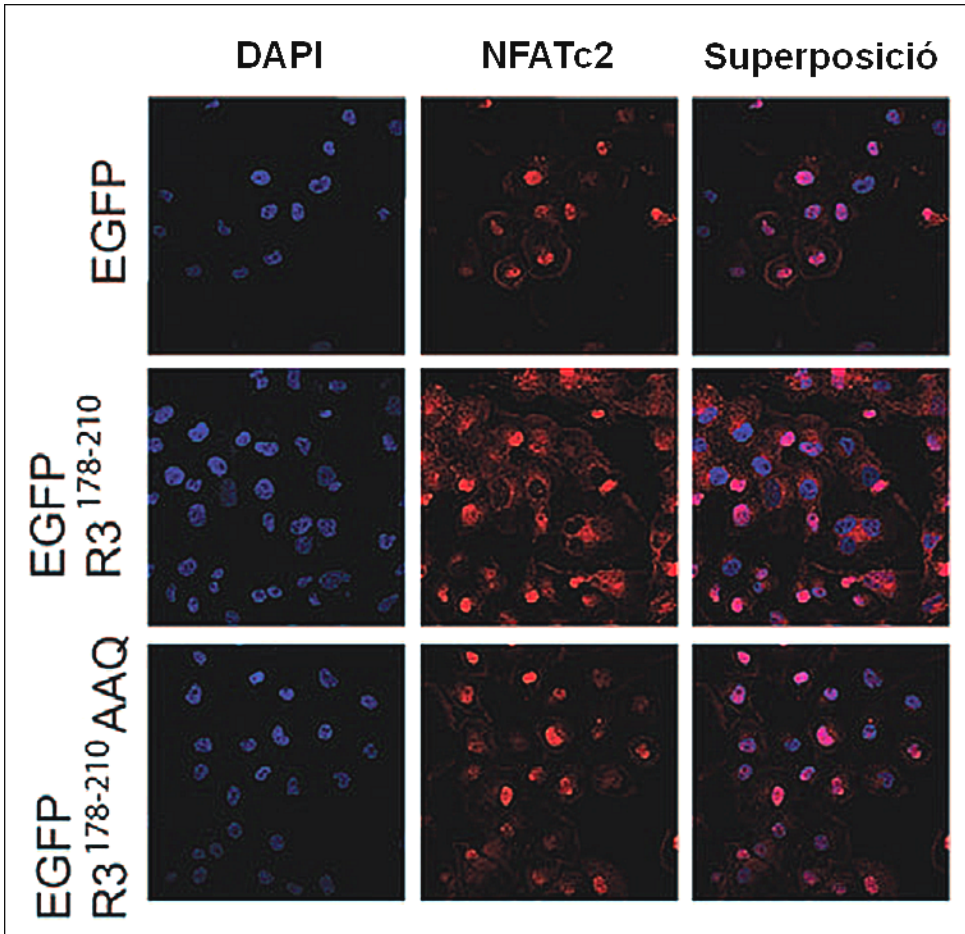


Figura 21. La sobreproducció de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ afecta la translocació dels NFATc a nucli en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*. Imatges representatives d'immunocitofluorescència sobre cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes (MOI= 20) amb els lentivirus EGFP/ R3¹⁷⁸⁻²¹⁰/ R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ. Seguidament van ser seleccionades per citometria segons la fluorescència de EGFP i posteriorment estimulades amb ionomicina i calci durant 30 min. Per a la detecció de NFATc es va usar un anticòs específic anti-NFATc2 (1:200, ARP38988 AVIVA; en vermell) i una tinció nuclear amb DAPI (blau). Les imatges van ser capturades en un microscopi de fluorescència LEICA.

El marcatge de NFATc2 en les cèl·lules MDA-MB-231 control (EGFP) és completament nuclear, fet que indica que l'estimulació és suficient per a activar la via i per a provocar la translocació dels NFATc a nucli (Figura 21). En la condició de sobreproducció de RCAN3, en canvi, es poden veure nuclis sense NFATc2 i una acumulació de NFATc2 en el citoplasma. Per últim, en les cèl·lules transduïdes amb EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ es detecta NFATc2 també majoritàriament a nucli igual que succeeix a la

condició control, fet que demostra que la via Cn-NFATc està activa. D'aquests resultats se'n pot concloure que en una situació de sobreproducció de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ es produeix en condicions d'estimulació de la via de Cn-NFATc una inhibició de la translocació dels NFATcs de citosol a nucli, fet que indica que els NFATcs no estan activats per Cn. Això no es reproduïx en la condició de sobreproducció de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ.

La sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ disminueix l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*. Vist que la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix la translocació dels NFATc a nucli, per tal de verificar d'altres formes que aquest pèptid està inhibint la via de Cn-NFATc, es va analitzar el nivell d'activitat transcripcional dels NFATc. Per a fer-ho es va decidir realitzar assajos amb el gen reporter de la luciferasa sota el control d'un promotor regulat pels factors de transcripció NFATc en cèl·lules TNBC humanes MDA-MB-231 i MDA-MB-468 i així poder determinar el grau d'activació dels NFATc. Les cèl·lules es van transfectar amb el vector 9xNFAT-luc, gen regulat per un promotor que conté 9 caixes d'unió dels NFATc. Com a control intern de la transfecció les cèl·lules es cotransfecten amb luciferasa renilla. Posteriorment les cèl·lules es van transduir amb els lentivirus EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ (a diferents concentracions de lentivirus, concretament a una MOI de 20, 10, 5 i 2,5 en les condicions EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ). A les 12 h va afegir l'estímul de ionomicina, clorur de calci i PMA a les cèl·lules per a activar la via Cn-NFATc i quantificar, una vegada afegida la luciferina, l'activitat luciferasa (veure'n secció 3.5.7 de Materials i Mètodes).

Mitjançant transferència de western de les diferents mostres tumorals es van analitzar amb l'anticòs anti-EGFP els nivells de proteïna produïda en cada condició.

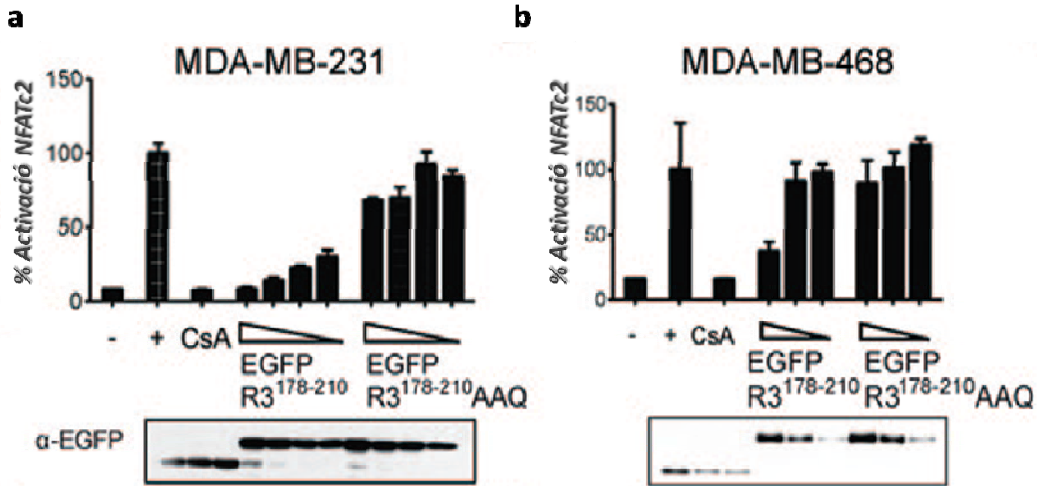


Figura 22. El pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules de TNBC humanes MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*. Assaig del gen reporter de la luciferasa 9xNFAT-luc en cèl·lules humanes TNBC MDA-MB-231 (a) i MDA-MB-468 (b) transduïdes amb R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ. (-) sense estimulació; (+) estimulades amb I α /PMA/CaCl₂; (CsA) estimulades amb I α /PMA/CaCl₂/CsA. Es considera un nivell del 100% a l'activació dels NFATc en cèl·lules estimulades amb ionomicina/PMA/CaCl₂. Els resultats són representatius de tres assajos independents i per triplicat. Els resultats mostrats es representen com a \pm SEM. L'expressió de cada proteïna en cada condició assajada es va comprovar per transferència de western usant un anticòs anti-EGFP, mostrada en els panells inferiors a les gràfiques.

Els resultats de producció de luciferasa mostren que l'activitat transcripcional dels NFATc es redueix marcadament quan incrementa la concentració de pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ a les mostres, és a dir, a major concentració de pèptid, menor activitat dels NFATc (Figura 22). La disminució de concentració de EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ quedà palès en l'anàlisi realitzat de les mostres per transferència de western i anti-EGFP. En canvi, les cèl·lules que sobreproduïxen el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ mantenen un nivell similar d'activació dels NFATc que no s'afecta a diferents concentracions de pèptid present en les mostres (Figura 22). Per tant, aquests resultats permeten concloure que els aminoàcids 197-199 del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ són essencials per a la unió a Cn i la inhibició de la via Cn-NFATc, ja que el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix no només la translocació dels NFATcs a nucli sinó l'activitat promotora dels NFATc en cèl·lules TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*.

4.7.2 El pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix la producció de proteïnes codificades per gens regulats pels NFATc com COX-2 en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*

La inhibició de RCAN3 inhibeix l'expressió de gens diana regulats pels NFATc. Per tant, el primer per confirmar era si el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ també té aquesta capacitat d'inhibir gens dependents de NFATc com COX-2, IL-8 i CSF-2. Per a fer-ho es va analitzar la capacitat del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ per inhibir la producció de la proteïna COX-2. Això es va fer mitjançant l'anàlisi per transferència de western amb anti-COX-2 en cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb les construccions lentivirals EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ a diferents concentracions de lentivirus (MOI de 20, 10 5 i 2,5) i posteriorment estimulades amb calci, ionomicina i PMA (i amb tractament amb CsA en la condició control).

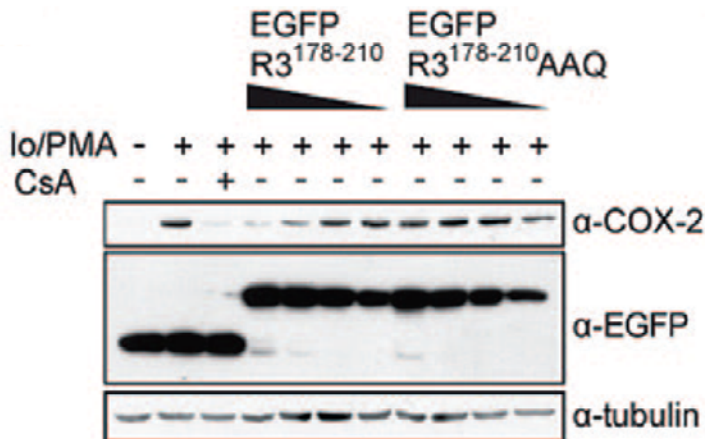


Figura 23. La sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix la producció de COX-2 en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*. Assaig de dosi-dependència entre l'expressió de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ i COX-2 analitzat per transferència de western amb anti-COX2 i anti-EGFP en cèl·lules MDA-MB-231. Com a control de càrrega es va usar la tubulina. Els lentivirus es van transduir a diferents MOI (20, 10, 5 i 2,5 respectivament) i posteriorment es van estimular les cèl·lules amb calci, ionomicina (Io) i PMA. Com a control d'inhibició de la via Cn-NFATc es va usar l'estímul de calci en presència de CsA. (-) sense estimulació, (+) amb estimulació.

La transducció de les cèl·lules MDA-MB-231 amb les dos construccions lentivirals usant MOIs diferents generen, efectivament, quantitats diferents de proteïna de fusió, tant EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ com EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ, proporcionals a la quantitat de lentivirus transduïda (Figura

23, anti-EGFP) mentre que els nivells proteics de tubulina detectats indiquen que la quantitat de proteïna total carregada en cada carril és similar entre les diferents condicions assajades, de manera que aquestes variacions en la quantitat de proteïnes de fusió derivades de la transducció no pot ser deguda a variacions en la càrrega de proteïna total en les mostres. Respecte a l'efecte del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sobre el nivell de proteïna de COX-2, es pot observar (Figura 23, carrils 4-8) com la quantitat de COX-2 varia de forma inversament proporcional a la quantitat de proteïna EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ present a la mostra. Pel contrari, la producció del pèptid mutat, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ, no presenta cap efecte sobre la producció de COX-2 ja que el nivell de proteïna es manté constant en tots els carrils corresponents a les mostres que sobreproduïxen EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ (Figura 23, carrils 8-11) i és similar al nivell de COX-2 observat en les mostres no transduïdes estimulades (Figura 23, carril 2). En el control negatiu, en el qual s'ha afegit un tractament amb CsA previ a l'estimulació de la via amb calci, es pot observar com el nivell de COX-2 és pràcticament indetectable, fet que confirma la necessitat de l'activació de la via Cn-NFATc, i concretament l'activació dels NFATc, per a la inducció del gen COX-2 i posterior producció de la proteïna (Figura 23, CsA, carril 3).

Dels resultats se'n pot concloure que el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix la senyalització dels NFATc dependent de Cn i com a conseqüència es produeix una inhibició en la inducció de la producció de COX-2, proteïna codificada per un gen diana dels NFATcs. Aquest efecte és exclusivament degut a la competició del motiu PxlIT-like de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ amb el motiu homòleg present en els NFATc ja que en el pèptid no hi ha cap altra seqüència capaç d'inhibir la senyalització dels NFATc.

4.7.3 La inhibició de la via de senyalització de Cn-NFATc incrementa la migració cel·lular en la línia cel·lular de càncer de mama humà MDA-MB-231 *in vitro*

Donat que la producció de COX-2 s'inhibeix en presència d'alts nivells del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i que COX-2 està implicada en la capacitat migratòria de les cèl·lules, es va decidir analitzar la capacitat de migració de cèl·lules TNBC MDA-MB-231 transduïdes amb els lentivirus EGFP, EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ mitjançant un assaig de tancament de ferides. Les cèl·lules es van transduir amb els lentivirus i, després de ser seleccionades per FACS (segons la fluorescència de la EGFP) es van estimular amb ionomicina, calci i PMA per a activar-ne la via Cn-NFATc. Els temps d'anàlisi en el tancament de les ferides usats va ser de 0, 4 i 12

h (Figura 24). Les imatges es van capturar de forma manual en cinc zones de cada ferida i en dues ferides per cada condició. La quantificació es va fer mitjançant el software d'imatge ImageJ. Es va mesurar l'amplada de la ferida en cada imatge i se'n va fer la mitja per cada ferida i condició. Es va considerar un tancament del 0% a l'amplada total de la ferida en el moment 0 h.

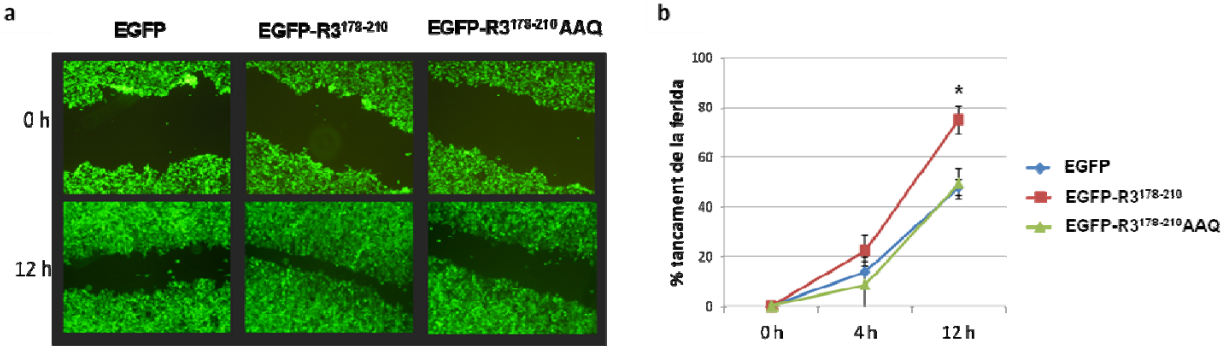


Figura 24. La sobreproducció d'EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ incrementa la migració de cèl·lules MDA-MB-231. a) Imatges representatives i b) la corresponent quantificació de l'assaig de tancament de ferida en cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb els lentivirus EGFP, EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ i posteriorment seleccionades per FACS i estimulades amb ionomicina, calci i PMA. Es van analitzar per duplicat 3 zones per cada ferida i condició a les 0, 4 i 12 h d'experiment. Els resultats es mostren com la mitja ±SEM, amb (*) p<0.05. Les imatges van ser capturades amb un microscopi de fluorescència a 20x.

En la condició control, així com en la condició EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ, 12 h després de la generació de la ferida aquesta ha estat tancada en un 50 %. Aquest percentatge incrementa fins al 75 % aproximadament en la condició de sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. El resultat tot i que no era esperat és clar i significatiu; la sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ incrementa la migració de les cèl·lules MDA-MB-231 a les 12 h després de la realització de la ferida. No obstant cal repetir l'assaig ja que només s'ha realitzat dues vegades.

4.8 EFECTE ANTITUMORAL DEL PÈPTID R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ EN TUMORS ORTOTÒPICS DE TNBC *in vivo*

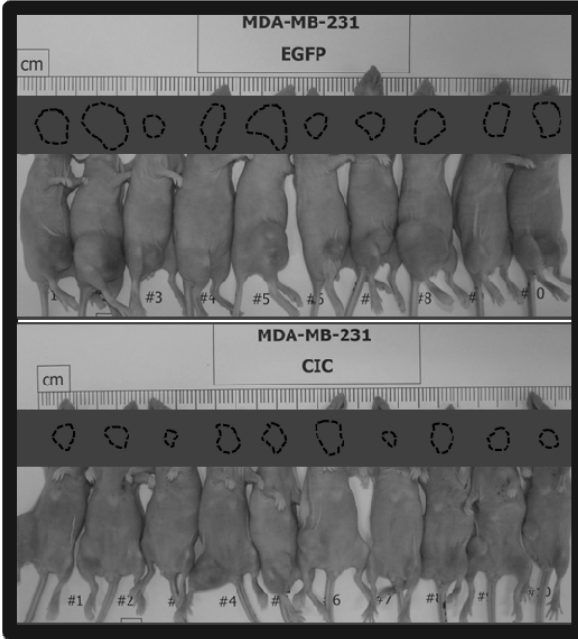
Els resultats obtinguts *in vitro* amb la sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ van en la mateixa direcció que els obtinguts amb la proteïna RCAN3 sencera en quant a la seva efectivitat en inhibir la via de senyalització de Cn-NFATc, però no pel què fa a la capacitat de migració cel·lular. Per a comprovar que l'efecte del pèptid és funcional *in vivo*, es va decidir realitzar experiments de formació de tumors ortotòpics de càncer de mama triple negatiu humà en ratolins BALB/c. Amb aquesta finalitat es van transduir les cèl·lules TNBC humanes MDA-MB-231 amb lentivirus que sobreprodueixen EGFP i EGFP-R3⁷⁸⁻²¹⁰ (amb una MOI de 20). Donat que l'efecte observat amb EGFP era molt similar a l'obtingut amb EGFP-R3⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ es va decidir només generar tumors que sobreexpressessin EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Per a l'obtenció del model ortotòpic, es van injectar 2 milions de cèl·lules, transduïdes amb els lentivirus corresponents en el teixit adipós associat a la glàndula mamària engonal dreta (per a més detalls consultar l'apartat 7.2.2 de Materials i Mètodes). Els tumors generats a partir d'ara seran anomenats com a tumors EGFP (control) i tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ respectivament per a facilitar-ne la descripció.

4.8.1 Els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten un menor volum tumoral que els tumors EGFP

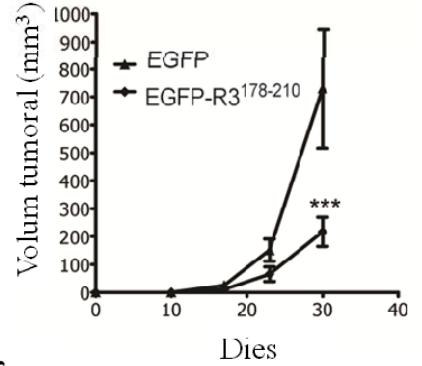
Per a analitzar els efectes de la sobreproducció de la proteïna de fusió EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en la progressió tumoral es va realitzar un seguiment dels animals i del desenvolupament dels tumors. Amb aquest objectiu, els animals d'experimentació es van supervisar bisetmanalment, de la mateixa manera que se'n va enregistrar el pes i les dimensions dels tumors ortotòpics de mama en creixement en cada condició assajada. Els resultats obtinguts mostraren que els animals injectats amb les cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb els lentivirus que produïen el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (CIC a la Figura 25) presentaven un menor volum tumoral en comparació amb les condicions control (Figura 25). Aquest resultat es pot observar macroscòpicament, amb unes diferències òbvies en les dimensions dels tumors (limitades per una línia discontinua que ressegueix el contorn del tumor) tot i la variabilitat associada a un experiment d'aquestes característiques (Figura 25 a). La quantificació del volum permet donar significança estadística a les diferències observades (Figura 25 b). En el cas del pes tumoral, les diferències no són

significatives però si que hi ha una tendència a la disminució del pes del tumor en la condició de sobreproducció del pèptid (Figura 25 c).

a



b



c

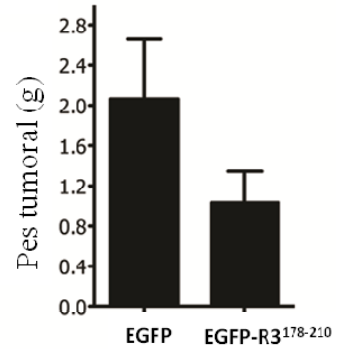


Figura 25. Els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten un menor volum tumoral que els tumors EGFP control. Es van transduir cèl·lules MDA-MB-231 amb les construccions lentivirals EGFP i pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ a MOI 20. D'aquestes cèl·lules se'n van injectar 2×10^6 al teixit adipós de la mama engonal dreta (model *in vivo* ortotòpic) de ratolins BALB/c. Es va seguir el creixement tumoral bisetmanalment mesurant-ne els diàmetres. L'extracció de mostres es va fer després del sacrifici. a) Imatge dels animals on es visualitzen els tumors crescuts en les condicions control (EGFP) i sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (CIC en la Figura). La línia discontinua ressegueix el contorn dels tumors ortotòpics. b) Corbes de creixement del volum tumoral al llarg d'un mes. Els resultats es presenten com la mitjana \pm SEM. *** $p < 0.001$. c) Pes tumoral de cada condició assajada. Els pesos dels tumors es representen com la mitja \pm SEM.

4.8.2 Els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una major inhibició de la translocació nuclear de NFATc que els tumors EGFP

Per a comprovar si la via Cn-NFATc està inhibida en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ es va analitzar la localització subcel·lular dels NFATc en els tumors EGFP i EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Amb aquest objectiu es va realitzar una IHC anti-NFATc2 humà. D'aquesta manera es pot observar la localització subcel·lular de NFATc2 o, el què és el mateix, si la translocació a nucli d'aquest factor de transcripció està o no inhibida en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en comparació amb els tumors EGFP (control). En els resultats obtinguts, tot i ser qualitius, mostren que els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten, com en el cas dels tumors RCAN3, una reducció en l'abundància del NFATc2 en comparació als tumors EGFP control. A més, s'observa que la sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ redueix marcadament els nivells proteics de NFATc2 localitzats a nucli en comparació amb la condició control, en la qual es pot veure un intens marcatge de NFATc2 en els nuclis de les cèl·lules tumorals (Figura 26 a). Per tant, aquests resultats indiquen que la sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix la translocació de NFATc2 a nucli en els tumors TNBC generats.

Els NFATc2 inactius o fosforilats romanen al citoplasma, on teòricament s'acumulen. En els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ s'observa una proporció més igualada de NFATc entre nucli i citosol mentre que la proporció entre ambdues localitzacions en els tumors EGFP creix considerablement ja que es localitzen els NFATc de forma predominant a nucli (Figura 26 a).

Donada la marcada reducció dels nivells proteics de NFATc2 en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ es va decidir mirar l'abundància d'aquest factor de transcripció a nivell global en el tumor mitjançant una transferència de western i posterior anàlisi amb anti-NFATc2 d'extractes de proteïna procedents dels tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Com a control positiu es va usar un extracte total de proteïnes de cèl·lules Jurkat T estimulades amb calci i ionomicina durant 45 min. Com a control negatiu es van usar extractes de les mateixes cèl·lules estimulades en presència de CsA. Com a control de proteïna total carregada es va usar la PSF. Els resultats obtinguts mostren que les cèl·lules Jurkat T estimulades en presència de CsA presenten un NFATc2 de major massa molecular que correspon a la proteïna fosforilada i inactiva (Figura 26 b, carril 1) mentre que les cèl·lules estimulades amb ionomicina presenten diverses bandes de mobilitat electroforètica diferent que corresponen als NFATc2 desfosforilats (Figura 26 b, carril 2). Respecte als tumors, es pot observar

que els tumors que sobreproduïen EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, com també passava en els tumors RCAN3, presenten una producció molt inferior de NFATc2 que els tumors EGFP, tot i que en els tumors EGFP la proteïna total carregada és molt inferior a la dels tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, fet que fa encara més evident la reducció dels nivells proteics de NFATc2 present en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figura 26 **b**, carrils 4 i 5, panell anti-PSF). En quant a l'estat d'activació dels NFATcs, l'anàlisi per transferència de western amb anti-NFATc2 no mostra canvis entre les diferents condicions assajades EGFP i EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.

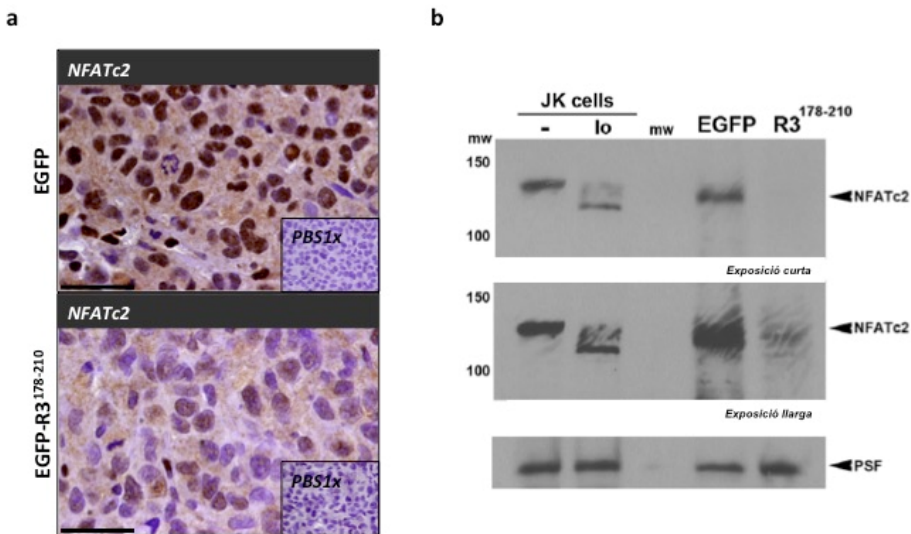


Figura 26. Els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ produeixen una disminució marcada de l'abundància de la proteïna NFATc2 i de manera focalitzada una inhibició de la translocació nuclear de NFATc2 respecte als tumors EGFP control. **a)** Assaig d'IHC amb un anticòs anti-NFATc2 humà. La imatge superior correspon a la condició tumoral EGFP i la inferior correspon als tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Les imatges situades al racó inferior dret corresponen al control d'especificitat de l'anticòs primari ja que aquest no es va afegir i les seccions es van incubar amb PBS 1x. L'escala representa 50 µm. Les imatges van ser capturades amb un microscopi Olympus BX51 a 60x i usant el programa Cell[^]B. **b)** Transferència de western amb extractes de proteïna procedents dels tumors ortotòpics TNBC EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i posterior anàlisi amb l'anticòs específic anti-NFATc2 per a la comprovació dels nivells proteics de NFATc2 i de l'estat d'activació d'aquest, que depèn del grau de fosforilació del factor de transcripció. Com a control de NFATc2 s'han estimulat cèl·lules Jurkat T amb calci i ionomicina durant 45min (lo) o no estimulades (-). S'ha usat un anticòs anti-PSF com a control de càrrega de proteïna total. Els panells superior i mig corresponen a temps d'exposició curt i llarg respectivament. El marcador de massa molecular (Figura 26, carril 3) i els valors corresponents estan expressats en kDa.

4.8.3 La sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no altera l'expressió gènica de *NFATc2* en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*

Donat que els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, com en el cas dels tumors RCAN3, presenten una reducció marcada de l'abundància del *NFATc2* en els tumors en comparació amb els tumors EGFP control, es va procedir a analitzar si la sobreproducció de EGFP-R3178-210 en cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 afectava l'expressió gènica de *NFATc2* en comparació amb cèl·lules control EGFP (Figura 27). Amb aquesta finalitat, cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 es van transduir amb les construccions lentivirals que codifiquen per EGFP control o les proteïnes de fusió EGFP-R3178-210 o EGFP-R3178-210AAQ, i es van estimular amb ionomicina, calci i PMA, i es recolliren per a la posterior extracció del RNA total. A continuació es va generar el cDNA i amb l'ús d'encebadors específics per *NFATc2* humà i sondes UPL es va amplificar el DNA per qPCR (veure'n protocol més detallat a l'apartat 3.3.1.5 de Materials i Mètodes). El gen *HPRT1* va usar-se com a control intern de la PCR. Els resultats mostren que no hi ha diferències significatives en el nivell d'expressió de *NFATc2* en cap de les línies cel·lulars TNBC humanes assajades (Figura 27) en cap de les condicions experimentals (EGFP, EGFP-R3178-210 o EGFP-R3178-210AAQ). Per tant, igual que en el cas que en la sobreexpressió de RCAN3, la de R3178-210 no altera l'expressió gènica de *NFATc2*.

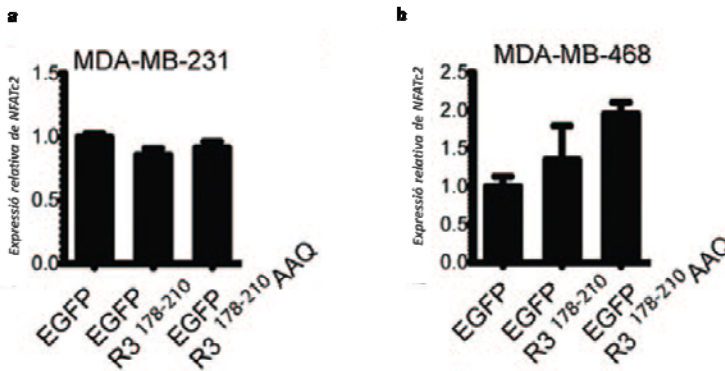


Figura 27. La producció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no altera l'expressió gènica de *NFATc2* en cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*. Assaig de qPCR per a la quantificació de l'expressió gènica del *NFATc2* en cèl·lules MDA-MD-231 (a) i MDA-MB-468 (b) transduïdes amb els lentivirus EGFP, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰AAQ a una MOI de 20 i estimulades amb ionomicina, calci i PMA. L'amplificació del gen d'expressió constitutiva *HPRT1* va ser usat com a control intern de la PCR. Aquest experiment es va fer per triplicat i els resultats mostrats es representen com a mitjana \pm SEM.

Fins a aquest punt d'aquest treball els efectes funcionals del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sobre la progressió tumoral i la via de la Cn-NFATc van molt en paral·lel amb els observats amb la proteïna sencera RCAN3. Tot i així, es va decidir seguir caracteritzant les conseqüències de la inhibició de la via Cn-NFATc *in vivo*.

4.8.4 La sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix l'expressió gènica de *IL-8* i *CSF-2* i la producció de proteïna COX-2 i IL-8 en tumors ortotòpics TNBC *in vivo*.

La sobreproducció de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en tumors ortotòpics TNBC humans té com a conseqüència la inhibició de la translocació dels NFATc a nucli. El pròxim pas va ser comprovar si l'expressió de gens diana dels NFATc com ara *IL-8* i *CSF-2* estava també afectada. De la mateixa manera es va procedir a comprovar els nivells de proteïna IL-8 i de COX-2, que estan implicades en diversos processos de la progressió tumoral.

En primer lloc es va decidir analitzar l'expressió gènica de gens dependents de NFATc com *IL-8* i *CSF-2*. Per analitzar l'expressió gènica de *IL-8* i *CSF-2*, es va realitzar, amb cDNA provinent de mostres de tumors EGFP i EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, una qPCR amb sondes UPL i encebadors específics per a l'amplificació d'aquests gens (Figura 28 a i b). Dels resultats se'n pot concloure que R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix de forma molt significativa l'expressió gènica tant de *IL-8* com de *CSF-2*, gens diana dels NFATc. A continuació, es va procedir a fer l'anàlisi a nivell de proteïna. Amb aquesta finalitat es van llisar mostres de tumors EGFP i EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i es va realitzar una transferència de western que, posteriorment, es va analitzar amb anticossos específics per COX-2 i IL-8 (Figura 28 c i d).

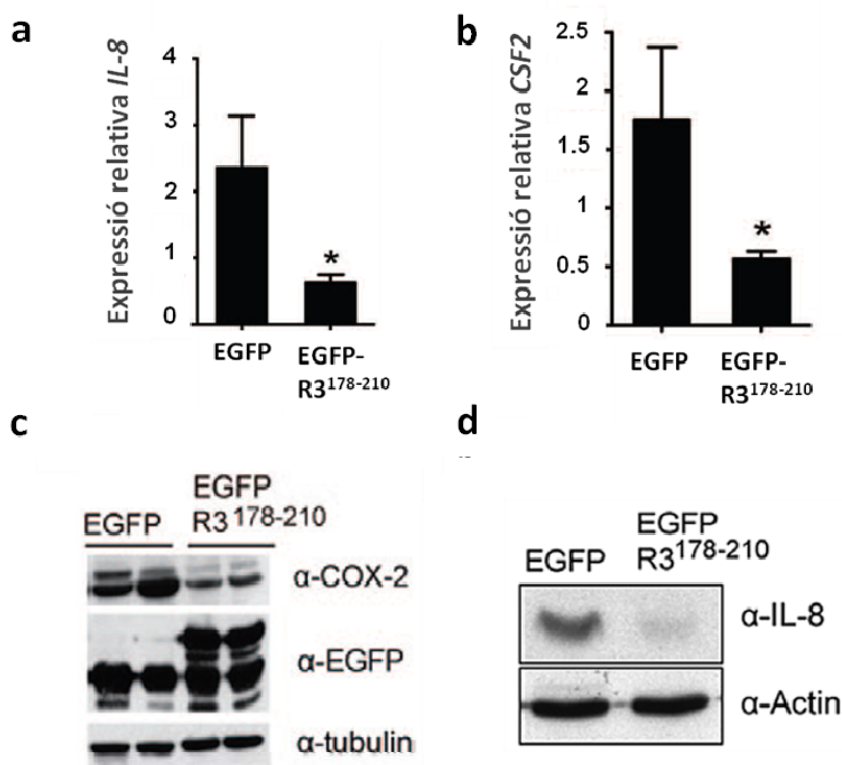


Figura 28. R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix l'expressió gènica de *IL-8* i *CSF-2* i la producció de les proteïnes *IL-8* i *COX-2* en tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. **a** i **b**) Anàlisi per qPCR de l'expressió gènica de *IL-8* (**a**) i *CSF-2* (**b**). Es van usar sondes UPL (*Universal ProbeLibrary*), conjugades amb FAM, i es van analitzar els resultats de la qPCR pel mètode de quantificació relativa de comparació de Ct, 2- $\Delta\Delta^{Ct}$ (amb una eficiència d'encebador de 2). Com a control intern de la PCR es va usar l'expressió gènica del *HPRT1* humà. Les dades es presenten com \pm SEM. L'anàlisi estadística va realitzar-se per ANOVA i a continuació el test Bonferroni (* $p < 0.05$). **c** i **d**) Transferència de western per a la detecció de COX-2 i EGFP (**c**) i IL-8 (**d**) en extractes de proteïnes procedents de mostres de tumors ortotòpics TNBC que sobreproduïxen EGFP o EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Com a control de càrrega de proteïna total es va usar la tubulina i l'actina respectivament.

Els resultats mostren que R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeix marcadament la producció de les proteïnes COX-2 i IL-8 en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ respecte als EGFP (Figura 28 **c** i **d**). Els canvis observats a més no són deguts a canvis en la quantitat de proteïna carregada (Figura 29, panell anti-tubulina i anti-actina). A més, per comprovar que els tumors tenien una quantitat similar de proteïna exògena (EGFP o EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰), es va realitzar una anàlisi de les membranes amb un anticòs anti-EGFP que confirmaren aquest fet.

Es pot concloure a partir dels resultats anteriors que els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, al igual que els tumors RCAN3, presenten una inhibició de la senyalització de Cn-NFATc respecte els tumors control EGFP.

4.8.5 Els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten menys proliferació i un increment en l'apoptosi cel·lular respecte els tumors EGFP, però no s'observen diferències en la necrosi tumoral.

Per tal de determinar l'efecte de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en la proliferació cel·lular es van realitzar un seguit d'IHC per a detectar la proteïna marcador de proliferació per excel·lència Ki67. Es van usar mostres tumorals incloses en parafina per a les tècniques immunohistoquímiques i se'n va fer el recompte manual de cèl·lules proliferatives per camp de gran augment fins a l'obtenció de suficients camps de cada mostra per a aplicar les anàlisis estadístiques pertinents.

Els resultats obtinguts demostren que la sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en TNBC té un efecte inhibitori sobre la proliferació cel·lular tot i que no coneixem encara els mecanismes moleculars a través dels quals es produeix (Figura 29 a-c).

