



Implicacions del gen del receptor del virus de la hepatitis A-I (hHAVcr-I) en el desenvolupament i progressió del carcinoma renal de cèl.lula clara

Thais Cuadros Arasa

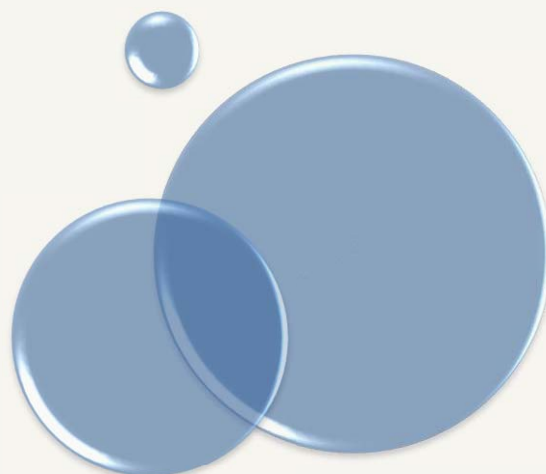
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

IMPLICACIONES DEL GEN DEL
RECEPTOR DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS A-1 (hHAVcr-1)
EN EL DESENVOLUPAMENT I
PROGRESSIÓ DEL
CARCINOMA RENAL DE
CÈL·LULA CLARA

THAÏS CUADROS ARASA



IMPLICACIONES DEL GEN DEL RECEPTOR DEL VIRUS
DE LA HEPATITIS A-1 (hHAVcr-1) EN EL
DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ DEL CARCINOMA
RENAL DE CÈL·LULA CLARA

Thais Cuadros Arasa

Tesi Doctoral

IMPLICACIONS DEL GEN DEL RECEPTOR DEL VIRUS
DE LA HEPATITIS A-1 (hHAVcr-1) EN EL
DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ DEL CARCINOMA
RENAL DE CÈL·LULA CLARA

Memòria presentada per

Thais Cuadros Arasa

Per tal d'optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat al Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM)

de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron sota la direcció de:

Dra. Anna Meseguer Navarro i

Dra. Maya Vilà Iglesias

Tesi adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, programa de
Biomedicina (Bienni 2005-2007), de la Universitat de Barcelona.

Tutor: Octavi Viñas Folch

Thais Cuadros Arasa Dra. Anna Meseguer Navarro Dra. Maya Vilà Iglesias Dr. Octavi Viñas Folch

Barcelona, Maig del 2012

Agraïments

M'he saltat tots els protocols:

En contra de totes les recomanacions de començar la tesi escrivint els Resultats i Material i Mètodes, he decidit començar pels agraïments, perquè penso que és la part que un major nombre de persones llegirà i a més, al cap i la fi, és la part més important, ja que a banda de tots els coneixements científics que hagi pogut adquirir (cosa que un afable tribunal acabarà de decidir...) el que queda de tot això és l'experiència vital que un s'endu després de passar uns quants anys envoltat de gent molt diversa (i quan dic diversa creieu-me...DIVERSA). Així que aquestes paraules us les dedico a tots els que heu passat per la meva vida en aquesta etapa de la mateixa i a tots els que ja en formàveu part.

Com si fossin els títols de crèdit d'una peli però al revés, he après que als agraïments es comença pels directors/es així que, Anna moltes gràcies per donar-me la oportunitat de treballar al teu laboratori i confiar en mi. Per ordre d'aparició continuaré amb la "*co-starring*" de la peli, Maya, GRÀCIES per ensenyar-me tot el que sé al laboratori, per ser la millor mestre que qualsevol podria tenir, per estar disposada a ajudar-me sempre que ho he necessitat, per les inoblidables estones de riures (i...algun plor que altre que "darían al traste con mi fama de tipa dura"), per ser tan bona confident i escoltar tan bé (cosa molt de capricorn ja t'ho diré...així que no és cap mèrit reina, venia amb el pack) ahhh i gràcies també per contribuir a incrementar el meu "refranero" particular (ja saps "quien se pica ajos come" sempre va ser el meu preferit).

Si això realment fos una peli i...elements en té per ser-ho, us ho asseguro, ara vindria el títol i sense cap mena de dubte "En ocasiones veo bandas" seria el que més s'escauria perquè, de tant en tant alguna n'he vist i inclús les he vist desaparèixer...

Deixeu-me agrair en aquest punt als productors executius, la "Fundació Marató de TV3" sense el seu patrocini res de tot això hagués estat possible, ja us ho asseguro: espero que no hagi estat a fons perdut!!!

Ara venen els tan esperats "protes", i per endavant aviso que si algú troba a faltar el seu nom no pensi que no ha estat important per mi, és tan sols que

cinc anys de tesi han deixat la seva petjada a les meves neurones, m'heu d'entendre. En fi, a tots els habitants d'aquests passadissos grocs...mil gràcies...amb alguns només he compartit algun somriure còmplice o algun furtiu bon dia però malgrat tot, heu estat uns grans extres. Començaré per ordre d'aparició: Del lab de patologia mitocondrial gràcies a tots per acollir-me mil cops com un més de vosaltres, començant pel Toni, sempre disposat a dir quelcom amable i a fer-te sentir com a casa, el Ramiro, veí de Sant Pol i l'home més endreçat que conec. A les nenes, la Mari Carmen, la Gise, la Yolanda i la M^a Jesús per donar el toc femení a l'únic reducte masculí de la primera planta del institut, al Javi sempre tan eloqüent i col·lega i a l'Emiliano, un tio com cal i, per acabar, a les velles glòries del laboratori, en Lluís i en Tòfol de qui hi havia molt que aprendre, sens dubte. Seguidament vindria el laboratori de malalties neurodegeneratives, que ha passat a ser el meu nou laboratori. Al Miquel, el Jordi, la Celine, l'Annabelle, la Marta, la Iria, l'Ariadna i la Bea, per donar-me aquesta oportunitat i fer-me sentir tan bé des d'un principi...mil gràcies!!!

Ara ja toca canviar de passadís i dirigir-me al meu segon laboratori, és a dir el també conegut com laboratori de la Lide, on tantíssimes coses han passat...en fi, a veure començarem pel Pep, el "jefe no-jefe", company d'innombrables "juergues" amb qui sempre hi ha hagut un moment per la distensió i el riure, i amb qui tantes hores de converses i birres he compartit, gràcies per rebre tan bé al meu "*brother*" durant la seva primera etapa a l'institut i saps que sempre tindràs uns col·legues amb qui comptar!!. A les seves nenes, que primer van ser les que va adoptar d'en Darth Vader, "les cuquis", l'Ariadna i la Irene, que sens dubte van revolucionar el pati amb les seves "melenas al viento" i el seu riure contagiós, i després van seguir les oficials, l'Anna Masià (Felicitats marassa!!!) i el darrer fitxatge, l'Anna Almazán (molta sort amb tot). Només et retrec una cosa Pep, que finalment no poguessis fitxar el crack de l'Adrià, tanta falta que ens feia una mica d'hormona masculina al passadís!!!