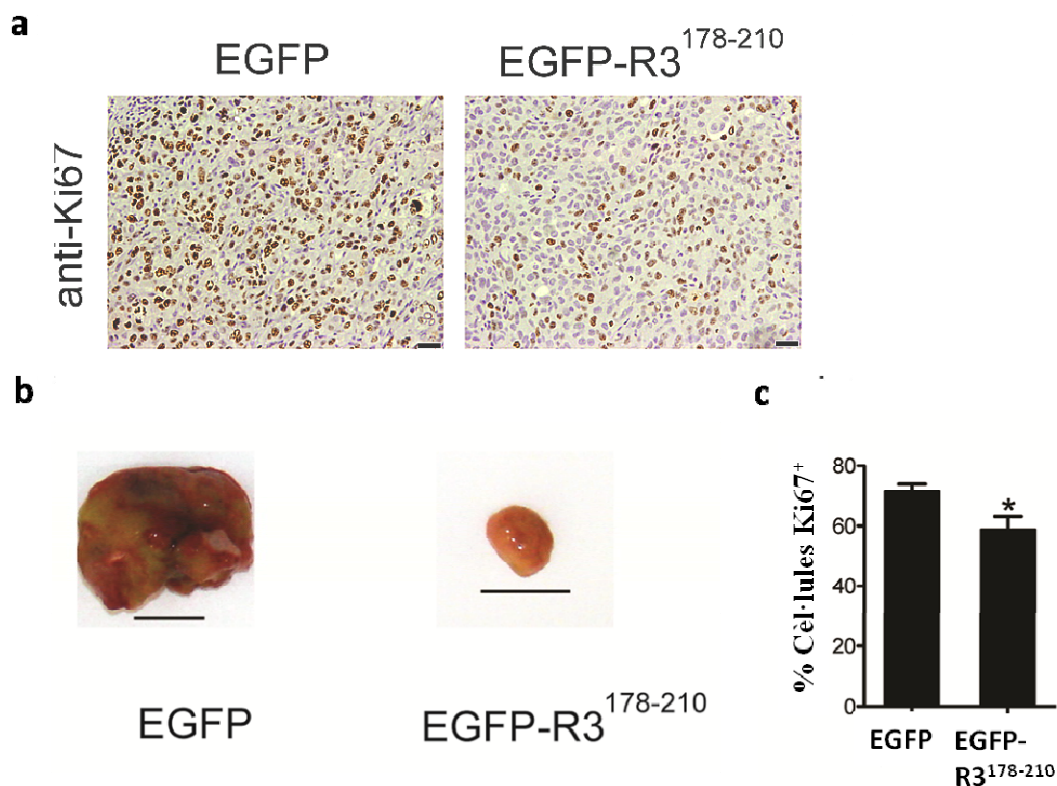


Figura 29. Els tumors que sobreproduïxen EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una menor proliferació *in vivo*. **a)** Assaig de IHC amb anticòs anti-Ki67, marcador de proliferació cel·lular, sobre mostres tumorals EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ incloses en parafina. El segment d'escala representa 50 µm. S'ha usat una contratinció nuclear amb hematoxilina. Les imatges van ser capturades a 40x en un microscopi Olympus BX51 **b)** Tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ representatius de cada condició assajada. El segment d'escala representa 1 cm. **c)** Quantificació del percentatge de cèl·lules Ki67⁺ en les condicions EGFP/ EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Els tumors que sobreproduïxen el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten un menor nivell de proliferació cel·lular amb (*)p<0.05.

La via de Cn-NFATc pot estar implicada en processos de mort cel·lular com l'apoptosi. De fet, es va descriure que aquesta via de senyalització podria participar en la inducció de l'apoptosi a través dels receptors Fas en cèl·lules neuronals de rata exposades a metamfetamina (Jayanthi *et al.*, 2005). Per a estudiar la via Cn-NFATc en la mort cel·lular i en TNBC es va procedir a la realització d'un seguit d'assajos d'IHC i d'anàlisi anatomo-patològics per a estudiar la necrosi i l'apoptosi tumoral. En els tumors RCAN3 s'ha demostrat que aquests tumors

presenten un increment en el percentatge de cèl·lules apoptòtiques respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ però, en canvi, no hi ha una alteració en el percentatge de necrosi tumoral. A continuació, es pretenia comprovar si els tumors que sobreproduïen el pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, que inclou únicament el motiu PxlIT-like de RCAN3 d'unió a Cn, poden reproduir els resultats observats en els tumors RCAN3.

Per una banda, per a l'estudi de la necrosi es van tenyir amb H-E diferents seccions histològiques de mostres tumorals incloses en parafina per a realitzar, posteriorment, un seguit de fotografies amb lupa que ens van permetre localitzar les zones necròtiques del tumor. Microscòpicament es va confirmar l'àrea necròtica definida per la lupa per tres investigadors independents. Els resultats derivats de la tinció amb H-E mostren que la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no afecta significativament a la necrosi tumoral tot i que s'observa una tendència a incrementar la necrosi tumoral (Figura 30 **c i d**).

Per l'altra banda, la mort cel·lular per apoptosi va ser analitzada mitjançant la tècnica de tunel. A diferència de la mort cel·lular per necrosi que no varia entre tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, els resultats per la tècnica de tunel mostren que la sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ incrementa l'apoptosi de forma significativa en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ respecte els EGFP (Figura 30 **a i b**), d'igual manera que es va demostrar pels tumors RCAN3 respecte els EGFP i RCAN3 AAQ.

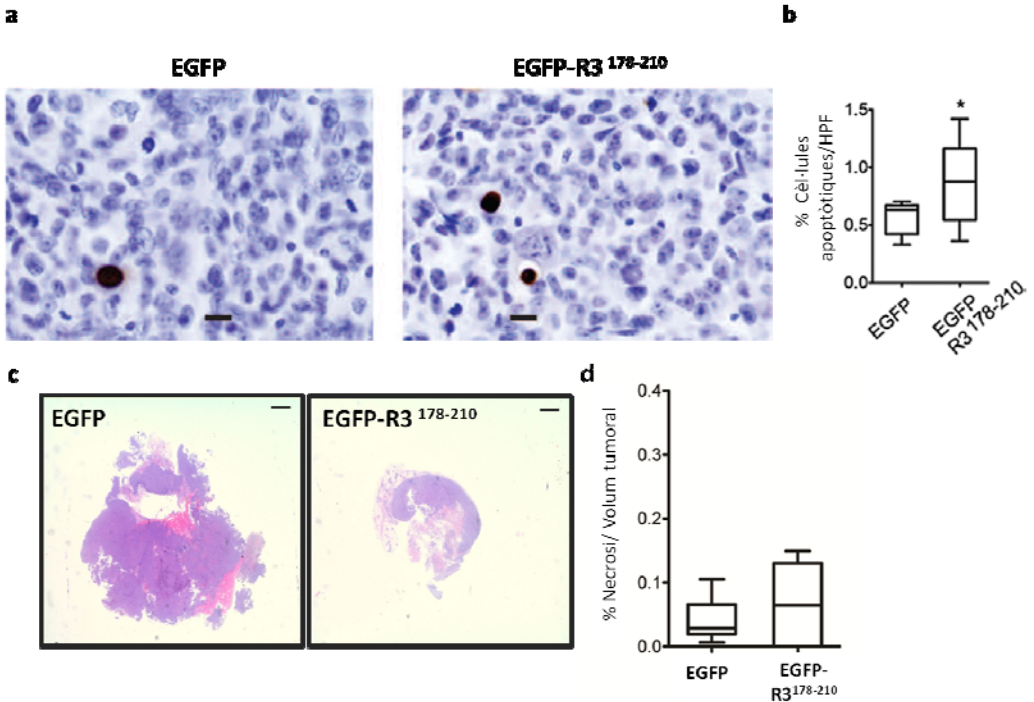


Figura 30. EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ incrementa l'apoptosi però no la necrosi tumoral en els tumors ortotòpics TNBC EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ humans. a) Imatges representatives de l'assaig de tunel en mostres de tumor incloses en parafina. Les imatges es van capturar amb un microscopi Olympus BX51 a 40x. El segment d'escala representa 50 μ m. Es va usar l'hematoxilina com a contrast nuclear. b) *Box plot* de la quantificació del número de cèl·lules tumorals apoptòtiques en els tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ basat en l'assaig de tunel (n= 8 i 8 respectivament), (*)p<0,05. c) Imatges representatives dels tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ realitzades amb lupa estereoscòpica. Tinció histològica d'hematoxilina-eosina de seccions histològiques de mostres de tumors incloses en parafina per a l'anàlisi de la necrosi tumoral. El segment d'escala representa 1 mm de la realitat. d) *Box plot* de la relació entre el percentatge de l'àrea necròtica tumoral i el volum tumoral per a cada condició assajada, EGFP i EGFP- R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Per tant, la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ produeix, igual que en el cas de RCAN3, tumors TNBC que presenten una reducció en la proliferació cel·lular i afavoreix l'apoptosi respecte els tumors EGFP control.

4.8.6 L'angiogènesi tumoral està inhibida en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰

L'efecte inhibitori dràstic de RCAN3 sobre l'angiogènesi tumoral en tumors ortotòpics TNBC ens va animar a fer el mateix tipus d'anàlisi pels tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. A més, s'havia demostrat en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ la inhibició de proteïnes implicades en l'angiogènesi tumoral com ara IL-8 i COX-2 (Figura 28). Per tant, el pròxim pas fou la caracterització de l'angiogènesi tumoral en els tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Amb aquest objectiu, es va realitzar una IHC sobre talls de tumor inclosos en OCT i congelats per a detectar el marcador de vasos sanguinis CD31 a nivell proteic i una qPCR en mostres tumorals per determinar l'expressió gènica del *VEGF*.

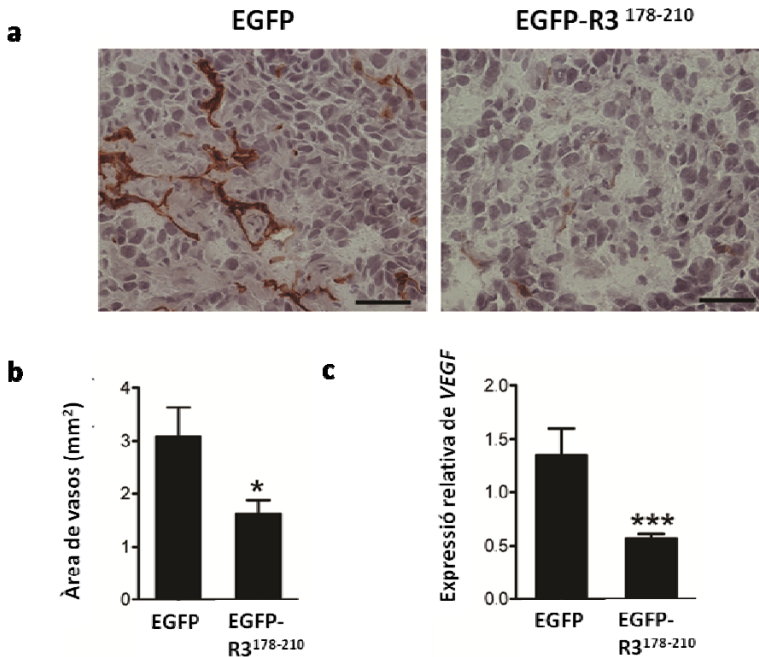


Figura 31. L'angiogènesi està inhibida en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. **a)** Imatges representatives de la IHC anti-CD31 sobre mostres tumorals incloses en OCT i congelades. Les imatges van ser capturades a un augment de 40x en un microscopi de camp clar (Olympus BX51). El segment d'escala representa 100 µm. Es va usar hematoxilina com a contratiñint nuclear. **b)** Quantificació manual de l'àrea de vasos en el tumor per les condicions control (EGFP) i de sobreproducció de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. En els tumors que expressen el pèptid es pot observar una disminució significativa de l'àrea de vasos amb (*) $p \leq 0.05$. **c)**

Quantificació per qPCR de l'expressió del gen proangiogènec *VEGF*. S'ha usat l'expressió gènica de *HPRT1* d'expressió constitutiva com a control intern de la PCR.. (***) $p < 0.005$.

Els resultats confirmen que la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en les cèl·lules tumorals altera també l'organització estromal. En aquest cas, per exemple, es pot veure clarament una de les conseqüències: la inhibició de l'angiogènesi tumoral (Figura 31 **a** i **b**). L'àrea total de vasos en la condició control és significativament major que en les condicions de sobreproducció del pèptid, aproximadament el doble. A més, els nivells de transcrit del gen *VEGF*, marcador proangiogènec per excel·lència, són tres vegades majors que els dels tumors control. Això suggereix que el pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ afecta l'expressió gènica del factor proangiogènec *VEGF* i, com a conseqüència, s'observa una menor presència de vasos intratumorals. Els mecanismes i vies a través de les quals s'aconsegueix aquest fenotip tumoral, però, encara són desconegudes.

La presència de vasos en els tumors generalment s'associa a una major agressivitat del tumor ja que és a través dels vasos que pot obtenir nutrients i oxigen per a créixer més ràpidament. Els vasos també són portes d'accés a altres òrgans diana per a les cèl·lules tumorals ja que a mesura que el tumor creix, les cèl·lules tumorals es van desdiferenciant i van adquirint noves capacitats com ara la intravasació, la capacitat de migració cel·lular, la capacitat de formar un nòdul metastàtic, etc. L'estudi d'aquest fenotip cada vegada més invasiu de les cèl·lules tumorals ens les condicions d'interès (que correspon a la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰) ens permet conèixer millor els efectes funcionals que desencadena la sobreproducció de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.

4.8.7 La sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ disminueix la presència de cèl·lules polimorfonucleades (PMN) en l'infiltrat tumoral

Per a determinar l'efecte de la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ respecte a la presència de PMN en els tumors, es va realitzar una tinció clàssica d'H-E sobre talls histològics de mostres tumorals incloses en parafina. Gràcies a la seva morfologia nuclear característica, normalment multilobulada, es poden diferenciar-los fàcilment entre la massa cel·lular tumoral. Cal tenir en compte, però, que per a estudiar-ne la infiltració, s'ha d'evitar la quantificació d'aquestes cèl·lules en zones hemorràgiques o pròximes a zones necrosades ja que són zones on s'acumulen de forma habitual.

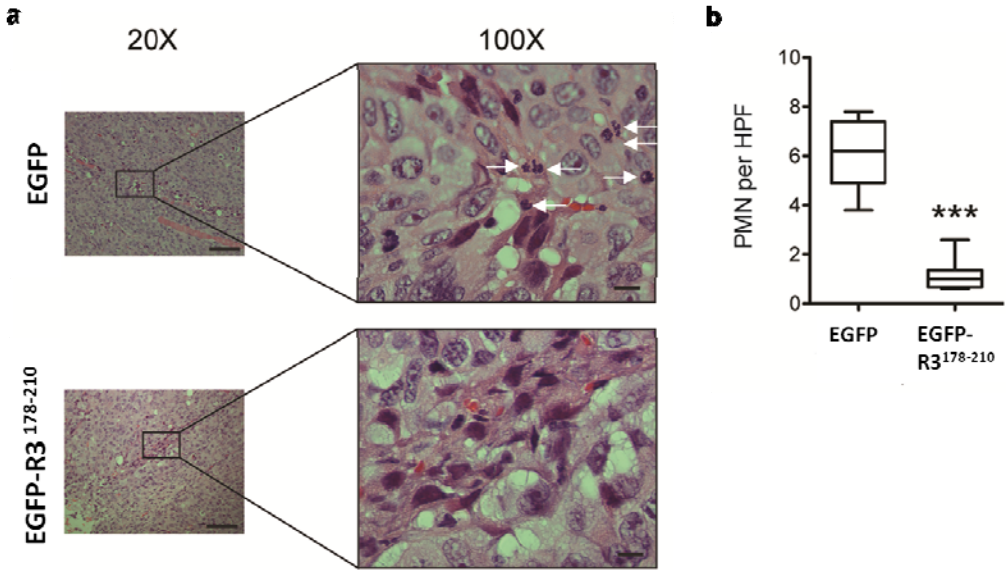


Figura 32. La infiltració de PMN és pràcticament absent en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en comparació amb els tumors EGFP. a) Imatges representatives de talls histològics tenyits amb hematoxilina-eosina procedents de mostres tumorals incloses en parafina. Les fletxes mostren PMN en el teixit tumoral. Les imatges van ser capturades a 20x i a 100x al microscopi Olympus BX51. Els segments d'escala en les imatges corresponen a 50 µm i a 5µm respectivament. b) Representació de box plot generat amb el programa d'anàlisi estadístic SPSS per la quantificació manual del nombre de PMN per camp de gran augment en tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ mitjançant el programa ImageJ. En els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ s'observa una absència marcada significativa del nombre de PMN infiltrats en el tumor, $p \leq 0.005$ (***)

Analitzant la histologia dels tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ és evident que la quantitat de PMN en la massa tumoral dels tumors EGFP control és molt superior a la dels tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figura 32 a) i la diferència esdevé altament significativa en la quantificació realitzada (Figura 32 b). Dels resultats se'n pot concloure que el pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ altera significativament el microambient tumoral, mitjançant el bloqueig de la infiltració de cèl·lules PMN en el tumor.

Un altre tipus cel·lular que forma part de l'infiltrat cel·lular intratumoral són els TAMs. Mitjançant la tinció d'H-E no es van observar canvis significatius entre els dos grups de tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (resultat no mostrat). Per a confirmar aquest resultat es va decidir utilitzar el marcador de TAMs F4/80 i aplicant tècniques d'immunofluorescència sobre talls histològics de tumors inclosos en parafina es van localitzar i quantificar aquestes cèl·lules en la massa tumoral, evitant també les zones necròtiques i hemorràgiques. Com es pot observar, la presència de TAMs no és significativament diferent entre els tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figura 33). La presència d'aquest tipus cel·lular en el tumor no està alterada.

En base als anteriors resultats es pot concloure que en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, al igual que en els tumors RCAN3, es produeix una inhibició de la infiltració de PMN, principalment de TANS, però no de TAMs en el microambient tumoral en comparació als tumors EGFP que presenten molta infiltració tumoral de TANS.

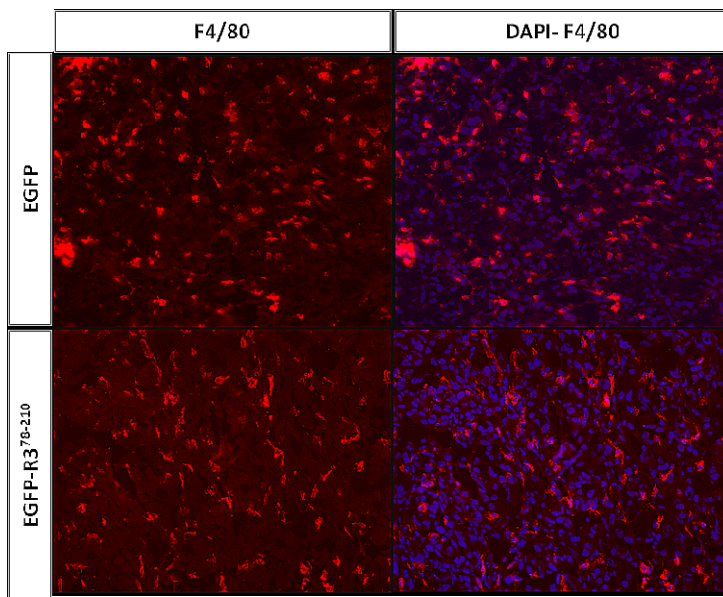


Figura 33. La sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no altera la presència de TAMs en la massa tumoral. Imatges representatives d'immunofluorescència anti-F4/80 de ratolí sobre mostres tumorals incloses en parafina en les condicions control (EGFP) i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (n=2 i 2, respectivament). Les mostres es van teyir amb DAPI com a contrast nuclear i muntar amb mowiol. Les imatges es van capturar amb el microscopi Olympus Bx51 evitant zones hemorràgiques i necròtiques.

L'efecte diferencial del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en comparació als tumors EGFP a nivell de TANs possiblement és deguda a què el pèptid inhibeix la senyalització de Cn-NFATc, incloent-hi l'expressió de gens de citoquines i quimiocines dependents dels NFATc i, a més, produeix un alliberament de citoquines o de factors quimiotàctics diferents respecte als tumors EGFP. De fet, s'ha descrit anteriorment que un dels factors alliberats per les cèl·lules tumorals és IL-8, proteïna codificada pel gen *CXCL8* i que la seva expressió està regulada pels NFATc. IL-8 actua com a quimioatracent per a l'infiltrat cel·lular immunitari i concretament per al reclutament dels TANs (Vandercappellen *et al.*, 2008). En les cèl·lules tumorals dels tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, així com en les dels tumors RCAN3, l'abundància de IL-8 és molt inferior tant a nivell transcripcional com a nivell de proteïna comparat amb els tumors EGFP.

4.8.8 El pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no afecta la transició epiteliomesenquimal (EMT) en tumors ortotòpics TNBC humans

Per tal de continuar caracteritzant l'efecte antitumoral de l pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, es va decidir analitzar si la sobreproducció del pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ podria afectar al fenotip cel·lular. Ara bé, donat que les cèl·lules TNBC i, concretament les MDA-MB-231 presenten un fenotip mesenquimal, es va decidir analitzar el procés invers a la EMT, l'anomenada transició mesenquimo-epitelial (MET). La reversió d'un fenotip mesenquimal cap a un fenotip epitelial s'associa a una major estat de diferenciació cel·lular, però no necessàriament significa un efecte antitumoral per disminució de l'agressivitat tumoral perquè, per exemple, les cèl·lules que han adquirit característiques mesenquimals per a poder migrar i escapar d'un tumor primari, i envair un òrgan secundari, cal que reverteixin el fenotip cap a un fenotip epitelial per a poder iniciar la formació d'un nòdul metastàtic potencialment mortal.

Per a analitzar la possible MET *in vivo* en el model ortotòpic TNBC humà, es van usar talls histològics dels tumors EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i es va procedir a la detecció per IHC de les proteïnes humanes vimentina (marcador mesenquimal, Figura 34) i E-cadherina (marcador epitelial, resultat no mostrat).

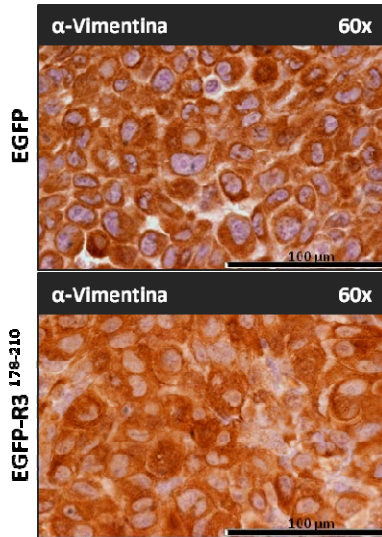


Figura 34. Els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no semblen alterar el fenotip mesenquimal cel·lular observat en els tumors EGFP. Imatges representatives de l'assaig d'IHC amb anti-vimentina sobre seccions histològiques de mostres dels tumors incloses en parafina. Les imatges es van capturar a 60x en un microscopi Olympus Bx15 i es va usar l'hematoxilina com a contrast nuclear. No es veuen diferències significatives entre les condicions assajades (EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰). Els canvis en intensitat s'atribueixen a variabilitats inherents a la tècnica. El segment d'escala correspon a 100 μm de la mida real.

La sobreproducció del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no sembla alterar el fenotip mesenquimal (representat per vimentina) de les cèl·lules tumorals EGFP, és a dir, no hi ha una reversió mesenquima-epitelial (MET) en les cèl·lules tumorals que sobreprodueixen el pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figura 34). A més, no s'observa marcatge de la E-caderina, com a marcador epitelial, que només és positiu en teixit no tumoral (imatge no mostrada). Per tant, aquests resultats semblen suggerir que tant la sobreproducció de la proteïna RCAN3 com la del seu pèptid derivat EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no alteren el fenotip mesenquimal de les cèl·lules tumorals.

4.8.9 El pèptid EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ causa una disminució dels marcadors premetastàtics ID1 i S100A4 *in vivo*

Tot i que en els tumors RCAN3 i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ s'observa una reducció en el creixement tumoral *in vivo*, en l'angiogènesi, i en la infiltració de PMNs al microambient tumoral, no sembla haver-hi cap

alteració en la MET. En aquest punt es va creure oportú analitzar l'efecte funcional de EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en la metastasi, ja que l'expressió gènica de diversos marcadors premetastàtics està regulada pels NFATc, com és el cas de la S100A4 (Tae Hyong Kim et al., 2009).

Per aquest motiu es va procedir a la detecció de marcadors associats a la capacitat metastàtica en les mostres tumorals EGFP i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Els marcadors que es varen analitzar per IHC són ID1 i S100A4. En ambdós casos es van obtenir resultats similars.

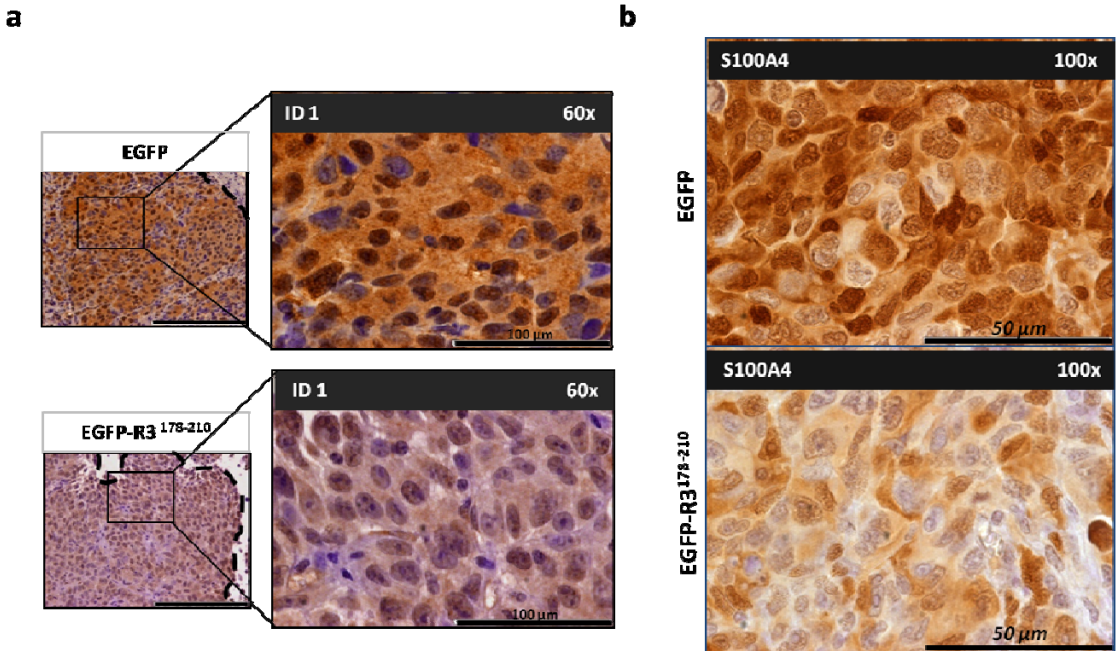


Figura 35. Els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ tenen una producció de marcadors metastàtics com ID1 i S100A4 molt inferior a la dels tumors EGFP. Imatges representatives procedents d'assajos d'IHC amb anticossos anti-ID1 humana (a) i S100A4 (b) en mostres tumorals (EGFP/ EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰) incloses en parafina (n= 8 i 8 respectivament). Les imatges es van capturar a 60x en un microscopi de camp clar (Olympus BX51). Les línies discontinües dibuixades en les imatges 20x mostren el marge tumoral en la glàndula mamària. Els segments d'escala corresponen a 500 μm i 100 μm, respectivament (a) i a 50 μm (b).

En els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, el marcatge dels marcadors metastàtics ID1 i S100A4 és significativament inferior al dels tumors EGFP control (Figura 35). La localització subcel·lular tant de ID1 com de S100A4 és citosòlica però també intensament nuclear en la condició EGFP control. En canvi, en els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ el marcatge es localitza predominantment en el citosol. Amb aquests resultats, per tant, es pot concloure que els tumors EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una clara inhibició dels marcadors de metastasi en càncer de mama ID1 i S100A4.

4.9 TERÀPIA PROTEICA ANTITUMORAL AMB EL PÈPTID R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ EN TUMORS ORTOTÒPICS TNBC

Donats els bons resultats obtinguts al sobreexpressar RCAN3 i el pèptid R3178-210 en la inhibició de la progressió tumoral dels tumors ortotòpics de TNBC, es va decidir fer una primera aproximació experimental per utilitzar el pèptid com a eina terapèutica. En col·laboració amb l'empresa BCN peptides S.A. (Sant Quintí de Mediona, Barcelona), es va sintetitzar el pèptid R3178-210 (pèptid anomenat a partir d'ara com a MP1: Ac-KYEHAGTESTPSVVVHVCESETEEE-NH₂) i el mateix pèptid però conjugat amb un àcid gras (anomenat ara com a MP2: Àcid gras-KYEHAGTESTPSVVVHVCESETEEE-NH₂). La conjugació amb àcid gras s'utilitza com a agent internalitzador (protein transduction domain, PTD), ja que la internalització dels pèptids a les cèl·lules és de manera natural molt poc eficient. BCN peptides S.A. havia usat anteriorment la conjugació amb àcid gras en altres pèptids a nivell comercial i estava demostrat que aquest tipus de PTD presenta una bona eficiència d'internalització, per aquest motiu es va escollir aquest PTD per a conjuguar-lo al nostre pèptid R3178-210. Seguidament es va procedir al disseny experimental per tal d'usar aquests pèptids com a agents terapèutics antitumorals en els tumors ortotòpics de càncer de mama humà.

4.9.1 Efecte dels pèptids MP1 i MP2 en l'activació transcripcional dels NFATc en cèl·lules MDA-MB 231 *in vitro*.

Per a determinar si els pèptids derivats de RCAN3 MP1 i MP2 tenen un efecte inhibidor sobre la via de senyalització Cn-NFATc es van realitzar quatre experiments *in vitro* emprant cèl·lules MDA-MB-231 estimulades amb ionomicina, clorur càlcic i PMA i transfectades amb el vector 9xNFAT-luc que conté un cDNA que codifica pel gen reporter de la luciferasa sota el control d'un promotor regulat pels factors de transcripció NFATc. Es va administrar el pèptid MP1 o MP2 a diferents

dosís i temps a cèl·lules MDA-MB-231 i se'n va determinar l'activitat dels NFATc de forma directe determinant l'activitat luciferasa del gen reporter 9xNFAT-luc. En absència de pèptids les cèl·lules mostren l'activitat màxima dels NFATc (control positiu d'activitat NFATc) i en presència de CsA s'obté el nivell màxim d'inhibició dels NFATc (control negatiu d'activitat NFATc). En els dos primers experiments es van tractar les cèl·lules a unes concentracions de pèptids de 10, 50 i 100 μ M durant 2, 4 i 16 h abans de ser estimulades. En els dos experiments es produïa una certa inhibició dosi-dependent dels pèptids MP1 i MP2 sobre l'activitat luciferasa, sent l'efecte més pronunciat pel pèptid MP2. La viabilitat de les cèl·lules en els dos experiments era similar i no s'observaren canvis morfològics a nivell cel·lular (resultats no mostrats). Posteriorment es va assajar els pèptids a 10, 100 i 250 μ M (la concentració estoc dels pèptids era de 10 mM, resuspesos en 100 % DMSO). L'assaig es va fer administrant els pèptids 2 i 6 h abans d'estimular les cèl·lules, donat que amb 4 h ja havíem obtingut efectes dependents de la dosi dels pèptids sobre l'activitat dels NFATcs. Els pèptids es deixaven també durant l'estimulació cel·lular (però a la meitat de la concentració final).

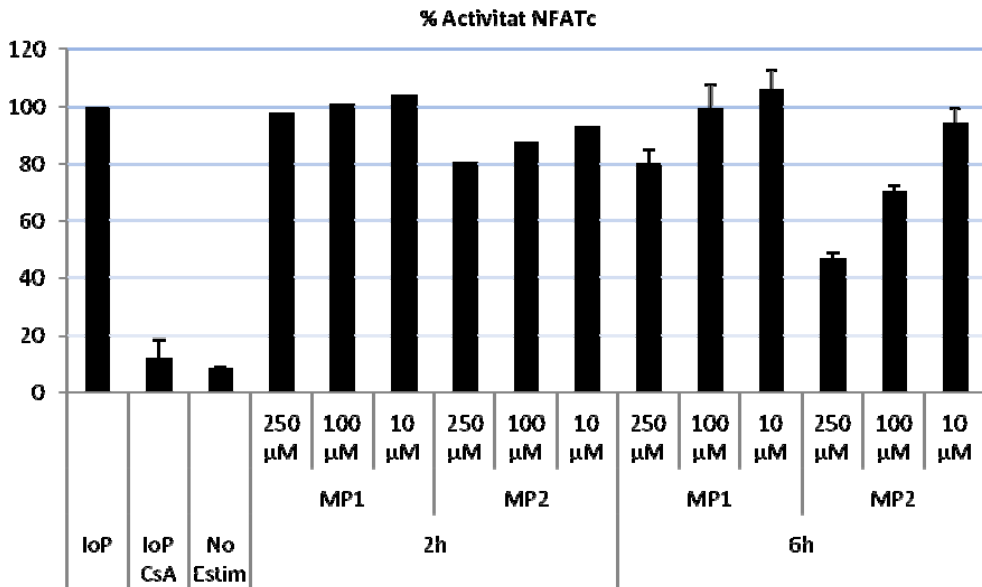


Figura 36. Els tractaments amb els pèptids MP1 i MP2 inhibeixen l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules de TNBC humanes MDA-MB-231 *in vitro*. Assaig del gen reporter de la luciferasa 9xNFAT-luc sota el control d'un promotor regulat pels NFATc en cèl·lules humanes de càncer de mama MDA-MB-231. Aquestes cèl·lules es van transfectar amb el plasmidi reporter 9xNFATc-luc i CMV-Renilla, es van tractar amb els pèptids MP1 MP2 a concentracions

decreixents (250, 100 i 10 μM) durant 2 i 6 h. Posteriorment es van estimular amb clorur de calci, ionomicina i PMA. (No Estim) sense estimulació; (IoP) estimulades amb Io/PMA/CaCl₂; (IoP CsA) estimulades amb Io/PMA/ CaCl₂/CsA en presència dels pèptids (però a la meitat de concentració final). Les unitats de luciferasa van normalitzar-se respecte als valors de luciferasa renilla. Les dades es presenten com a mitjana del percentatge de l'activació transcripcional dels NFATc on el 100% és l'activació assolida per cèl·lules estimulades amb ionomicina/PMA/CaCl₂. Els resultats són representatius de dos assajos independents i es representen com a mitjana \pm SEM.

Els resultats obtinguts (Figura 36) mostren una inhibició de l'activitat luciferasa de fins el 20% en les cèl·lules exposades al pèptid MP1. En MP2 s'observa un major efecte en la concentració de 250 μM (50 % d'inhibició). La viabilitat de les cèl·lules és similar però s'observaren canvis morfològics a nivell cel·lular a la major concentració de pèptid administrat, les cèl·lules adoptaven una forma més arrodonida. Els resultats, tenint en compte els 4 assaigs realitzats, mostren els pèptids MP1 i MP2 inhibeixen l'activitat transcripcional dels NFATcs de forma dosi-dependent. La teràpia proteica de tumors TNBC amb els pèptids MP1 i MP2 no semblen afectar el creixement tumoral. Per a poder provar la capacitat terapèutica dels dos pèptids sintetitzats MP1 i MP2 *in vivo*, es van generar tumors ortotòpics de TNBC humà a partir de la injecció de cèl·lules MDA-MB-231 sense transduir amb cap lentivirus a la mama engonal dreta de tres grups de ratolins immunosuprimits BALB/c. Una vegada formats els tumors, quan el volum mig del tumor era d'aproximadament 150 mm³, es va procedir a l'administració del tractament amb els pèptids MP1 i MP2 administrant per injecció subcutània peritumoral 5 mg de pèptid /kg a raó de 2,5 ml/kg, dos cops per setmana durant 2 setmanes. Com a control es van generar un grup d'animals als quals en comptes del pèptid s'injectà el vehicle emprat en la síntesi dels pèptids (DMSO).

Una vegada obtinguts els tumors ortotòpics de TNBC humà, es va iniciar el tractament anteriorment descrit. Donat que la sobreproducció tant de RCAN3 com del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ afecten el creixement tumoral de forma significativa en comparació amb els tumors control (Figures 9 i 25 respectivament), el primer que es va decidir fer fou analitzar el volum tumoral dels tumors per a veure l'efecte dels pèptids MP1 i MP2 usats com a tractament antitumoral.

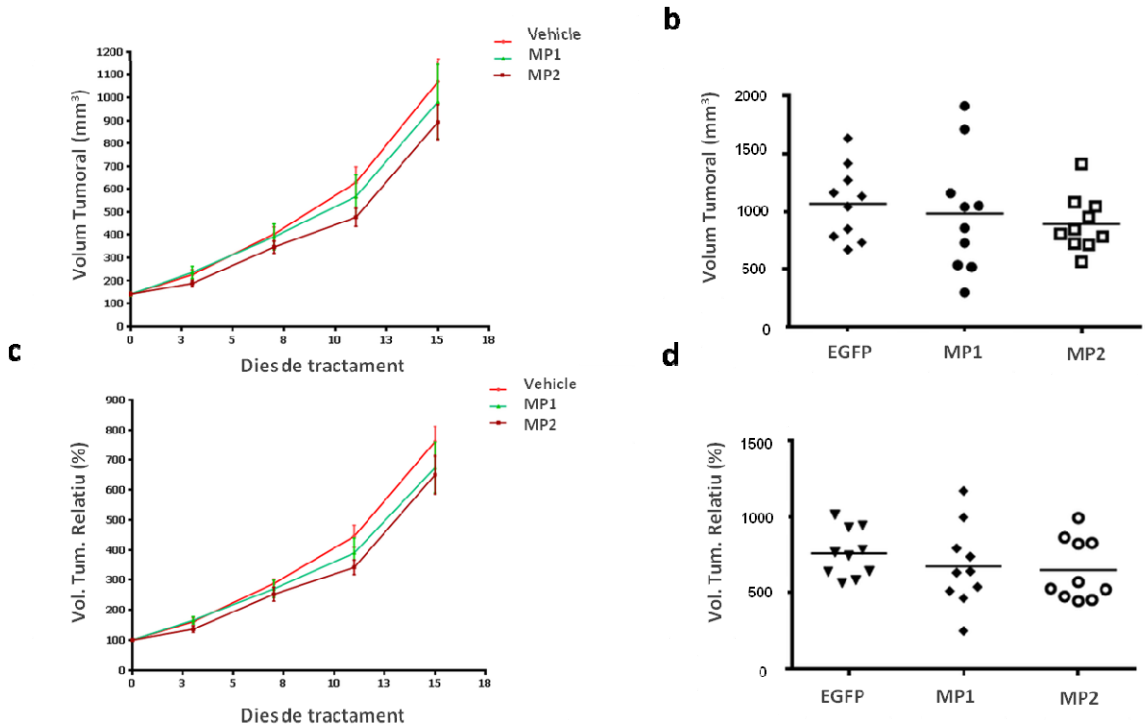


Figura 37. L'administració dels pèptids MP1 i MP2 per injecció subcutània peritumoral no afecta al creixement dels tumors ortotòpics TNBC humans ja formats. Cinètiques del volum tumoral durant els dies de tractament amb els pèptids MP1, MP2 o control (vehicle, en la imatge) expressat tant en volum total (mm³) (a), com en volum relatiu, (b), mostrades com la mitjana ± SEM. Es mostren també les gràfiques de dispersió amb els valors procedents de cada animal respecte al volum tumoral (mm³), (c), com al volum tumoral relatiu (%), (d) corresponent al dia 15 de tractament. Per a cada tractament s'han usat 10 animals. El volum tumoral relatiu (%) es calcula com a volum tumoral en el dia x/ volum tumoral inicial *100.

Els resultats obtinguts demostren que el tractament amb el pèptid MP1 o el MP2, conjugat amb un àcid gras no altera significativament el creixement tumoral en comparació amb la condició control no tractada amb cap pèptid. Tot i no ser un resultat significatiu, sembla que els animals tractats amb MP1, i sobretot amb MP2, presenten una menor velocitat (representada a la gràfica pel pendent) en incrementar el volum tumoral en els 10 primers dies de tractament (Figura 37 a). A partir del dia 10 les cinètiques de creixement s'acceleren i el tumors MP1 i MP2 creixen de forma paral·lela a les dels tumors control no tractats fins el dia

del sacrifici de l'animal (dia 15) (Figura 37 **a** i **b**). La variabilitat entre els animals és bastant alta, i sembla reforçar la conclusió de què no hi ha canvis significatius entre les condicions assajades. Aquest efecte d'alentiment del creixement tumoral en els primers 15 dies de tractament amb MP1 i MP2 podria ser degut a la baixa eficiència de la internalització dels pèptids i a què en les nostres condicions experimentals l'àcid gras no és massa efectiu. Tot i així, varem decidir prosseguir amb la caracterització dels tumors TNBC tractats.

4.9.2 El tractament amb pèptid MP1 o MP2 inhibeix l'angiogènesi en els tumors ortotòpics TNBC humans ja formats

El tractament amb MP1 i MP2 no és prou eficient per inhibir el creixement de tumors ortotòpics TNBC humans formats per injecció de la línia cel·lular MDA-MB-231. No obstant, podrien haver-hi efectes no observables a simple vista. Un dels efectes més clars obtinguts tant en els tumors en situació de sobreproducció de RCAN3 com del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, és la inhibició de l'angiogènesi que quedà ben palès amb la reducció de l'àrea de vasos presents en els tumors RCAN3 i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Per tant, per analitzar l'efecte del tractament amb MP1 i MP2 en l'angiogènesi tumoral es va procedir a la realització d'assajos d'IHC anti-CD31 sobre mostres dels tumors tractats amb MP1, MP2 o els control (tractats amb el vehicle DMSO).

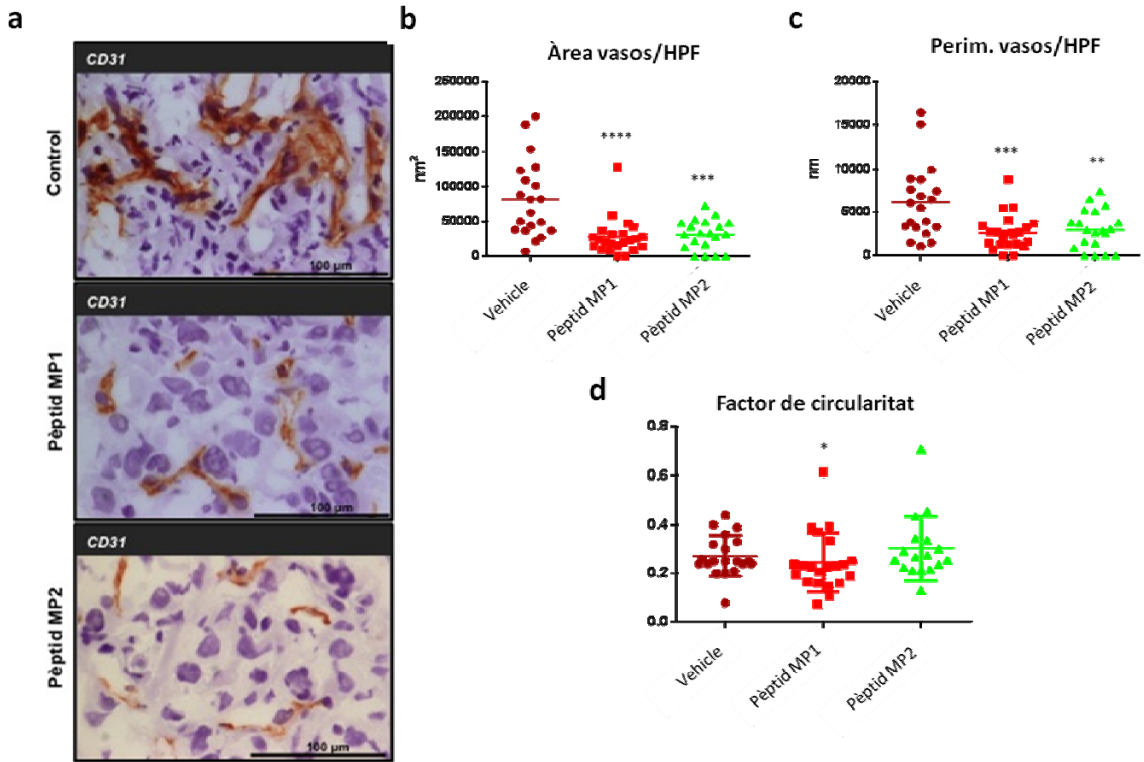


Figura 38. El tractament antitumoral amb els pèptids MP1 o MP2 inhibeix l'angiogènesi tumoral *in vivo*. MP1: tractament amb el pèptid sintètic R3¹⁷⁸⁻²¹⁰; MP2: tractament amb el pèptid sintètic R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ conjugat a un àcid gras; Vehicle: el tractament del grup control sense pèptid (vehicle, DMSO). Els tumors, quan el volum va arribar als 150 mm³, es van tractar peritumoralment amb els pèptids MP1 o MP2 o amb el vehicle en el grup de tumors control a raó de 2,5 ml/kg bisetmanalment. **a)** IHC amb anti-CD31 sobre mostres dels tumors incloses en parafina. El segment d'escala representa 100 μ m en el teixit real. **b)** Quantificació de l'àrea tenyida amb CD31 en relació a l'àrea tumoral per HPF, (***) $p < 0,005$ i (****) $p < 0,001$. Per a l'anàlisi estadística s'ha usat el test ANOVA. **c)** Quantificació del perímetre dels vasos intratumorals en els diferents tractaments, (***) amb $p < 0,005$ per a MP1 i (**) amb $p < 0,01$ per a MP2. **d)** Anàlisi quantitatiu del factor de circularitat o "roundness". En escala del 0 a 1, on 1 descriu un cercle perfecte, (*) $p < 0,05$.

En els resultats obtinguts es pot observar que l'angiogènesi i l'àrea dels vasos ocupada pels tumors és significativament major en el grup control en comparació amb els grups tractats tant amb MP1 com amb MP2 (Figura 38). A més, la Figura mostra que el tractament amb els pèptids, tant sol com conjugat amb l'àcid gras de BCN, inhibeix l'angiogènesi tumoral (Figura 38 a) i que, a més, no hi han diferències

significatives entre l'efecte observat en el tractament tumoral amb els pèptids MP1 i MP2. Això ens permet concloure que la incorporació del lípid conjugat al pèptid MP2 en el nostre cas i en les condicions experimentals emprades no representa una millora en la internalització del pèptid. A més, d'aquests resultats també se'n conclou que el pèptid MP1 (no conjugat amb l'àcid gras) s'internalitza poc a nivell cel·lular però que, tot i no ser suficient per inhibir el creixement tumoral, sí que sembla suficient per a inhibir l'angiogènesi dels tumors TNBC. Caldria millorar el pèptid amb nous agents internalitzadors (PTD) per incrementar l'eficàcia d'aquest procés i, per tant, l'efectivitat funcional del pèptid MP1.

L'anàlisi de l'angiogènesi tumoral mitjançant la detecció de CD31 confirmen que, igual que s'observa en els tumors ortotòpics RCAN3 i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figures 15 i 31 respectivament), els tumors tractats amb el pèptids MP1 i MP2 mostren una inhibició significativa de l'angiogènesi, amb una menor àrea i perímetre (aproximadament la meitat) dels vasos sanguinis en comparació amb la dels vasos dels tumors control (Figura 38 **b** i **c**). Tot i que els tumors tractats amb MP1 i MP2 tenen un efecte similar en la inhibició de l'angiogènesi, els tumors tractats amb MP2 presenten una lleugera tendència a una major inhibició de l'angiogènesi respecte MP1 que no és estadísticament significativa (Figura 38 **b**).

Per a estudiar més al detall l'alteració vascular es va mesurar el perímetre de les àrees tenyides amb CD31. El perímetre ens dona informació addicional dels vasos sobre la morfologia d'aquests. En aquest cas s'ha calculat el perímetre total dels vasos presents en les seccions o talls histològics dels tumors, per tant, la informació que se'n deriva és la grandesa dels vasos. Els resultats de la quantificació del perímetre dels vasos indiquen que el perímetre dels vasos dels tumors tractats amb el vehicle és significativament més gran que el dels vasos presents en els tumors tractats amb els pèptids MP1 o MP2 (Figura 38 **c**).

Ara bé, només amb la informació del perímetre no es pot assegurar que un major perímetre signifiqui un vas més gran o que englobi una major àrea tenyida per CD31 ja que cal tenir també en compte la forma del vas. A més, per coneixements derivats de la geometria es sap que la forma que conté una major àrea en un menor perímetre és el cercle. Per a analitzar la forma es va usar un nou paràmetre: el factor de circularitat o "*roundness*" que mesura, com el seu nom indica, el grau de circularitat d'un objecte amb valors d'entre 0 i 1 on 1 és el cercle perfecte. Aquest factor varia significativament en els tumors que han rebut el tractament amb MP1 però no en els tumors tractats amb MP2, en comparació amb els tractats amb el vehicle control

(Figura 38 d). Els resultats obtinguts ens mostren que els vasos dels tumors tractats amb MP1 són més estirats i petits en comparació amb els vasos dels tumors control. Respecte als tumors tractats amb MP2, aquestes cèl·lules tumorals no presenten diferències en el factor de circularitat en comparació amb els tumors control. Això significa que la morfologia és diferent només en els tumors tractats amb MP1.

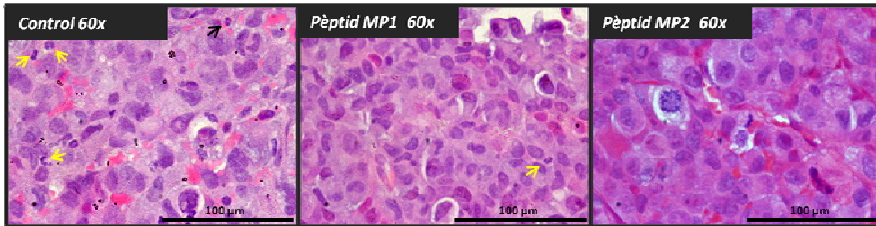
L'anàlisi dels diferents paràmetres relacionats amb la caracterització de l'angiogènesi tumoral en tumors tractats amb els pèptids MP1 o MP2 permet concloure que l'administració d'aquests dos pèptids, amb o sense àcid gras conjugat, inhibeix significativament l'angiogènesi tumoral en tumors ortotòpics TNBC humans i que aquest efecte cursa amb una reducció de les dimensions dels vasos. Aquest resultat indica que el tractament tumoral amb els pèptids MP1 i MP2 permet mimetitzar, en part, l'efecte funcional dels tumors RCAN3 o EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en quant a la inhibició de l'angiogènesi tumoral.

4.9.3 El tractament tumoral amb els pèptids MP1 i MP2 inhibeix la infiltració de cèl·lules polimorfonucleades en els tumors ortotòpics TNBC humans.

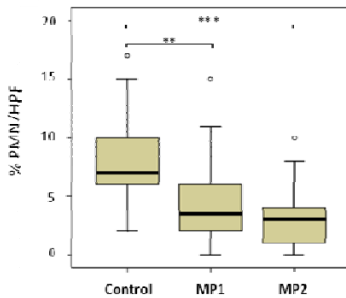
Per a seguir caracteritzant les conseqüències del tractament tumoral amb els pèptids MP1 i MP2 es va decidir analitzar la infiltració cel·lular inflammatòria intratumoral.

Per analitzar l'infiltrat inflamatori en els tumors tractats amb els pèptids MP1 i MP2 i comparar-ho amb els tumors tractats amb el vehicle control, es va realitzar sobre els talls histològics dels tumors TNBC tractats amb el vehicle control o amb els pèptids (MP1 o MP2), una tinció clàssica d'hematoxilina i eosina. D'aquesta manera les cèl·lules infiltrades poden detectar-se gràcies a la peculiar morfologia nuclear. En aquest cas es va analitzar la fracció de l'infiltrat inflamatori que correspon a les cèl·lules polimorfonucleades o PMNs, majoritàriament neutròfils associats als tumors (TAN). Els resultats obtinguts demostren que els tumors tractats amb el pèptid MP1 o MP2 presenten un número significativament menor de cèl·lules PMN per camp de gran augment que els tumors tractats amb el vehicle control (Figura 39 a i b).

a



b



c

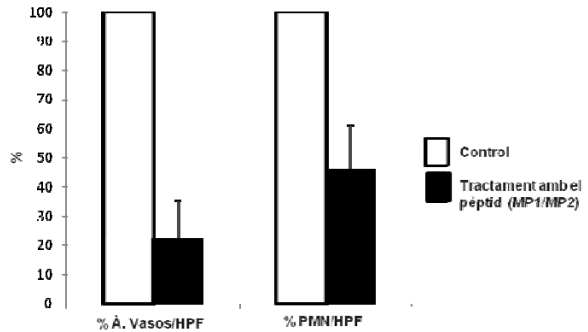


Figura 39. La teràpia peptídica amb MP1 i MP2 inhibeix la infiltració de PMN en el microrambient tumoral. a) Imatges representatives de la presència de PMNs visualitzats mitjançant tinció amb H-E de talls histològics de mostres tumorals incloses en parafina (control, MP1 i MP2). El segment d'escala representa 100 µm de la realitat. **b)** Box plot de la quantificació manual de cèl·lules PMN infiltrades per tumor i camp de gran augment (HPF). L'anàlisi estadística es va realitzar amb el programa estadístic SPSS amb l'aplicació del test estadístic Mann-Whitney. El nombre de cèl·lules infiltrades en els tumors tractats amb MP1 i MP2 és significativament inferior al nombre present en els tumors tractats amb el vehicle (DMSO) (** $p < 0,01$ i *** $p < 0,005$, respectivament). **c)** Percentatges de l'àrea de vasos en els tumor tractats amb MP1 i MP2 respecte l'àrea dels vasos dels tumors tractats amb vehicle (mostrats en la Figura 38b), i de la infiltració de PMN en els tumors tractats amb els pèptids (MP1 i MP2 conjuntament) respecte a la infiltració de PMN en els tumors tractats amb vehicle (representats com a 100 % (Figura 39b) per a la comparació de resultats.

L'associació entre l'angiogènesi i l'infiltrat tumoral generalment correlacionen de forma positiva, a més angiogènesi més infiltrat de PMN. Sembla lògic argumentar que si el tumor disposa d'una major xarxa vascular, presenti també un major nombre de cèl·lules PMN infiltrades en el microambient tumoral. Tot i que la quantificació de PMNs es va realitzar en zones allunyades de qualsevol vas, per a saber si l'efecte observat en els tumors tractats amb els pèptids sobre el nombre de cèl·lules PMNs infiltrades podia explicar-se per la inhibició de

l'angiogènesi tumoral es va analitzar la relació entre ambdós paràmetres (Figura 39 c). En primer lloc es va quantificar (en percentatge) l'àrea de vasos per camp de gran augment (HPF) en el tractament amb els pèptids (MP1 i MP2) respecte els tumors tractats amb vehicle (dades derivades de la Figura 38 b) i en segon lloc es va fer el mateix per a calcular el percentatge d'infiltrat inflamatori (dades derivades de la Figura 39 b). Per a obtenir aquests resultats es va fer la mitjana entre els tractaments MP1 i MP2, ambdós molt similars. Els valors d'aquests paràmetres corresponents als tumors control (vehicle) es van considerar com 100 % i els valors dels tumors tractats (MP1 i MP2 conjuntament) es van relativitzar a aquest percentatge per a obtenir el percentatge tant de l'àrea de vasos com de l'infiltrat de PMN. Els resultats indiquen que els tumors tractats presenten una inhibició de la presència de PMN d'un 60 % aproximadament respecte els tumors no tractats. En canvi, la inhibició dels vasos correspon al 80 % en els tumors tractats en comparació amb els tumors control. Donat que la inhibició de PMN és menor que la dels vasos, es suggereix que l'afectació sobre la presència de l'infiltrat cel·lular es deu bàsicament a la inhibició de l'angiogènesi (Figura 39 c).

D'aquests resultats se'n conclou que la injecció subcutània peritumoral del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sol o conjugat amb un agent internalitzador pot esdevenir una eina terapèutica interessant en la teràpia antitumoral ja que, tot i no afectar el creixement tumoral degut a la baixa eficiència d'internalització en les cèl·lules tumorals, és capaç d'alterar processos essencials en la progressió tumoral com ara l'angiogènesi i el reclutament de cèl·lules immunitàries com els PMN. És necessari optimitzar les condicions experimentals així com provar altres PTDs per a incrementar l'efecte del pèptid però, els resultats obtinguts són esperançadors i, per això, cal continuar estudiant l'efecte de RCAN3 i del pèptid derivat com a eina pel desenvolupament de nous fàrmacs.



5. DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

El càncer de mama és la primera causa de mort per càncer en les dones de països desenvolupats. La seva progressió segueix diferents etapes: hiperplàsia, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma invasiu (que pot evolucionar cap a la formació de metàstasi). El càncer de mama és una malaltia complexa en la qual el manteniment i la progressió tumoral depenen tant de lesions genètiques intrínseques a les cèl·lules (ja sigui en oncogens o gens supressors de tumors) com del microambient tumoral en el què es troben (Poliak *et al.*, 2011). Aquesta és una malaltia heterogènia que comprèn una gran varietat de subtipus clínics i morfològicament diferents. Per tant, la classificació d'aquesta malaltia és complexa i té en compte característiques tant diverses com la signatura molecular, el pronòstic i les dianes terapèutiques. La millora del coneixement de la biologia del càncer de mama ha portat a la identificació de diverses dianes moleculars contra les quals s'han desenvolupat tot un seguit de teràpies. Algunes de les dianes identificades són els receptors 2 del factor de creixement epidermal humà (HER2), els receptors d'estrògens (ERs) i els receptors de progesterona (PRs). A grans trets, la presència o absència d'expressió d'aquestes molècules permet classificar el càncer de mama en diferents subgrups. La manca d'expressió de totes tres dianes en les cèl·lules tumorals defineix el subgrup de càncer de mama triple negatiu (TNBC) (Higgins and Baselga, 2011).

El TNBC és el càncer de mama més agressiu, del qual no s'han identificat dianes terapèutiques, i s'associa a metàstasis primerenca i resistència a la quimioteràpia i es manifesta en dones més joves. Malauradament, només el 20 % dels casos responen bé a la teràpia estàndard amb quimioteràpia (Polyak *et al.*, 2011). Actualment s'estan usant teràpies amb inhibidors de molècules com PARP, JAK quinases i EGFR però cap d'elles té massa èxit en el tractament del TNBC. De fet, això no és sorprenent ja que els TNBC es poden subclassificar en 5 o 6 subgrups més, cadascun amb una signatura molecular i una sensibilitat als agents terapèutics diferent (Lehmann *et al.*, 2011; Sherri *et al.*, 2015). Per aquest motiu l'avanç en el coneixement d'aquesta malaltia requereix un millor coneixement del seu perfil molecular i de les alteracions que es produeixen en les vies de senyalització cel·lular per tal d'identificar noves dianes terapèutiques essencials per a desenvolupar tractaments específics per el TNBC.

Una de les vies de senyalització implicada recentment en càncer es la de Cn-NFATc. En aquesta via, mentre la Cn està conservada de llevats a humans, els NFATc apareixen a vertebrats i conseqüentment la senyalització cel·lular de Cn-NFATc esdevé funcional de forma directa o indirecta sobre diferents programes cel·lulars, fet que incrementa la complexitat funcional dels organismes. En aquest context també apareixen noves formes de regulació dels sistemes. Paral·lelament a l'aparició dels NFATc a vertebrats els inhibidors endògens de Cn, les RCAN, passen de ser una única proteïna a eucariotes inferiors a ser-ne tres a vertebrats (Mulero *et al.* 2007). Les seqüències aminoacídiques entre les RCANs presenten una elevada identitat de seqüència entre elles en les regions central i carboxi-terminal de la proteïna. En aquestes regions s'han identificat diversos motius entre els quals es troba el responsable de la inhibició de la via de Cn-NFATc, la seqüència CIC (Aubareda *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2009). Més endavant es va determinar que la seqüència responsable dins del motiu CIC de la inhibició de la Cn vers els NFATc era el motiu PSVVVH de les RCANs (motiu tipus PxlIT). El nostre grup proposa que les proteïnes RCAN, constitueixen un mecanisme clau per a modular la senyalització Ca^{2+} -Cn-NFATc. Concretament proposem la inhibició específica de la via de Cn-NFATc en cèl·lules tumorals mitjançant la sobreproducció de RCAN3 o del pèptid derivat d'aquesta, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, que inclou el motiu PSVVVH, com a eina terapèutica per inhibir la progressió tumoral en un model ortotòpic de càncer de mama triple negatiu. La inhibició d'aquesta via de senyalització ja s'ha demostrat prèviament que és beneficiosa en la teràpia del transplantament d'òrgans i en el tractament de malalties autoimmunes i ara, s'ha analitzat el seu efecte en progressió tumoral.

La implicació de NFATc en processos oncogènics és cada vegada més evident. No s'han descrit alteracions gèniques en els NFATc en càncer però sí una desregulació de l'expressió dels NFATc o de la seva acumulació a nucli en patologies com el càncer de pàncrees (Buchholz *et al.*, 2006) i de pròstata (Lehen'kyi, *et al.*, 2007). En l'activació dels NFATc Cn és essencial ja que els desfosforila i permet la seva translocació i acumulació al nucli on activen la transcripció de diversos gens (Medyouf *et al.*, 2007). L'activitat de la Cn, no obstant, es pot inhibir pels fàrmacs immunosupressors CsA i FK506, que formen complexos amb la ciclofilina A i FKBP12, respectivament, que interaccionen amb Cn i inhibeixen l'activitat fosfatasa de l'enzim. La inhibició de l'activitat de la Cn mitjançant aquests fàrmacs afecta la via de Cn/NFAT però també moltes altres, i com a conseqüència, es produeixen alteracions importants en la cèl·lula responsables dels efectes secundaris observats en els pacients

que reben tractaments amb aquests fàrmacs. L'estudi dels reguladors endògens de la via de senyalització Cn/NFATc pot conduir al desenvolupament de fàrmacs nous i més específics d'aquesta via de senyalització que només afectin a la senyalització de Cn vers els NFATc sense afectar altres substrats de l'enzim. Entre els reguladors endògens de la Cn es troba la família de reguladors de la Cn o RCANs (Davies *et al.*, 2007).

Els resultats d'aquest treball indiquen que la RCAN3 inhibeix la progressió tumoral en un model ortotòpic de TNBC. En concret, la unió entre la subunitat catalítica de la Cn (CnA) i els NFATc es dona a través del motiu PxlIT dels NFATc. Aquest motiu també és present en les RCANs (anomenat PxlIT-like) i competeix amb els NFATc per unir-se a Cn (Mulero *et al.* 2009; Li *et al.*, 2011). Els nostres resultats demostren que la sobreexpressió de RCAN3 inhibeix l'activitat fosfatasa de la Cn respecte els NFATc. En concret, es mostra que RCAN3 interacciona amb Cn pel motiu PxlIT-like (residus 194-199: PSVVVH) però que la mutació de 3 aminoàcids (V197A V198A H199Q, anomenada com a mutació AAQ) en aquest motiu pràcticament anul·la aquesta interacció (Figura 1, carrils 3 i 4). La dèbil interacció romanent però visible entre la proteïna RCAN3 AAQ i la Cn (Figura 1) es pot explicar perquè en la seqüència de RCAN3 hi ha altres motius a part del PxlIT, capaços d'interaccionar amb la Cn (tot i que més dèbilment) com ara el motiu LxxP (Mehta *et al.*, 2009). La sobreproducció d'un pèptid derivat de RCAN3 (anomenat com a pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰) que inclou el motiu PxlIT-like com a únic motiu d'unió a la Cn, interacciona fortament amb Cn. En canvi, la generació de la mateixa mutació AAQ en aquest pèptid (anomenat com a pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ) perd la capacitat d'interacció amb l'enzim (resultats obtinguts en anteriors estudis del nostre grup).

La inhibició de la senyalització de Cn-NFATc per RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ és resultat de la presència d'un motiu PxlIT d'unió a la CnA en ambdues proteïnes, RCAN3 i NFATc, i d'aquesta forma les dues proteïnes competeixen per unir-se a Cn. Aquesta interacció té lloc en una regió de Cn fora del centre actiu i, per tant, no bloquejaria en principi l'accés dels substrats al centre actiu enzimàtic (Li *et al.*, 2011).

La competició de RCAN3 amb NFATc per unir-se a CnA a través dels motius PxlITs té com a conseqüència la inhibició de la senyalització dels NFATc. Els nostres resultats confirmen que la localització subcel·lular dels NFATc, concretament de NFATc2, és nuclear ja sigui en condicions de producció de HA-NFATc1-EGFP recombinant en cèl·lules HEK 293T estimulades amb clorur calci i ionomicina, com de la proteïna endògena

en cèl·lules HEK 293T (Figura 2 i 3) i MDA-MB-231 estimulades amb calci (Figura 4). En canvi, es demostra que NFATc2 té una localització citoplasmàtica en condicions en les quals la Cn està inhibida, ja sigui degut a un tractament amb CsA (Figura 2 i 3 en cèl·lules HEK 293T) o degut a la sobreproducció de la proteïna RCAN3 mitjançant l'ús d'un vector lentiviral en cèl·lules MDA-MB-231 (Figura 4). En canvi, quan s'empra un lentivirus per produir la proteïna RCAN3 AAQ s'obté un resultat similar a les condicions control amb EGFP. Conjuntament, aquests resultats validen tant la funcionalitat d'aquests vectors lentivirals RCAN3/RCAN3 AAQ com l'estímul usat per a activar (calci i ionomicina) o inhibir (tractament amb CsA previ a l'estimulació amb calci i ionomicina) la via de Cn-NFATc. La detecció de la proteïna NFATc2 endògena ha estat possible gràcies a la caracterització realitzada d'un anticòs anti-NFATc2 que detecta la proteïna exògena HA-NFATc2-EGFP per ICF i IHC en la mateixa localització que ho fa l'anticòs anti-EGFP. L'anti NFATc2 serà una eina molt útil per analitzar els nivells d'aquesta proteïna en els tumors ortotòpics. S'ha detectat amb aquest anticòs el NFATc2 endògen en diverses línies cel·lulars.

En quant a la localització subcel·lular de la proteïna NFATc2 en RCAN3 AAQ *in vitro*, s'observa que és nuclear i per tant actiu i, conseqüentment, la proteïna mutant RCAN3 AAQ anul·la la funció inhibidora de RCAN3 sobre la senyalització Cn-NFATc (Figura 4). Respecte al pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, la seva sobreproducció en cèl·lules TNBC també té com a conseqüència una inhibició de la translocació dels NFATc2 a nucli, localitzant-se a citosol i per tant restant inactiu, fet que no es reproduïx en els vectors control ni en la sobreproducció del pèptid mutat, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ (Figura 21). Donat que, en condicions de sobreproducció tant de RCAN3 com del R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en cèl·lules TNBC estimulades la translocació de NFATc2 a nucli està inhibida, i, vist que això no succeeix en les cèl·lules que sobreproduïxen les formes mutades RCAN3 AAQ i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ, els resultats ens permeten concloure que la sobreproducció del motiu PxlIT-like de RCAN3 i del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ és responsable de la inhibició de la senyalització Cn-NFATc *in vitro* (Figura 4 i 21).

En relació a l'efecte funcional de RCAN3/ R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sobre l'activitat transcripcional dels NFATc, els resultats mostren que l'activitat transcripcional dels NFATc2 sobre el gen reporter de la luciferasa es redueix dràsticament d'una manera dosi-dependent en cèl·lules TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468 que sobreproduïxen RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figures 5 i 22) en comparació amb les cèl·lules RCAN3 AAQ/ R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ *in vitro*. D'aquest efecte també n'és responsable el motiu PxlIT-like que contenen ja que en la condició de sobreproducció de RCAN3 AAQ o

del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ, l'activitat transcripcional dels NFATc sobre els promotors de gens dependents de NFATc roman inalterada. A més, també s'observa que el nivell d'inhibició de l'activitat dels NFATc2 sobre els promotors és proporcional al nivell de sobreproducció de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Es podria especular que l'efecte observat podria ser degut a que la sobreproducció de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ afecta directament al promotor dels *NFATc* i per tant a la seva expressió gènica. D'aquesta manera s'explicaria la davallada en la senyalització de Cn-NFATc2 així com l'activitat dels NFATc sobre els promotors de gens dependents dels NFATc. No obstant, els resultats demostren per primera vegada que ni la sobreproducció de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ ni l'efecte inhibitori d'aquests sobre la via Cn-NFATc afecten o regulen l'expressió gènica de *NFATc2* (Figures 11 i 27). Per tant, es pot concloure que la disminució de l'activitat transcripcional dels NFATcs sobre els gens regulats pels NFATc és una conseqüència de la competició dels motius PxlXIT-like presents a RCAN3 i en el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ amb els motius PxlXIT dels NFATc per a unir-se a la Cn.

Els NFATcs, com a factors de transcripció, interaccionen amb molts promotors diferents i regulen l'expressió de molts gens. En els últims vint anys s'han descrit diversos gens diana dels NFATcs, alguns molt relacionats amb processos tumorals com *COX2*, *CSF2*, *IL-8*, *TNF α* , prostaglandines, etc. Per exemple, en línies cel·lulars de melanoma maligne s'ha descrit que la via de senyalització BRAF-MEK-ERK activa NFATc1 i NFATc3 que, al seu torn, activen directament *COX-2* (Yan *et al.*, 2006). Per tant, és important modular aquesta via de senyalització en càncer. En el present treball es demostra que la sobreproducció de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ *in vitro* inhibeix els nivells de proteïna COX-2 en cèl·lules TNBC humanes *in vitro* respecte les cèl·lules MDA-MB-231 estimulades. A més, els resultats demostren que la disminució del nivell de proteïna de COX-2 observada és inversament proporcional al nivells de proteïna RCAN3 o del pèptid derivat *in vitro* (Figures 6 i 23). En canvi, RCAN3 AAQ o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ no afecten l'abundància de COX-2 i en aquestes cèl·lules es detecten uns nivells proteics de COX-2 similars als de les cèl·lules estimulades, no transduïdes amb cap lentivirus, independentment de les quantitats de proteïna mutant AAQ produïda.

Hi ha articles que demostren que una major abundància de COX-2 promou la migració cel·lular en línies de càncer de mama, concretament MDA-MB-231 (Singh, *et al.*, 2005). Alguns estudis relacionen també la via Cn-NFATc amb la migració cel·lular. Un dels primers articles en els quals es va demostrar la implicació de Cn en la migració de cèl·lules tumorals va ser Stathatos N *et al.* (2005) que van descriure que la capacitat de

migració de les cèl·lules de melanoma depèn de l'activació de la Cn. En aquest article es va demostrar que la inhibició de Cn amb CsA o amb el pèptid VIVIT (pèptid sintètic que competeix amb els motius PxlIT dels NFATc per a unir-se a Cn) provoca una inhibició de la migració cel·lular. Respecte a les RCANs, hi ha articles que demostren que la sobreproducció de RCAN1 té com a conseqüència la reducció de la motilitat *in vitro* en cèl·lules de càncer de tiroides (Espinosa *et al.*, 2009). Es creu que és degut a la disminució de la senyalització Cn-NFATc perquè, si s'inhibeix la via amb el pèptid VIVIT, s'observa un increment en els nivells de la proteïna RCAN1. Ara bé, aquest resultat no es pot extrapolar tan fàcilment a RCAN3 ja que l'expressió gènica del transcrit *RCAN1-4*, a diferència de RCAN3, està regulat per la via de senyalització dels NFATc (Davies *et al.*, 2007). En aquest treball s'ha demostrat que la sobreproducció de RCAN3 en cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro* no inhibeix la capacitat de migració cel·lular. De fet, els assajos realitzats de cura de ferides són assajos en els quals hi intervé tant la proliferació com la migració cel·lular. S'esperava observar un increment en la migració de les cèl·lules control EGFP o les que sobreproduïen RCAN3 AAQ respecte les cèl·lules que produeixen RCAN3 de forma proporcional a la inhibició de COX-2 observada i dependent de la inhibició de Cn-NFATc. No obstant, no es veuen diferències en la migració cel·lular entre els tres grups assajats (Figura 7). No obstant sembla observar-se una tendència, que no és significativa, a que la cinètica de tancament de ferides amb cèl·lules que sobreproduïen RCAN3 és més lenta respecte el grup de RCAN3 AAQ (Figura 7 a) i les cèl·lules tractades amb CsA (Figura 7 b). Respecte a l'efecte del pèptid en la migració cel·lular *in vitro*, contràriament al resultat esperat, sembla que la sobreproducció de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ promou la migració cel·lular *in vitro* (Figura 24) però s'han realitzat dos únics estudis i els resultats no són conclouents. Donat que tant les cèl·lules RCAN3 com R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una reducció de l'abundància de COX-2 significativa, s'esperaria observar un efecte inhibitori sobre la migració cel·lular si aquesta depengués únicament dels nivells de COX-2. Per tant, altres vies han d'estar actuant sobre la capacitat de migració d'aquestes cèl·lules. A més, les cèl·lules procedeixen d'una població cel·lular seleccionada per FACS pel mateix nivell d'expressió de EGFP i, per tant, l'heterogeneïtat en els nivells de proteïna COX-2 no en seria una possible explicació. Ara bé, és veritat que en aquest assaig és pràcticament impossible realitzar una ferida en el mateix percentatge exacte de subconfluència del cultiu. Variacions en aquest aspecte podrien també influir en el resultat obtingut. Caldria, a continuació, analitzar l'efecte que pot tenir la sobreproducció de RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en el cicle cel·lular o en l'adhesió cel·lular ja que podrien afectar a la

velocitat de tancament de la ferida, i per tant també a la capacitat de migració cel·lular. Un altre factor a tenir en compte és l'estimulació que han rebut les cèl·lules. A més, no es pot descartar l'efecte d'altres vies de senyalització sobre la via Cn-NFATc en les condicions experimentals assajades. Es van realitzar uns assajos *transwell* amb cèl·lules HUVEC i medi condicionat de cèl·lules MDA-MB-231 que sobreproduïen RCAN3, RCAN3 AAQ, pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ o el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ però no es van observar diferències significatives en cap cas (resultats no mostrats). Finalment, es van realitzar experiments preliminars *in vitro* de creixement cel·lular independent d'ancoratge i de capacitat metastàtica de les cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb els diferents vectors lentivirals però no mostren resultats concloents i cal repetir-los usant diferents línies cel·lulars TNBC per poder determinar l'efecte de RCAN3 i el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en la invasió cel·lular. Això, però, ja serà objecte d'estudi d'un treball posterior.

Com s'ha comentat anteriorment, COX-2 està implicada no sols en migració cel·lular sinó també en la inhibició del creixement tumoral de cèl·lules d'osteosarcoma *in vivo* (Masahiko Fujiwara *et al.*, 2011). En el present treball, donat que la sobreproducció de la proteïna RCAN3 o el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibia la producció de COX-2 respecte a les condicions control, es va decidir generar tumors ortotòpics de TNBC amb cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb EGFP, RCAN3, RCAN3 AAQ i EGFP-R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ humanes. Aquest model ortotòpic amb cèl·lules transduïdes que produeixin proteïnes d'interès és freqüentment usat en l'experimentació en càncer (Gould *et al.*, 2015) ja que és una manera de determinar els efectes funcionals de molècules en els processos biològics i patològics perquè interroga l'expressió gènica i les funcions *in vivo* d'un gen determinat.