Ara toca centrar-nos en els patxutxos...ufff aquí hi ha molt a dir, gràcies a les belles glòries de la planta 14, el Valentí per les bones estones i el Mariano, "por las risas que nos hemos echao y las horas de conversación INTERMINABLE, hijo...que palique!!! por traernos al institut ese toque de

Agraïments

bifurka que deja huella y por tantos buenos ratos que deberían repetirse más a menudo”. A la Marta Sesé, per tenir sempre una paraula amable y un bon consell per donar, al “trope” per amenitzar-nos els dinars amb la seva companyia i tenir tan bon ull a l’hora de fitxar la gent, la Neus, la tia més treballadora i tenaç que ha passat per aquests passadissos, “muchacha suerte con esta nueva etapa guapa, te lo mereces!!!” i a totes les tècnics que han anat passant l’Eneris, l’Anna Esquerra i la Marta Rebull, gràcies per portar un toc d’aire fresc i...sobretot per les galetes!!! I per últimmmmm la Lide...això és capítol a part...cada cop que he renegat d’haver-me ficat en això, m’he parat a pensar en ella...només per això ha valgut la pena, companya entranyable de nombroses “fechorías”...una de les persones que m’ha fet riure més en aquesta vida i amb la que he compartit de tot...”gracias por ser tan generosa, por ser tan colega y gracias al personaje que mueve los hilillos con tanto arte por ponerte a mi vera!!!!”

David, encara que només ens hem conegut a l’etapa final de la tesi, m’ha encantat trobar-te!!!!. Pep Villena, company del laboratori del davant!!! Gràcies per ser sempre tan amable i pels grans fitxatges que vas fer, la Natàlia i el Jaime...dues grans adquisicions i dignes companys de cultius i juergues. A la Rosi, per ser tan bona gent i estar sempre disposada a col·laborar. A la gent de neuroimmuno...per on començar...fijo que em deixo algú...Carmen, Mireia, Zoraida, Marta, Ester, M^a José, Carme, Núria, Nico i Sunny gràcies per estar allà, per les hores de cultius compartides i ser tan col·legues!!!!

Per últim, aquí van les paraules pel meu laboratori, gràcies nois per demostrar-me que es poden fer col·legues a la feina i que un lab amb bon rotllo sempre funciona millor...començaré pel Joan, gràcies per la comprensió i el recolzament i les estones reconfortants “al banc de les lamentaciones”, “gracias Maria por la amabilidad con la que me trataste desde el primer dia”, gràcies Marta Riera i Olga per ser un exemple a seguir al laboratori, per ser tan bona gent, i pels sopars balsàmics que encara hem de compartir!!! gràcies Bea per ser tan atenta, per estar sempre on toca i com toca, per tantes estones de converses i per ser una gran cofundadora dels famosos “akelarres” que tantes sessions de psicòleg ens han estalviat. Ara ve l’altra membre de “akelarre foundation”... gràcies Conx per ser tan honesta, tan madura, malgrat quedar-te

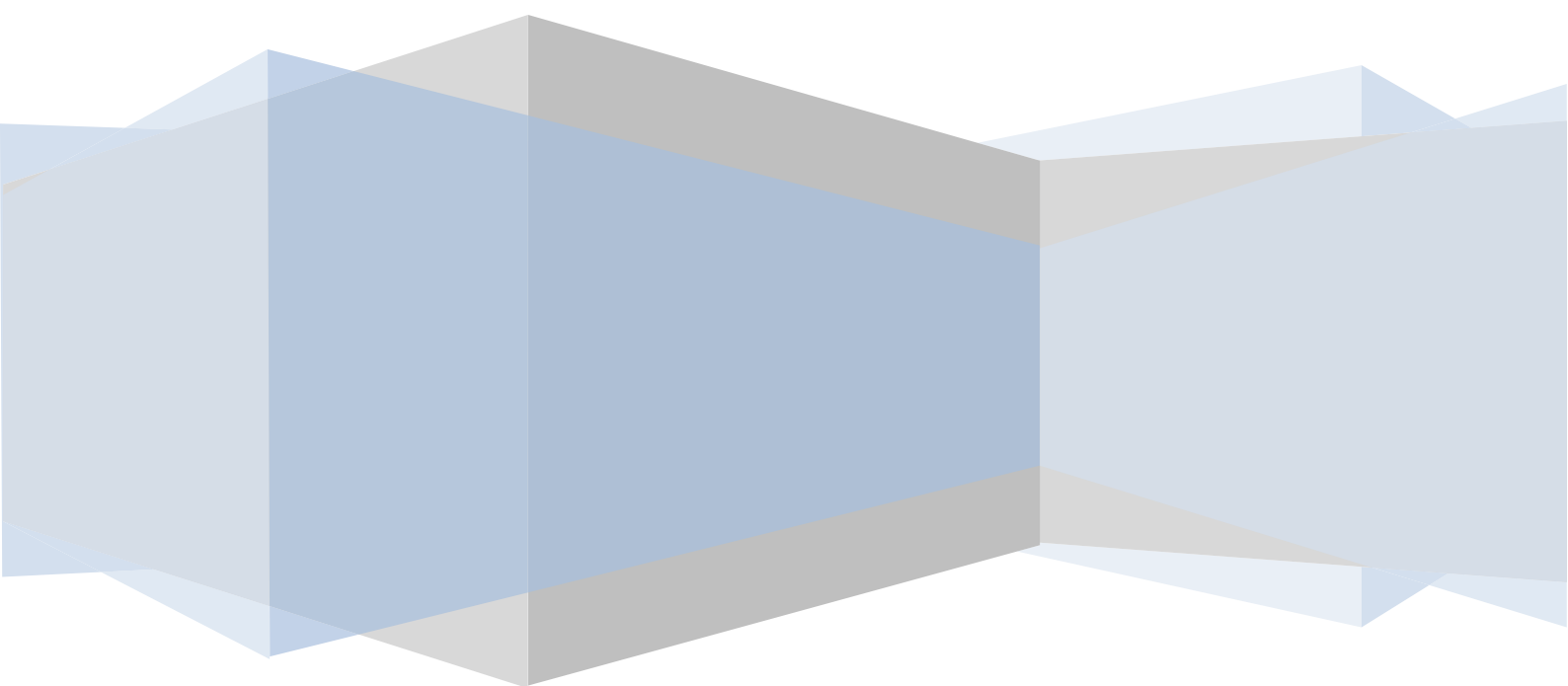
eternament als 23...i perquè mai un carrer va tenir un nom més adient (sobretot trobant-se a la sortida del cubano...) queda pendent un brindis al Carrer de les Cabres posem...d'aquí a...final d'any????!!!! A les noves incorporacions del lab la Natàlia i l'Ayleen ("a ver si hay suerte y te conceden esa beca") molta sort amb el que us espera...no és tan dur com diuen :), i gràcies als que vingueren de l'UAB o sigui del "más allá", gràcies Jordi, sense tu i la presència de "el *molluscum contagiosum*" no sé com hagués valorat els TMA's del pebrots, molta sort amb tot, ja queda menys!!! Al Nabil per ser la meva primera víctima...sé que continuas con la ciencia así que no te habré traumatizado tanto....A les meves conejitas: Toni...gràcies per aportar un toc diferent al laboratori i per tenir l'honor de ser la primera persona a la qui vaig esbrincar a la feina...tot sigui per salvar un pipetus!!!! Gràcies per les "juergues" improvisades, per ser un bon company i ensenyar-me cada dilluns "la chica AS" aixxxx...m'has canviat la vida!!!. I per acabar l'Edu...gràcies per ser tan col·lega, per ser l'últim en tancar una juerga, per aportar humor al laboratori i revolucionar una mica el pati...ja t'ho diré... i gràcies per les no-copes a les que em vas convidar en complir la meva part del tracte!!! Queda pendent, que ho sàpigues.

Per acabar, i espero no haver-me deixat ningú, unes parauletes per la família....gràcies per convertir-me en qui sóc, per estar sempre, incondicionalment, a les dures i les madures, per entendre els meus silencis i formar part de la meva vida. Gràcies als meus germans, la Eva i en Marc (aprofito l'avinentesa per desmentir que siguem bessons) per ser els millors companys que es poden desitjar, i als meus pares, perquè no he pogut tenir una millor sort en el repartiment!! Gràcies a tots els que m'heu acompanyat, i especialment un record pel B., D. i V. per fer-me tan feliç.