En el model ortotòpic de ratolí de TNBC desenvolupat en aquest treball es demostra que en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ el volum tumoral es redueix de forma significativa respecte el dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ (Figures 9 i 25). L'efecte supressor del creixement tumoral de RCAN3 és degut a la interacció amb Cn, ja que la proteïna mutada RCAN3 AAQ, que no s'uneix a Cn, i la EGFP presenten un volum tumoral similar, molt superior al dels animals amb tumors RCAN3. A més a més, el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ que també conté la regió responsable de la interacció amb la Cn reproduïx el mateix efecte de reducció del volum tumoral observat amb els tumors RCAN3, proteïna de la qual deriva. En base a aquests resultats es pot concloure que els efectes observats en la reducció del volum dels tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ poden explicar-se per una competició al·lostèrica entre RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i els NFATC, que contenen motius

PxlXIT, per interaccionar en un mateix lloc en Cn. Les diferències en l'expressió de gens dependents dels NFATc podrien probablement explicar en part les diferències en el volum tumoral observades entre els tumors RCAN3 i els RCAN3 AAQ i EGFP, igual que les observades entre els tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i els EGFP control

Les proteïnes NFATc s'han implicat recentment en la progressió tumoral (Müller *et al.*, 2010; Manacini *et al.*, 2009). De fet, en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, en els quals el volum tumoral és força reduït, en comparació amb els tumors EGFP i RCAN3 AAQ, el NFATc2 sembla ser menys abundant. En quant a l'activació del NFATc2, per IHC s'observa que aquesta proteïna es localitza més a citosol i menys a nucli que en els respectius compartiments cel·lulars en els tumors EGFP i RCAN3 AAQ, i per tant està més inactiu (Figures 10 i 26). Resultats similars s'obtenen amb tumors R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ respecte els R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ. Això permet concloure que el NFATc2 està més inactiu en les cèl·lules tumorals dels tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ que en els tumors EGFP i RCAN3 AAQ. No obstant, quan s'analitzen els nivells de NFATc2 per transferència de western, l'anàlisi amb anti-NFATc2 mostra que no hi ha diferències clares en l'estat de desfosforilació del NFATc2 entre els diferents grups en estudi. Això s'explica pel fet que, en l'extracte total de proteïnes usat en la transferència de western hi ha diverses poblacions cel·lulars diferents, des d'adipòcits cel·lules tumorals, cèl·lules endotelials, entre d'altres. Per tant, no es pot descartar que la barreja de diferents tipus cel·lulars en el tumor emmascari la desfosforilació del NFATc2 en les cèl·lules tumorals.

Si NFATc2 està inactiu en tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ seria d'esperar que la l'expressió gènica regulada pels NFATc i els productes proteics codificats per aquests gens també estiguessin marcadament reduïts en aquests tumors en comparació als tumors EGFP i RCAN3 AAQ. Al igual que s'ha demostrat *in vitro*, *in vivo* també s'observa una reducció dramàtica en els nivells de proteïna COX-2 en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figures 12c i 28c). COX-2, codificada per un gen regulat pels NFATc, està sovint sobreproduïda en diferents tipus de càncers i línies cel·lulars tumorals, incloent les cèl·lules MDA-MB-231 (Yiu *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2005; Iñiguez *et al.*, 2000). La inhibició de l'activitat de l'enzim COX-2 s'ha demostrat que és una forma efectiva de frenar la progressió tumoral, com es demostra per l'eficiència dels fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (NSAID) i d'inhibidors selectius de COX-2 en la prevenció i progressió de diferents tipus de càncers (DuBois *et al.*, 2003; Iñiguez *et al.*, 2003). No obstant, s'ha demostrat que els inhibidors de COX-2 desenvolupats fins ara comporten cert risc cardiovascular i el seu ús de forma regular és limitat. A més a més de la COX-2, altres proteïnes

codificades per gens regulats pels NFATc estan inhibides en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ com ara la citoquina IL-8 (Figures 12 i 28).

Recentment, s'ha demostrat que la baixa expressió de IL-8 en el TNBC humà (representat en aquest estudi amb la línia cel·lular MDA-MB-231) està associada a un bon pronòstic en els pacients afectats, de manera que la IL-8 és una possible diana terapèutica per aquest tipus de càncer (Rody *et al.*, 2001; Maldonado-Perez *et al.*, 2009). De fet, teràpies dissenyades contra els receptors de IL-8 (CXCR1 i CXCR2) per a bloquejar l'activació de IL-8, han donat resultats positius en la reducció tant de l'angiogènesi com del creixement de tumors de pulmó (Keane *et al.*, 2004; Tazzyman *et al.*, 2011). Aquests dos receptors tenen una estructura similar degut a una duplicació gènica en el seu origen. La senyalització després de la unió amb el receptor es transmet a través de la membrana i de canvis conformacionals en la cua C-terminal dels receptors. Els CXCR1 s'activen per IL-8 mentre que els receptors CXCR2 poden activar-se per unió a múltiples interleuquines (IL-6, IL-11 entre d'altres). Amb la unió lligand-receptor s'activa la proteïna G i les quinases de serina-treonina, com el Phosphatidylinositol-3 (PI3-K), que activarà la via de senyalització d'Akt. L'increment en l'expressió d'Akt en càncer s'ha descrit que té un paper important en la proliferació i supervivència cel·lular, el creixement tumoral, la migració cel·lular o la formació de metàstasis (Bellacosa *et al.*, 1991; Hernandez-Aya *et al.*, 2011; Irie *et al.*, 2005; Chin *et al.*, 2009). La via de senyalització de IL-8 regula, entre altres, l'activitat de la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK). Aquesta proteïna inicia una cascada de senyalització que inclou varies serina/treonina quinases. Com a resultat d'aquesta senyalització s'activen altres cascades com la de RAF-1/MAP/ERK. L'activació de MAPK indueix la proliferació i supervivència cel·lular en diferents tipus cel·lulars, inclosos cèl·lules tumorals (MacManus CF *et al.*, 2007).

A més de l'activació de la via de IL-8 a través de PI3-K, la unió de la IL-8 amb els receptors activa la fosfolipasa C (PLC). Com a conseqüència de l'activitat de PLC es forma el diacilglicerol (DAG) i l'inositol trifosfat i s'inicia una mobilització de calci i una activació per fosforil·lació de la proteïna quinasa C (PKC). PKC, alhora, pot fosforilar c-fos i c-jun que dimeritzaran formant el factor de transcripció AP-1 i entraran a nucli per activar la transcripció gènica juntament amb altres factors de transcripció com els NFATc.

Els resultats obtinguts en els tumors ortotòpics RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ mostren una disminució molt marcada significativa dels nivells de proteïna de IL-8 respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ (Figures 12 a i 28

a). S'obtenen resultats similars quan s'analitza l'abundància de la proteïna IL-8 (Figures 12 **d** i 28 **d**). No obstant, s'observa que l'abundància de la IL-8 en els tumors EGFP és superior a la dels tumors RCAN3 AAQ (Figura 12 **d**). Aquesta reducció de producció de IL-8 en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ podria explicar-se per la presència d'altres zones i motius proteïcs a RCAN3 AAQ, diferents del motiu PxlIT, que poden contribuir a la reducció dels nivells de IL-8. En aquest sentit, aquest efecte diferencial en l'abundància de IL-8 de RCAN3 AAQ respecte els tumors EGFP pot atribuir-se en part al fet que les proteïnes RCANs, tal i com ha estat prèviament descrit (Mehta *et al.*, 2009), tenen dos llocs d'unió a Cn en la seva seqüència: LxxP i PxlIT-like, igual que els NFATc. En aquest cas el motiu LxxP de RCAN3 AAQ, que està intacte, podria interaccionar dèbilment amb la Cn i podria tenir un cert efecte inhibitori sobre la producció de IL-8 (Figura 12 **d**). Donat que no disposem de tumors ortotòpics que sobreproduïen R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ i que per tant, no tenim dades de l'efecte de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ sobre el nivell de proteïna IL-8, hipotetitzem que la inhibició parcial de la IL-8 entre els tumors EGFP i RCAN3 AAQ es podria deure a la dèbil interacció del motiu LxxP amb la Cn observada en la Figura 1 o a altres proteïnes que puguin interaccionar amb regions conservades de RCAN3, diferents de la del motiu CIC, que puguin afectar la producció de IL-8.

Els tumors RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ tenen una proliferació cel·lular menor a la dels tumors EGFP o RCAN3 AAQ. Vists els resultats de IL-8, vam estudiar si IL-8 podia tenir relació amb la proliferació cel·lular i sembla que sí ja que IL-8 s'ha descrit com a factor responsable de la via d'activació de E2F, factor de transcripció clau en la progressió del cicle cel·lular (Murphy C. *et al.*, 2005). En el nostre grup hem demostrat *in vivo* que les cèl·lules dels tumors RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten en les cèl·lules tumorals una disminució en l'activació dels NFATc (Figures 10 i 26) i això comporta tot un seguit de conseqüències funcionals sobre les cèl·lules tumorals. Els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una disminució de la proliferació cel·lular (Figures 13 i 29), un increment en l'apoptosi, tot i que sense alteracions en el nivell de necrosi cel·lular (Figures 14 i 30). Donat que la única diferència entre els tumors RCAN3 i RCAN3 AAQ és la mutació del motiu PxlIT podem concloure que aquest efecte funcional de RCAN3 és degut a la competició de RCAN3 amb NFATc per unir-se a Cn. Resultats similars s'obtenen amb R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. No obstant, les isoformes dels NFATc involucrades i altres vies de senyalització diferent a la de Cn-NFATc implicades en l'obtenció d'aquest fenotip a RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no ha estat analitzada en aquest treball. El que es demostra en aquest treball és que tant l'efecte inhibitori sobre la proliferació com l'efecte promotor

de l'apoptosi cel·lular en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ són mediats per la via de senyalització Cn-NFAT.

Un dels primers estudis en els qual es van associar els NFATcs a la proliferació cel·lular es va realitzar en fibroblasts, en els quals s'activava constitutivament NFATc1 i s'indueïa transformació cel·lular i formació de colònies independent d'ancoratge (Neal *et al.*, 2003). En el nostre estudi, la competició de RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ amb NFATc per la interacció amb Cn explicaria que l'increment en l'abundància de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ impedeixi als NFATc executar la seva funció promotora de la proliferació cel·lular. De fet, la proliferació cel·lular i la regulació d'aquesta s'han relacionat amb la Cn. La primera vegada que es va relacionar la Cn amb la proliferació cel·lular va ser en els estudis realitzats per Takashige Masuo *et al.*, 2009. En aquest article es demostrava que la Cn promou la proliferació tant *in vitro* (línies cel·lulars de càncer de colon HT29 i WiDr) com *in vivo* en adenocarcinomes de colon. En el seu article, la inhibició de Cn per CsA inhibeix el cicle cel·lular incrementant els nivells de proteïna de p21, inhibidor de les ciclines, exercint una funció antiproliferativa. La CsA a més s'ha vist que inhibeix la proteïna PCNA, necessària per a la replicació del DNA i c-Myc, factor de transcripció també essencial en la progressió del cicle cel·lular (Takashige Masuo *et al.*, 2009). Curiosament, segons altres estudis, l'expressió de c-Myc augmenta quan NFATc2 s'uneix directament al seu promotor, demostrant que l'expressió gènica de c-Myc està regulat per aquest NFATc (Buchholz *et al.*, 2006). Això indica que la inhibició de la via Cn-NFATc està implicada en la inhibició parcial de la proliferació. A més a més, l'increment del calci intracel·lular és essencial per l'activació cel·lular. De fet, varis estudis demostren que la senyalització per calci estimula la transcripció de gens associats a la progressió del cicle cel·lular i també promou la transició de la fase G1 a S (Anraku *et al.*, 1991; Lipskaia *et al.*, 2004). Aquests resultats suggereixen que les proteïnes NFATc, activades per defosforilació com a conseqüència de l'activació de Cn per l'estimulació per calci, són uns reguladors notables en la maquinària del cicle cel·lular (Viola *et al.*, 2005). A més, s'ha demostrat que el promotor de CDK4 presenta la seqüència consens dels llocs d'unió al DNA dels NFATc i que CDK4 està regulada negativament per NFATc2 de forma independentment al factor de transcripció AP-1 (Baksh *et al.*, 2002). Aquests resultats demostren que NFATc2 controla directament l'expressió gènica de *CDK4*. A més, NFATc2 ha estat implicat en el control de diferents gens de les ciclines actuant com un regulador negatiu de la ciclina A2, E i B1 durant l'activació dels limfòcits (Caetano *et al.*, 2002). També s'ha descrit que el tractament amb CsA i FK506 en queratinòcits

suprimeix l'expressió de p21 i p27, inhibidors de CDKs (Santani *et al.*, 2001). Totes aquestes evidències recolzen la hipòtesi que els factors de transcripció NFATc controlen l'expressió d'alguns dels gens relacionats amb el cicle cel·lular i són reguladors importants de la progressió del cicle cel·lular.

Un altre factor relatiu a l'efecte de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sobre la proliferació cel·lular és la inhibició de COX-2 observada en els tumors RCAN3 /R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Recentment s'ha descrit que COX-2 té un paper notable en la regulació del cicle cel·lular ja que s'ha demostrat que el silenciament de COX-2 en cèl·lules de càncer de mama redueix la proliferació cel·lular (Park *et al.*, 2012; Sheng Yang and Hui Han, 2014). Referent a la IL-8, aquesta s'ha associat també amb el cicle cel·lular. Un dels articles publicats demostra que, a través de la via PI3K-AKT, IL-8 pot regular de forma postraduccional la ciclina D en cèl·lules de càncer de pròstata, incrementant-ne la proliferació (MacManus *et al.*, 2007). En aquest treball, els tumors RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no produeixen pràcticament IL-8 (Figures 12 d i 28 d) i aquest efecte és en part degut a la inhibició de la via Cn-NFATc per RCAN3 o el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Els efectes sobre la proliferació independents de Cn-NFAT, però, poden venir també via altres vies de senyalització de proteïnes que interaccionen tant amb RCAN3 i RCAN3 AAQ, independentment del motiu PxlXIT, o d'efectes d'altres vies deguts a la senyalització de IL-8 i/o COX-2 (Figures 12 i 28). Tots aquests factors i publicacions recolzen els resultats derivats del present treball, que relacionen l'alteració en la via de senyalització Cn-NFATc amb una disminució de la proliferació cel·lular. Alhora, aquesta disminució pot explicar, en part, les diferències en el volum tumoral observades en els tumors RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.

Per a determinar si existien alteracions en el grau d'apoptosi cel·lular que també poguessin contribuir a les diferències de volum tumoral observades en els tumors ortotòpics de TNBC RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ respecte els tumors EGFP i RCAN3 AAQ s'ha estudiat l'apoptosi cel·lular.

L'apoptosi està finament regulada a nivell cel·lular i molecular. Hi ha moltes molècules implicades en aquest procés com les caspases, quinases i factors de transcripció. De fet, s'ha demostrat que les proteïnes NFATc s'uneixen a regions promotores i incrementen l'expressió d'alguns efectors de l'apoptosi com TNF- α o FasL (Rao *et al.*, 1997). Sembla a ser que NFATc2 té una funció pro-apoptòtica en limfòcits T ja que les cèl·lules deficitàries en NFATc2 disminueixen l'expressió de FasL i TNF- α i són resistents a l'apoptosi (Chuvpilo *et al.*, 2002). No obstant, altres estudis indiquen que els membres dels NFATc

tenen rols a vegades també anti-apoptòtics. Per exemple, s'ha descrit que la sobreproducció de NFATc1 en adipòcits protegeix les cèl·lules de l'apoptosi en resposta a l'absència de factors de creixement (Neal and Clipstone, 2003).

En el present treball demostrem que els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten un increment de l'apoptosi cel·lular *in vivo*, fet que és, per tant, dependent de la via Cn-NFATc. No coneixem, encara, els mecanismes pels quals els NFATc inhibeixen l'apoptosi en les cèl·lules tumorals, però podria ser que els gens regulats pels NFATc i implicats en la proliferació cel·lular, com c-Myc, actuessin com interruptors de la senyalització cel·lular de manera que una disminució en la seva funcionalitat, per alteració de la via Cn-NFATc per exemple, iniciés una via que desencadenés en apoptosi. No descartem la implicació d'altres vies de senyalització, independents de Cn-NFATc, com a partícips en l'efecte proapoptòtic observat en els tumors RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.

En aquest treball de tesi doctoral demostrem que la interacció dels motius PxlIT-like de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ amb la Cn, i la consegüent inhibició de la senyalització Cn-NFATc afecten característiques pròpies del desenvolupament tumoral com la proliferació i l'apoptosi cel·lulars. No obstant, altres propietats haurien d'estar afectades per a explicar les diferències tan evidents de la mida dels tumors ortotòpics RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en comparació amb els dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ.

L'angiogènesi és indispensable en el desenvolupament embrionari i està molt regulada per diverses vies de senyalització. No obstant, la inducció perllongada de l'angiogènesi s'associa freqüentment amb malalties com inflamació crònica, diabetis o càncer entre d'altres (Folkman *et al.*, 1995). La relació entre Cn i els NFATc amb l'angiogènesi fa anys que es coneix. Els models animals deficientes en NFATc3, NFATc4 i en la subunitat B de la Cn (CnB) van demostrar, per primera vegada, la importància de la via de senyalització Cn-NFATc en l'angiogènesi (Graef *et al.*, 2001). Els ratolins sense CnB o sense els gens NFATc3/NFATc4 morien a la meitat de la gestació degut a desordres vasculars causats per una expressió ectòpica de VEGF que, en condicions normals, està suprimida pels NFATc. Els NFATc controlen les funcions angiogèniques de la proteïna *Frizzled-related protein 2* (SFRP2), proteïna moduladora de la senyalització de Wnt entre d'altres. *SFRP2* s'expressa a la vasculatura de molts tipus de tumors, incloent aproximadament el 85% dels carcinomas de mama humans (Bhati *et al.* 2008). La inhibició del *NFATc2* s'ha descrit que altera l'angiogènesi *in vivo* (Urso *et al.*, 2011). En aquests assajos, com a conseqüència de la inhibició dels *NFATc* s'ha observat una

reducció de l'expressió gènica de COX-2. No obstant, aquests estudis es descriuen des del punt de vista de l'anàlisi molecular de l'activitat de les proteïnes NFATc en les cèl·lules i en el microambient tumoral. En el nostre estudi, en canvi, ens focalitzem en els efectes funcionals derivats de l'alteració de la via de senyalització Cn-NFATc per RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, específicament en el desenvolupament tumoral.

L'angiogènesi tumoral és una característica essencial en el desenvolupament i progressió del càncer i es considera una diana per a teràpies antitumorals. Com a conseqüència del tractament antiangiogènec s'aconsegueixen tres efectes: la regressió de la vasculatura tumoral, la normalització dels vasos existents i la inhibició de la formació de nous vasos (Willet *et al* 2004). La regressió és l'efecte més visual a simple vista. La normalització dels vasos dóna lloc a vasculatura més eficient però es pot confondre amb una no-resposta del tumor al tractament ja que aquests canvis no sempre es tradueixen en variacions en el diàmetre del tumor. D'entre els tractaments investigats, s'ha demostrat que l'administració d'inhibidors de Cn com CsA i FK506, és eficaç per inhibir la resposta angiogènica induïda per VEGF en les cèl·lules endotelials *in vivo* (Hernandez *et al.*, 2001; Courtwright *et al.*, 2009; Siamakpour-Reihani *et al.*, 2001). Aquests articles evidencien la implicació de la via Cn-NFATc en la regulació de l'angiogènesi. Els nostres resultats també van en la mateixa direcció. Nosaltres demostrem que la sobreproducció de la proteïna RCAN3 o del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ que inhibeix l'activitat fosfatasa de la Cn sobre els NFATc produeix una disminució dràstica en la presència i l'àrea tumoral dels vasos i que aquest efecte és concretament degut al motiu PxlIT-like d'interacció amb la Cn ja que els tumors RCAN3 AAQ, no presenten cap afectació en l'angiogènesi tumoral (Figures 15 a i b, i 31 a). No es coneix si aquesta alteració en l'àrea dels vasos afecta també a la funcionalitat del vas. Per a comprovar això s'haurien de fer injeccions amb un líquid de contrast (normalment amb tinta xinesa) en els vasos de l'animal. Està previst fer aquests assajos en un futur proper.

Els tumors ortotòpics RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una inhibició significativa de l'expressió de VEGF en més del 50% vers els tumors control o els RCAN3 AAQ/ R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ AAQ (Figures 15 c i 31 c). VEGF és alliberat per les cèl·lules tumorals, les endotelials i els fibroblasts i, quan s'uneix als seus receptors, s'activen un seguit de vies de senyalització entre les quals hi ha la via de Cn-NFATc. Alhora, aquesta via actua com a regulador positiu del mateix VEGF, ja que NFATc actiu pot induir la transcripció tant de VEGF com dels seu receptor VEGFR1 (Jinnin M *et al.*, 2008). Altres gens dependents dels NFATc que s'indueixen i que també

tenen un paper en l'angiogènesi són *COX-2*, *RCAN1-4*, i *IL-8*, per tant, de forma indirecta, la interacció de VEGF amb el seu receptor pot induir l'expressió d'aquests gens. De fet, estudis en animals deficients en *COX-2* han demostrat que *COX-2* té un rol essencial en l'angiogènesi tumoral. En ells, la densitat vascular està inhibida en els animals homozigots per la deleció del gen *COX-2* (Williams *et al.*, 2000). Les cèl·lules tumorals malignes expressen nivells elevats de *COX-2* i *VEGF*, factors que indueixen la generació de nous vasos sanguinis que aporten nutrients i oxigen a les cèl·lules malignes i permeten el creixement tumoral. El VEGF també estimula l'expressió de *COX-2* i, com a conseqüència, es produeixen tot un seguit de prostaglandines derivades de l'activitat d'aquest enzim *COX-2*. Les prostaglandines poden estimular la producció de VEGF d'una manera paracrina o autocrina, dependent del compartiment cel·lular involucrat. Aquesta retroalimentació encara augmenta més els nivells de prostaglandines i de factors angiogènics, que, al seu torn, indueixen enzims proteolítics que poden actuar a la matriu extracel·lular i facilitar altres característiques pròpies de les cèl·lules tumorals com la capacitat d'invasió.

VEGF també és capaç d'induir de forma indirecta l'expressió de *RCAN1-4* a través de la via Cn-NFATc, fet que s'associa a una funció de control de l'activació de la via de Cn-NFAT per part de *RCAN1-4*. Contràriament a *RCAN1-4*, la isoforma *RCAN1-1* no està regulada per la via Cn-NFATc, però podria tenir un paper promotor de l'angiogènesi (Masashi *et al.*, 2004). La implicació exacta de la família de les RCANs en la formació de la vasculatura tumoral no és del tot clara. En un estudi de Ryeom i col·laboradors, la deleció d'aquestes dos isoformes de *RCAN1* causa una hiperactivació de la via Cn-NFATc i una apoptosi prematura de les cèl·lules endotelials, donant com a resultat la inhibició de l'angiogènesi tumoral *in vivo* (Ryeom *et al.*, 2003). El tractament amb CsA d'aquest model de ratolí transgènic causa una recuperació dels defectes observats sobre les cèl·lules endotelials i restableix el creixement tumoral. Posteriorment, Baek va demostrar que un lleuger augment en l'expressió del mateix *RCAN1* contribueix a una angiogènesi tumoral alterada i insuficient degut a la inhibició de la Cn, i, com a resultat, es va observar una supressió significativa en el creixement tumoral (Baek *et al.*, 2009). Els resultats d'aquests estudis suggereixen que els efectes exactes de la via Cn-NFATc depenen del context cel·lular, i que la força relativa de les senyals involucrades defineix el fenotip resultant. Respecte a l'ambigüitat de resultats obtinguts amb *RCAN1*, es suggereix que aquesta isoforma podria tenir funcions independents de la Cn (Vega *et al.*, 2003). En les nostres condicions experimentals, els nostres resultats demostren

que les cèl·lules tumorals amb la via de senyalització Cn-NFATc alterada per sobreproducció de RCAN3 o del pèptid derivat, produeixen nivells molt baixos de VEGF i no són capaces de desencadenar una resposta angiogènica adequada a diferència del que succeeix en els tumors RCAN3 AAQ, fet pel qual podem concloure que la inhibició de l'angiogènesi tumoral en els tumors és resultat de la interacció del motiu PxlXIT de RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ amb Cn i el conseqüent desplaçament dels NFATc, fet que comporta la inhibició de la senyalització de la via Cn-NFATc i els efectes fenotípics observats en el volum reduït dels tumors ortotòpics RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Ara bé, amb una alteració d'aquestes dimensions, s'esperaria observar, a nivell histològic, algunes àrees de necrosi corresponents a les zones tumorals menys irrigades i, en canvi, no s'observen diferències significatives en el grau de necrosi cel·lular entre els diferents grups tumorals assajats.

En el procés de la necrosi tumoral, les cèl·lules canceroses inicien la necrosi en situacions com la falta de nutrients o la isquèmia. En aquestes situacions les cèl·lules moren i són fagocitades per cèl·lules immunitàries infiltrades en el tumor. La mida tumoral és important a l'hora d'estudiar àrees necròtiques perquè com més gran és el tumor en volum, més aportació sanguínia necessitarà. Si la xarxa vascular tumoral està afectada, no totes les cèl·lules rebran els nutrients i oxigen necessaris i s'espera, que com a conseqüència, incrementi l'àrea de necrosi tumoral. Però en els models ortotòpics generats a partir de cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb els lentivirus que expressen tant la proteïna sencera RCAN3 com el pèptid derivat d'aquesta proteïna, no s'observa cap diferència pel què fa a l'àrea necròtica d'aquests tumors en comparació amb els tumors EGFP i RCAN3 AAQ (Figures 14 i 30). A mesura que el tumor va creixent, les cèl·lules es van adaptant a un ambient pobre en oxigen i nutrients. En el cas dels tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ probablement les cèl·lules tumorals no pateixen una disminució sobtada del nivell de nutrients o oxigen o s'han adaptat a créixer en aquestes condicions i, per tant, no presenten un increment significatiu en la necrosi. Per aquest motiu, tot i que l'àrea de vasos estigui molt reduïda en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ respecte als tumors RCAN3 AAQ o EGFP, obtenim un percentatge de necrosi similar entre les condicions tumorals assajades. Ara bé, el fet que el percentatge de necrosi per volum tumoral no variï podria explicar-se per la diferència en el volum tumoral. El percentatge d'àrea necròtica quantificat entre les diferents condicions és el mateix però el volum mig de cada condició és diferent. Si la relació entre àrea necròtica/volum és igual en les tres condicions significaria que la necrosi varia en funció del volum, com seria d'esperar. No obstant, tot

i no tenir uns resultats significatius, els resultats obtinguts mostren una lleugera tendència a incrementar de la relació de l'àrea necròtica/volum en els tumors RCAN3 en comparació als de EGFP i RCAN3 AAQ. Aquests resultats suggereixen que la sobreproducció de RCAN3 no sembla afectar la necrosis tumoral.

Un altre factor a tenir en compte en l'angiogènesi és la IL-8, interleuquina imprescindible en els processos inflamatoris i regulada majoritàriament pels NFATcs a través de la via de senyalització Cn-NFATc, entre d'altres, en cèl·lules TNBC (Kaunisto *et al.*, 2015). Els nostres resultats demostren que en els tumors RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ hi ha una inhibició de la IL-8 que pot afectar al creixement tumoral i a la proliferació cel·lular però a més, hi ha articles que demostren que la IL-8 també té un rol en l'angiogènesi. En condicions de silenciament de la *IL-8* en cèl·lules de melanoma, s'observa un efecte inhibitori de la IL-8 sobre la proliferació de les cèl·lules endotelials i sobre la morfologia i quantitat de vasos generats *in vivo* (Srivastava *et al.*, 2015). No obstant, l'efecte més conegut de la IL-8 en la progressió tumoral és el reclutament de neutròfils associats a tumor (TANs). Les cèl·lules tumorals secreten IL-8 que atrau les cèl·lules immunitàries, principalment neutròfils al microambient tumoral. En un primer moment l'objectiu que es persegueix en aquesta infiltració de neutròfils de l'hoste és l'eliminació de les cèl·lules tumorals.

Diversos estudis han demostrat que les vies de senyalització NFK β i la via JAK2/STAT5 també estarien implicades en la inducció de l'expressió gènica de *IL-8* en càncer, demostrant que Cn-NFATc no és la única via reguladora de IL-8 (Bobrovnikova-Marjon *et al.*, 2004; Britschgi *et al.*, 2012). La via Cn-NFATc indueix l'expressió de *IL-8* en resposta a l'estimulació per prostaglandines, fet que enllaça la producció de proteïna COX-2 amb la senyalització de IL-8 (Sales *et al.*, 2009). Cal tenir en compte que concretament les cèl·lules MDA-MB-231 no expressen els receptors de IL-8 (Kaunisto *et al.*, 2015), CXCR1 i CXCR2, i, per tant, el reclutament de neutròfils via IL-8 ha de ser un efecte paracrí. Els nostres resultats demostren que els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten, en comparació als tumors controls EGFP i RCAN3 AAQ, una inhibició significativa dels PMN, entre els quals són majoritaris els TANs (Figures 16 i 32). Aquests resultats són corroborats per d'altres estudis en els quals s'ha relacionat positivament l'activació dels NFATc amb el reclutament de neutròfils i l'expressió i producció de citoquines com IL-8 (Zhang *et al.*, 2014). Altres estudis relacionen la presència de neutròfils amb l'increment de la mortalitat en pacients de càncer de mama (Azab *et al.*, 2012). A més, s'ha descrit recentment que la migració dels neutròfils

augmenta en les cèl·lules de càncer que expressen concretament NFATc2 i disminueix en les que tenen *IL-8* silenciats per shRNA. (Kaunisto *et al.*, 2015). Aquesta fou precisament una de les hipòtesis plantejades en el nostre treball i s'ha pogut demostrar que la sobreproducció a nivell cel·lular de del motiu PxlIT-like de RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ desplaça els NFATc de la seva interacció amb Cn i això produeix, entre d'altres efectes, una inhibició de la via de senyalització de Cn-NFATc i de l'expressió gènica de la *IL-8*, regulada pels NFATc, fet que es tradueix amb l'absència quasi total d'infiltració de TANs en el microambient dels tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰.

Un dels altres tipus cel·lulars presents en l'infiltrat de cèl·lules immunitàries són els macròfags associats a tumors (TAMs). Sobre els macròfags associats a tumor (TAMs) se'n coneixen pocs detalls donada la seva complexitat individual, les diverses funcions que realitzen i perfils moleculars en diferents càncers. Per exemple, no es coneixen els factors que controlen l'equilibri entre les funcions supressores de tumors i protumorals dels macròfags ni les alteracions que pateixen i que promouen la progressió tumoral. Diversos autors suggereixen l'existència de diverses poblacions de TAMs en un mateix tumor, que poden anar canviant de fenotip durant el desenvolupament del tumor i la seva localització en el microambient tumoral. Per exemple, els TAMs reclutats a les àrees hipòxiques es creu que promouen l'angiogènesi (Lewis *et al.*, 2006), mentre que els TAMs de l'estroma jugarien un paper més actiu en la invasió i l'angiogènesi (Pollard *et al.*, 2008). Estudis moleculars parlen d'una altra població de macròfags que estaria implicada en el desenvolupament del tumor (Ojalvo *et al.*, 2009). D'entre els estudis que demostren que els TAMs podrien tenir funcions protumorals, n'hi ha que descriuen que una disminució el reclutament de macròfags al tumor causa una disminució en l'angiogènesi, creixement tumoral i metàstasi *in vivo* (Miselis *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2001). Tot i que aquests estudis descriuen funcions protumorals, les conseqüències de la supressió de les poblacions de macròfags són molt heterogènies, degut possiblement a la gran varietat de factors que produeixen i alliberen al microambient tumoral en funció de cada situació (Joyce *et al.*, 2009). Els nostres resultats indiquen que els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ no presenten diferències significatives en el número de TAMs entre les diferents condicions tumorals assajades, ni quantificant-los en tinció d'H-E ni usant anticossos específics per a detectar-los (Figures 17 i 33). L'alteració diferencial entre les cèl·lules immunes infiltrades (TANs i TAMs) en els diferents grups de tumors suggereix que les alteracions observades en els TANs són degudes als nivells de producció de *IL-8* per les cèl·lules

tumorals i que les citoquines i factors quimiotàctics secretats per les cèl·lules tumorals no afecten als TAMs. Amb la via de Cn-NFATc inhibida en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, hi ha una inhibició marcada significativa de IL-8 que comporta la manca de reclutament de TANS o PMNs. També podria ser que la disminució de la infiltració de TANS en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ vingués donada en part, per un efecte indirecte d'accessibilitat d'aquestes cèl·lules a la massa tumoral derivat de la inhibició de l'angiogènesi. No obstant, la quantificació de cèl·lules infiltrades s'ha realitzat en zones allunyades dels vasos i, per tant, no hauria d'influir l'àrea vascular amb el reclutament d'aquestes cèl·lules. Recentment s'han publicat estudis que confirmen els nostres resultats on demostren que NFATc2 és capaç de promoure el reclutament de TANS mitjançant la regulació de *IL-8* (Kaunisto *et al.*, 2015).

Una altra característica dels tumors TNBC és la capacitat d'invasió mitjançant la transició epiteli-mesenquimal. Aquesta transició permet a la cèl·lula canviar d'un fenotip epitelial a un de mesenquimal, teixit menys diferenciat en el qual apareixen les capacitats d'invasió i metàstasi. En els tumors generats en aquest treball no s'han observat canvis en el fenotip de EMT de les cèl·lules MDA-MB-231 usades. Aquestes cèl·lules *per se* presenten un fenotip mesenquimal ja que expressen vimentina però no E-caderina. Aquests resultats també s'han demostrat en estudis de l'expressió de gens implicats en EMT en línies cel·lulars de càncer de mama (Hollestelle *et al.*, 2013). Per tant, partim de cèl·lules altament desdiferenciades amb capacitat d'invasió i de metàstasi. Ara bé, aquest fenotip observat en els tumors EGFP i RCAN3 AAQ no és diferent al dels tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ (Figures 18 i 34) i per tant no semblen afectar la EMT. Aquests resultats preliminars cal repetir-los emprant altres línies de TNBC abans de poder concloure l'efecte de RCAN3 i el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en la EMT.

Pel que fa referència a la capacitat de RCAN3 i el pèptid derivat d'aquesta de produir metàstasi s'han analitzat dos marcadors, la ID1 i la S100A4. ID1 és un membre de la família de factors de transcripció hèlix-loop-helix (HLH), proteïnes que tenen dominis d'homodimerització o heterodimerització i un domini d'unió a DNA. La família de les proteïnes ID (que comprèn els membres ID1 a ID4), però, és la única que no té aquest domini d'unió al DNA. Tot i així, regulen de forma negativa la transcripció gènica unint-se directament a d'altres factors de transcripció (Norton *et al.*, 2000). Els factors de transcripció IDs estan implicats en processos cel·lulars importants com en la diferenciació cel·lular i la proliferació però també en l'angiogènesi (Lyden *et al.*, 1999), la migració, la invasió i la metàstasi. La sobreexpressió de ID1 en cèl·lules epitelials de

càncer de mama promou la invasió cel·lular i la metàstasi pulmonar en càncer de mama (Gupta *et al.*, 2007), mentre que el seu silenciament les disminueix (Fong *et al.*, 2011). Pel què fa a referència a S100A4, és un membre de la família de proteïnes S100, implicada directament en la formació de metàstasi. L'abundància de la S100A4, concretament, s'ha descrit que és elevada en càncer de mama, de pàncrees, de pròstata i d'esòfag entre d'altres (Garrett *et al.*, 2006; Takenaga *et al.*, 1997) i s'ha definit com un marcador de pronòstic ja que els seus nivells d'expressió s'associen positivament a la malignitat del tumor i a la mort del pacient (Rudland *et al.*, 2000; Platt-Higgins *et al.*, 2000). L'expressió gènica de la S100A4 està regulada pels NFATc. Ambdues proteïnes, ID1 i S100A4, es consideren marcadors de malignitat dels tumors i per aquest motiu s'han analitzat en aquest projecte. Tot i no observar canvis en EMT *in vivo*, ni en la migració de les cèl·lules MDA-MB-231 *in vitro*, es va decidir analitzar la capacitat d'invasió de les cèl·lules tumorals. Els resultats *in vivo* derivats d'aquest anàlisi han mostrat que l'abundància d'ID1 i de S100A4 és molt inferior en els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ que en els tumors EGFP i RCAN3 AAQ (Figures 19 i 35). Això demostra que el motiu PxlIT-like present en RCAN3 i en R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ és el responsable de la inhibició dels marcadors pre-metastàtics ID1 i S100A4 a través de la inhibició de la interacció Cn-NFATc. Alguns estudis han descrit una possible via de regulació de la S100A4 a través de la proteïna Src, codificada per un gen regulat pels NFATc (Kim *et al.*, 2009). En aquest estudi no s'ha estudiat els mecanismes moleculars implicats en la inhibició de l'abundància de ID1 i S100A4 quan s'inhibeix la via Cn-NFATc amb RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ però els resultats obtinguts demostren que la via de senyalització de Cn-NFATc és important en la producció i funcionalitat d'ID1 i S100A4 i, per tant, podrien promoure els processos cel·lulars d'invasió i metàstasi. A més, tractant-se de marcadors de malignitat, els resultats semblen indicar que la sobreproducció de RCAN3/R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ alleuja el pronòstic del tumor. Actualment s'han realitzat al laboratori assajos preliminars de creixement independent d'ancoratge *in vitro* (Figura 8) i de formació de metàstasi experimental *in vivo* injectant les cèl·lules MDA-MB-231 transduïdes amb els lentivirus RCAN3/RCAN3 AAQ però els resultats tant *in vitro* com *in vivo* no són concloents i cal aprofundir emprant diverses línies cel·lulars de TNBC. Ara bé, cal tenir en compte que, pel què fa als assajos de metàstasi experimental, aquests estan dissenyats per a introduir les cèl·lules directament en els vasos de forma que s'està valorant simplement la capacitat d'aquestes per a, una vegada arribades als capil·lars pulmonars, activar la proliferació cel·lular i formar un nòdul metastàtic detectable gràcies a l'expressió de l'EGFP incorporada al vector lentiviral. En aquest tipus d'experiment no es pot

saber si la sobreproducció de RCAN3 o del pèptid derivat afecta a la capacitat d'extravasació. En cas que així fos, potser el percentatge de cèl·lules RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ capaces d'arribar al torrent sanguini i amb la possibilitat d'aturar-se, extravasar i créixer en teixit pulmonar seria menor que el percentatge en cèl·lules control. Per ara, no hem pogut confirmar que la disminució d'ID1 i de S100A4 en tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ tinguin una repercussió significativa en la formació de metàstasis pulmonars *in vivo*.