Agraiments

OBJECTIUS	PÀG. 1-4
INTRODUCCIÓ	
1. El Ronyó.....	PÀG. 7-10
2. El Carcinoma Renal Cel·lular.....	PÀG. 11-36
3. El Receptor del Virus de la Hepatitis A-1.....	PÀG. 36-41
4. Vies de senyalització implicades en el desenvolupament del ccRCC.....	PÀG. 42-46
5. Principis de la senyalització via JAK-STAT.....	PÀG. 46-57
6. Hipòxia tumoral i angiogènesi.....	PÀG. 57-68
MATERIAL I MÈTODES	
1. Cultius cel·lulars.....	PÀG. 72-83
2. Manipulació del RNA.....	PÀG. 84-93
3. Manipulació del DNA.....	PÀG. 93-103
4. Manipulació de proteïna.....	PÀG. 103-116
ANNEX MATERIAL I MÈTODES.....	PÀG. 117-119
RESULTATS	
1. Anàlisi de l'expressió d'hHAVcr-1 <i>in vivo</i>	PÀG. 123-134
2. Estudi <i>in vitro</i> del procés de <i>shedding</i> d'hHAVcr-1.....	PÀG. 135-139
3. Generació de sistemes estables d'interferència i sobreexpressió d'hHAVcr-1.....	PÀG. 140-141
4. <i>Microarray</i> d'RNA.....	PÀG. 142-148
5. La sobreexpressió d'hHAVcr-1 condueix a la sobreexpressió d'IL-6.....	PÀG. 148-159
6. La interferència d'hHAVcr-1 induïx la disminució en l'expressió de HIF-1 α	PÀG. 159-163
DISCUSSIÓ	
1. Estudi de l'expressió d'hHAVcr-1 <i>in vivo</i>	PÀG. 167-174
2. Estudi de l'expressió d'hHAVcr-1 <i>in vitro</i>	PÀG. 174-181
3. Resum final.....	PÀG. 182-183
CONCLUSIONS	PÀG. 187-188
BIBLIOGRAFIA	PÀG. 192-220

Objectius



1. Determinar el potencial pronòstic i diagnòstic de l'expressió de hHAVcr-1 en casos de carcinoma renal de cèl·lula clara.

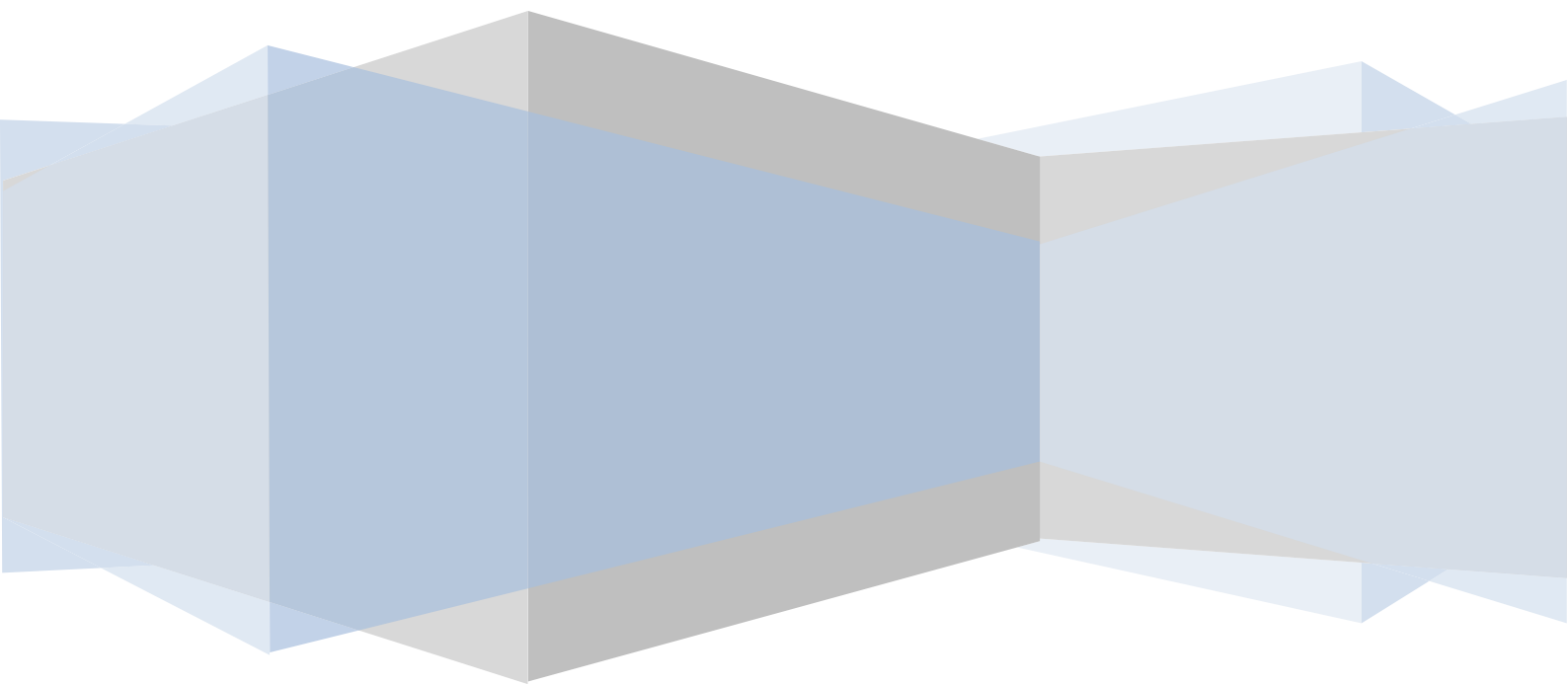
- Correlació del nivells d'expressió de hHAVcr-1 presents en mostres de teixit i orina de pacients amb ccRCC amb les característiques anatomo-patològiques i de seguiment clínic.

2. Determinar la funció de hHAVcr-1 i la seva implicació en el desenvolupament i progressió del ccRCC.

- Establiment de línies cel·lulars de sobreexpressió i interferència de hHAVcr-1.
- Estudi dels perfils d'expressió gènica derivats d'aquestes línies cel·lulars modificades.
- Identificació i estudi de les diferents vies d'expressió diferencial i de les molècules diana que correlacionen amb la presència o absència de la proteïna.

3. Disseny de noves estratègies pel diagnòstic, la prognosi i el tractament del ccRCC.

Introducció



1. El Ronyó

És l'òrgan fonamental de l'aparell urinari propi dels vertebrats i participa en la importació i exportació de grans volums d'aigua i soluts, en resposta a diferents situacions fisiològiques.

El ronyó porta a terme les seves accions homeostàtiques a través de la filtració glomerular selectiva, mitjançada per l'elevada pressió sanguínia al glomèrul, la secreció tubular de toxines i la reabsorció de substàncies metabòliques importants. Tots aquests processos són els que regulen la concentració dels productes finals del metabolisme, la pressió osmòtica, l'equilibri àcid-base, la composició iònica i el volum mitjà intern.

El ronyó també intervé en dos mecanismes homeostàtics de vital importància, portats a terme per hormones, que són:

- La síntesi i excreció de l'Eritropoetina, implicada en la producció d'eritròcits per part de la medulla òssia.
- El manteniment i regulació de la pressió sanguínia pel sistema Renina-Angiotensina. El ronyó secreta renina, enzim que catalitza el pas d'Angiotensinògen a Angiotensina II, un dels principals vasoconstrictors arterials i un important estímul per la secreció d'Aldosterona per part de la glàndula suprarenal, que regula la quantitat de Na^+ reabsorbit en el ronyó.

1.1 Anatomia renal

Els ronyons són dos òrgans parells situats a la part posterior de l'abdomen, sota la caixa toràcica, un a cada banda de la columna vertebral. Cadascun d'ells, està envoltat per un embolcall fibrós, que forma una ferma làmina que cobreix tot l'òrgan. En humans, i en la majoria de mamífers, cada ronyó s'alimenta d'una sola artèria renal que prové directament de l'aorta abdominal de manera que, rep la sang arterial a la màxima pressió possible. La sang un cop filtrada pel glomèrul surt del ronyó per la vena renal (Veure FIGURA 1). El sistema vascular està íntimament connectat amb les unitats funcionals del ronyó, les nefrones.

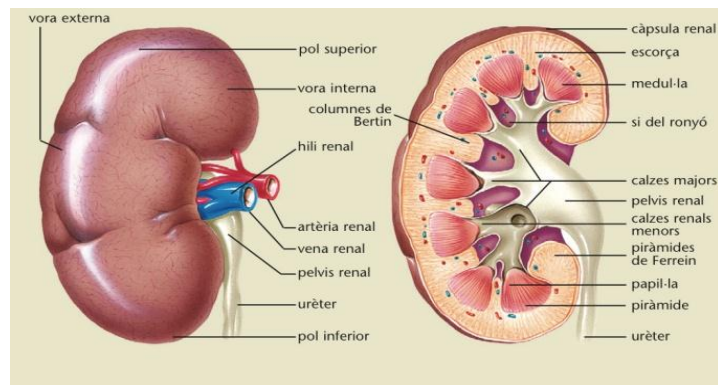


Fig. 1 | Estructura Renal

Adaptat de [www. enciclopedia.cat](http://www.encyclopedia.cat)

L'anàlisi d'una secció longitudinal renal permet la identificació de dues zones clarament diferenciades, d'una banda, una part més externa anomenada escorça renal o còrtex i de l'altra una part més interna anomenada medul·la. La medul·la està composta per diverses estructures en forma piramidal, anomenades piràmides renals. Cada piràmide es divideix en una zona externa pròxima al còrtex i una zona interna convergent cap el sinus renal.

1.1.1 La nefrona

És la unitat funcional del ronyó essent responsable de la filtració i purificació de la sang. El nombre de nefrones que conté un ronyó humà es troba al voltant del milió d'unitats.

La nefrona està composta per una porció glomerular denominada càpsula de *Bowman* i un túbul que penetra cap a la medul·la i que es divideix en tres regions principals: el túbul proximal, la nansa de *Henle* i el túbul distal. Una porció del túbul distal es connecta amb el glomèrul del qual es originari, donant lloc a una estructura anomenada aparell juxtaglomerular (Veure FIGURA 2).

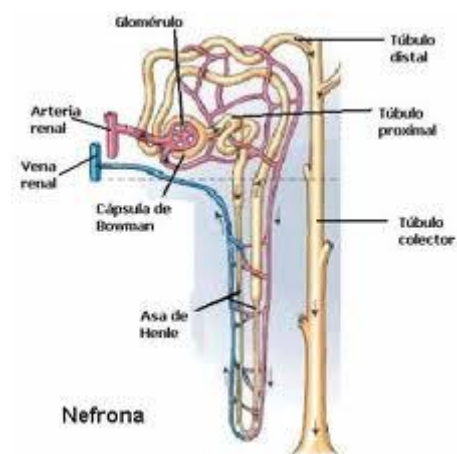


Fig. 2 | Esquema de la nefrona

Adaptat de [www. iqb.es](http://www.iqb.es)

Es diferencien dos tipus bàsics de nefrones, les corticals, en les que els glomèruls es troben a la part externa del còrtex i presenten nanses de *Henle* curtes que es mantenen a l'escorça o penetren solament a la part externa de la

medul·la i les juxtamedul·lars, que presenten el glomèrul en el còrtex intern i tenen nanses de *Henle* llargues, de tal manera que penetren profundament a la zona interna de la medul·la.

a) El corpuscle renal

Els túbuls renals s'inicien als corpuscles renals. Aquests, estan constituïts per dues parts: el glomèrul i la càpsula glomerular o de *Bowman*, coberta membranosa que és el inici del túbul proximal.

El glomèrul és un cabdell de capil·lars sanguinis units per teixit connectiu. La sang entra al glomèrul per l'arteriola aferent, travessa la xarxa de capil·lars i surt per l'arteriola eferent de diàmetre menor. Aquestes dues arterioles, entren i surten del glomèrul pel mateix punt: el pol vascular. Dins la càpsula, el glomèrul està revestit per una capa de cèl·lules epitelials anomenades podòcits, que formen la capa visceral de la càpsula de *Bowman*. Entre aquesta capa i la capa epitelial parietal de la càpsula de *Bowman* pròpiament dita, s'hi troba l'espai de *Bowman* que té continuïtat amb la llum del túbul proximal. Els elements plasmàtics es filtren pels capil·lars glomerulars cap a l'espai de *Bowman* i el filtrat glomerular és conduït pel túbul renal. La barrera de filtració entre la llum del capil·lar i l'espai de *Bowman* està formada per l'endoteli capil·lar, la membrana basal d'aquest i la capa de podòcits.

b) El túbul proximal

Topològicament es distingeixen dos components del túbul proximal, la *pars convoluta* o *contornejada*, que és la continuació de l'epiteli parietal de la càpsula de *Bowman* i la *pars recta* que s'endinsa cap a les zones més internes de la medul·la renal.

El prototipus de cèl·lula tubular epitelial és de forma columnar amb una membrana apical *brush border* molt desenvolupada, una membrana basal que li serveix d'adhesiu i de suport, i un citoesquelet organitzat i molt especialitzat, que li permet interaccionar amb la membrana plasmàtica i les proteïnes d'adhesió. La polarització i la distribució apical-basolateral d'aquestes cèl·lules, és essencial pel correcte funcionament del túbul.

La *pars convoluta* del túbul proximal juga un paper important en la reabsorció de Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} i PO_4^{3-} , aigua i soluts orgànics. És aquí on es reabsorbeix aproximadament la meitat de l'ultrafiltrat. La *pars recta*, està implicada en la secreció d'àcids i bases orgàniques i amb freqüència es veu afectada per l'acumulació de compostos nefrotòxics.

c) La nansa de Henle

És un segment del túbul renal en forma de nansa, situat entre el túbul proximal i el túbul distal que penetra cap a la medul·la renal. Està formada per una primera branca descendent, una branca prima ascendent i una branca gruixuda ascendent. Reabsorbeix al voltant d'un 25% dels ions Na^+ i Cl^- filtrats, i un 15% d'aigua. La sortida preferent de sodi en relació a l'aigua, determina una hipertonia del interstici renal, indispensable per a concentrar o diluir l'orina i per tant mantenir el balanç hídric de l'organisme.

d) El túbul distal i col·lector

El túbul distal, continuació de la nansa de *Henle*, està compost morfològicament de tres segments diferenciats: la branca gruixuda ascendent de la nansa de *Henle*, la màcula densa (localitzada a l'aparell juxtaglomerular) i el túbul contornejat distal.

El túbul col·lector, és una estructura tubular del ronyó que recull la orina procedent dels túbuls contornejats distals de diverses nefrones i desemboca al conducte papil·lar de *Bellini*. Es compon de segment cortical i medul·lar i és l'encarregat del manteniment del balanç hídric pel control de la hormona antidiürètica.

e) L'aparell juxtaglomerular

Es localitza a la regió vascular del glomèrul, on una porció del túbul distal de la nefrona entra en contacte amb el seu glomèrul parental. L'aparell juxtaglomerular s'encarrega principalment de la regulació de la pressió arterial a través del control del sistema Renina-Angiotensina (RAS), mitjançant la secreció de Renina.