Fins aquí els resultats obtinguts demostren que la interacció del motiu PxlIT-like de RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ amb Cn desplaça o evita que els NFATc interaccionin amb l'enzim i d'aquesta forma es produeix la inhibició de la via de Cn-NFATc. És precisament la inhibició d'aquesta via la responsable de la inhibició de la progressió tumoral degut a la inhibició de la proliferació cel·lular, increment de l'apoptosi, inhibició de l'angiogènesi i de la infiltració de TANs observada en els tumors ortotòpics RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Tots els anteriors resultats indicaven que RCAN3 i el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ tenien capacitat antitumoral.

Donada la capacitat antitumoral de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ es va plantejar a continuació realitzar una teràpia amb aquest pèptid per determinar el possible ús d'aquest pèptid derivat de la RCAN3, regulador endogen de la Cn, com a eina per al desenvolupament de nous fàrmacs antitumorals. La teràpia proteica, així com la peptídica, porta associats diversos problemes o limitacions a nivell tècnic, com ara l'eficiència d'internalització de la molècula a administrar en les cèl·lules diana. Altres limitacions són l'especificitat de la internalització en les cèl·lules diana i per descomptat la concentració a la qual s'administra la molècula per a obtenir un efecte concret però evitant-ne l'excés de toxicitat. Per tant, cal tenir en compte la farmacodinàmia i farmacocinètica per poder determinar la freqüència d'administració. Per a resoldre la baixa eficiència d'internalització cel·lular dels pèptids s'utilitzen agents internalitzador (PTD). En aquest context, es va procedir a la síntesi tant del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sol com del pèptid conjugat a un PTD que, en el nostre cas, va ser un àcid gras de la companyia BCN Peptides, estratègia que havia sigut eficaç amb alguns dels seus pèptids. En primer terme es va comprovar que els dos pèptids, amb o sense àcid gras, s'internalitzaven ja que eren capaços d'inhibir l'activitat transcripcional dels NFATc de forma dependent de la dosi (Figura 36). A continuació, per abordar l'efecte terapèutic *in vivo* es va decidir administrar el pèptid de forma subcutània peritumoral. Els resultats obtinguts tant amb el pèptid sol com el àcid gras conjugat reproduïen els efectes observats en els tumors ortotòpics TNBC sobre l'angiogènesi (Figura 38) i sobre el

reclutament de TANs (Figura 39) tot i que no hi va haver una reducció significativa del volum tumoral en comparació amb el tractament control (el vehicle, DMSO; Figura 37). El fet de no observar un efecte dels pèptids sobre el creixement tumoral suggereix la possibilitat d'una eficiència molt limitada de la transducció dels pèptids emprats ja que l'eficiència de internalització del pèptid sol o modificat amb l'àcid gras no sembla massa diferent ja que s'obtenen valors molts similars en ambdós casos. És per això que caldria provar diversos PTD per optimitzar la internalització del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ i avaluar en millors condicions l'efecte funcional del pèptid. Tampoc es pot descartar que per obtenir l'efecte funcional de RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en el creixement tumoral calgui actuar en els estadis inicials de creixement d'aquest.

Tot i això, s'ha vist que hi han efectes en l'angiogènesi tumoral. L'anàlisi dels vasos es pot fer de diverses maneres quantificant paràmetres físics diferents que dona informació diferent. Per exemple, el perímetre dels vasos ens dóna informació sobre la morfologia dels vasos. Una morfologia de vasos curta i estreta dóna un valor de perímetre menor que una morfologia allargada i gran. La presència de ramificacions també és un altre característica que dóna informació de la funcionalitat del vas, igual que el factor de circularitat. Aquest últim paràmetre mesura la proximitat de la morfologia a una circumferència perfecta. El factor de circularitat es quantifica en valors del 0 (no circular) al 1 (completament circular). En aquest treball, tot i no haver-se'n analitzat tots els paràmetres esmentats com el de número de ramificacions en cada vas o el factor de circularitat, s'ha analitzat l'àrea, el perímetre i el factor de circularitat. Els resultats obtinguts són clars; el tractament amb el pèptid disminueix l'àrea, el perímetre i el factor de circularitat, fet que ens demostra que el tractament amb els pèptids disminueix la mida dels vasos (perímetre) i genera uns vasos més prims (factor de circularitat). Per tant, no només hi ha una disminució del nombre de vasos sinó que hi ha un canvi en els vasos, és a dir, el tractament amb el pèptid (tan sol com conjugat a l'àcid gras) altera la formació de vasos de manera que es generen vasos més curts, prims i tortuosos (Figura 38). Aquesta dada fa pensar en què possiblement el tractament amb el pèptid té com a conseqüència una disminució en la funcionalitat dels vasos formats durant el creixement tumoral. Per a confirmar això, però, caldria realitzar assajos de funcionalitat de vasos mitjançant injecció de tinta xinesa o un contrast comú previ al sacrifici dels animals que no s'ha pogut dur a terme de moment.

En relació a l'efecte dels pèptids sintetitzats sobre el reclutament de TANs en els tumors ja formats, els resultats reproduïen els

obtinguts amb els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. Els tumors tractats tant amb el pèptid sol com amb el pèptid conjugat amb un àcid gras presenten una inhibició marcada en el número de TANs infiltrats (Figura 39).

Els resultats derivats de les anàlisis realitzades en els tumors tractats amb el pèptid sol o conjugat són molt similars, la qual cosa fa pensar en què els dos pèptids presenten uns valors d'eficiència d'internalització similars i, per tant, més baixos dels esperats. Actualment s'està pensant en el disseny de nous agents internalitzadors per a poder-los conjuguar al pèptid i provar-los de nou com agents terapèutics. Tot i no tenir el tractament optimitzat ni haver obtingut encara el resultat esperat de la disminució del volum tumoral com a conseqüència del tractament, els resultats observats d'inhibició de l'angiogènesi i del reclutament de cèl·lules immunitàries PMN són clars i ens fan pensar que es comporten, en part, de forma similar a la dels reguladors endògens de la via de senyalització Cn-NFATc com RCAN3 (o derivats d'aquests (R3¹⁷⁸⁻²¹⁰)). Per tant, poden ser la base de futures teràpies antitumorals en els càncers de mama TNBC, contra els quals, fins a l'actualitat, no hi ha una estratègia clarament eficaç.

En el tractament antitumoral amb CsA i Fk506 no s'han vist efectes positius en pacients tractats amb CsA o FK506 (Demir *et al.*, 2015). Altres estudis *in vivo* en tumors ortotòpics de càncer de bufeta han demostrat que l'ús de CsA i FK506 com a tractament antitumoral és efectiu ja que provoca un retard significatiu en el creixement tumoral (Kawahara T *et al.*, 2015a). Recentment s'han publicat resultats similars tant *in vitro* com *in vivo* en els quals es demostra que el tractament de diversos tipus de càncers de pròstata (dependents o independents d'hormones) responen als fàrmacs CsA i FK502 i presenten un retard significatiu en el seu creixement (Kawahara *et al.*, 2015b). No obstant, s'ha descrit també FK506, tot i inhibir la Cn, provoca un dany endotelial que comporta el trencament dels vasos i la mort de les cèl·lules endotelials. A més, s'ha descrit en carcinoma de pell que la CsA té un efecte que afavoreix el desenvolupament dels tumors ja que incrementa les espècies reactives d'oxigen a la cèl·lula i com a conseqüència incrementa l'angiogènesi tumoral (Zhou AY and Ryeom S, 2014).

En aquest treball es proposa la inhibició específica de la via de Cn-NFATc en cèl·lules tumorals com a eina terapèutica per inhibir la progressió tumoral en un model ortotòpic de càncer de mama triple negatiu. Els resultats obtinguts demostren que en situacions de sobreproducció de la proteïna RCAN3 o un pèptid derivat d'aquesta, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, en cèl·lules MDA-MB-231 s'inhibeix la via de Cn-NFATc i

l'expressió gènica regulada pels NFATc. A més, aquesta sobreproducció de RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en tumors ortotòpics de TNBC produeix una disminució dràstica del creixement tumoral mitjançant una inhibició de la proliferació cel·lular, de l'angiogènesi tumoral i de la infiltració de cèl·lules PMN en el microambient tumoral fet que no té lloc en els tumors control EGFP o els tumors RCAN3 AAQ, mutant on la RCAN3 no pot interaccionar amb Cn ni, per tant, inhibir la seva senyalització.

Aquests resultats s'extendrien a totes les RCANs de vertebrats perquè ténen la seqüència CIC molt conservada entre elles. Donada l'elevada identitat de la seqüència entre els PxlITs de les RCANs de vertebrats es fàcil hipotetitzar que la sobreproducció cel·lular de les diferents proteïnes RCAN tindran un paper similar al descrit aquí per RCAN3 i el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰. No obstant, les diferents RCAN tenen un extrem N-terminal diferent i no conservat entre elles que confereix a cada RCAN unes propietats particulars i, per tant, no es pot descartar que aquestes poguessin contrarestar l'efecte inhibidor de la progressió tumoral que confereix el motiu PxlIT, en la regió C-terminal de les RCAN. Es podria pensar en una redundància funcional del PxlIT a nivell endogen entre les RCAN, però cada membre de les RCAN té probablement un rol específic resultat d'una expressió gènica diferencial determinada tant per l'ús de promotors diferents específics com per les propietats que li confereix l'extrem N-terminal no conservat d'aquestes proteïnes i el context cel·lular (Porta et al., 2007).

En base a tot el descrit anteriorment, aquest treball demostra que el pèptid R3178-210 derivat de les proteïnes RCANs és un potent agent antitumoral. El mecanisme de la interacció entre RCAN3 i Cn, directe i sense necessitar la unió d'immunofilines intracel·lulars, suggereix que el pèptid R3178-210 podria ser un candidat alternatiu als fàrmacs CsA i FK506, essent més específic i exhibint probablement menys efectes secundaris. En aquest context, el pèptid R3178-210 és una nova eina per a la recerca de fàrmacs antitumorals i immunosupressors.

A grayscale histological micrograph showing a cross-section of tissue. The image displays various cellular structures, including what appears to be a layer of stratified epithelium at the top right, transitioning into a more cellular, possibly connective tissue or muscle layer. The overall texture is fibrous and granular. The text '6. CONCLUSIONS' is overlaid in the lower-middle portion of the image.

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquest treball d'investigació són les següents:

- RCAN3 i el pèptid derivat d'aquesta, R3¹⁷⁸⁻²¹⁰, inhibeixen la senyalització cel·lular de Cn-NFATc en cèl·lules MDA-MB-231 tal i com s'observa per la inhibició de la translocació nuclear de NFATc2 i de l'expressió de gens dependents de NFATc com COX-2 en cultius cel·lulars de TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468 humanes.
- La sobreproducció de RCAN3 i de R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ inhibeixen l'activitat transcripcional dels NFATc en cèl·lules TNBC MDA-MB-231 i MDA-MB-468 *in vitro*. RCAN3 regula de forma indirecta l'activitat dels NFATc però no regula l'expressió gènica d'aquests factors de transcripció.
- Els tumors que sobreprodueixen RCAN3 o R3¹⁸⁷⁻²¹⁰ inhibeixen marcadament el volum tumoral en comparació amb els tumors ortotòpics EGFP i RCAN3 AAQ de ratolí de TNBC humà.
- Els tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten, en comparació amb els tumors EGFP i RCAN3 AAQ, una disminució significativa de la proliferació cel·lular i un increment de l'apoptosi. En canvi, la necròsi tumoral no s'altera.
- La sobreproducció de RCAN3 o del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ en tumors ortotòpics TNBC inhibeix marcadament l'angiogènesi tumoral en comparació amb els tumors EGFP i RCAN3 AAQ. Aquest efecte funcional correlaciona amb una disminució marcada i significativa de l'expressió gènica de COX-2 i de VEGF en les cèl·lules tumorals.
- La inhibició de l'expressió gènica de la *IL-8* en les cèl·lules dels tumors RCAN3 i R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ correlaciona amb una reducció important de reclutament de neutròfils associats al tumor en el microambient tumoral.
- Els tumors que sobreprodueixen RCAN3 o R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ presenten una disminució significativa de l'abundància dels marcadors pre-metastàtics ID1 i S100A4 en comparació amb la dels tumors EGFP i RCAN3 AAQ.

- L'administració del pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sol o conjugat amb un àcid gras en cèl·lules MDA-MB-231 disminueix l'activitat transcripcional dels NFATc de manera dosi-dependent *in vitro*.
- El tractament de tumors ortotòpics de TNBC humà amb el pèptid R3¹⁷⁸⁻²¹⁰ sol o conjugat amb un àcid gras no altera el volum tumoral però inhibeix l'angiogènesi tumoral i el reclutament de neutròfils. Per tant, el pèptid *per se* té activitat antiangiogènica.

A grayscale microscopic image of a tissue section, likely a histological slide. The image shows a complex arrangement of cells and fibers, with a prominent layer of elongated, spindle-shaped cells in the lower half. The upper half shows a more dense, fibrous structure. The overall appearance is that of a biological specimen under a microscope.

7. ANNEX

ARTICLE 1

Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis

da Silva-Diz, Solé-Sánchez S, A Valdés-Gutiérrez, M Urpí, D Riba-Artés, RM Penin, G Pascual, E González-Suarez, O Casanovas, F Viñals, JM Paramio, E Batlle and P Muñoz.

Oncogene. 2013;32(32):3732-43

Durant el període de pràctiques de màster (2009) i període predoctoral (2010-2011) vaig fer recerca en el laboratori de la Dra. Purificación Muñoz. El meu treball en el seu grup de recerca està inclòs en aquesta publicació i va ser el següent:

- Manteniment de la colònia d'animals, inducció de tumors amb DMBA/TPA, necròpsies i extracció de mostres. Processament de la pell per a l'aïllament de queratinòcits i cèl·lules mare fol·liculars. Generació de cultius primaris de cèl·lules mare epidermals. Selecció cel·lular i anàlisi de poblacions cel·lulars per FACS.
- Tècniques d'immunofluorescència (GFP, P-caderina, CD34, Ki67) i d'immunohistoquímica (GFP, β -catenina), i tincions H-E per a l'anàlisi de les fases del cicle fol·licular. Captura d'imatges amb microscopia confocal i de camp clar. Quantificació dels resultats obtinguts i interpretació.

ORIGINAL ARTICLE

Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis

V da Silva-Diz¹, S Solé-Sánchez¹, A Valdés-Gutiérrez¹, M Urpí¹, D Riba-Artés¹, RM Penin², G Pascual³, E González-Suárez¹, O Casanovas⁴, F Viñals^{4,5}, JM Paramio⁶, E Batlle⁷ and P Muñoz¹

Epidermal keratinocytes and hair follicle (HF) stem cells (SCs) expressing oncogenes are competent at developing squamous cell carcinomas (SCCs) in epidermis and HFs, respectively. To determine whether bulge and hair germ (HG) SCs from HF contribute to SCC generation at distant epidermis, the most frequent epidermal region where these lesions arise in human skin, we used a skin cancer mouse model expressing E6 and E7 oncoproteins from Human papillomavirus (HPV) 16 in SCs and basal keratinocytes. This previously described mouse model recapitulates the human skin papillomavirus-induced SCC pathology. We show that E6 and E7 expression promote the expansion of keratin 15 (K15)-expressing cells. These K15⁺ aberrant cells exhibit some HGSC markers and diminished expression of *Tcf3* and *Sox9* hair SC specification genes, which are accumulated in HFs and mislocalized to interfollicular epidermis. Leucine-rich G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5)-expressing SCs, localized in the bulge and HG, are the origin of the expanded K15⁺ cell population. A large subset of the Lgr5⁺ SC progeny, expressing K15 and P-cadherin, is aberrantly mobilized to the upper region of HFs and the epidermis, and accumulates at E6/E7-induced pre-neoplastic lesions and epidermal tumors. These findings indicate that aberrant accumulation of altered SCs in HFs and their subsequent migration to the epidermis contribute to HPV-induced tumor development.

Oncogene advance online publication, 3 September 2012; doi:10.1038/onc.2012.375

Keywords: cell lineage tracing; hair follicle stem cells; carcinogenesis mouse models; papillomavirus; squamous cell carcinoma

INTRODUCTION

The epidermis encompasses the interfollicular epidermis (IFE) and associated appendages, such as hair follicles (HFs) and sebaceous glands. In adult mouse skin, the IFE and sebaceous glands undergo constant renewal, whereas HFs cycle between phases of growth (anagen), involution (catagen) and resting (telogen), enabling hair regeneration.¹ Resting HFs contain a lower region, comprising the bulge and the secondary hair germ (HG), and an upper region, formed by the isthmus and the infundibulum, which interfaces with the IFE. These HF regions and the sebaceous glands are thought to be maintained by its own population of stem cells (SCs).² However, the functional relationship between these SC populations is complex, and bulge SCs may contribute to the maintenance of sebaceous glands.³ Bulge SCs are characterized by the expression of $\alpha 6$ -integrin, along with CD34, cytokeratin 15 (K15), *Sox9*, *Tcf3* and *Lhx2* among other markers.^{4–8} Leucine-rich G-protein-coupled receptor 5 (*Lgr5*) identifies a subset of cells localized at the bottom of the bulge.⁹ HGSCs generated from bulge SCs¹⁰ are characterized by the expression of basal $\alpha 6$ -integrin, K15, *Lgr5*, *Lhx2* and P-cadherin and the loss of CD34 expression.^{11,12} Lineage-tracing experiments demonstrated that these HF SC populations are involved in the homeostasis of HFs, but not in that of the IFE in mice. Nevertheless, after injury, HF SCs can migrate upwards to repair epidermal damage.¹³

The most common human epithelial skin cancers are basal cell carcinomas (BCCs) and squamous cell carcinomas (SCCs), the latter being more aggressive and prone to metastasis.¹⁴ Human papillomavirus (HPV) infection is involved in the etiology of epidermal SCCs, the high-risk β -type HPVs (such as HPV5 and HPV8) being more related to skin SCC development, in close association with sun exposure and immunodeficiency.^{15–17} High-risk α -type HPVs (HPV16 and HPV18) are involved in SCC development in anogenital and head and neck areas.^{17,18} However, HPV16 was also detected in human skin SCCs, indicating that this HPV type is competent at inducing malignant skin lesions.^{19,20} HPV16 encodes oncoproteins E6 and E7, which inactivate several proteins, the retinoblastoma (Rb) protein family and the tumor-suppressor protein p53 being the best characterized of these.²¹ The impact of HPV16 E6 and E7 expression on skin cancer was demonstrated through the generation of the K14-HPV16 mouse model.²² HPV16 E6 and E7 expression in these mice is driven by the K14 promoter to basal keratinocytes, including HF SCs. These mice develop spontaneous SCCs that frequently start off as hyperplasias and dysplasias in the IFE,²³ recapitulating HPV-induced pathology in human skin.²⁴ Although this carcinogenesis mouse model is well characterized, cells that actually contribute to E6/E7-induced skin tumors are still unknown.

Epidermal keratinocytes and HF SCs are competent at originating skin SCCs. Indeed, conditional expression of the constitutively

¹Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain; ²Pathology Service, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain; ³Department of Cell Differentiation and Cancer, Center for Genomic Research (CRG), Biomedical Research Park (PRBB), Barcelona, Spain; ⁴Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO/IDIBELL), Barcelona, Spain; ⁵Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain; ⁶Molecular Oncology Unit, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas, Madrid, Spain and ⁷Oncology Program, Institute for Research in Biomedicine (IRB), Barcelona, Spain. Correspondence: Dr P Muñoz, Aging and Cancer Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Av Gran Via de L'Hospitalet 199-203, 08907 Barcelona, Spain. E-mail: p.muñoz@idibell.cat

Received 14 May 2012; revised 29 June 2012; accepted 9 July 2012

active KRas^{G12D} and abrogation of the p53 function in IFE keratinocytes and bulge SCs and their immediate progeny promote generation of SCCs in IFE and HFs, respectively.^{25,26} However, it is not known whether mutated SCs, localized in the HFs, can contribute to neoplastic lesions that usually develop in the IFE, and which are the mechanisms involved in this process. In this regard, the cell target of HPV infection are the basal keratinocytes, including HF SCs, and HFs are a natural reservoir of HPV.²⁷

Here we determine the impact of E6 and E7 expression on the homeostasis and dynamics of HF SCs during SCC development, and address the involvement of these SCs in HPV16-induced skin tumorigenesis at the IFE.

RESULTS

E6 and E7 expression induces aberrant accumulation and mislocalization of K15⁺-expressing cells

K14-HPV16/K15-enhanced green fluorescent protein (EGFP) mice, generated by crossing K14-HPV16^{Tg/+} and K15-EGFP^{Tg/Tg} mice, were used to evaluate the impact of E6 and E7 expression on HF SC homeostasis. They developed hyperplasias and dysplasias early at the IFE and spontaneous SCCs (32% of mice) by age 1 year, recapitulating the phenotype previously reported in K14-HPV16^{Tg/+}

mice.²³ EGFP expression under K15 promoter enables identification of bulge SCs and HGSCs during tumorigenesis.⁶

We quantified the percentage of $\alpha 6$ -integrin⁺/K15-EGFP^{high} SCs in WT/K15-EGFP^{Tg/+} (WT-K15) and K14-HPV16^{Tg/+}/K15-EGFP^{Tg/+} (E6/E7-K15) mouse skins. The $\alpha 6$ -integrin⁺/K15-EGFP^{high} cell population was significantly larger in all E6/E7-K15 skins, regardless of mouse age (Figures 1a and b). Stronger expression of K15 and EGFP in the E6/E7-K15 skins was corroborated by western blot (Supplementary Figure S1a). In WT-K15 skins, the majority of K15-EGFP⁺ cells were localized in the lower region of HFs (bulge and HG); only a small subset was occasionally found in the upper region of HFs and in the IFE (Figure 1c; Supplementary Figures S1c and d), as previously reported.^{5,26} However, in E6/E7-K15 mice, the population of K15⁺ cells was significantly larger in the bulge and HG, and a subset of K15⁺ cells was mislocalized in the upper region of HFs and in the IFE in the absence of pre-neoplastic lesions (Figure 1c, Supplementary Figures S1b–d). The fact that not all the K14⁺ cells, expressing E6/E7, displayed EGFP labeling and that K15⁺ cells localized in the IFE expressed K14 and K5 at similar levels as in K15⁻ cells (Supplementary Figures S2a and b) strongly argues against a direct induction of K15 mediated by K14-driven E6/E7 expression. K15⁺ cells located in the suprabasal layer of the IFE showed expression of keratin 10 (K10), a marker of committed suprabasal IFE keratinocytes, suggesting that these

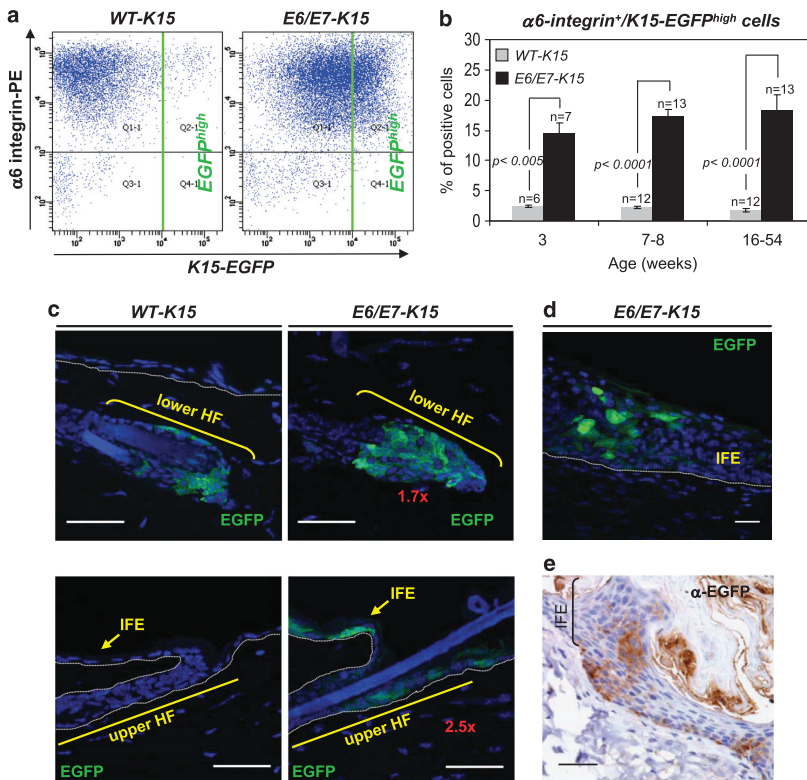


Figure 1. E6/E7 mouse skins show an aberrantly expanded K15-EGFP⁺ cell population. **(a)** Representative results of $\alpha 6$ -integrin⁺/K15-EGFP^{high} cell quantification by flow cytometry in keratinocytes isolated from WT-K15 and E6/E7-K15 mice. **(b)** $\alpha 6$ -integrin⁺/K15-EGFP^{high} cell quantification (mean \pm s.e.), as shown in **(a)**, from control and E6/E7-K15 littermate mice of indicated age. *n* indicates the number of mice analyzed. *P*-values are those from the indicated *t*-tests. **(c–e)** Localization of K15-EGFP⁺ cells was examined in back-skin sections by direct detection of green fluorescence from EGFP **(c, d)** or by using α -EGFP antibodies **(e)**. Red numbers indicate the *n*-fold increase in these populations at the indicated HF regions in E6/E7-K15 relative to WT-K15 skins. **(d, e)** K15-EGFP⁺ cells were detected in hyperplastic regions of the IFE in E6/E7 mice. Scale bar: 20 **(d, e)** and 30 μ m **(c)**.

mislocalized cells follow the IFE differentiation program (Supplementary Figure S2b). Interestingly, E6/E7-K15 mice older than 16 weeks accumulated K15-expressing cells in hyperplastic and dysplastic regions of the IFE (Figures 1d and e), suggesting that these aberrant cells may be involved in pre-neoplastic lesion development.

The analysis of the expression of HF SC markers in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ and $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP^{high} cells isolated from WT-K15 skins indicated that, as expected, these cells upregulated the expression of bulge SC and HGSC markers, whereas $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP⁻ cells showed strong downregulation of these markers and high levels of expression of *Lrg6* and *Lrig1*, two markers of SC residing in the isthmus and infundibulum (Supplementary Figure S3a).^{28,29} These observations indicate that $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP⁻ cells correspond to basal keratinocytes depleted of bulge SCs and HGSCs. The higher level of expression of *Hmgn3*, *Sox4*, *Gata3* and *P-cadherin* detected in the $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP^{high} cells (Supplementary

Figure S3a) indicated that these cells showed phenotypic characteristics of HGSCs in WT-K15 skins.¹² However, in E6/E7-K15 mice, the $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP^{high} cells showed an increased expression of *Sox4* and *P-cadherin*, and similar expression of *Hmgn3* and *Gata3* compared with those isolated from WT-K15 skins (Figure 2a), indicating that K15⁺-expanded cells retain some HGSC markers. Remarkably, even though E6 expression was detected in all analyzed cell populations (Supplementary Figure S3b), K15⁺-expanded cells display a specific induced gene-expression pattern compared with those of other isolated cell populations (Figure 2a). These observations rule out the possibility that E6/E7 expression directly induces the expression of these HGSC markers.

In accordance with the expansion of cells exhibiting HGSC markers, E6/E7-K15 skins had a significantly higher percentage of $\alpha 6$ -integrin⁺/P-cadherin⁺ cells (Supplementary Figures S4a and b), most of which expressed K15-EGFP (Figure 2b). Stronger expression of P-cadherin in the E6/E7 mouse skins was

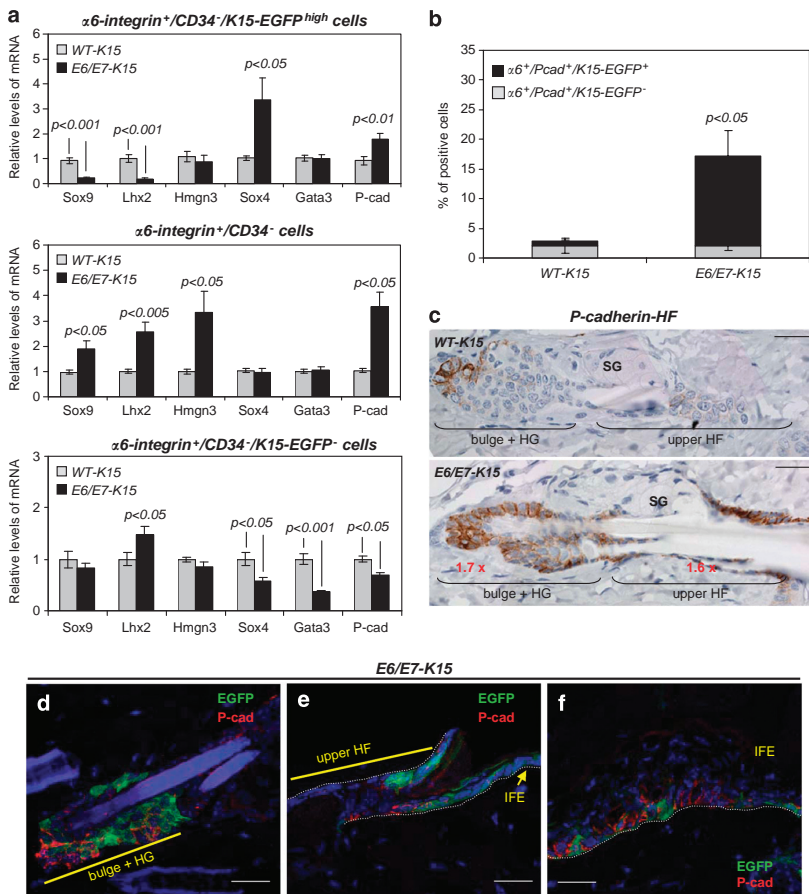


Figure 2. Expanded and mislocalized K15⁺ cells express some HGSC markers. (a) mRNA quantification of bulge SC and HGSC markers by quantitative real-time (qRT)-PCR in the indicated population of cells isolated from 8-week-old WT-K15 and E6/E7-K15 mice (three for each genotype). The results correspond to the mean \pm s.e. of mRNA levels from E6/E7 samples relative to WT samples. *Gapdh* and *Hprt1* were used as housekeeping genes. (b) Representative results of the quantification by flow cytometry of K15-EGFP^{high}/P-cadherin⁺ cell expressing $\alpha 6$ -integrin. (c) Localization of P-cadherin⁺ cells in the HFs of back-skin sections of indicated mice. Numbers in red indicate the n-fold increase of P-cadherin⁺ cells in E6/E7-K15 skins relative to WT-K15 skins. (d-f) Identification of P-cadherin and K15-EGFP coexpressing cells in the bulge and HG (d), upper region of HFs (e) and hyperplasias in the IFE (f) in E6/E7-K15 mice. K15-EGFP cells were detected by direct fluorescence and P-cadherin⁺ cells using α -P-cadherin antibodies. Scale bar: 20 μ m.

corroborated by western blot (Supplementary Figure S4c). As previously reported,¹² most of the cells expressing high levels of P-cadherin were localized in the HG (Figure 2c) in WT-K15 skins. Nevertheless, the E6/E7 skins had significantly more P-cadherin⁺ cells in the lower and upper regions of the HF and in the IFE (Figure 2c). K15-EGFP expression was detected in these expanded and mislocalized P-cadherin⁺ cells (Figures 2d–f), which accumulated in hyperplastic regions (Supplementary Figures S4d and e).

Because Lgr5 identifies bulge SCs and HGSCs,⁹ we crossed K14-HPV16 mice with Lgr5-EGFP-Ires-CreER^{T2} mice, then quantified the

Lgr5-EGFP⁺ cells in WT/Lgr5-EGFP-Ires-CreER^{T2} (WT-Lgr5) and K14-HPV16^{Tg/+}/Lgr5-EGFP-Ires-CreER^{T2} (E6/E7-Lgr5) skins. We detected no major differences in the percentage of Lgr5⁺-SCs, which reside in the bulge ($\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺/Lgr5-EGFP⁺ cells) and the HG ($\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁻/Lgr5-EGFP⁺ cells) in both mouse genotypes (Figure 3a). Unlike the K15⁺ and P-cadherin⁺ cells, Lgr5⁺-SC location was restricted to the lower region of HFs in E6/E7 skins (Figure 3b). These results indicate that E6/E7 expression does not induce generalized expression of HGSC markers.

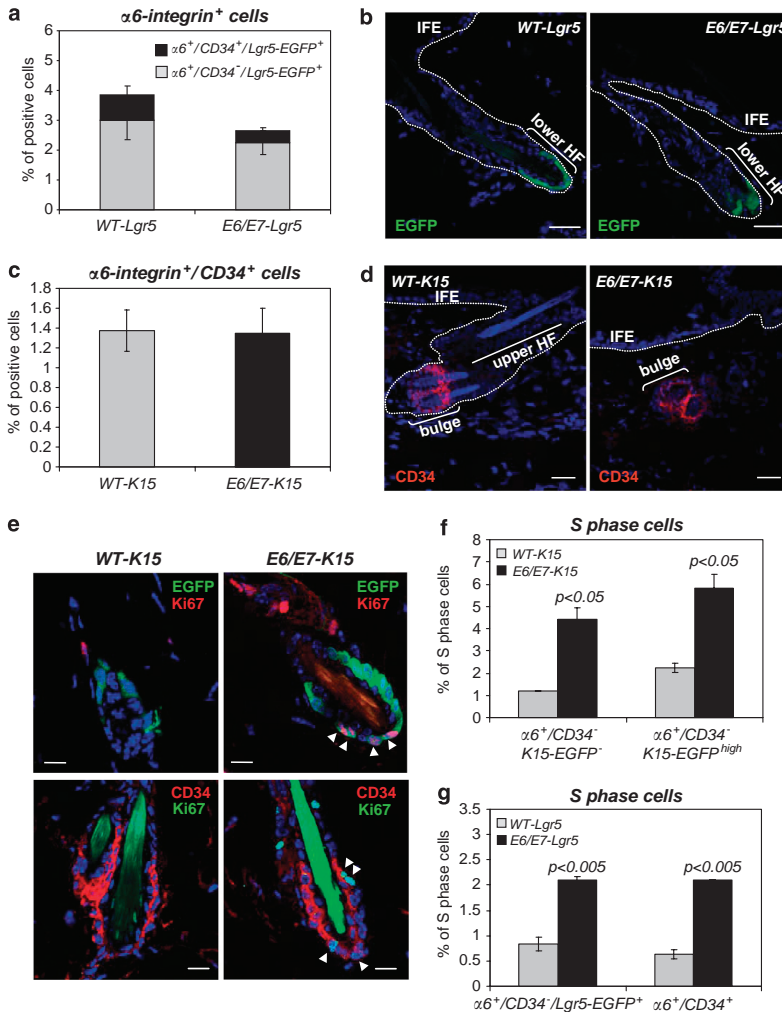


Figure 3. CD34⁺-bulge SC and Lgr5⁺-SC populations actively proliferate but are not expanded in the E6/E7 mouse skins. **(a)** Quantification (mean \pm s.e.) by flow cytometry of the percentage of Lgr5⁺/CD34⁺ and Lgr5⁺/CD34⁻ cells expressing $\alpha6$ -integrin in keratinocytes isolated from four WT-Lgr5 and eight E6/E7-Lgr5 mice. **(b)** Localization of Lgr5-expressing cells in skin sections of WT-Lgr5 and E6/E7-Lgr5 mice, detected by EGFP direct fluorescence. **(c)** Results represent the mean \pm s.e. of the percentage of $\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells in seven WT-K15 and ten E6/E7-K15 mouse skins, quantified by flow cytometry. **(d)** Representative images of the immunodetection of CD34-expressing cells in the bulge in back-skin sections from WT-K15 and E6/E7-K15 mice. Note the absence of CD34⁺ and Lgr5-EGFP⁺ cells from the upper region of HFs and the IFE of E6/E7-expressing skins. Scale bar: 30 μm . **(e)** Representative images of the immunodetection of Ki67⁺ cells in HFs of WT-K15 and E6/E7-K15 mouse skins. Ki67⁺/K15-EGFP⁺ and Ki67⁺/CD34⁺ cells are indicated by white arrowheads. **(f, g)** Percentage of S-phase cells (mean \pm s.e.) in the indicated populations isolated from skins from 8-week-old WT-K15 and E6/E7-K15 mice **(f)** (six for each genotype) and from WT-Lgr5 and E6/E7-Lgr5 mice **(g)** (three for each genotype). *P*-values for the indicated *t*-test comparisons are shown.

Finally, to determine whether E6 and E7 expression can alter the CD34⁺-bulge SC population, we quantified the α 6-integrin⁺/CD34⁺ cell population in WT-K15 and E6/E7-K15 mice. Similar percentages of CD34⁺-bulge SCs and an unaltered localization of these cells at the bulge were observed in WT and E6/E7-K15 mice (Figures 3c and d). Collectively, our results indicate that E6 and E7 expression leads to the generation of an aberrant cell population that conserves the expression of certain HGSC markers, without modifying the size or location of bulge SCs.