2. El Carcinoma Renal Cel·lular

El carcinoma renal cel·lular (RCC), també conegut com adenocarcinoma renal, és la forma de càncer que es desenvolupa a partir de les cèl·lules epitelials del túbul renal [1]. És la lesió maligna més abundant del ronyó, representant aproximadament el 85% del total de càncers renals. El 15% restant el conformen nefroblastomes tals com, els tumors de *Wilms*, que representen entre el 5 i el 6% dels casos, neoplasmes cel·lulars transicionals de la pelvis renal, que representen entre el 7 i el 8% del total dels casos i diversos sarcomes d'origen renal [2].

El carcinoma renal cel·lular es pot presentar de forma esporàdica i de forma hereditària. Gran part del coneixement que es té sobre les bases genètiques del càncer renal, deriva de l'estudi de les formes hereditàries del mateix [3]. No és una malaltia única sinó que està formada per un nombre de tipus de càncers diferents que tenen com a origen comú les cèl·lules epitelials del túbul renal [4]. Cadascuna d'aquestes malalties, deriva d'un tipus histològic diferent, presenta una evolució clínica pròpia, té una resposta diferent a la teràpia i presenta diversos gens implicats en el seu desenvolupament [5]. Així doncs, morfològicament i atenent a la classificació de la *World Health Organization* (WHO) [6], el carcinoma renal cel·lular hereditari es pot subdividir en les tipologies que es descriuen a continuació:

2.1 Tipus tumorals i patogènesi molecular:

a) Carcinoma renal cel·lular de cèl·lula clara

El carcinoma renal de cèl·lula clara (ccRCC, *clear cell Renal Cell Carcinoma*), representa el subtipus de RCC més comú [7] i en un primer moment va ser conegut a la literatura com a tumor de cèl·lula granular, tumor *Grawitz* o hipernefoma [8].

El ccRCC és una lesió principalment solitària i maligna que s'origina a partir del còrtex renal. Les cèl·lules que es proposen per ser les d'origen, són les cèl·lules del túbul proximal renal. Una examinació més acurada revela la presència d'una lesió groguenca, ben definida i arrodonida amb hemorràgies multifocals i necrosi. Una examinació microscòpica, posa en evidència una gran

varietat de patrons histològics entre els que destaquen patrons alveolars i sòlids envoltats de vasos prims. Les cèl·lules típicament mostren un citoplasma clar degut a cúmuls de lípids i glicogen. Ocasionalment, pot ser detectat un citoplasma granular eosinofílic.

Les característiques nuclears són utilitzades pel sistema de gradació de *Führman* [9] per tal de proporcionar informació pronostica [10], de manera que cada grau patològic queda definit per les característiques que a continuació es detallen: Grau I, les cèl·lules presenten nuclis petits i uniformes; Grau II, és caracteritzat per cèl·lules amb una cromatina granular oberta sense nuclèols evidents; Grau III, on s'identifiquen prominents nuclèols; Grau IV, es defineix per la presència de macronuclèols i pleomorfisme nuclear. El grau més alt identificat dins de la lesió és el que determina el grau total del RCC. La citologia d'un ccRCC, obtinguda per aspiració amb agulla fina (FNA), demostra petits grups d'estructura papil·lar i una disposició de les cèl·lules formant estructures en forma de flor. Les cèl·lules individuals poden contenir un citoplasma clar, granulat o multivacuolat. Els nuclis sovint presenten relacions baixes nucli:citoplasma i lesions d'elevat grau poden presentar nuclèols vermells.

El diagnòstic del ccRCC, com el d'altres subtipus de RCC, es basa principalment en característiques morfològiques. Els casos de ccRCC immunoreaccionen amb l'anticòs RCC [11], cosa que pot ser útil per distingir lesions metastàtiques amb característiques de cèl·lula clara. Altres immunotincions amb CD10 [12], l'antigen de membrana epitelial [13] i citoqueratines [14,15], han estat examinades sense obtenir resultats concloents a l'hora de distingir entre els diferents subtipus de RCC.

La supervivència dels pacients amb ccRCC es correlaciona bé amb l'estadiatge patològic així doncs, un augment en l'estadiatge es caracteritza per tumors amb una mida gran, amb extensió cap a la vena renal o invasió cap al greix perirenal. La propagació metastàtica del ccRCC es dona cap a pulmons, ossos i nòduls limfàtics. Llocs inusuals tals com, glàndules tiroides, cor, melsa i pàncrees, poden donar-se però en estadis de ccRCC molt avançats.

Per la tècnica de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*), l'anàlisi de LOH (*Loss-of-heterozygosity analysis*) i l'anàlisi de CGH (*Comparative genome*

hybridization) s'han determinat deleccions del cromosoma 3p que han posat en evidència que aquest pot ser un esdeveniment primerenc en la patogènesi del ccRCC [16,17,18]. Les regions específiques del cromosoma 3 que són deleccionades, inclouen la posició 3p25-26 on es troba el gen *vhl* (*von Hippel-Lindau*), 3p21-22, i 3p13-14 [19,20,21,22,23]. El locus *vhl* també és afectat en ccRCC per mutacions i metilacions del DNA [24]. Locus addicionals afectats, identificats per LOH, que demostren una pitjor prognosi de la malaltia inclouen els cromosomes 9p, 14q, 17p i 10q [24,25,26,27,28].

La malaltia de *von Hippel-Lindau* és un síndrome rar i autosòmic dominant que cursa per angiomes retinals, hemangioblastomes del sistema central nerviós, feocromocitomes, i carcinoma renal cel·lular de cèl·lula clara (Veure FIGURA 3) [29]. El gen supressor tumoral *Von Hippel-Lindau* (*vhl*) va ser identificat al 1993 [30]. En aquesta malaltia, un dels al·lels del gen *vhl* és heretat amb una mutació. Lesions focals associades, tals com el carcinoma renal cel·lular, apareixen amb la inactivació o el silenciament de l'al·lel de *vhl* restant. Defectes al gen de *vhl*, semblen ser els responsables també del 60% dels casos de carcinoma renal de cèl·lula clara esporàdics, els quals, representen la major proporció de tots els casos de carcinoma renal cel·lular [31]. La proteïna VHL, funciona com un supressor tumoral, inhibint el creixement cel·lular quan és reintroduït a cèl·lules de carcinoma renal cel·lular en cultiu [32,33]. Els gens induïbles per hipòxia són normalment inhibits per la proteïna VHL, incloses certes proteïnes involucrades en l'angiogènesi (com per exemple, el *vascular endothelial growth factor* (VEGF)), el creixement cel·lular (*transforming growth factor alpha* (TGF- α)), la captació de glucosa (per exemple, el transportador de glucosa (GLUT-1)) i el balanç àcid-base (carbonic anhidrasa IX) [34].

Amb la pèrdua de VHL, aquestes proteïnes són sobreexpressades, creant un microambient favorable per la proliferació de les cèl·lules epitelials. Així, cèl·lules deficientes en la proteïna VHL esdevenen tal com si fossin hipòxiques inclús en condicions de normòxia. La proteïna VHL, juntament amb les proteïnes elongines B i C, s'uneixen a la proteïna *cul2* (membre de la família *culina* de les proteïnes ubiquitina-lligases), indicant que una part de la proteïna VHL, actua com a subunitat receptora del complex ubiquitina-lligasa que promou la ubiquitinació i destrucció de proteïnes [35,36]. VHL uneix directament

els activadors factors transcripcionals induïbles per hipòxia, HIF-1 α i HIF-2 α , i els desestabilitza [37]. Aquestes vies regulades per la proteïna VHL són estudiades com a possibles dianes terapèutiques pel tractament del carcinoma renal de cèl·lula clara. HIF és un regulador clau en la resposta a hipòxia en organismes multicel·lulars. Així doncs, la proteïna VHL té un paper central en els mecanismes sensors d'oxigen. Per que la unió de HIF-1 α a VHL es doni, un residu prolina ha de patir una hidroxilació, cosa que constitueix una modificació proteica poc usual [38,39]. La hidroxilació d'un residu asparagina, bloqueja la interacció de HIF-1 α amb el coactivador transcripcional p300 [40]. Així, nombroses passes d'hidroxilació cooperen per tal d'inhibir l'activitat de HIF-1 α . Per tal de correlacionar el genotip amb el fenotip de la malaltia, s'han avaluat mutacions en VHL que determinen l'efecte en la ubiquitinació de HIF-1 α . En aquest sentit, s'ha trobat que les mutacions de VHL que alteren el processament de HIF-1 α són les mateixes que aquelles que estan associades amb manifestacions vasculars de la malaltia de von Hippel-Lindau, tals com, l'hemangioblastoma [41,42]. Donat que el carcinoma renal cel·lular es desenvolupa en un subgrup de pacients amb hemangioblastoma, la sobreexpressió de HIF-1 α sembla ser necessària però no suficient per induir la tumorigènesi renal. Amb tot, HIF-1 α es presenta com a factor clau i de vital importància per la patogènesi de la malaltia. La inhibició de HIF induïda per VHL és suficient per tal de suprimir el creixement cel·lular del carcinoma renal de cèl·lula clara en models preclínics [43,44].

La proteïna de matriu cel·lular fibronectina [45] així com la chaperonina TRiC/CCT [46] i el factor de transcripció Jade1 [47,48,49], són molècules que interaccionen amb la proteïna VHL de forma depenent a les mutacions de VHL, suggerint que deuen també contribuir a la patogènesi de la malaltia.

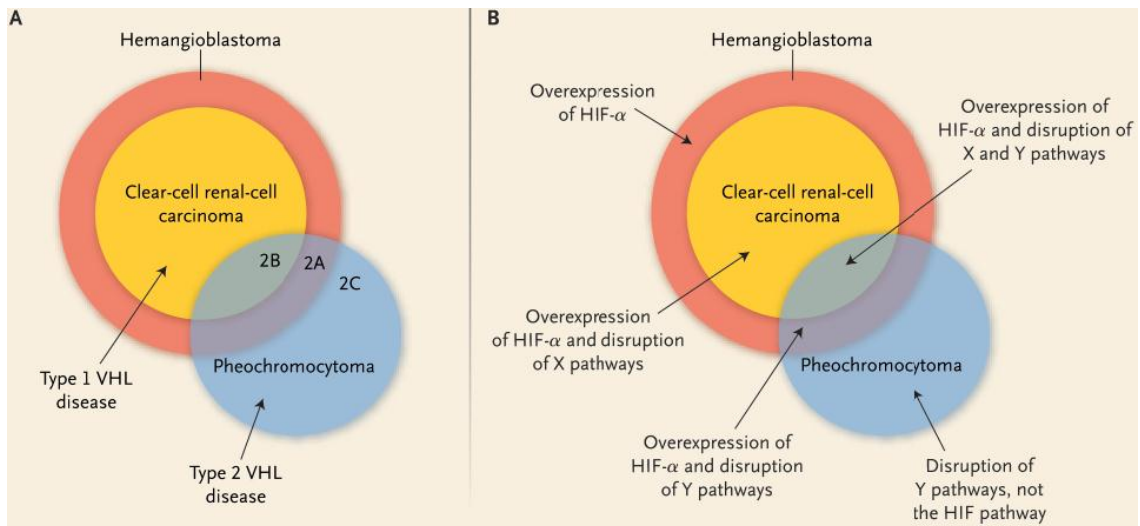


Fig. 3 | Representació esquemàtica, mitjançant diagrames de Venn, de l'espectre clínic de la malaltia de von Hippel-Lindau i de potencials mecanismes biològics. Les tres principals manifestacions de la malaltia de von Hippel-Lindau (l'hemangioblastoma del SNC, el feocromocitoma i el ccRCC) són representades mitjançant diagrames de Venn. **A)** La malaltia de VHL tipus 1, és la més comú i inclou casos de ccRCC i hemangioblastoma del SNC, és la que deriva de les principals afeccions a la proteïna de VHL tals com aquelles resultants de mutacions truncants. La malaltia de VHL tipus 2 deriva de mutacions més subtils de VHL i inclou al feocromocitoma amb 1, 2 o cap de les alteracions descrites anteriorment. Així doncs, el subtipus 2B predispone als pacients a patir les 3 malalties, el 2A hemangioblastomes i feocromocitomes i el 2C només feocromocitomes. **B)** L'espectre de manifestacions de la malaltia de VHL suggereix la implicació de vies bioquímiques específiques per exemple, les mutacions en el gen de VHL que interrompen la ubiquitinació i destrucció de HIF- α són les mateixes que aquelles que correlacionen amb lesions d'hemangioblastoma. Les mutacions de VHL tipus 2A interrompen el processament de HIF- α però no causen RCC, suggerint que altres vies addicionals han de ser interrompudes per tal que es desenvolupi un càncer renal. Aquestes vies de senyalització són anomenades vies X. Els feocromocitomes poden desenvolupar-se a partir de mutacions en el gen de VHL que no afectin al processament de HIF- α (conegudes com a vies de senyalització Y). Així la sobreexpressió de HIF- α es correlaciona amb el desenvolupament d'hemangioblastomes i sembla ser necessària però no suficient per induir la tumorigènesi renal i no és necessària per la inducció dels feocromocitomes.

Adaptat de Cohen *et al.* [29]

b) Carcinoma renal cel·lular papil·lar

El carcinoma renal cel·lular papil·lar presenta una taxa de supervivència als cinc anys del 90% i una predominança homes front dones de 5:1. El carcinoma renal cel·lular papil·lar localitzat, metastatitza menys freqüentment que el carcinoma renal cel·lular de cèl·lula clara [50]. Malgrat això, el interval de supervivència del carcinoma renal cel·lular papil·lar metastàtic és probablement pitjor al que presenta el carcinoma renal de cèl·lula clara [51]. El risc a patir els dos tipus de malaltia és particularment elevat en pacients en l'últim estadi d'una malaltia renal.

Existeixen dos subtipus de carcinoma renal cel·lular papil·lar: els tumors tipus ú, que són lesions papil·lars, cobertes per petites cèl·lules que presenten un citoplasma pàl·lid i un petit nucli ovalat amb els nuclèols indistingibles, i els de tipus dos, que són lesions papil·lars cobertes per cèl·lules de gran mida amb

abundant citoplasma eosinofílic [52]. Les cèl·lules tipus dos estan caracteritzades per presentar pseudoestratificació i un gran nucli esfèric amb varis nuclèols. Aquests tumors tipus dos són generalment més heterogenis, tenen una pitjor prognosi, i poden desenvolupar-se a partir dels de tipus ú [53].