E6/E7 skins show a normal hair cycle despite the activation of bulge SC proliferation and the accumulation of K15⁺/P-cadherin⁺-aberrant cells in HFs

To determine which events lead to the accumulation of K15⁺/P-cadherin⁺ cells, we analyzed the effect of E6 and E7 expression on keratinocyte proliferation. IFE of E6/E7-K15 mice had a significantly higher percentage of Ki67⁺-proliferating keratinocytes (Supplementary Figure S5a), as previously described.²³ A similar percentage of Ki67⁺ cells was observed in K15⁻ and mislocalized K15⁺ cell populations (Supplementary Figures S5d and e), indicating that both populations proliferated similarly in the IFE. During the resting phase of the hair cycle (8-week-old mice), HF SCs from WT-K15 mice exhibited reduced proliferation. However, a significant increase of Ki67⁺ cells was observed in E6/E7-K15 HFs (Supplementary Figure S5a), and specifically in the population of CD34⁺ and K15⁺ cells (Figure 3e; Supplementary Figure S5b). Furthermore, cell-cycle analysis of CD34⁺-bulge SCs, α 6-integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP^{high} and α 6-integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP⁻ showed that all these cell populations had a significantly higher percentage of S-phase cells in E6/E7-K15 skins (Figure 3f; Supplementary Figure S5c). Similarly, the Lgr5⁺-SCs from the HG (α 6-integrin⁺/CD34⁻/Lgr5-EGFP⁺) actively proliferated in the E6/E7 mouse skins (Figure 3g; Supplementary Figure S5c). These findings demonstrate that CD34⁺-bulge SCs and Lgr5⁺-SCs divide more actively during the resting phase of the hair cycle in E6/E7 mice than in WT mice, although the size of these cell populations was unaltered.

As upregulation of the Wnt/ β -catenin pathway promotes proliferation of bulge SCs and HGSCs at the onset of the hair cycle,^{12,30} we examined whether this pathway was activated under E6/E7 expression. Unlike the WT-K15 controls, which displayed normal β -catenin localization at cell-cell contacts, aberrant nuclear localization of β -catenin was observed in the lower region of telogen HFs in E6/E7 skins (Figure 4a). In addition, the expression of *Tcf3*, a cofactor of β -catenin, and of *Lgr5* and *Axin2*, two β -catenin target genes,^{31,32} was significantly stronger in the α 6-integrin⁺/CD34⁺ cells from 8-week-old E6/E7 mice (Figure 4b), indicating that the β -catenin signaling pathway was upregulated in CD34⁺-bulge SCs. Conversely, we did not observe a higher level of *Axin2* expression or even a significantly lower expression of *Lgr5*, *Tcf3* and *Lef1* in α 6-integrin⁺/CD34⁻/K15-EGFP^{high} cells, and no altered expression of *Lgr5*, *Lef1* and *Tcf3* was detected in basal keratinocytes depleted in bulge SCs and HGSCs in E6/E7-K15 mice (Figure 4b). Indeed, the loss of *Lgr5* expression in these expanded cells was correlated with the absence of size change in the Lgr5⁺-SC population in E6/E7 mice. Furthermore, similar to what was observed in WT-K15 skins, no nuclear β -catenin was detected in IFE keratinocytes of E6/E7-K15 mice (data not shown). Given that a significant population of keratinocytes exhibited K15 expression in the IFE, these results suggest that Wnt/ β -catenin signaling is not activated in the mislocalized K15⁺ cells and that the aberrant population of K15⁺ cells actively proliferates in the absence of activated β -catenin signaling.

Although the CD34⁺-bulge SCs actively proliferated and exhibited upregulated β -catenin signaling, we found no major alterations in the hair coat or hair cycle in E6/E7-K15 mice. Indeed, the skins of mice older than 16 weeks, which presented

asynchronous hair cycles, had a similar ratio of anagen follicles to that of WT-K15 mice (Supplementary Figure S6a). Precocious entry to the anagen phase was not observed during the first telogen phase (21-day-old E6/E7 mice) (Figure 4c). Furthermore, no altered distribution of K15⁺ or P-cadherin⁺ cells in downward-growing HFs was observed during the first anagen phase in 28-day-old E6/E7-K15 mice (Supplementary Figures S6b and c). Consistent with normal progression of the hair cycle, no significant changes of hair-specification genes expressed in HF-transient amplifying and matrix cells¹² were observed in E6/E7-K15 skins in anagen (Figure 4d). These results indicate that a more robust activation of Wnt/ β -catenin signaling in bulge SCs and/or other signals orchestrated by dermal fibroblast may be necessary to induce unprogrammed anagen onset in E6/E7 mice. Furthermore, our data suggest that K15⁺ cells accumulated in the lower HF did not alter the normal progression of the hair cycle, probably because they are subsequently mobilized to the IFE.

Lgr5⁺-SCs are the origin of the aberrantly accumulated and mobilized K15⁺-SC

To determine the origin of the expanded and mislocalized K15⁺ cells, we traced the Lgr5⁺-SC lineage in WT and E6/E7 mice. To this end, we generated the K14-HPV16/Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2}/Rosa26-LacZ (E6/E7-Lgr5-LacZ) mouse line. Tamoxifen was administered to 21-day-old mice to activate Cre recombinase and enable labeling of Lgr5-expressing SCs at the first post-natal telogen phase, and subsequently, of their progeny.⁹ Analysis of LacZ⁺ cells 6 days post tamoxifen treatment (27-day-old mice) demonstrated a similar efficiency of Cre-mediated recombination in WT and E6/E7-Lgr5-LacZ mice: 85.9% of WT and 80.6% of E6/E7 HFs contained LacZ⁺ cells. At this point, the WT-Lgr5-LacZ and E6/E7-Lgr5-LacZ mice presented a similar number of LacZ⁺ cells in the lower region of HFs (Figure 5a; Supplementary Figure S7a), in correlation with the similar number of Lgr5-expressing cells detected in both genotypes. However, 35 days post tamoxifen treatment (56-day-old mice), the E6/E7 mouse skins contained more LacZ⁺ cells than the WT skins in the lower region of resting HFs, implying that the progeny of Lgr5⁺-SCs accumulate in this region (Figure 5a). Furthermore, although LacZ⁺ cells were restricted to bulge and HG in the WT skins, the E6/E7 skins also presented LacZ⁺ cells in the infundibulum and in the IFE, even though the Lgr5 promoter was only active in the bulge and HG in E6/E7-Lgr5-LacZ mice (Figure 5b; Supplementary Figure S7a).⁹ It is important to note that LacZ⁺ cells in the infundibulum were always observed in those HFs exhibiting LacZ⁺ cells in their bulge and HG. Likewise, the IFE regions containing LacZ⁺ cells were close to LacZ⁺ HFs (Supplementary Figure S7b). These results indicate that the mislocalized LacZ⁺ cells are the progeny of Lgr5⁺-SCs of neighbor HFs that are mobilized to the infundibulum and the IFE. As expected, a subset of K15⁺ and P-cadherin⁺ cells expressed β -galactosidase in the bulge and HG (Figure 5c). Because the low dose of tamoxifen used enabled only a small percentage of Lgr5⁺ cells in each HF to be traced, not all the K15⁺ and P-cadherin⁺ cells showed LacZ⁺ staining. More importantly, our results showed that the LacZ⁺ cells mobilized at the IFE expressed K15 and P-cadherin proteins (Figure 5c), indicating that actively proliferating Lgr5⁺-SCs in HFs were the origin of the expanded and mislocalized K15⁺/P-cadherin⁺ cells at the IFE.

Mobilized Lgr5⁺-SC progeny contributes to development of E6/E7-induced SCCs in the IFE

To assess whether mobilized K15⁺ cells are involved in tumor development, we first analyzed the presence of K15-EGFP⁺ in spontaneous and DMBA (7,12-dimethylbenz-alpha-anthracene)-TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)-induced tumors in E6/E7 mice by flow cytometry. Consistent with previous results,³³ we observed a population of CD34-expressing cells in tumors

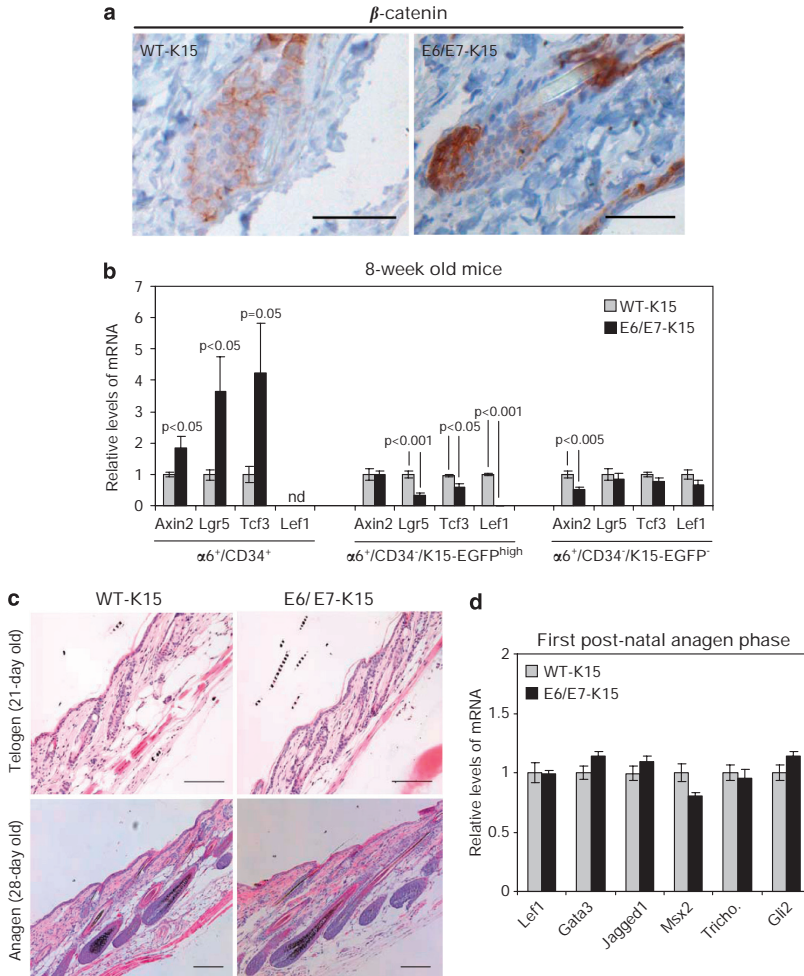


Figure 4. E6/E7 mouse skins have a normal hair cycle despite the activation of β -catenin signaling in bulge SCs and accumulation of K15⁺ cells in HFs. **(a)** Representative images of β -catenin protein localization in HFs of WT-K15 and E6/E7-K15 mice. **(b)** Quantification of *Axin2*, *Lgr5*, *Tcf3* and *Lef1* mRNA by qRT-PCR in the indicated cells, isolated from 8-week-old WT-K15 and E6/E7-K15 mice. The results correspond to the mean \pm s.e. from E6/E7 samples relative to WT samples (four to six mice for each genotype). *Gapdh* and *Hprt1* were used as housekeeping genes. **(c)** Representative images of H/E staining of back-skin sections from 21-day-old (HFs in synchronized telogen) and 28-day-old (HFs in synchronized anagen) WT-K15 and E6/E7-K15 mice. **(d)** Quantification of the indicated HF fate-specification gene mRNAs isolated from 28-day-old WT-K15 and E6/E7-K15 mice (three mice of each genotype). Results show the mean \pm s.e. of mRNA of these genes in E6/E7-expressing cells relative to those in WT cells. *Gapdh* and *Hprt1* were used as housekeeping genes. *P*-values for the indicated *t*-test comparisons are shown. Scale bar: 40 **(a)** and 100 μ m **(c)**.

(Supplementary Table S1). We also found a variable percentage of tumor cells expressing K15-EGFP (0.1–58%) that were more abundant in *in situ* SCCs than in infiltrating SCCs (Figure 6a; Supplementary Table S1). Furthermore, K15⁺ and P-cadherin⁺ cells were detected in SCCs and a subset of tumor cells coexpressed both markers (Figures 6b–d).

To determine whether the mobilized cells are the origin of epidermal tumors, E6/E7-Lgr5-LacZ mice were treated with tamoxifen during the first telogen phase. Eight-week-old mice were treated with DMBA-TPA and then analyzed for the presence of LacZ⁺ cells in pre-neoplastic and neoplastic lesions. In accordance with the clonal labeling of Lgr5⁺ cells in bulge and HG, groups of LacZ⁺ cells, clearly delimited by surrounding areas

of unlabeled cells, were apparent in most hyperplastic and dysplastic lesions (Figure 7a). *In situ* SCCs, an early neoplastic lesion emerging from the IFE, exhibited LacZ⁺ cells, and 39% of SCCs developed in the E6/E7-Lgr5-LacZ mice were formed by LacZ⁺ tumor cells (Figure 7a). Tumors frequently presented a heterogeneous composition of LacZ⁺ and LacZ⁻ cells, indicating the polyclonal origin of these tumors, as recently suggested.³⁴ We also found a subset of LacZ⁺ cells expressing K15 and P-cadherin, and K15-EGFP⁺ and P-cadherin⁺ cells were also seen in LacZ⁻ tumor cells (Figure 7b), suggesting that mobilized Lgr5-SCs progeny with deficient LacZ recombination and/or IFE keratinocytes could be the source of these LacZ⁻ SCCs. Overall, these results indicate that the mobilized K15⁺ cells, which originate

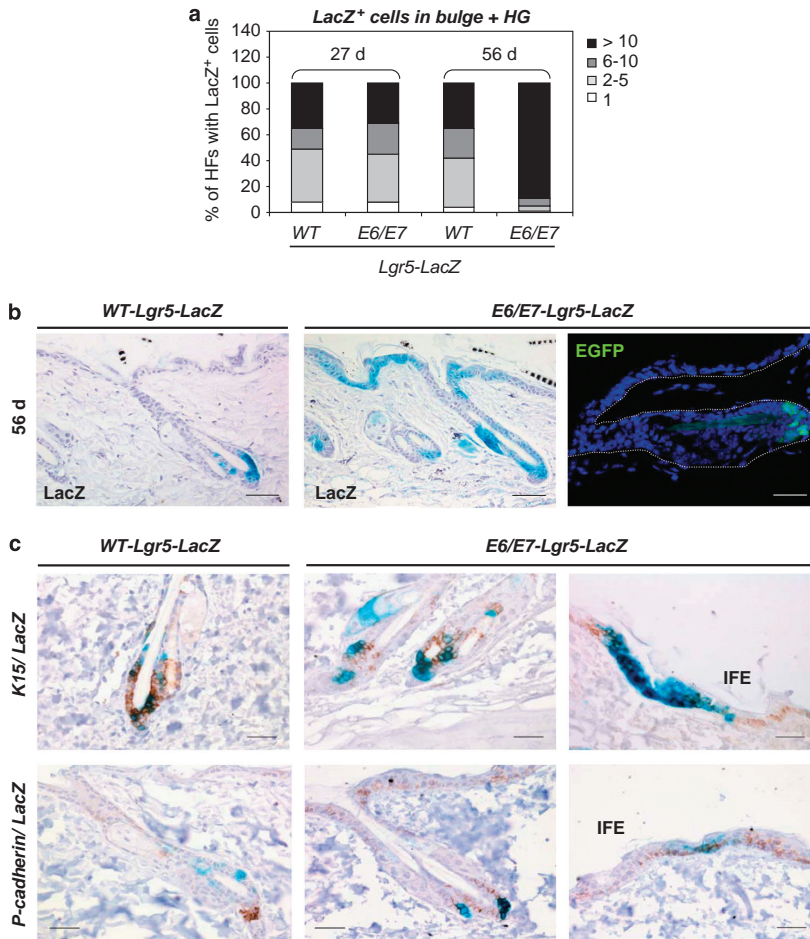


Figure 5. Lgr5⁺-SCs are the origin of the expanded and mobilized K15⁺/P-cadherin⁺ cells. (a) Results indicate the percentage of HF follicles presenting the indicated number of LacZ⁺ cells per HF at 6 days (27-day-old mice) or at 35 days (56-day-old mice) after tamoxifen treatment. (b) Skin sections from WT-Lgr5-LacZ and E6/E7-Lgr5-LacZ mice showing LacZ⁺ cells 35 days (56-day-old mice) after tamoxifen treatment. Scale bar: 50 μm. Matching skin sections from E6/E7-Lgr5-LacZ mice, indicating the localization of Lgr5-expressing SCs using direct EGFP fluorescence. Scale bar: 20 μm. (c) The expression of K15 and P-cadherin in Lgr5⁺ SCs and their progeny were analyzed by immunohistochemistry in LacZ-stained skin sections of three control and two E6/E7 mice 35 days (56-day-old mice) after tamoxifen treatment. Scale bar: 30 μm.

from deregulated Lgr5⁺-SC progeny, contribute to the development of E6/E7-induced SCCs in the IFE.

DISCUSSION

E6 and E7 oncoproteins from HPV are involved in human and mouse skin SCC development,^{17,19,20,22} but the cellular origin of these HPV-induced tumors remains unknown. Here we show that E6 and E7 expression induces alterations in HF SC homeostasis and dynamics and that both events contribute to SCC development in the IFE.

Conditional expression of an activated KRas mutant and loss of p53 function, specifically in bulge SCs and their immediate progeny and epidermal keratinocytes, induce SCC generation, indicating that these mutated cells are competent at developing SCCs at the HF follicles and IFE, respectively.^{25,26} An intriguing question is

whether altered SCs, localized in lower regions of the HF follicles, contribute to neoplastic lesion development in the distant regions of the epidermis. In K14-HPV16 mice, E6 and E7 expression is targeted to epidermal basal keratinocytes and SCs in HF follicles, and almost all SCCs developed are initiated in the IFE. E6 and E7 expression induces the generation of an aberrant K15-expressing cell population that accumulates in HF follicles, and lineage-tracing assays showed that the expanded population originates from proliferating Lgr5⁺-SCs in HF follicles. Indeed, Lgr5⁺-SCs progeny, initially accumulates in the lower HF follicles, coinciding with the expansion of K15⁺/P-cadherin⁺ cells at this location, and a subset of them is mobilized to the IFE in E6/E7 mice (Figure 7c). K15⁺-aberrant cells conserve the expression of certain HGSC markers, but have reduced expression of *Lgr5*, *Sox9* and *Lhx2*. The expression of E6/E7 could induce expression of K15 or HGSC markers in basal keratinocytes. However, two observations

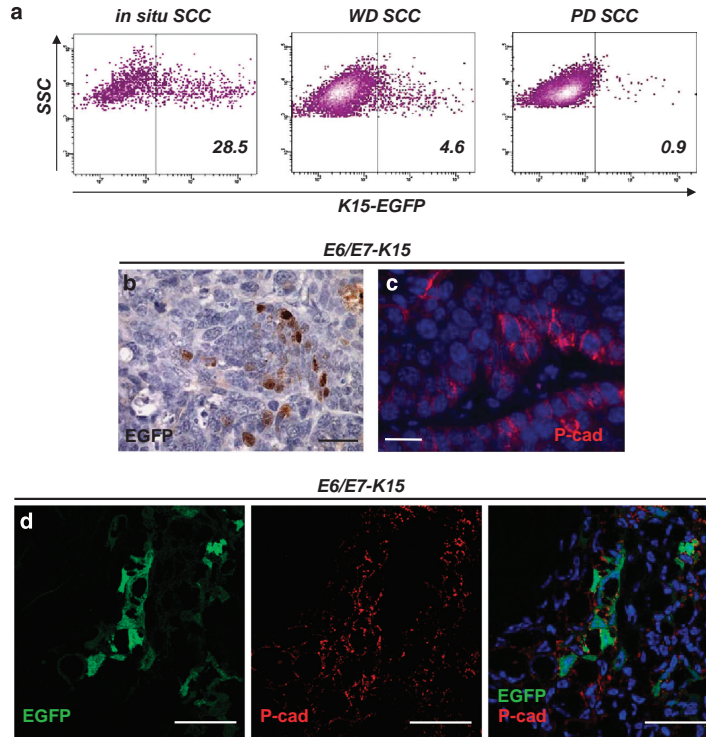


Figure 6. SCCs from E6/E7 mice contain a subset of K15-EGFP⁺ and P-cadherin⁺ tumor cells. (a) Representative results of K15-EGFP⁺ cell quantification in different tumors by flow cytometry. (b, c) Identification of K15-EGFP⁺ and P-cadherin⁺ cells in SCCs. Scale bar: 20 μm. (d) Identification of tumor cells coexpressing EGFP and P-cadherin in SCCs. Scale bar: 30 μm. PD SCC, poorly differentiated squamous cell carcinoma; WD SCC, well-differentiated squamous cell carcinoma.

indicate that the aberrant cell population is not produced in this way: (i) although E6 expression levels were similar in expanded K15-EGFP⁺ cells and basal keratinocytes depleted in bulge SCs and HGSCs ($\alpha 6^{+}/CD34^{-}/K15\text{-EGFP}^{+}$ cells), the expression of reported markers was induced only in the former population and these populations had different gene-expression profiles and (ii) the expression of K15 and P-cadherin was observed in some, but not all, K14⁺ basal cells in HF and IFE. This study cannot rule out the possibility that some proliferating cells, residing in the infundibulum and the IFE, reacquire expression of HF SC markers, as previously suggested in basal cell carcinoma mouse models.^{35,36} However, the migration of Lgr5⁺-SC progeny to the infundibulum and IFE suggests that a population of these aberrant K15⁺/P-cadherin⁺ cells, generated in HF, is mobilized to the IFE.

The expanded K15⁺ cell population is probably generated by disrupting the balance between SC self-renewal and differentiation of their progeny. Although HF from E6/E7 mice exhibit similar amounts of CD34⁺ bulge SCs and Lgr5⁺ SCs as control mice, these cells abnormally divide during the HF resting phase. p53 and Rb control self-renewal in adult SCs from different tissues, including epidermis.^{37–40} In this regard, the absence of pRb is by itself sufficient to promote increased proliferation of bulge SCs,⁴⁰ although it is insufficient to promote tumor development.⁴¹ However, the simultaneous abrogation of p53 and Rb in K14-expressing epidermal cells induces spontaneous SCCs.⁴² Furthermore, these tumors displayed an increased K15⁺ cell population at the early stages,⁴² recapitulating some of the E6/E7-induced alterations described here.

Our results show that E6 and E7 expression induces activation of the β -catenin signaling in CD34⁺-SCs, an essential pathway for subsequent production of transient amplified cells during the hair cycle.³⁰ Although bulge SCs actively proliferated and β -catenin signaling was activated, we did not find any alterations of the hair cycle in E6/E7 skins. These data indicate that the increased Wnt/ β -catenin signaling in CD34⁺-bulge SCs was insufficient to interfere with the normal progression of the hair cycle. In this regard, the presence of sustained elevated levels β -catenin in HF SCs, induced by the ectopic expression β -catenin mutant, promoted the activation of bulge SC proliferation and a precocious entry in anagen phase at one defined stage of the hair cycle.³⁰ This indicates that other factors, in conjunction with Wnt/ β -catenin signaling activation, are required to induce hair regeneration.³⁰ Furthermore, K15-expanded and mobilized cells showed downregulated β -catenin signaling, indicating that these cells proliferate independently of Wnt/ β -catenin signaling. Previous studies reported the physiological relevance of Wnt signaling in HF SC homeostasis and lineage determination. Indeed, the abrogation of β -catenin affects HF development and SCs fail to differentiate into follicular keratinocytes, adopting an epidermal fate instead.⁴³ In addition, *Tcf3* and *Sox9*, expressed in bulge and HG, are important during early HF SC specification. Deletion of these genes impairs the maintenance of bulge SCs and HF development.^{4,8,44,45} We observed that accumulated K15⁺ cells do not interfere with the normal progression of the hair cycle, probably because they are subsequently mobilized to the IFE. Furthermore, no aberrant nuclear β -catenin was observed in IFE

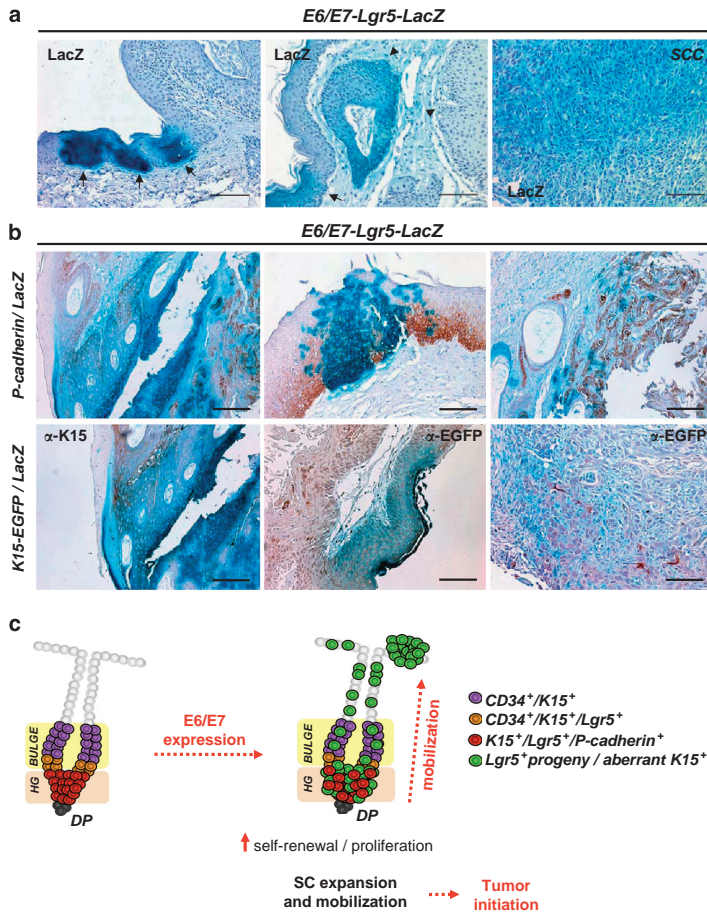


Figure 7. Mobilized Lgr5⁺ SCs contribute to the development of E6/E7-induced tumors in the IFE. **(a)** Representative images showing LacZ staining of the Lgr5⁺-SCs progeny in pre-neoplastic lesions (arrows) and SCC (arrowhead) from E6/E7-Lgr5-LacZ mice. **(b)** Identification of K15-EGFP⁺ and P-cadherin⁺ cells in LacZ-stained tumors using α -K15 and α -EGFP, or α -P-cadherin antibodies, respectively. Scale bar: 100 μ m. **(c)** Model describing alterations in homeostasis and dynamics of HF SCs during tumor initiation. E6 and E7 expression induces activation of bulge and Lgr5⁺ SC self-renewal, giving rise to an aberrant population of cells that abnormally proliferate and exhibit certain HGSC markers. Some of these aberrant cells, initially accumulated in the lower region of HFs, migrate to the upper region of HFs and to the IFE. Mobilized Lgr5⁺-SC progeny accumulates in pre-neoplastic lesions of the IFE and contributes to E6/E7-induced SCC development.

keratinocytes from E6/E7 skins, and β -catenin signaling and Sox9 and Tcf3 expression were downregulated in aberrant CD34⁻/K15⁺ cells. These observations indicate that mobilized K15⁺ cells might feature deregulated β -catenin signaling and hair-specification program, favoring the acquisition of IFE features and precluding the formation of ectopic HFs in the IFE.

In the IFE, K15⁺ cells actively proliferate at a similar ratio to neighbor K15⁻ basal keratinocytes, indicating that both populations of cells are competent at developing SCC at this location. Accordingly, lineage-tracing assays demonstrated that mobilized Lgr5⁺-SC progeny, expressing K15 and P-cadherin, initially accumulate in hyperplastic and dysplastic lesions in the IFE, and participate in generating SCCs in this region. In cervix SCCs, the consistent expression of E6 and E7 from HPV16 is necessary not only for tumor initiation but also for malignant tumor progression through the induction of genomic instability among other mechanisms.⁴⁶ Therefore, aberrantly mobilized cells, which

constantly express E6 and E7, might acquire enough chromosomal instability and mutations at the tumor initiation stage, and thereby participate in SCC development. Interestingly, we observed a higher percentage of K15⁺ cells in early neoplastic lesions (*in situ* SCCs) than in infiltrating SCCs, suggesting that during tumor progression, the expression of this bulge and HG SC marker is lost in some tumor cells by an unknown mechanism. Accordingly, phenotypic features of cells with SC features (such as the expression of some cancer SC markers) may change during tumor growth.^{47,48} The migration of K15⁺ cells reported here resembles to that described for the mobilization of HF SCs to epidermal wounds during the initial steps of healing.¹³ It is worth noting that wound induction promotes tumor development in injured areas of the IFE^{36,49} and the generation of HPV8-induced SCCs in skin is accelerated by wound induction. Although mobilization of K15⁺/P-cadherin⁺ cells to the IFE was not associated with any detectable wounds, it may have been

analogously promoted by accumulated DNA damage resulting from the absence of p53 function, or in response to other altered signals emerging from E6/E7-expressing IFE keratinocytes, possibly creating a wound-like microenvironment at this location. In addition, HPV16 E6 targets and deregulates the function of several members of the membrane-associated family scaffold proteins (MAG1-3) and proteins, such as Dlg, Scribble and MUPP1, which, through PDZ-domain interaction, form multiprotein complexes that are involved in cell-to-cell contact via tight junctions, cell polarity and signaling.⁵⁰ As a consequence, E6 interaction with PDZ-domain proteins may induce cell motility and activate the signaling pathways involved in survival and proliferation, promoting pre-neoplastic lesions and SCC development.^{17,46} Finally, the strong inflammatory response described in E6/E7 mice⁵¹ could induce the proliferation of HF SCs and their subsequent migration to these areas, contributing to tumorigenesis.

Together, our findings indicate that E6 and E7 expression induces proliferation of bulge SCs and an imbalance in the homeostasis of HF SCs, leading to the expansion and migration of Lgr5⁺-SC progeny to the infundibulum and the IFE, where these aberrant cells contribute to tumor development. The effect of E6 and E7 expression on SC homeostasis described here may provide insight into the mechanism involved in the HPV-induced tumorigenesis in other tissues. The cervical epithelium is the most frequent target tissue of HPV16, and infection with this high-risk HPV is the cause of most cervical SCCs.¹⁸ Interestingly, abnormal activation of Wnt/ β -catenin signaling has been reported in HPV-induced cervical and oropharyngeal SCCs,^{52,53} which accelerate the development of tumors.⁵⁴ Therefore, although HFs are absent from this epithelium, E6 and E7 expression may induce alterations in the pathways that control cervical SC homeostasis and dynamics, as reported here, leading to the aberrant expansion of this population of cells and promoting tumorigenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animal models

To generate the mouse lines described in this study, we used the following mice: K14-HPV16^{Tg/+},²² K15-EGFP^{Tg/Tg} and Lgr5-EGFP-Ires-CreER^{T2}/Rosa26-LacZ.⁹ Animal housing and handling, and all procedures involving mice, were approved by the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL) ethics committee, in accordance with Spanish national guidelines and regulations.

Isolation of cells from skin and SCCs

Adult keratinocytes were isolated as described previously.⁵⁵ Excised tumors were minced and incubated with collagenase I (60 U/ml; Sigma, St Louis, MO, USA) and dispase (0.7 U/ml; Gibco, Auckland, New Zealand) overnight at 37 °C. Cell suspensions were filtered and recovered after centrifugation. Tumor cells were incubated with anti-CD31 antibody (1:200; BD Bioscience, San Jose, CA, USA) for 30 min at 4 °C, then with Dynabeads anti-rat (1:50; Invitrogen, Frederick, MD, USA) for 30 min at 4 °C to deplete the suspension of endothelial cells. The cells in the supernatant were used in flow cytometry assays.

Flow cytometry

Isolated keratinocytes and tumor cells (100 000 cells per 100 μ l buffer, 5% FBS in phosphate-buffered saline) were stained with biotin-labeled CD34 antibody (1:50; eBioscience, San Diego, CA, USA) for 30 min at 4 °C, then with streptavidin-allophycocyanin (1:50; BD Bioscience) and phycoerythrin-labeled α 6-integrin (CD49f) antibody (1:50; BD Bioscience) for 30 min at 4 °C. For P-cadherin staining, keratinocytes were incubated with P-cadherin antibody (1 μ g/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), biotin-labeled anti-goat antibody (1:300; Dako, Glostrup, Denmark) and then with streptavidin-allophycocyanin (1:50; BD Bioscience). The live cells excluded propidium iodide (Sigma). Fluorescence-activated cell sorting was performed

with a BD Bioscience Aria apparatus. To determine the ratio of cells at each cell-cycle phase, sorted populations were fixed in 70% ethanol at -20 °C, then treated with a solution containing 20 μ g/ml propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 0.1% Triton X-100 and 0.2 mg/ml RNase (Sigma) for 15 min at 37 °C and analyzed by flow cytometry.

Lineage-tracing assays

To activate Cre recombinase in Lgr5-EGFP-Ires-CreER^{T2}/Rosa26-LacZ mice, WT and E6/E7-expressing mice were treated at age 21 days with 3-mg dose of tamoxifen (30 mg/ml dissolved in corn oil; Sigma) administered by intraperitoneal injection. Mice were killed at the indicated times after tamoxifen treatment. To identify cells expressing β -galactosidase in back skins, we conducted LacZ staining as previously described.⁴⁹

Western blotting

Whole-cell extracts were prepared from isolated keratinocytes as previously described.⁵⁵ After transfer, proteins were incubated with the antibodies anti-EGFP (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), anti-K15 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-P-cadherin (1:500; R&D Systems) and anti- β -actin (1:10 000; Sigma). Antibody binding was detected with a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase using enhanced chemiluminescence.

Tumor-induction experiments

Back skin from E6/E7 mice (8–12-week-old) was shaved and then treated with DMBA and TPA as previously described.⁵⁶

Histology, immunofluorescence and immunohistochemistry

Skins were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, embedded in paraffin wax and sectioned at 4 μ m. For immunofluorescence or immunohistochemical staining, antigen retrieval was performed in 10 mM sodium citrate (pH 6.0). Skin sections were blocked with 5% horse serum in phosphate-buffered saline for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. The primary antibodies used were anti-K15 (1:100; Santa Cruz), anti-EGFP (1:500; Abcam), anti-P-cadherin (1:500; R&D Systems), anti-K14 (1:400; Covance, Emeryville, CA, USA), anti-K5 (1:1000; Covance), anti-K10 (1:500; Covance), anti-Ki67 (1:100; Invitrogen) and anti- β -catenin (1:150; BD Bioscience). Skin sections were then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. The MOM Basic Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used for mouse monoclonal antibodies (following the manufacturer's instructions). To analyze CD34-expressing cells, tissue samples were embedded in optimal cutting temperature, and sections were incubated with biotin-labeled CD34 antibody (1:100; eBioscience) overnight at 4 °C. To visualize EGFP directly, skins were fixed in 4% formaldehyde for 30 min and then embedded in optimal cutting temperature. Nuclei were stained using 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for immunofluorescence. Samples were imaged on a Leica DM6000B microscope and a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica, Mannheim, Germany).

Reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) and then cleaned in RNeasy Mini Spin columns (Qiagen, Germantown, MD, USA). RNA samples were DNase-treated with Turbo DNA-free (Ambion, Austin, TX, USA). The High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used for reverse transcription. Real-time PCR reactions were performed on an Applied Biosystems 7900HT System, using PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems) and TaqMan Gene Expression Assays (Supplementary Table S2). For HPV16 E6 mRNA quantification, quantitative real-time PCR was performed on a LightCycler 480 II System using LightCycler 480 SYBR Green Mix (Roche, Mannheim, Germany) and primers previously described.⁵⁷ All data were normalized with respect to *Gapdh* and *Hprt1* expression.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D Hanahan and JM Arbeit (NCI MMHCC Repository) for the K14-HPV16 mice, A Villanueva for helpful advice, S Gonzalo for critical reading of the manuscript,

R Alvarez, J Comas and E Castaño (Universitat de Barcelona-SCT) for their technical support in flow cytometry and the IDIBELL animal facility service for mouse care. VdSD is funded by a Spanish Ministry of Science and Innovation fellowship, SSS is funded by a Spanish Ministry of Education fellowship and DRA and AVG received an IDIBELL fellowship. The research of PM's group is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2008-01173) and by the Catalan Department of Health (Generalitat de Catalunya).

Author contributions: Conception and design was provided by VdSD, SSS, DRA and PM. Collection and assembly of data was performed by VdSD, SSS, DRA, AVG, MU, RMP and GP. Data analysis and interpretation was done by VdSD, SSS, DRA, AVG, MU, RMP, GP, EGS, OC, FV, JMP, EB and PM. The manuscript was written by PM.