El carcinoma renal cel·lular papil·lar inclou varis síndromes familiars. El carcinoma renal papil·lar hereditari, és un desordre autosòmic dominant associat al carcinoma renal cel·lular multifocal amb característiques histològiques similars a les descrites pel carcinoma renal papil·lar tipus ú [54,55]. El gen causal, mutacions en el qual són responsables del carcinoma renal papil·lar hereditari, ha estat identificat al cromosoma 7 (cromosoma que es troba duplicat en el 75% dels casos de carcinoma papil·lar esporàdic) i codifica per MET, un receptor tirosina quinasa que és normalment activat pel factor de creixement d'hepatòcits [56]. En el carcinoma renal papil·lar hereditari, el domini tirosina quinasa del receptor MET, pateix mutacions per substitucions aminoacídiques autoactivants, les quals, promouen la transformació cel·lular [57]. Conseqüentment, el cromosoma 7, que porta la mutació a met, és duplicat, augmentant així la càrrega gènica [58,59]. Només un petit percentatge dels casos de carcinoma renal esporàdic tenen mutacions a met. Així, la patogènesi del carcinoma renal hereditari és diferent a la del carcinoma renal papil·lar esporàdic.

Pacients amb leiomiomatosi hereditària i síndrome de carcinoma renal cel·lular, presenten risc a patir leiomiomes cutanis i uterins i carcinoma renal papil·lar amb característiques histològiques de tipus dos [60]. Ocasionalment, es donen també casos de carcinoma renal de túbul col·lector o de cèl·lula clara. Aquests casos de carcinoma renal papil·lar metastatitzen ràpidament i són els més agressius dels de tipus familiar [61]. Fh, el gen que causa aquest síndrome autosòmic dominant, codifica per la fumarat hidratasa, enzim del cicle de Krebs [62]. Amb la pèrdua del gen tumor supressor, l'al·lel salvatge es perd en casos de leiomiomatosi hereditària així com, en lesions de carcinoma renal cel·lular [63].

En la mateixa línia, han estat descrits casos de carcinoma renal cel·lular amb característiques histològiques sòlides o casos de cèl·lula clara en pacients

que presenten el síndrome hereditari paraganglioma. Algunes formes de paraganglioma hereditari estan associades a defectes en la línia germinal en el gen de la succinat deshidrogenasa B [64]. La proteïna, és un altre enzim mitocondrial del cicle de Krebs.

Així doncs, es pot concloure que existeix una estreta connexió entre la producció d'ATP cel·lular, les respostes per hipòxia i la tumorigènesi en teixits renals i neuronals.

Un nombre de casos de carcinoma renal papil·lar esporàdic presenten translocacions cromosòmiques que impliquen el gen *tfe3* localitzat al cromosoma Xp11.2 [65,66,67]. Nens i adults joves són afectats sense cap predilecció pel sexe, i les característiques histològiques podrien correspondre a casos de carcinoma renal cel·lular papil·lar, carcinoma renal cel·lular de cèl·lula clara o a un únic tipus de patologia. El gen *tfe3* codifica per a un factor de transcripció hèlix-loop-hèlix relacionat amb el producte del proto-oncogen *c-myc*. Dominis clau *TRE3* es fusionen amb altres productes gènics, i el carcinoma renal cel·lular condueix a la sobreexpressió de *TFE3*.

c) Oncocitoma i carcinoma renal cel·lular cromòfob

Els Oncocitomes, que són benignes, representen aproximadament el 5% de les nefrectomies realitzades per la sospita de trobar-se davant un carcinoma renal cel·lular. Els carcinomes renals cel·lulars cromòfobs, també representen el 5% del total de casos de carcinoma renal cel·lular i poden tenir un curs benigne després de la cirurgia, si és que l'estadiatge del tumor i el grau són favorables [68,69]. Els Oncocitomes s'originen a partir de les cèl·lules intercalades tipus A del túbul col·lector, mentre que el carcinoma renal cel·lular cromòfob s'origina a partir de les cèl·lules intercalades tipus B.

El síndrome *Birt-Hogg-Dubé* és una malaltia autosòmica dominant caracteritzada per la presència de fibrofolliculomes a la cara i al coll del pacient [70,71,72,73].

Aproximadament el 15% dels pacients afectats, tenen tumors renals múltiples, la majoria de vegades cromòfobs, però també poden ser barreges dels tipus cromòfob i oncocitomes. Ocasionalment, pacients amb el síndrome de *Birt-*

Hogg-Dubé poden presentar també carcinomes renals de cèl·lula clara o papil·lars. El gen *bhd*, implicat en el desenvolupament d'aquest síndrome, codifica la proteïna Foliculina [74], que es creu que té un paper de supressor tumoral. Mutacions a *bhd*, es donen rarament en carcinomes renals cel·lulars esporàdics [75,76]. El fenotip renal del síndrome, dóna suport a la existència d'una estreta relació entre l'oncocitoma i el carcinoma renal cromòfob.

d) Carcinoma renal cel·lular del túbul col·lector

Els carcinomes renals cel·lulars dels túbul col·lector representen menys d'un 1% del total de càncers renals i són considerats tumors agressius. El subtipus de carcinoma renal de túbul col·lector és similar al carcinoma cel·lular transicional de l'uroteli.

A la FIGURA 4 es mostra una representació histològica dels diferents subtipus de carcinoma renal cel·lular:

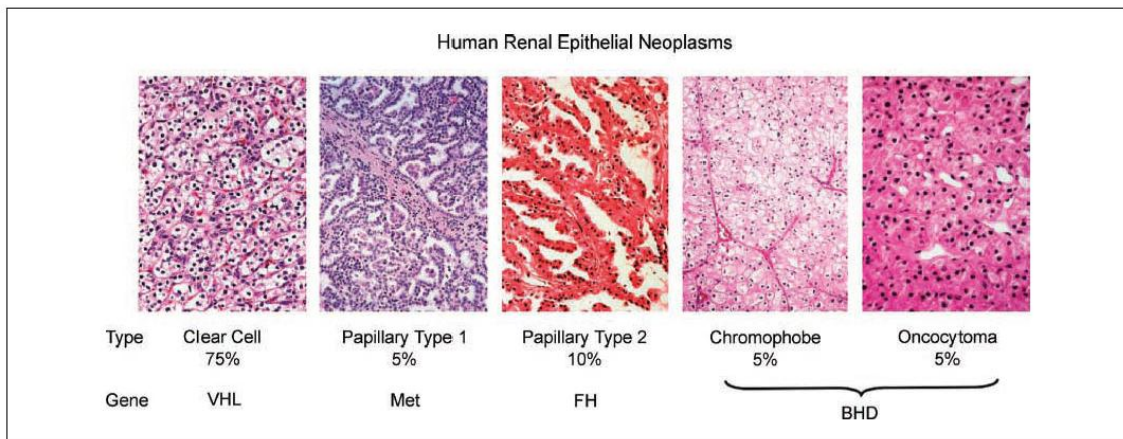


Fig. 4 | Subtipus tumorals de RCC. El càncer renal està conformat per un nombre de tipus de càncer diferents que tenen lloc al ronyó. Cadascun d'ells presenta un tipus histològic diferent, té una evolució clínica diferent i està associat a alteracions gèniques diferents.

Adaptat de Linehan *et al.* [4]

2.2 Incidència

La incidència anual del RCC a la Unió Europea és d'aproximadament 40.000 nous casos mentre que, més de 200.000 casos són diagnosticats arreu del món cada any. La incidència global dels carcinomes renals cel·lulars primaris ha augmentat en els darrers 20 anys d'un 2 a un 4 % per any. La ràtio Home:Dona és de 2:1 [77].

El carcinoma renal cel·lular és molt més freqüent entre la població Escandinava i Nord americana mentre que una incidència menor la presenten Asiàtics i Africans. La majoria de casos es donen en persones d'edat compresa entre el 50 i els 70 anys d'edat però inclús pot ser observat en nounats.

2.3 Etiologia

Els principals factors de risc del carcinoma renal cel·lular són la obesitat, el tabaquisme, la hipertensió, factors hereditaris i casos de fracàs renal crònic [78]. Una dieta rica en fruita i vegetals sembla exercir un efecte protector davant la malaltia.