REFERENCES

- Blainpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 207–217.
- Watt FM, Jensen KB. Epidermal stem cell diversity and quiescence. *EMBO Mol Med* 2009; **1**: 260–267.
- Peterson M, Brylka H, Kraus A, John S, Rapp G, Schettina P et al. TCF/Lef1 activity controls establishment of diverse stem and progenitor cell compartments in mouse epidermis. *Embo J* 2011; **30**: 3004–3018.
- Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* 2001; **15**: 1688–1705.
- Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* 2003; **120**: 501–511.
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 411–417.
- Rhee H, Polak L, Fuchs E. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles. *Science* 2006; **312**: 1946–1949.
- Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, Fuchs E. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 33–43.
- Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippet HJ, Clevers H et al. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet* 2008; **40**: 1291–1299.
- Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* 2011; **144**: 92–105.
- Muller-Rover S, Tokura Y, Welker P, Furukawa F, Wakita H, Takigawa M et al. E- and P-cadherin expression during murine hair follicle morphogenesis and cycling. *Exp Dermatol* 1999; **8**: 237–246.
- Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N et al. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 155–169.
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 2005; **11**: 1351–1354.
- Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2001; **344**: 975–983.
- Schaper ID, Marucci GP, Weissenborn SJ, Kasper HU, Dries V, Smyth N et al. Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* 2005; **65**: 1394–1400.
- Karagas MR, Nelson HH, Sehr P, Waterboer T, Stukel TA, Andrew A et al. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 389–395.
- Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 2010; **40**: 1–13.
- zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology* 2009; **384**: 260–265.
- Hama N, Ohtsuka T, Yamazaki S. Detection of mucosal human papilloma virus DNA in Bowenoid papulosis, Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol* 2006; **33**: 331–337.
- Gormley RH, Groft CM, Miller CJ, Kovarik CL. Digital squamous cell carcinoma and association with diverse high-risk human papillomavirus types. *J Am Acad Dermatol* 2011; **64**: 981–985.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 550–560.
- Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-HPV16 transgenic mice. *J Virol* 1994; **68**: 4358–4368.
- Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1899–1917.
- Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 1905–1912.
- Lapouge G, Youssef KK, Vokaer B, Achouri Y, Michaux C, Sotiropoulou PA et al. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 7431–7436.
- White AC, Tran K, Khuu J, Dang C, Cui Y, Binder SW et al. Defining the origins of Ras/p53-mediated squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 7425–7430.
- Boxman IL, Hogewoning A, Mulder LH, Bouwes Bavinck JN, ter Schegget J. Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubic and perianal hair from patients with genital warts. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 2270–2273.
- Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S et al. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 427–439.
- Snippert HJ, Haegebarth A, Kasper M, Jaks V, van Es JH, Barker N et al. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science* 2010; **327**: 1385–1389.
- Lowry WE, Blainpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L, Fuchs E. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev* 2005; **19**: 1596–1611.
- Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 1172–1183.
- Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, Haegebarth A, De Palo M, Anti M et al. The intestinal Wnt/TCF signature. *Gastroenterology* 2007; **132**: 628–632.
- Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Husseint T, Metzger D, Chambon P et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 2008; **452**: 650–653.
- Arwert EN, Lal R, Quist S, Rosewell I, van Rooijen N, Watt FM. Tumor formation initiated by nondividing epidermal cells via an inflammatory infiltrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 19903–19908.
- Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 299–305.
- Wong SY, Reiter JF. Wounding mobilizes hair follicle stem cells to form tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 4093–4098.
- Meletis K, Wirta V, Hede SM, Nister M, Lundeborg J, Frisen J. p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* 2006; **133**: 363–369.
- Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G et al. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 37–48.
- Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 2009; **138**: 1083–1095.
- Lorz C, Garcia-Escudero R, Segrelles C, Garin MI, Ariza JM, Santos M et al. A functional role of RB-dependent pathway in the control of quiescence in adult epidermal stem cells revealed by genomic profiling. *Stem Cell Rev* 2010; **6**: 162–177.
- Ruiz S, Santos M, Segrelles C, Leis H, Jorcano JL, Berns A et al. Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development* 2004; **131**: 2737–2748.
- Martinez-Cruz AB, Santos M, Lara MF, Segrelles C, Ruiz S, Moral M et al. Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and Trp53 tumor suppressors. *Cancer Res* 2008; **68**: 683–692.
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. Beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 2001; **105**: 533–545.
- Vidal VP, Chaboissier MC, Lutzkendorf S, Cotsarelis G, Mill P, Hui CC et al. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Curr Biol* 2005; **15**: 1340–1351.
- Nguyen H, Rendl M, Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin. *Cell* 2006; **127**: 171–183.
- McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* 2009; **143**: 195–208.
- Schober M, Fuchs E. Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF-beta and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 10544–10549.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012; **10**: 717–728.
- Kasper M, Jaks V, Are A, Bergstrom A, Schwager A, Barker N et al. Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 4099–4104.
- Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaic V, Massimi P, Nagasaka K et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene* 2008; **27**: 7018–7030.
- de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 2005; **7**: 411–423.
- Shinohara A, Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Mori Y, Takami T et al. Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene

- is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001; **82**: 450–455.
- 53 Rodriguez-Sastre MA, Gonzalez-Maya L, Delgado R, Lizano M, Tsubaki G, Mohar A *et al*. Abnormal distribution of E-cadherin and beta-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2005; **97**: 330–336.
- 54 Bulut G, Fallen S, Beauchamp EM, Drebing LE, Sun J, Berry DL *et al*. Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice. *PLoS One* 2011; **6**: e27243.
- 55 Muñoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet* 2005; **37**: 1063–1071.
- 56 Blanco R, Munoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA. Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 2007; **21**: 206–220.
- 57 Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORFs. *Am J Pathol* 1993; **142**: 1187–1197.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

ARTICLE 2

RCAN 1 and 3 proteins regulate thymic positive selection

*Eva Serrano-Candelas, German Aleman-Muench , **Sònia Solé-Sánchez**, Anna Aubareda, Sergio Martínez-Høyer, Jaume Adan _Alvaro Aranguren-Ibanez, Melanie A. Pritchard Gloria Soldevila, Merce Perez-Riba*

Biochem Biophys Res Commun. 2015;460(2):295-301.

Per a la realització d'aquest article he contribuït fent el manteniment i gestió de les colònies d'animals tant C57BL/6 com dels transgènics RCAN1 (TghRCAN1), l'extracció d'òrgans (timus, ganglis axilars, inguinals, melsa, cor, cervell i fetge) d'aquests animals, processament d'aquests per a l'obtenció de suspensions cel·lulars i realització d'anàlisis generals exceptuant citometria.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

RCAN 1 and 3 proteins regulate thymic positive selection



Eva Serrano-Candelas^{a,1,4}, Germán Alemán-Muench^{b,4}, Sònia Solé-Sánchez^a,
 Anna Aubareda^{a,3}, Sergio Martínez-Høyer^{a,2}, Jaume Adán^c, Álvaro Aranguren-Ibáñez^a,
 Melanie A. Pritchard^d, Gloria Soldevila^{b,**,5}, Mercè Pérez-Riba^{a,*,5}

^a Human Molecular Genetics Laboratory, Cell Signaling Unit, Bellvitge Biomedical Research Institute – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08908, Spain

^b Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF 04510, Mexico

^c LEITAT Technological Center, Biomed Division, Parc Científic de Barcelona, Barcelona 08028, Spain

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Victoria 3168, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2015

Available online 14 March 2015

Keywords:

Thymocyte positive selection

RCAN1

RCAN3

Calcineurin

NFATc

RAF kinase

ABSTRACT

Cooperation between calcineurin (CN)-NFATc and RAF-MEK-ERK signaling pathways is essential in thymocyte positive selection. It is known that the Regulators of Calcineurin (RCAN) proteins can act either facilitating or suppressing CN-dependent signaling events. Here, we show that RCAN genes are expressed in lymphoid tissues, and address the role of RCAN proteins in T cell development. Over-expression of human RCAN3 and RCAN1 can modulate T cell development by increasing positive selection-related surface markers, as well as the “Erk^{hi} competence state” in double positive thymocytes, a characteristic molecular signature of positive selection, without affecting CN activity. We also found that RCAN1/3 interact with RAF kinases and CN in a non-exclusive manner. Our data suggests that the balance of RCAN interactions with CN and/or RAF kinases may influence T cell positive selection.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes play a crucial role in cell-mediated adaptive immunity against infections as well as in

anti-tumoral immunity. In the thymus, T cell development requires the recognition of self-peptide-MHC complexes by immature thymocytes leading to the selection of a self-restricted and autotolerant T cell repertoire [1]. TCR signaling sets the avidity/affinity threshold that dictates thymocyte fate; driving cells to death by neglect, rescue from apoptosis by positive selection or cell deletion by negative selection [2]. Distinct signaling signature occur in thymocytes depending on whether they are being positively or negatively selected, including the CN-NFATc and the RAF-MEK-ERK MAPK signaling pathways, both essential to positive selection [1,2].

Calcium mediated activation of CN leads to CN-dependent dephosphorylation of their substrates, including the cytosolic NFATc transcription factors 1 to 4 (NFATc1–4), key regulators of the immune response. These are then translocated to the nucleus leading to cytokine gene expression via cooperation with other transcription factors [3]. In the thymus, the CN subunits CNAβ and CNB, in cooperation with NFATc3, are essential for positive selection [4–6].

As RAF/ERK and CN/NFATc regulate thymocytes positive selection and mature T cell responses, both signaling pathways need to be fine-tuned in the immune system. Indeed, CN is the target of

Abbreviations: BM, bone marrow; CIC, calcipressin (renamed as RCAN) inhibitor of calcineurin; CN, calcineurin; DP, double positive; DN, double negative; mAb, monoclonal antibody; NFATc, cytosolic Nuclear Factor of Activated T-cells; RCAN, Regulator of Calcineurin; SP, single positive; WT, wild type.

* Corresponding author. Human Molecular Genetics Group, Cell Signaling Unit, Bellvitge Biomedical Research Institute – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain. Fax: +34 932607414.

** Corresponding author. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF 04510, Mexico. Fax: +52 5555503892.

E-mail addresses: soldevi@unam.mx (G. Soldevila), mpr@idibell.cat (M. Pérez-Riba).

¹ Current address: Biochemistry Unit, Department of Physiological Sciences I, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona 08036, Spain.

² Present address: BC Cancer Research Centre, Vancouver V5Z 1L3, Canada.

³ Present address: Kennedy Institute of Rheumatology, University of Oxford, Oxford OX3 7HE, United Kingdom.

⁴ These authors contributed equally to this work.

⁵ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.029>

0006-291X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

the immunosuppressive drugs cyclosporine A and FK506 (Tacrolimus). However, prolonged treatment with these drugs is associated with severe side effects [7]. As an emergent alternative, several endogenous inhibitors of CN have been described, including the family of Regulators of Calcineurin (RCAN) proteins [8]. RCAN proteins, which are highly conserved from yeast to human (RCAN1, RCAN2 and RCAN3 in human) [9,10], bind to CN and inhibit NFATc-mediated gene expression in human T cells [9,11]. Nevertheless, *in vivo* functional studies have emphasized the dual role of RCAN proteins, either promoting or suppressing CN signaling, depending on the different RCAN motifs and the cellular context [12–16].

Recent data indicates that RCAN1-1 isoform affects T cell development in a CN pathway-independent manner, suggesting that additional interactions with other signaling pathways can occur [17]. In this context, several proteins involved in TCR signaling are known to interact with members of RCAN family, including IRAK-1 inhibitor Tollip [18], the NF- κ B-inducing kinase (NIK) [19] and the kinase CRAF [20].

In order to gain information about the function of RCAN proteins in the immune system, we determined the gene expression of *mRcan* family members in mouse adult and embryonic lymphoid tissues. Moreover, overexpression of human *RCAN3* (hRCAN3) and of human *RCAN1* (hRCAN1) in two different mice models show that *hRCAN1/3* influences positive selection-related signals.

2. Material and methods

2.1. Mice

Ten to twelve week-old C57BL/6 female mice purchased from Harlan Laboratories were used for BM reconstitution experiments and for *Rcan* gene expression analysis. PAC77 *RCAN1* transgenic mice (TghRCAN1), was generated by introducing a 135 kb PAC genomic clone into mixed genetic background C57BL/6 x CBA mice (Supporting Methods). Seven to twelve week-old female TghRCAN1 mice were used. Mice were maintained at the IDIBELL facility in accordance with Institutional guidelines. Animal protocol procedure was approved by Ethics committee of the institution (EC-IDIBELL) and for CEA-Generalitat de Catalunya (Catalonian Government Ethical Committee) (protocol 5769). The procedure meets local and national legislation, which is a transposition of the 2010 63 EU directive.

2.2. Genotyping and characterization of hRCAN1 expression in TghRCAN1 mice

TghRCAN1 mice genotyping was carried out by DNA amplification of the 3' UTR of the *hRCAN1* gene from animal tail (Supporting methods). Mouse endogenous IL2 precursor locus DNA amplification was used as loading DNA control (Table S1). *hRCAN1-1* and

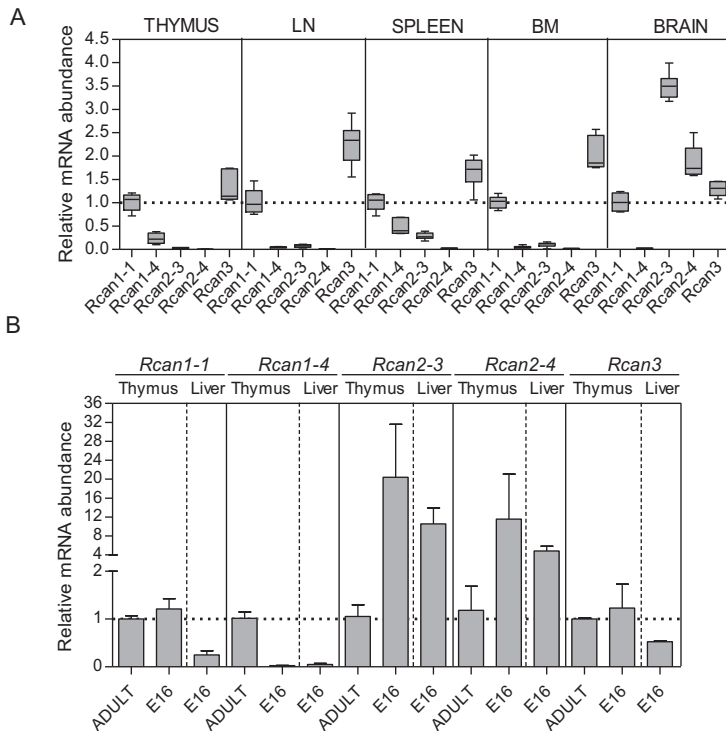


Fig. 1. *Rcan* mRNAs are expressed in adult and embryonic mouse lymphoid tissues. Quantification of mouse *Rcan* transcript variants was performed by q-PCR analysis of cDNA samples from adult and E16 embryonic tissues. (A) Relative abundance of *Rcan* transcripts in adult lymphoid tissues. As a positive control of *Rcan* gene expression [25], brain tissue is shown. Values were normalized to *Hprt* and the abundance of each mRNA form is shown relative to the expression levels of *Rcan1-1* in each specific tissue; $n \geq 5$. (B) Relative abundance of *Rcan* mRNA forms in E16 fetal thymic lobes and liver. Bars represent the mean value \pm SEM of two pools of fetuses from different litters collected at the same developmental stage analyzed independently. Values were normalized to *Hprt* gene expression and then relative to its own expression level in adult thymus. (A and B) Horizontal dashed line corresponds to the expression value of 1.

hRCAN1-4 overexpression was confirmed at mRNA level by semi-quantitative PCR using specific primers (Table S1) and normalized to mouse *Capdh* gene expression values. mRNA samples were resolved in 8% acrylamide continuous gel and stained with EtBr. TghRCAN1 tissues were lysed in RIPA buffer (Supporting methods), and 80 μ g of soluble extract were used to western blot analysis using anti-hRCAN1 antibody.

2.3. Real time quantitative PCR (qPCR) analysis of mouse *Rcan* transcripts

Total RNA was isolated from fetal liver and thymi (E16 day of gestation) and adult (10–12 weeks) lymphoid organs (spleen, thymus, BM and maxillary, axillary and inguinal lymph nodes) and adult brain using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's protocol. Total RNA (1.7 μ g) previously treated with DNase[™] (Applied Biosciences, USA), was reverse transcribed using the Superscript II enzyme (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) and analyzed by qPCR using specific primers and UPL probes (Table S2) using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [21] as previously described [11]. *Hprt1* and *Gusb* genes were used as internal controls of cDNA amplification, and results are shown normalized to *Hprt1* values.

2.4. Anti-RCAN1 and anti-RCAN3 antibody generation

Monoclonal antisera against hRCAN1 protein and hRCAN3 protein were generated at the Technological Center LEITAT, Biomed Division (Barcelona, Spain), by immunizing mice with the synthetic

peptide RPEYTPIHLS at the C-terminus of human RCAN1 protein (from Peptide 2.0, Chantilly, VA, USA) or with amino acids 2 to 65 of human RCAN3 protein grown in bacteria, respectively (depicted in Fig. S2). IgG fractions were purified using protein G affinity chromatography (GE Healthcare, USA) following the manufacturer's protocol.

2.5. Reconstitution of mice with human RCAN3-transduced BM cells

The human full length HA-tagged *RCAN3* sequence was subcloned in the retroviral vector pMIG (Addgene plasmid 9044; [22]). The protocol from Shah and colleagues [23] was used to reconstitute animals with retrovirally transduced BM cells with slight modifications.

2.6. Flow cytometry

Thymocytes were isolated from fresh thymus by forcing the tissue through a 70 μ m nylon mesh and maintained in 10% FBS RPMI media on ice. 3×10^6 cells were stained with fluorescence-conjugated antibodies against surface markers (Table S3). For intracellular staining of phosphoproteins, thymocytes were stimulated with 10 μ g/ml anti-CD3 (Immunotools, Germany) plus anti-CD28 antibody (BD Pharmingen, USA) and crosslinking with 10 μ g/ml of anti-hamster IgG (ThermoScientific Pierce, USA) for 3 min (for pERK, pAKT and pP38 detection) or for 15 min (for pSAP/JNK detection) at 37 °C. Afterwards, cells were fixed and permeabilized with Lyse/Fix and Perm Buffer II (BD Biosciences, USA) and stained with specific anti-phosphoprotein primary antibodies (Table S3),

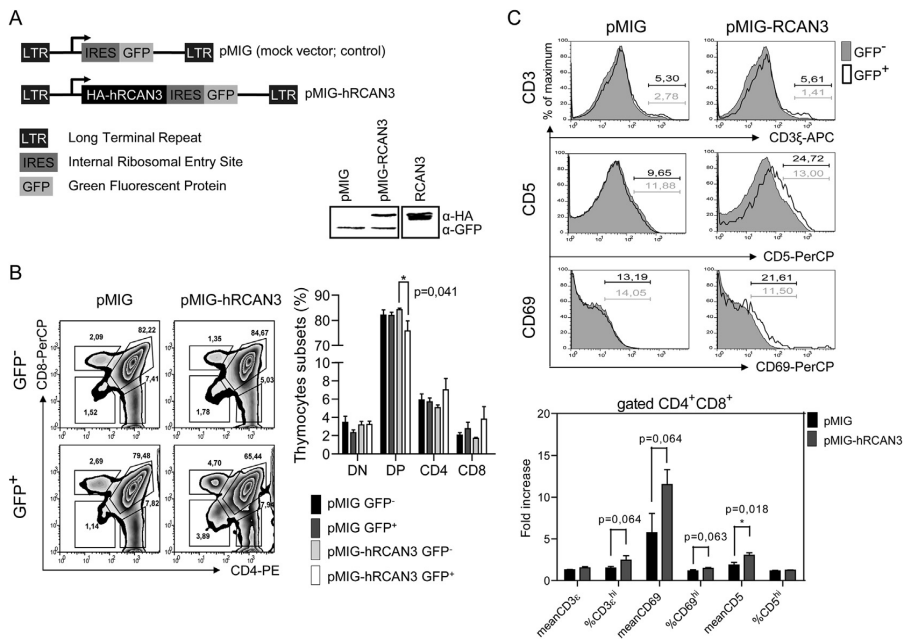


Fig. 2. *hRCAN3* overexpression increases positive selection of thymocytes. (A) Representation of retroviral constructs used to transduce BM progenitors and estimation of the transduction efficiency of the retrovirus in NIH/3T3 cells. HEK293T cells overexpressing HA-hRCAN3 were used as a positive control. (B) Representative dot plots (left panel) and global analysis (right panel) of CD4 versus CD8 staining of thymus in both GFP⁻ (endogenous) and GFP⁺ (transduced) gated subpopulations from pMIG and pMIG-hRCAN3 reconstituted animals. (C) Upper panel, representative histograms showing CD3 ζ , CD69 and CD5 staining in gated DP thymocytes from pMIG and pMIG-hRCAN3 mice. Lower panel, global analysis of MFI in CD3, CD5 and CD69, and CD3 ζ ^{hi}, CD5^{hi} and CD69^{hi} populations in gated DP subset. Values show the value in gated GFP⁺ cells in each mouse normalized to the values of their GFP⁻ cells. (B and C) Diagram bars represent mean \pm SEM of four independent experiments, $n \geq 7$.

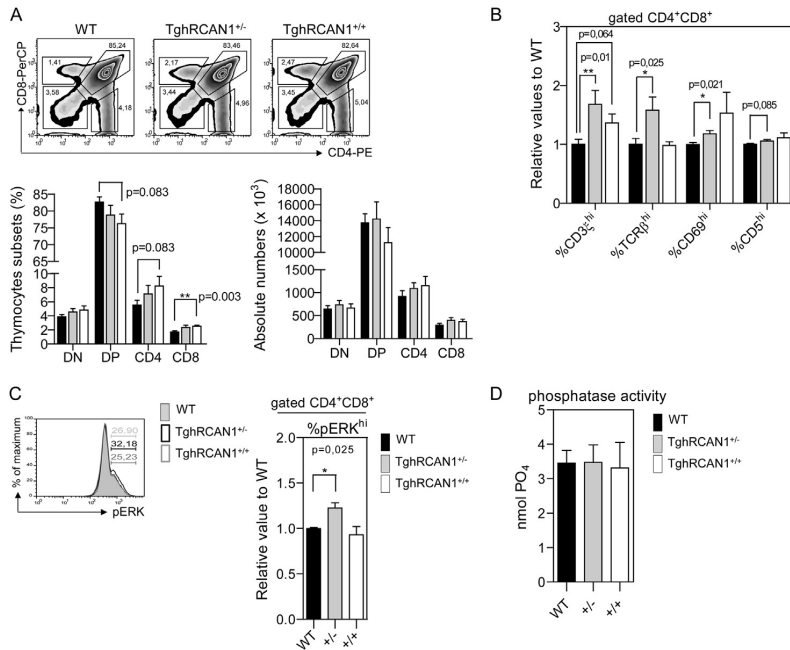


Fig. 3. Overexpression of the *hRCAN1* gene increases positive selection of thymocytes. (A) Upper panel, representative CD4 versus CD8 staining dot plots from adult WT, TghRCAN1^{-/-} and TghRCAN1^{+/-} thymi. Lower panel, percentage (left panel) and total cells (right panel) of each thymocyte subset from each genotype. (B) Global analysis of CD3^e^{hi}, TCR^β^{hi}, CD69^{hi} and CD5^{hi} subpopulations in gated DP thymocytes from each genotype. (C) Left panel, representative histogram of pERK levels in gated DP thymocytes after anti-CD3 and anti-CD28 stimulation. Right panel, analysis of the percentage of pERK^{hi} subpopulation in gated DP thymocytes from each genotype. (A, B and C) Data represents mean ± SEM of at least two independent experiments, n ≥ 6. (B and C) Values in bar diagrams are shown relative to the mean value for WT mice within each experiment. (D) *In vitro* phosphatase activity of CN in thymocytes from the different genotypes. Mean values ± SEM are depicted, (WT and TghRCAN1^{-/-} n = 3; TghRCAN1^{+/-} n = 2).

and subsequently stained with anti-rabbit AlexaFluor 467 (Invitrogen/Life Technologies) and fluorochrome-conjugated antibodies against surface markers (see Table S3). In all cases, dead cells were gated out based on the forward scattering (FSC) and side scattering (SSC) profile. Samples were captured in a FACScalibur (BD Biosciences) cytometer and data was analyzed with FlowJo Tree Star software.

2.7. Calcineurin phosphatase activity

CN phosphatase activity from thymocytes towards phosphorylated RII substrate was analyzed using the calcineurin cellular assay kit (ENZO Life Sciences) as previously described [24]. Each reaction was performed in the presence of 40 units of human recombinant CN.

2.8. Pull-down and co-immunoprecipitation assays

Jurkat T cells (2.5×10^7) were used for pull-down experiments as described in Ref. [11]. For coimmunoprecipitation (coIP) assays, G protein Sepharose beads (GE Healthcare) were incubated with 2 μg of anti-BRAF (Santa Cruz, CA USA), or unrelated IgG, for 3 h at 4 °C, washed and incubated with soluble extracts from Jurkat T cells and analyzed by western blot using anti-CRAF (1:1000), anti-BRAF (1:500) and anti-CN A (1:500) antibodies (BD Biosciences).

2.9. Statistical analysis

Non-parametric Mann–Whitney test (two-tailed; unpaired) was used to calculate statistical significance using the SPSS 15.0

software (SPSS, USA). Asterisks indicate **p* value ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001. *p*-values below 0.1 are also indicated.

3. Results and discussion

3.1. Mouse *Rcan* genes are differentially expressed in adult and embryonic lymphoid tissues

RCAN1 gene encodes two major protein products, RCAN1-1 and RCAN1-4. In turn, *RCAN2* gene encodes RCAN2-3 and RCAN2-4 isoforms. In contrast, one unique protein product has been detected for human and mouse *RCAN3* [9,10,25]. Since a precise description of *RCAN* gene expression in lymphoid tissues has not previously been performed, we first investigated the expression pattern of mouse *Rcan* genes. As shown in Fig. 1A, all *Rcan* mRNA forms are detected in adult lymphoid tissues. Notably, in lymphoid tissues, both *Rcan1-1* and *Rcan3* are the major forms, with *Rcan3* being the most abundant. In contrast, *Rcan1-4* and *Rcan2-3* were expressed at lower levels, while *Rcan2-4* mRNA was almost undetectable.

Since early T cell development initiates with the recruitment of lymphoid progenitors to the thymic anlage from 13.5 days of gestation, we also analyzed *Rcan* gene expression in E16 fetal thymi and compare it to that in fetal liver, an organ with a hematopoietic function during the fetal stage. Expression of *lymphocyte antigen 75/CD205* (*Ly75/DEC-205*) gene was analyzed to corroborate the purity of embryonic thymi [26] (Fig. S1). Interestingly, both *Rcan1-1* and *Rcan3* mRNAs are similarly abundant in fetal and adult thymi, being lower in embryonic livers (Fig. 1B). These results suggest that both transcripts may play a role in thymocytes in both the adult and

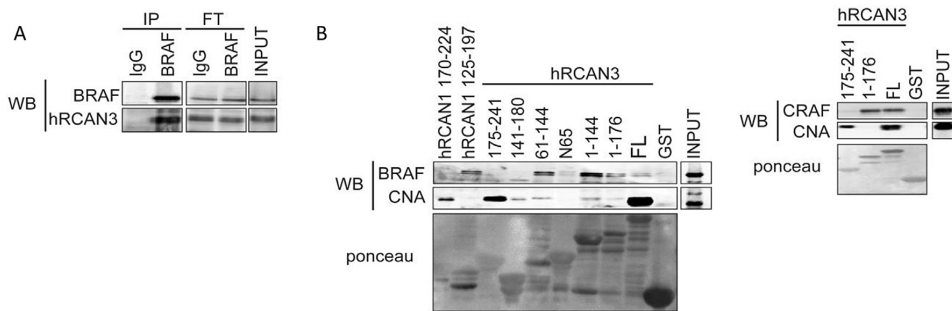


Fig. 4. RCAN1-1 and RCAN3 proteins interact with RAF protein kinases and CN in a non-exclusive manner. (A) Endogenous BRAF protein was immunoprecipitated from Jurkat T cells with anti-BRAF mAb, and mouse IgG as a control, and analyzed for its binding to RCAN3 by WB with anti-hRCAN3 antibody. (B) Pull down experiments using recombinant GST-RCAN1-1 and GST-RCAN3 fusion proteins and deletion mutants as a bait and soluble protein extract from Jurkat T cells as source of endogenous CN and RAF proteins. Samples were analyzed by WB and analyzed with anti-BRAF, anti-CRAF and anti-CNA mAb.

early developmental stages. In addition, *Rcan1-4* is expressed preferentially in adult thymus whereas *Rcan2* transcripts are increased in both fetal tissues compared to adult thymus (Fig. 1B). This switch in *Rcan* gene expression from fetal to adult thymi might be associated with the distinct nature of signals occurring in the thymic niche at these ages.

All these data indicate that *Rcan* transcripts may have specific roles instead of redundant roles in the immune system.

3.2. *hRCAN3* overexpression promotes the expression of positive selection-related markers

Since *Rcan1* and *Rcan3* were preferentially expressed in adult thymi (Fig. 1A), we next evaluated their putative role in thymocytes development. Since *Rcan3* transgenic mouse is not available, we performed reconstitution experiments with retrovirally transduced BM cells to overexpress *hRCAN3*. As a control, pMIG vector (mock vector) was used (Fig. 2A).

In order to explore the functional role of RCAN3 in T cell development, we first analyzed thymocyte populations, comparing GFP⁺ versus GFP⁻ populations from pMIG and pMIG-*hRCAN3* reconstituted mice. Our data revealed that mice that received BM cells overexpressing *hRCAN3* showed a significant decrease in double positive (DP; CD4⁺CD8⁺) cells with a trend towards an increase of single positive (SP; CD4⁺ or CD8⁺) populations (Fig. 2B).

Subsequently, we analyzed the impact of *hRCAN3* overexpression on the acquisition of positive selection-related markers such as CD3e, CD5 and CD69 on the surface of DP cells [27–29] (Fig. 2C). *hRCAN3* overexpression increases the percentage of CD3e^{hi}, CD69^{hi} cells, as well as the MFI (mean fluorescence intensity) of CD69 and CD5 within gated DP thymocytes, suggesting a functional association between *hRCAN3* upregulation and the increase of positive selection-related signals.

3.3. *hRCAN1* overexpression promotes the expression of positive selection-related markers

Considering that *mRcan1-1* and *mRcan3* mRNA forms are the most abundant in thymocytes (Fig. 1) and the high amino acid sequence identity between them (Fig. S2), it would be expected that some RCAN3 and RCAN1 functions could overlap. Hence, we next analyzed a transgenic mouse containing the complete *hRCAN1* gene including its 5' flanking region containing both promoters regions that regulate *hRCAN1-1* and *hRCAN1-4* expression (TghRCAN1). All TghRCAN1 animals were viable, fertile and

displayed no macroscopic general abnormalities, but a reduced body weight compared to wild type (WT) animals (Fig. S3A). Overexpression of both *hRCAN1-1* and *hRCAN1-4* in lymphoid tissues was confirmed at the mRNA (Fig. S3B) and protein (Fig. S3C) level.

We next tested whether *hRCAN1* overexpression influenced T cell development. As shown in Fig. 3A, *hRCAN1* overexpression decreased the percentage of DP thymocytes and significantly increased SP CD8⁺, and to a lesser extent CD4⁺ cells. When analyzing the impact of *hRCAN1* overexpression on the acquisition of positive selection related markers within DP cells, we observed a significant increase of CD3e^{hi}, TCRβ^{hi} and CD69^{hi} subpopulations and, to a lesser extent, of CD5^{hi} subpopulation in TghRCAN1^{+/-} mice compared to the other genotypes (Fig. 3B). TghRCAN1^{+/+} mice showed more variability with a tendency towards an increase in CD69^{hi} and CD3e^{hi} populations (Fig. 3B).

It has been previously described that positive selection of DP thymocytes depends on their ability to achieve an “ERK^{hi} competence” state, where cells are able to phosphorylate and activate ERK in response to low-avidity ligands [6]. It is noteworthy that only a small population among DP is able to achieve this high phosphorylation status of ERK [6]. Therefore, we analyzed ERK activation in DP thymocytes from TghRCAN1 mice. In accordance with the increase of positive selection markers in DP cells, we observed a significant increase in the percentage of pERK^{hi} in DP cells from TghRCAN1^{+/-} mice (Fig. 3C), but not in other downstream TCR signaling kinases such as pAKT, pP38 and pJNK in DP cells (data not shown).

Therefore, using two different *in vivo* models, our results indicate that overexpression of both *hRCAN1* and *hRCAN3* proteins increase positive selection related signals in the thymus, suggesting, to some extent, a functional overlapping role of these proteins during T cell development.

Interestingly, a different transgenic model specific for the *hRCAN1-1* isoform, not including the *hRCAN1-4* isoform, showed an impairment of positive selection, reducing the thymic production of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in heterozygous animals [17]. These dissimilar results suggest that differential expression of *hRCAN1* isoforms differentially affects thymocyte development. Indeed, in our results, the effects on positive selection markers in TghRCAN1 were more evident in heterozygous animals. This could be explained by the reduced protein levels of RCAN1-4 in homozygous compared to heterozygous animals (Fig. S3C), likely due to the higher expression of RCAN1-1 isoform, which could inhibit NFATc-dependent RCAN1-4 gene expression.

It is known that the acquisition of “ERK^{hi} competence” state among DP undergo positive selection requires the CN-NFATc signaling pathway [6]. Due to the described role of RCAN proteins as modulators of CN activity towards NFATc, we next analyzed the CN enzymatic activity of thymocytes from our TghRCAN1 model. Surprisingly, we did not find differences in CN activity (Fig. 3D), similarly to that reported in transgenic mice overexpressing exclusively the hRCAN1-1 isoform [17]. This suggests that hRCAN1 may be exerting its effects on thymocyte selection through the interaction with other proteins different to CN.

3.4. RCAN1-1 and RCAN3 interact with RAF kinases

It is well established that RCAN proteins interact with other proteins other than CN, thereby modulating other signaling pathways [18,19,30,31]. Indeed, RCAN1-4 isoform is able to interact with CRAF kinase [20]. However, no studies have yet addressed the possible interaction between RCAN1-1 and RCAN3 with RAF proteins. By coimmunoprecipitation assays, we were able to determine that endogenous BRAF coimmunoprecipitates with endogenous hRCAN3 (Fig. 4A). In addition, RCAN1 and RCAN3 are able to interact with both BRAF and CRAF kinases. Furthermore, this interaction of RAF kinases on RCAN takes place in a different site from that previously described for the CNA interaction [9], and in a non-mutually exclusive manner, reinforcing the idea that CN-NFATc, RAF/ERK signaling pathways and RCAN proteins may be closely regulated.

In conclusion, we evidence that *mRcan* genes are expressed in lymphoid tissue and that overexpression of *hRCAN3* and *hRCAN1* in two mice models influence positive selection-related signals and thymocyte development.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We specially thank J. Ramsés Chávez Ríos for technical assistance. This work has been supported by grants SAF2009-08216 from MICINN, 2009 SGR1490 from Generalitat de Catalunya (G.C.), and Grant 79573 from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). S.M-H was supported by a fellowship from IDIBELL PhD fellowship, G.A. from CONACYT (# 208213) and E.S.-C. from SAF009-08216. GS was recipient of a fellowship from PASPAs (Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM) (DGAPA (Dirección General Asuntos del Personal Académico), UNAM, México) and from PIV2009, AGAUR, Generalitat de Catalunya, Catalunya, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.029>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.029>.

References

- [1] N. Labrecque, T. Baldwin, S. Lesage, Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection, *Immunol. Cell. Biol.* 89 (2011) 16–26.

- [2] T.K. Starr, S.C. Jameson, K.A. Hogquist, Positive and negative selection of T cells, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 139–176.
- [3] H. Li, A. Rao, P.G. Hogan, Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins, *Trends Cell. Biol.* 21 (2011) 91–103.
- [4] O.F. Bueno, E.B. Brandt, M.E. Rothenberg, J.D. Molkentin, Defective T cell development and function in calcineurin A beta-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 9398–9403.
- [5] K. Cante-Barrett, M.M. Winslow, G.R. Crabtree, Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes, *J. Immunol.* 179 (2007) 103–110.
- [6] E.M. Gallo, M.M. Winslow, K. Cante-Barrett, A.N. Kademacher, L. Ho, L. McGinnis, B. Iritani, J.R. Neilson, G.R. Crabtree, Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development, *Nature* 450 (2007) 731–735.
- [7] S. Martínez-Martínez, J.M. Redondo, Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 997–1007.
- [8] K.J. Davies, G. Ermak, B.A. Rothermel, M. Pritchard, J. Heitman, J. Ahn, F. Henrique-Silva, D. Crawford, S. Canaider, P. Strippoli, P. Carinci, K.T. Min, D.S. Fox, K.W. Cunningham, R. Bassel-Duby, E.N. Olson, Z. Zhang, R.S. Williams, H.P. Gerber, M. Perez-Riba, H. Seo, X. Cao, C.B. Klee, J.M. Redondo, L.J. Maltais, E.A. Bruford, S. Povey, J.D. Molkentin, F.D. McKeon, E.J. Duh, G.R. Crabtree, M.S. Cyert, S. de la Luna, X. Estivill, Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin, *FASEB J.* 21 (2007) 3023–3028.
- [9] M.C. Mulero, A. Aubareda, A. Schluter, M. Perez-Riba, RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 330–341.
- [10] E. Serrano-Candelas, D. Farré, A. Aranguren-Ibáñez, S. Martínez-Hoyer, M. Pérez-Riba, The vertebrate RCAN gene family: novel insights into evolution, structure and regulation, *PLoS One* 9 (2014) e85539.
- [11] S. Martínez-Hoyer, A. Aranguren-Ibáñez, J. García-García, E. Serrano-Candelas, J. Vilardell, V. Nunes, F. Aguado, B. Oliva, E. Itarte, M. Perez-Riba, Protein kinase CK2-dependent phosphorylation of the human regulators of calcineurin reveals a novel mechanism regulating the calcineurin-NFATc signaling pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 2311–2321.
- [12] S. Ryeom, R.J. Greenwald, A.H. Sharpe, F. McKeon, The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 874–881.
- [13] R.B. Vega, B.A. Rothermel, C.J. Weinheimer, A. Kovacs, R.H. Naseem, R. Bassel-Duby, R.S. Williams, E.N. Olson, Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 669–674.
- [14] B. Sanna, E.B. Brandt, R.A. Kaiser, P. Pfluger, S.A. Witt, T.R. Kimball, E. van Rooij, L.J. De Windt, M.E. Rothenberg, M.H. Tschop, S.C. Benoit, J.D. Molkentin, Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 7327–7332.
- [15] S.Y. Shin, S.M. Choo, D. Kim, S.J. Baek, O. Wolkenhauer, K.H. Cho, Switching feedback mechanisms realize the dual role of MCIP in the regulation of calcineurin activity, *FEBS Lett.* 580 (2006) 5965–5973.
- [16] S. Mehta, H. Li, P.G. Hogan, K.W. Cunningham, Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 2777–2793.
- [17] K.R. Martin, D. Layton, N. Seach, A. Corlett, M.J. Barallobre, M.L. Arbones, R.L. Boyd, B. Scott, M.A. Pritchard, Upregulation of RCAN1 causes down syndrome-like immune dysfunction, *J. Med. Genet.* 50 (2013) 444–454.
- [18] J.Y. Lee, H.J. Lee, E.J. Lee, S.H. Jang, H. Kim, J.H. Yoon, K.C. Chung, Down syndrome candidate region-1 protein interacts with Tollip and positively modulates interleukin-1 receptor-mediated signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 1673–1680.
- [19] E.J. Lee, S.R. Seo, J.W. Um, J. Park, Y. Oh, K.C. Chung, NF- κ B-inducing kinase phosphorylates and blocks the degradation of down syndrome candidate region 1, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 3392–3400.
- [20] Y.J. Cho, M. Abe, S.Y. Kim, Y. Sato, Raf-1 is a binding partner of DSCR1, *Arch. Biochem. Biophys.* 439 (2005) 121–128.
- [21] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [22] L. Van Parijs, Y. Refaeli, J.D. Lord, B.H. Nelson, A.K. Abbas, D. Baltimore, Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death, *Immunity* 11 (1999) 281–288.
- [23] A.H. Shah, W.B. Tabayooyong, S.Y. Kimm, S.J. Kim, L. Van Parijs, C. Lee, Reconstitution of lethally irradiated adult mice with dominant negative TGF- β type II receptor-transduced bone marrow leads to myeloid expansion and inflammatory disease, *J. Immunol.* 169 (2002) 3485–3491.
- [24] M.C. Mulero, A. Aubareda, M. Orzaez, J. Messeguer, E. Serrano-Candelas, S. Martínez-Hoyer, A. Messeguer, E. Perez-Paya, M. Perez-Riba, Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 9394–9401.
- [25] S. Porta, E. Marti, S. de la Luna, M.L. Arbones, Differential expression of members of the RCAN family of calcineurin regulators suggests selective functions for these proteins in the brain, *Eur. J. Neurosci.* 26 (2007) 1213–1226.
- [26] A. Guerriero, P.B. Langmuir, L.M. Spain, E.W. Scott, PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells, *Blood* 95 (2000) 879–885.

- [27] P.S. Ohashi, H. Pircher, K. Burki, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities, *Nature* 346 (1990) 861–863.
- [28] W. Swat, M. Dessing, H. von Boehmer, P. Kieselow, CD69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 739–746.
- [29] C.J. Williams, T. Naito, P.G. Arco, J.R. Seavitt, S.M. Cashman, B. De Souza, X. Qi, P. Keables, U.H. Von Andrian, K. Georgopoulos, The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development, *Immunity* 20 (2004) 719–733.
- [30] M. Iizuka, M. Abe, K. Shiiba, I. Sasaki, Y. Sato, Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis, *J. Vasc. Res.* 41 (2004) 334–344.
- [31] S. Canaider, F. Facchin, C. Griffoni, R. Casadei, L. Vitale, L. Lenzi, F. Frabetti, P. D'Addabbo, P. Carinci, M. Zannotti, P. Strippoli, Proteins encoded by human down syndrome critical region gene 1-like 2 (DSCR1L2) mRNA and by a novel DSCR1L2 mRNA isoform interact with cardiac troponin I (TNNI3), *Gene* 372 (2006) 128–136.

A grayscale microscopic image of biological tissue, showing various cellular structures and fibers. The image is used as a background for the page.

8. REFERÈNCIES

8. REFERÈNCIES

- Abbott et al (1998). Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 9(10):2905-16.
- Aramburu, J., et al., (1998). Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1: 627-637.
- Aramburu, J., et al., (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285: 2129-2133.
- Aramburu, J., et al., (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 36: 237-295.
- Asfaha S. et al (2013). Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis. *Gastroenterology*, 244:155-166.
- Aubareda et al., (2006). Functional characterization of the calcipressin1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells. *Cell Signal* 18 (9):1430-8.
- Azab et al (2012). Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short-and long-term mortality in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*, 19 (1):217-24.
- Baek, K.H. et al. (2009) Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature*, 459: 1126–1130.
- Baksh DS et al, (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase4 expression. *Molecular Cell*, 10:1071-1081
- Baumgart S et al., (2012). Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 142(2):388-98
- Baumgartel et al., (2012). Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory. *Learn Mem*, 19 (9):375-84.
- Batiuk et al (1995). Cyclosporine-treated renal transplant patients have only partial inhibition of calcineurin phosphatase activity. *Transplant Proc*, 27(1):840-1
- Bellacosa et al (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 2554(5029):274-7.
- Bhati et al., (1998). Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *Am J Pathol*, 172 (5):1381-90.
- Bingle, L., et al (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*, 196 (3): 254-65
- Bingle L., et al., (2006). Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br. J. Cancer*, 94: 101-107.
- Bobrovnikova-Marjon et al, (2004). Expression of angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *Cancer Res* 64 (14):4858-69.
- Boiml, P.J., et al (2012) Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells. *Breastcancer Res* 14 (1):R23
- Borel et al., (1996). In vivo pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. *Adv. Pharmacol*, 35:115-246
- Borel et al, (1976). Biological effects of cyclosporine A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6(4):468-75.
- Boyle, P., (2012). Triple-negative breast cancer: epidemiological consideration and recommendations, *Ann Oncol* 23 suppl6:vi7-12
- Bresnick AR, Weber Dj et al. (2015). S100 proteins in cancer. *t Rev cancer*, 2: 96-109.
- Brew R, et al (2000). Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine*, 12:78 –85.

- Britschgi et al., (2012). JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. *Cancer Cell*, 22(6):796-811.
- Buchholz M et al, (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* 25:3714-24.
- Burkhart, D.L., et al., (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 9: 671-82.
- Burn et al, (2011). Calcium/NFAT signaling promotes early nephrogenesis. *Dev Biol* 352 (2): 288-98.
- Burnet et al., (1968). Evolution of the immune process in vertebrates. *Nature* 218 (5140): 426-30.
- Burri et al., (2004). Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics*, 231: 474-488.
- Caetano et al (2002). NFAT TC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB Journal*, 16:1940-1942.
- Calogero et al (2007) Inflammation and breast cancer. Inflammatory component of mammary carcinogenesis in ErbB2 transgenic mice. *Breast Cancer Res*, 9: 211
- Canaider et al., (2006). Proteins encoded by human Down Syndrome critical region gene 1-like 2 (DSCR1L2) mRNA and by a novel DSCR1L2 mRNA isoform interact with cardiac troponin I (TNNI3). *Gene* 372: 128-36.
- Cao et al, (2002). Pleiotropic defects in TCR signaling in a vav-1-null Jurkat T-cell line. *EMBO* 21(18):4809-19.
- Cao et al., (2013). Tumor cell-mediated neovascularization and lymphangiogenesis contrive tumor progression and cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 1836(2):273-86.
- Carmeliet and Jain (2014). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2014, 473 (7347): 298–307.
- Cavallo F., et al (2011). 2011: the immune hallmarks of cancer, *Cancer Immunol Immunotherapy*, 60: 319-326.
- Carvalho et al, (2007). The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle* 6(14):1789-95.
- Carty et al (1995). Patterns of clinical metastasis in breast cancer: an analysis of 100 patients. *Eur J Surg Oncol* 21(6):607-8
- Cao et al, 2002.
- Chambers et al, (2000). Clinical targets for anti-metastasis therapy. *Adv Cancer Res* 79:91-121.
- Chambers et al, (2011). Chronic calcineurin inhibition use is nephrotoxic. *Clin. Pharmacol. Ther.* 90 (2):207-9.
- Chan, G., et al. (1999). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*, 59: 991-4.
- Chen, C., et al., (2010). NFAT regulates CSF-1 gene transcription triggered by L-selectin crosslinking. *BioCell* 34: 57-63.
- Chen, Yao., et al., (2007). Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J. Cancer*, 12: 1949-1957.
- Cheng, N., et al., (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*, 10:1521-33.
- Chin et al., (2009). Function of akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cellular signalling*, 21: 470-6
- Chuvpilo et al, (2002). Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity*, 16(6):881-95.
- Coffelt SB, et al (2015). IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, 18;522(7556):345-8.

- Cole, B.K., et al., (2008). Localization to the cortical cytoskeleton is necessary for Nf2/merlin-dependent epidermal growth factor receptor silencing. *Mol Cell Biol*, 28 (4):1274-84.
- Colombo et al (1992). Granulocyte colony-stimulating factor gene transduction in murine adenocarcinoma drive neutrophil-mediated tumor inhibition in vivo. Neutrophils discriminate between G-CSF producing and G-CSF nonproducing tumor cells. *J Immunol* 149(1):113-9.
- Courtwright A, et al., (2009). SFRP2 stimulates angiogenesis via a Calcineurin/NFAT signaling pathway. *Cancer Res*, 69:4621-7
- Coussens and Werb (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-7
- Crabtree, G. R., and Clipstone, N. A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63: 1045-1083.
- Dahl et al, (2001). Calcineurin inhibitor attenuates the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension. *J. Cardiol* 37 (2): 114-8.
- Dahl et al, (2006). Calcineurin/NFAT signaling is required for perinatal lung maturation and function. *J. Clin. Invest.* 116 (10): 2597-609.
- Davies, MA., et al., (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29 (41): 5545-55.
- Davies, M.P., et al (1996). Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene* 13:1631-1637.
- Davies, BR. et al. (1996). Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene *Ej-ras1*. *Oncogene* 8:999-1008.
- Davies et al., (2007). Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: Regulators of calcineurin. *FASEB* 21 (12):3023-8.
- Demir T, (2015). Cancer Screening of Renal Transplant Patients Undergoing Long-Term Immunosuppressive Therapy. *Transplant Proc.* 47(5):1413-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.04.073.
- Deshpande, A., et al., (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17):2909-15.
- Donella-Deana, A., et al.,(1994). Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B). *Eur J Biochem* 219: 109-117.
- Dong D et al (2003) Overexpression of calcineurin in mouse causes sudden cardiac death associated with decreased density of K⁺ channels. *Cardiovasc Res.* 57(2):320-32.
- Duque et al (2005). Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 280 (109):868-93.
- Ek, M., et al.,. (2001) Inflammatory response pathways across the blood-brain barrier. *Nature*, 410:430-1.
- Engers and Gabbert (2000). Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126(12): 682-92.
- Facchin et al (2011). Complexity of Bidirectional Transcription and Alternative Splicing at Human RCAN3 locus. *PLoS One*, 6(9) e24508.
- Fernandez, P.M., et al., (2000). Effect of the cyclooxygenase-2 selective inhibitor NS398 on the secretion of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) from human prostate tumor cells. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 41:131-2.
- Ferrara N., and Davis-Smyth T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, 18: 4-25.
- Ferrara N. et al., (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2: 795-803.

- Feske et al, (2007). Calcium signaling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev. immunol* 7(9): 690-702.
- Fong S, et al (2004). *Id* genes and proteins as promising targets incancer therapy. *Trends Mol Med*; 10:387-92
- Fong et al. (2011). *Id-1* as a molecular target intherapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 13543-13548
- Folkman N., et al., 1995 Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27-31
- Freund, A., et al., (2003). IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene*, 22:256–65.
- Friday et al,(2003). Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation* 71(3):217-27.
- Fuentes et al, (1995). A new human gene from the Down Syndrome Critical Region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet* 4(10):1935-44.
- Fuentes et al, (1997). Genetic organization, alternative splicing and expression patterns of the DSCR (Down Syndrome Candidate Region 1) gene 44(3):358-61.
- Fuentes et al, (2000).DSCR1 overexpressed in Down Syndrome is an inhibitor fo calcineurin-mediated signaling pathway. *Hum Mol Genet* 9(11):1681-90.
- Garrett et al., (2006).S100A4, a mediator of metastasis. *j Biol Chem* 281: 677-680.
- Genescà et al, (2003). Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decerases calcipressin half-life. *biochem* 374 (Pt2):567-75.
- Ghably J, et al (2015). Paul Ehrlich's Mastzellen: a historical perspective of relevant developments in mast cell biology. *Methods Mol Biol* 1220: 3-10.
- Giri et al, (1991). Chromosomal mapping of the human genes to the calmodulin-dependent protein phosphatase (Calcineurin) catalytic subunit. *Biochem Biophys Res Commun*, 181 (1):252-8.
- Gould et al., 2015. Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nature* 21(5):431-439
- Graef IA, et al, (2001). Signals transduced by Ca²⁺/Calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*, 105: 863-75
- Gregory et al (2010). Wnt/ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph⁺ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell* 18(1): 74-87.
- Guasch et al., (2015). Calcineurin undergoes a conformational switch evoked via peptidyl-Prolyl isomeration. *PLoS One*, 10(8):e0134569.
- Gupta GP. et al (2007). *Id* genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 104:19506-11
- Gwack, Y., et al.,. (2007). Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42: 145-156.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144:646-674
- Hernandez GL, et al., (2001) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: Roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 193:607–620.
- Hernandez-Aya LF. et al., (2011). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *Oncologist*, 16: 404-414
- Heit et al., (2006).Calcineurin/NFAT signaling regulates pancreatic cell growth and function. *Nature*, 443: 345-349.
- Herrera, et al. Expression of metastasis-related genes in human epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002;20:5– 13.

- Hetts (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279(4):300-7.
- Hicklin, D. J., and Ellis, L. M. (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1011-1027.
- Higgins JM and Baselga J (2011). Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest.*,121(10):3797–3803
- Ho et al, (1996). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506.
- Holmgren et al, (1995). Dormancy of micrometastases- balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1 (2): 149-53.
- Hogan et al.,(2003).Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232
- Hollestelle et al., 2013. Loss of e-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Treat* 138: 47-57
- Hoth and Penner (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
- Horsley et al, (2008). NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 132, 299-310.
- Hu et al, (1993). Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation* 17(2):135-43.
- Huang S. et al., (2002). Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma.A; *J Pathol*, 161: 125-34.
- Hudis C.A. et al (2011). Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncoogist*, 16 (suppl.1), vi56-vi65.
- Hwajin Son and Aree Moon (2010). Epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Toxicol. Res.* 26: 245-252.
- Iñiguez et al, (2000). An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275: 23627-23635.
- Iñiguez et al., (2003).Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 9(12):73-8.
- Irie H.Y, et al. (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology*, 171:1023–34
- Jacobson et al, (1997). Stability of tacrolimus in a extemporaneously compounded oral liquid. *Am J Health Syst. Pharm* 54(2):178-80.
- Jauliac, S., et al., (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin mediated carcinoma invasion. *Nat. Cell Biol.* 4, 540–544
- Jiang K, et al. (2012). Cyclosporine A inhibits breast cancer cell growth by downregulating the expression of pyruvate kinase subtype M2. *Int J Mol Med.* 2012 Aug;30(2):302-8.
- Jin and Harrison (2002). Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *PNAS* 99 (21): 13522-13526
- Jinnin et al., 2008. Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nature Med* 14:1236-1246
- Joyce, (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 9 (4):239-352
- Jones and Thompson (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23(5):537-48.
- Kanda and Watanabe (2001).17βestradiol, progesterone and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-g production. *J Invest Dermatol.* 117 (2):274-83
- Kaunisto et al. (2015). NFAT1 promotes intratumoral neutrophil infiltration by regulating IL8 expression in breast cancer. *Molecular Oncology*, 9(6): 1140-1154

- Kawahara T et al., (2015). Cyclosporine A and tacrolimus inhibit bladder cancer growth through down-regulation of NFATc1. *Oncotarget* 30:6(3):1582-93.
- Kawahara T et al., (2015). The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. *Prostate*, 75 (6):573-84
- Keane et al (2004). Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol*, 175 (5):2853-60.
- Klee, C. B., et al., (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273(22):13367-70
- Klee et al, (1979). Calcineurin: a calcium-and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(12)6270-3
- Ke, H. and Huai, Q. (2003). Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 1095-1102.
- Kerbel, R., and Folkman, J., (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2: 727-739.
- Kim et al. (2009). Integrin (alpha6beta4) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. *Mol Cancer Res*, 7 (10): 1605-12
- Kino, T., et al., (1987). Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant Proc* 19: 36-39.
- Kingsbury et al, (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev*, 14(13):1595-604.
- Klauck TM., et al (1996). Coordination of the three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271: 1589-1592
- Klee, C. B., et al., (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273: 13367-13370.
- Koch, AE., et al., (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258: 1798-801.
- Kroemer G and Pouyssegur J (2008). Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13(6):472-82.
- Kuper, H., et al (2000) *Tricholpo Infections as a major presentable cause of human cancer. J Intern Med* 2000; 248: 171-183
- Kyung Sun lee et al (2012) Inhibition of p38 MAPK reduces expression of vascular endothelial growth factor in allergic airway disease. *J Clin Immunol* 32(3):574-86.
- Ladner et al, (1996). Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(8):924-931.
- Lai et al, (1998). Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem* 273 (29):18325-31.
- Lai, Y., et al., (2012). Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the Rac 1/RhoA-p38MAPK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 5: 630-8.
- LE K., et al., (2012). PPAR α activation inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy by prevention of NFATc4 binding to GATA-4. *Arch Biochem Biophys* 518: 71-78.
- Lee and Park (2006). Regulation of NFAT activation: a potential target for immunosuppression. *Mol cells* 22(1):1-7.
- Lehen'kyi V et al, (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca²⁺/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*, 26: 7380-5
- Lehmann BD, et al.(2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.*, 121(7):2750-2767.
- Lewis, et al., (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 66:605-612. [PubMed: 16423985]
- Lewis et al., (2007). The molecular choreography of store-operated calcium channel. *nature* 446, 284-287.

- Li H et al., (2007). Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *J Mol Biol*, 369(5):1296-306.
- Li H. et al., (2011). Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in Cell Biol*, 21: 1-103.
- Lin et al, (1999). Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J Biol Chem* 274(51):36125-31.
- Lin, C., et al (2000) A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells, *Cancer Res*, 60:1332
- Lin EY, et al., (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*. 193:727-740.
- Liotta et al, (1974). Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34(5):997-1004.
- Lipskaia L et al (2004). Alteration in temporal kinetics of Calcium signaling and control of growth and proliferation. *Biology of the Cell*, 96:55-68
- Liu J.F., et al., (2013). Depleting NFAT1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human lung cancer cells, *Cancer Cell Int*. 13:1-7.
- Liu et al, (1991). Calcineurin as a common target of cyclophilin-cyclosporinA and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66(4):807-15
- Liu, CH., et al. (2001). Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*, 276: 18563-9.
- Lyden, D., et al (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, 401: 670-677
- Lyden et al., (1999). Decreased ID2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*, 14: 1025-1031.
- Ma, X. et al. (2010). Prostaglandin E receptor EP1 suppresses breast cancer metastasis and is linked to survival differences and cancer disparities. *Mol. Cancer Res*. 8:1310-1318.
- Maayan Gal et al, (2014) The LxVP and PxlIT NFAT motifs bind jointly to overlapping epitopes on Calcineurin's catalytic domain distant to the regulatory domain, *Structure*, 22:1016-1027
- MacManus, C.F., et al. (2007). Interleukin-8 signaling promotes translational regulation of cyclin D in androgen-independent prostate cancer cells. *Mol Can Res*, 5: 737-48.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-484.
- Maes and Vanrenterghem (2004). Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-à-vis tacrolimus. *Transplant Proc*, 36:405-495.
- Maldonado-Pérez et al,(2009). Prokineticin 1 modulates Il-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Bichim Biophys Acta*, 1793(7):1315-24.
- Mallon et al (2000). The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2): 139-63
- Mammucari et al, (2005). Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell* 8(5):665-78.
- Mancini et al., (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 9 (11): 810-20.
- Marches et al, (1998). Cancer dormancy: role of cyclin-dependent kinase inhibitors in induction of cell cycle arrest mediated via membrane IgM. *Cancer Res* 58(4):691-7.
- Martin, D., et al., (2009). CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem*, 284 (10): 6038-42.

- Martínez-Martínez S et al. (2009). The RCAN carboxyl end mediates calcineurin docking-dependent inhibition via a site that dictates binding to substrates and regulators. *PNAs*, 106 (15):6117-6122
- Martinez-Hoyer S, et al. (2013) Protein kinase CK2-dependent phosphorylation of the human Regulators of Calcineurin reveals a novel mechanism regulating the calcineurin-NFATc signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2311–2321
- Masashi Iizukaa, et al., (2004) Down Syndrome Candidate Region 1, a Downstream Target of VEGF, Participates in Endothelial Cell Migration and Angiogenesis. *J Vasc Res* 41:334–344
- Masferrer, et al. (2000). Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*, 60: 1306-11.
- Matsoukas MT, et al., (2015). Identification of small-molecule inhibitors of calcineurin-NFATc signaling that mimic the PxlIT motif of calcineurin binding partners. *Sci. Signal*, 8 (382); ra63
- McLean, K., et al.,(2008) Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* 102:2138-2145
- Medyouf, J et al., (2007). Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 13(6):736-41.
- Medyouf, J. et al., (2008). The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors, *Cell Cycle* 7:297–303
- Metha, S et al., (2009). Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 29, 2777-2793
- Miller et al. (1998). Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Res* 1998;18:77 –81
- Minami, T., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem* 279: 50537–50554.
- Miselis NR, et al., (2008). Targeting tumor-associated macrophages in an orthotopic murine model of diffuse malignant mesothelioma. *Mol Cancer Ther.* 7:788–799.
- Miskin et al, (1998). A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281 (5376):562-5.
- Molkentin et al, (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res* 63(3):467-75.
- Mosesson Y., et al., (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer*, 11: 835-50.
- Mubecel Akdis et al., (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 127(3):701-21
- Mulero, MC et al., (2007). RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (3): 330-41
- Mulero, MC. et al., (2009) Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *J. BiolChem.*, 284:9394-9401.
- Müller et al, (2007). Linking calcineurin activity to leukemogenesis. *Nat Med* 13(6):669-71.
- Müller et al, (2009). Requirement for balanced Ca/NFAT signaling in hematopoietic and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (17):7034-9.
- Müller MR and Rao A (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 10(9):645-56.
- Muramatsu, T., and Kincaid, R. L. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochem Biophys Res Commun* 188: 265-271.

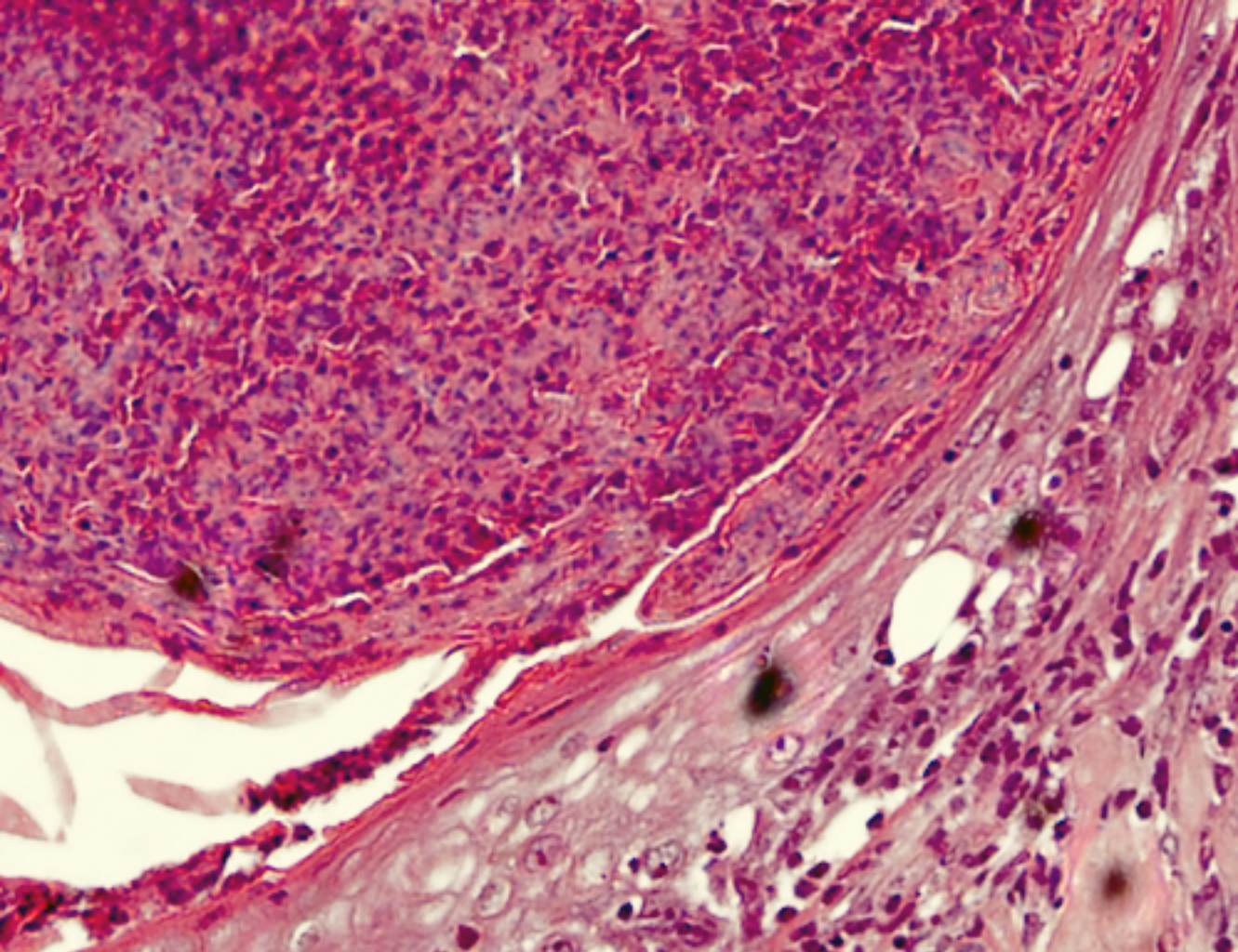
- Neal, JW. and Clipstone, NA (2003). A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 278:17246–17254.
- Neigishi-Koga and Takayanagi, (2009). Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev* 231, 241-256
- Nomura H, Nishimori H, Yasoshima T, et al. A new liver metastatic and peritoneal dissemination model established from the same human pancreatic cancer cell line: analysis using cDNA microarray. *Clin Exp Metastasis* 2002;19: 391–9.
- Norton et al., (2000). Id helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci*, 113: 3897-3905
- Nozawa, H., et al (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 103:12493-12498
- Ojalvo LS, et al., (2009). High density gene expression analysis of tumor- associated macrophages from mouse mammary tumors. *Am J Pathol.* 174:1048–1064. [PubMed: 19218341]
- Okamoto, S., et al., (1994). The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506- sensitive pathway accompanied by calcium mobilization. *J. Biol. Chem*, 269: 8582–8589.
- Ono M, et al., (1999). Biological implication of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 43 (Supl.) S69-S71
- Oshima, M., et al. (1996). Suppression of intestinal polyposis in APC delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell*, 87: 803–9.
- Paget et al, (1998). The distribution of secondary growth in cancer of the breast 1889.
- Pandey R et al, (2015). Cyclosporin A disrupts Notch signaling and cascular lumen maintenance. *PloS One* 16; 10(3): e0119279
- Park BW, Park S, Park HS, et al: Cyclooxygenase-2 expression in proliferative Ki-67-positive breast cancers is associated with poor outcomes. *Breast Cancer Res Treat* 133: 741-751, 2012
- Pekarek, IA., et al (1995) Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Ext Med* 181:435-440
- Penson, RT., et al. (2000). Cytokines IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNF α in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *Int J Gynecol Cancer*, 10: 33–41.
- Perou CM. et al, (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406 (6797):747-52
- Platt-Higgins et al.,(2000). Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) with other prognostic markers in human breast cancer, *Int J Cancer*, 89: 198-208.
- Polyak K et al., (2011). Heterogeneity in Breast cancer. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3786–3788.
- Pollard JW (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4 (1):71-8
- Pollard JW (2008) Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol.* 84:623–630. [PubMed: 18467655]
- Porta et al (2007). Differential expression of members of the RCAN family of calcineurin regulators suggest selective functions for these proteins in the brain. *Eur J Neurosci*, 26(5):1213-26.
- Pruitt KD et al., (2012). NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res* 40: D130-D135
- Quang CT., et al., (2015). The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells. *Cell Death and Disease*, 6: e1658
- Radiski and Radisky (2010). Matrix Metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15(2):201-12.
- Ranger et al., (1998). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity*, 9(5): 627-35
- Rao, A. et al., (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 15: 274-281.

- Rao A et al, (1997). *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu Rev Immunol.* 11(2):281-7.
- Rodi et al, (2001). *Identification of small molecule binding sites within proteins using phage display technology. Comb chem High throughput Screen* 4 (7):553-72.
- Rodríguez A, et al., (2009) *A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. Mol Cell.* 13:33(5):616-26. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.030.
- Robbs, BK., et al., (2008). *Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors, Mol. Cell. Biol.* 28:7168–7181
- Rodrigues, S., Bruyneel, E., Rodriguez, CM., et al. (2004). *Cyclooxygenase 2 and carcinogenesis. Bull Cancer; 91: S61–76.*
- Rudland et al., (2000). *Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. Cancer Res,* 60: 1595-1603.
- Ryder et al (2003). *Skeletal muscle reprogramming by activation of calcineurin improves insulin action on metabolic pathways. J Biol Chem* 278(45):444298-304.
- Ryeom S, (2003). *The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. Nat Immunol,* 4: 874-81
- Ryeom et al, (2008). *The threshold pattern of calcineuin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. Nat Immunol* 4(9):874-81.
- Sales KJ et al,(2009). *Prostaglandin F (2alpha)-F-prostanoid receptor regulates CXCL8 expression in endometrial adenocarcinoma cells via the calcium-calcineurin-NFAT pathway. Biochem Biophys Acta* 1793: 1917-28
- Sakuma et al, (2003). *Calcineurin is a potent regulation for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. Acta Neuropathol.* 150(3):271-80.
- Sang, Y., et al (2015). *Hypermethylation of TET1 Promoter Is a New Diagnostic Marker for Breast Cancer Metastasis. Asian Pac J Cancer Prev,* 16(3): 1197-200.
- Santani MP et al (2001). *Cross talk among calcineurin Sp1/Sp3 and NFAT in control of p21WAF1/Cip1 expression in keratinocyte differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* 98:9575-9580
- Sayanthi et al., (2005). *Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the gas ligand /Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (3):868-73
- Saydjari et al., 1986. *Effects of cyclosporin A and alpha-difluoromethylornithine on the growth of hamster pancreatic cancer in vitro. J Natl Cancer Inst* 77 (5):1087-92
- Saydjari et al., 1988. *Differential sensitivity of pancreatic and colon cancer to cyclosporine and alpha-difluoromethylornithine in vivo. Invest New Drugs* 6(4):265-72
- Sengupta S, et al (2013). *Cooperative involvement of NFAT and SnoN mediates transforming growth factor- α induced EMT in metastatic breast cancer (MDA_MB-231) cells. Clin Exp Metastasis.* 2013 Dec;30(8):1019-31.
- Serrano-Candelas E. et al., (2014). *The vertebrate RCAN gene family: novel insights into evolution, structure and regulation. PLoS One.* 2014; 9(1): e85539.
- Shankaran, V., et al (2001). *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. Nature* 410:1107-1111
- Shao, N., et al., (2013). *The depletion of interleukin-8 causes cell cycle arrest and increases the efficacy of docetaxel in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun.,* 431(3): 535-41.
- Sheng Yang and Hui Han(2014) *Effect of cyclooxygenase-2 silencing on the malignant biological behavior of MCF-7 breast cancer cells. ONCOLOGY LETTERS* 8: 1628-1634
- Sherr et al.,(2002). *The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell,* 2:103-12.

- Sherri Z et al., (2015). Predictive Biomarker prolifin of >6000 breast cancer patients shows heterogeneity in TNBC, with treatment implications. *Clinical Breast Cancer*. doi: 10.1016/j.clbc.2015.04.008
- Shiota, G., et al. (1999). Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 46: 407–12.
- Shono, T., et al. (2001). Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res*, 61: 4375–81.
- Shou et al, (2015). Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. *Cancer letters* 174-184
- Siamakpour-Reihani et al, (2011). The Role of Calcineurin/NFAT in SFRP2 Induces Angiogenesis-A rationale for Breast Cancer Treatment with the Calcineurin Inhibitor Tacrolimus. *PLoS ONE*, 6 (6):1-9
- Sieber and Baumgrass (2009). Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub-alterates to CsA and FK506? *Cell Commun signal* 7:25.
- Singh G., et al. (2010). Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation, *J. Biol. Chem.* 285: 27241–27250.
- Singh G et al, (2010). Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 285(35):27241-50.
- Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001;158:735– 43.
- Smith, WL., Langenbach, R. (2001). Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*, 107: 1491–5.
- Srivastava et al., (2015). Interleukin-8 is a key mediator of FKBP51-induced melanoma growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer* 112 (11):1772-81.
- Stathatos N, et al (2005) KISS-1/G protein-coupled receptor 54 metastasis suppressor pathway increases myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1 expression and chronically inhibits calcineurin activity. *J Clin Endocrinol Metab* 90(9):5432–5440
- Stemmer, P. M., and Klee, C. B. (1994). Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33: 6859-6866.
- Strieter, RM., et al., (1992). Interleukin-8: a corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol*, 141:1279–84.
- Strippoli et al, (2000). The murine DSCR1-like (Down Syndrome Candidate Region 1) gene family: conserved syntony with the human orthologous genes. *Gene* 257(2):223-32.
- Subbaramaiah, K. et al. (2008). EP2 and EP4 receptors regulate aromatase expression in human adipocytes and breast cancer cells. Evidence of a BRCA1 and p300 exchange. *J. Biol. Chem* 279:46700-46705.
- Sun X., et al (2009). Abl interactor 1 regulates Src-Id1-matrix metalloproteinase 9 axis and is required for invadopodia formation, extracellular matrix degradation and tumor growth of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 30 (12):2019-20116
- Tabaries et al., (2015). Granulocytic immune infiltrates are essential for the efficient formation of breast cancer liver metastases. *Breast Cancer Res*, 17:45.
- Tae Hyong Kim et al. (2009). Integrin (α6β4) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. *Molecular Cancer Research*, 7: 1605-1612
- Takashige Masuoa et al (2009) Cyclosporina A inhibits colorectal cancer proliferation probably by regulating expression levels of c-Myc, p21WAF1/CIP1 and proliferating cell nuclear antigen *Cancer Letters* 285:66–72.

- Takeyama et al., (1997). Expression of antisense RNA to S100A5 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells, *Oncogene* 14: 331-337.
- Takeuchi et al, (2007). Structure of the Cn-NFAT complex: defining a T cell activation switch using solution NMR and crystal coordinates. *Structure* 15(5):587-97.
- Tazyman et al, (2011). Inhibition of neutrophil infiltration into A549 lung tumors in vitro and in vivo using a CXCR2-specific antagonist is associated with reduced tumor growth. *Int J Cancer*, 129(4):847-58.
- Tie, et al., (2013). NFAT1 is highly expressed in, and regulates the invasion of, glioblastoma multiforme cells, *PLoS ONE* 8 :66008.
- Toker et al, (2006). AKT signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* 66(8):3963-6.
- Tsuji, M., et al., (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83: 493-501.
- Tsuji, M., et al. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93: 705-16.
- Urso et al, (2011). NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T cell activation and angiogenesis. *Blood* 118(3):795-803.
- Vandercappellen J. et al., (2008), The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Letters* 267 (2): 226-244.
- Vega et al, (2002). Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of Cn activity. *J. Biol. Chem* 277(33):30401-7.
- Vega RB, et al., (2003) Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 669-674.
- Varney MJ., Olsen, et al., (2002). Monocyte/Macrophage recruitment, activation and differentiation modulate interleukin-8 production: a paracrine role of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis. *In vivo*, 16, 471-477
- Viola et al, 2005, NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38; 335-344
- Wang, et al., (1996). Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* 383: 434-437.
- Wang et al., (2007). Different roles of loop 7 in inhibition of calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(2):263-8
- Wang, Y. et al., (2015). Molecular treatment of different breast cancers. *Anticancer Agents Med Chem*, 15(6):701-20
- Waugh, D.J. et al (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 14: 6735-6741.
- Weis and Cheresh (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 17 (11):1359-70.
- Welch DR and Rinker-Schaeffer CW (1999). What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst* 91(16):1351-3.
- Welch and Wei (1998). Correlation between reduction of metastasis in the MDA-MB-435 model system and increased expression of the Kai-1 protein. *Mol Carcinog* 21(1):111-20.
- Winslow et al., (2006). Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 10, 771-782.
- Williams et al. (2000) Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J. Clin. Invest.* 105, 1589-1594
- Willett, et al (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has anti-vascular effects in human rectal cancer. *Nature medicine* 10: 145-147.
- Yajuan Su, et al (2013) Id enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NFkB/MM-2 signaling pathways. *J. Transl. Medicine* 11:132

- Yan Y et al, (2006). NFAT3 is specifically required for TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and transformation of C141 cells. *J Cell Sci* 119: 2985-94
- Yang, G., Yu, F., Fu, Hu., Lu, F., Huang, B., Bai, L., Zhao, Z., Yao, L., Lu, Zu. (2007). Identification of the distinct promoters for the two transcripts of apoptosis related protein 3 and their transcriptional regulation by NFAT and NFkappaB. *Mol Cell Biochem* 302: 187-94.
- Yee et al (2010). The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Nat Cancer* 9: 162.
- Yiu GK et al,(2006). NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J. Biol Chem.* ,281:12210-7
- Yiu GK et al, (2011). NFAT promotes carcinoma invasive migration through glypican-6. *Biochem J. Biol Chem.* 440: 157-66
- Youn and Gabilovich (2010). The biopsy of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol*, 40(11):2969-75.
- Yonan et al, (2005). High-efficiency staining of proteins of different blot membranes. *Anal Biochem* 338(1):159-61.
- Zanoni et al., (2009). CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460:264-268.
- Zhang XY. et al., (2002). Changes of interleukin expression correlate with *Helicobacter pylori* infection and lymph node metastases in gastric carcinoma. *Doagn. ;ol. Pathol.*, 11:135-9
- Zhang, Z. et al.(2012). Transcription factor NFAT1 activates the mdm2 oncogene independent of p53, *J. Biol. Chem.* 287: 30468–30476
- Zhou et al., (2002). Regulation of the murine *Nfatc1* gene by NFATc2. *J Biol Chem*, 271 (2):10704-11.
- Zhou and Ryeoms, (2014). Cyclosporin A promotes tumor angiogenesis in a calcineurin-independent manner by increasing mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cancer Res*, 12 (11):1663-76.
- Zaichuk et al. (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* 199: 1513–1522
- Zoetewij JP et al, (2001). Targeted inhibition of calcineurin signaling blocks calcium-dependent reactivation of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood*. 97(8):2374-80.
- links:** World Health Organization. «Fact sheet No. 297: Cancer», February 2006; Male Breast Cancer Treatment - National Cancer Institute». National Cancer Institute, 2006; «Breast Cancer in Men: Cancer Research UK». Cancer Research UK, 2007



U



B

Universitat de Barcelona

IDIBELL