Pacients de diàlisi a llarg terme, presenten propensió a desenvolupar quistos als seus ronyons nadius i varis d'aquests pacients desenvolupen carcinoma renal cel·lular [79]. En concret, entre el 30 i el 50% dels pacients de diàlisi a llarg terme desenvolupen malaltia quística adquirida i fins a un 6% d'aquests pacients desenvolupen càncer renal [80].

2.4 Biologia molecular

A les darreres dècades, ha tingut lloc una explosió d'informació sobre les bases moleculars d'una gran varietat de càncers, inclòs el carcinoma renal cel·lular. Al 1979, Cohen *et al.* [81] van descriure una cohort de pacients en una família que presentava carcinoma renal cel·lular familiar amb un patró d'herència autosòmic dominant. Proposaren una translocació recíproca entre el braç curt del cromosoma 3 i el braç llarg del cromosoma 8. Tots els membres de la família amb la translocació 3-8 desenvoluparen carcinoma renal cel·lular, que usualment era bilateral. Un estudi addicional va demostrar que aquesta translocació del cromosoma 3 al 8 involucrava a l'oncogen cel·lular *c-myc* [82].

Varis estudis han suggerit un possible paper del cromosoma 3 a la etiologia del carcinoma renal cel·lular no familiar. Estudis realitzats per Carroll *et al.* [83] així com per Yoshida *et al.* [84] suggereixen rearranjaments al cromosoma 3.

El grup de Zbar *et al.* va trobar evidències de delecions en la seqüència d'ADN al braç curt dels cromosomes 3 i 11 en pacients amb carcinoma renal cel·lular [85]. A més, Rukstalis *et al.* van identificar una delecio al cromosoma 6 d'aquests pacients [86].

Les formes esporàdiques i familiars del carcinoma renal cel·lular es troben associades amb alteracions estructurals del braç curt del cromosoma 3 o 3p(1-3). Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la malaltia de Von Hippel-Lindau (VHL) és un desordre familiar caracteritzat pel desenvolupament de múltiples tumors, incloent el carcinoma renal cel·lular bilateral, feocromocitomes, hemangioblastomes del sistema nerviós central, angiomes retinals, i quistos pancreàtics. El patró d'herència és autosòmic dominant. Hi ha una pèrdua d'heterogocitat de la regió 3p en el carcinoma renal cel·lular i en altres tumors en pacients amb la malaltia de VHL [87]. El gen de *vhl* ha estat localitzat a la regió 3p(25-26) del cromosoma 3 [88].

Anàlisis moleculars genètiques del carcinoma renal cel·lular esporàdic, i de línies cel·lulars derivades de carcinoma renal cel·lular humà, revelen una pèrdua d'heterogocitat del cromosoma 3p en aproximadament el 90% dels tumors i en la pràctica totalitat dels carcinomes renals cel·lulars de cèl·lula clara. Mutacions del gen *vhl* han estat observades en el 57% d'una sèrie de 98 casos de carcinoma renal cel·lular esporàdic avançat i localitzat. No s'han trobat mutacions al gen *vhl* en una sèrie de 119 tumors estudiats d'origen no renal, cosa que suggereix que la pèrdua de funció del gen *vhl* és crítica pel desenvolupament del carcinoma renal cel·lular esporàdic [89].

2.5 Característiques clíniques

Una de les característiques principals del RCC és la falta de simptomatologia que evidenciï la seva aparició, cosa que provoca que aproximadament un terç dels pacients presentin metàstasi en el moment del diagnòstic. Així doncs, el carcinoma renal cel·lular pot presentar-se amb una gran varietat de manifestacions clíniques, poc específiques per a la malaltia, que van des de la clàssica presentació de la triada d'hematúria, dolor i massa renal palpable, fins als més complexos símptomes com els del síndrome paraneoplàsic. La clàssica triada indica pacients amb malaltia avançada i és vista en menys del 10% de malalts. De forma molt més comú, els tumors renals són descoberts de forma accidental durant estudis diagnòstics diversos.

L'hematúria és el símptoma més comú de presentació. Es manifesta en el 50% de pacients amb carcinoma renal cel·lular, però usualment és observat només en el cas que el tumor hagi envaït el sistema col·lector [90]. Els pacients poden manifestar dolor, si presenten formació de coàguls amb còlics associats. Les masses renals palpables fonamentalment són trobades en pacients pediàtrics. Aquells tumors localitzats al pol renal inferior són més fàcilment palpables. La massa normalment presenta una consistència dura i es mou amb la respiració. Un nombre considerable de pacients amb carcinoma renal cel·lular presenten símptomes sistèmics.

Així doncs, el carcinoma renal cel·lular pot manifestar-se amb una gran varietat de patrons simptomàtics diferents, que poden suggerir altres patologies de forma equívoca. La febre d'origen desconegut, la policitemia, la pèrdua de pes o l'anèmia també es poden donar. Les nombroses manifestacions humorals i sistèmiques del carcinoma renal cel·lular són conegudes amb el nom de síndromes paraneoplàsics. Les freqüències d'aquests efectes sistèmics es troben classificats a la Taula 1.

TAULA 1. Frequència d'efectes sistèmics en pacients amb RCC

Síntoma	Incidència	%
ESR elevat	362/651	55.6
Anèmia	409/991	41.3
Hipertensió	89/237	37.6
Caquèxia	338/979	34.5
Pirèxia	164/954	17.2
Test de funció hepàtica anormal	60/400	15.0
Fosfatasa alcalina elevada	64/434	14.7
Hipercalcèmia	33/557	5.7
Policitèmia	33/903	3.7
Neuromiopia	13/400	3.3
Amiloidosi	12/573	2.1

ESR: taxa de sedimentació d'eritròcits

Adaptat de Chisholm GD and Roy RR.[91]

2.6 Avaluació radiogràfica.

Existeix una gran varietat d'estudis d'imatge que permeten determinar si una massa renal és benigna o maligna (Veure FIGURA 5). Malgrat tot, inclús amb la disponibilitat d'aquestes modalitats diagnòstiques que inclouen, la urografia excretora, la tomografia computacional (CT), l'arteriografia, la venografia, la ultrasonografia, i la imatge per ressonància magnètica (MRI), un cert nombre de pacients presenten una massa renal indeterminada. És important poder separar quists renals benignes de neoplasmes sòlids, molts dels quals, són malignes [92]. De totes les tècniques d'avaluació radiogràfica existents, destaquem a continuació aquelles que s'empren majoritàriament:

a) Urografia intravenosa

La urografia excretora és sovint emprada en l'avaluació inicial de pacients amb hematúria que generalment mostren una lesió per massa renal. Tumors de mida moderada, generalment a la part posterior del ronyó, poden passar desapercebuts. El principal criteri diagnòstic és la distorsió del sistema

col·lector. Altres senyals com, la pèrdua de visualització d'una part del sistema col·lector o una distorsió del contorn renal, poden suggerir l'existència d'una massa renal.

La nefrotomografia, ajuda a eliminar la distorsió de la càpsula de *Bowel* i pot delimitar els marges laterals del ronyó més clarament. Aquesta prova és d'importància quan es vol diferenciar entre lesions quístiques i sòlides. Un quist benigne, sol mostrar en aquest tipus de prova una forma definida, mentre que la massa sol ser radiogràficament translúcida.

Finalment, podem dir que la urografia intravenosa ens proporciona una important informació respecte el ronyó contralateral.

b) Tomografia Computacional (CT)

La tomografia computacional ha esdevingut la tècnica d'imatge elegida per a la diagnosi i l'estadiatge del carcinoma renal cel·lular. Aquesta tècnica proporciona la visualització de l'anatomia per secció creuada, cosa que permet relacionar les lesions del ronyó amb estructures col·laterals, com el fetge, la melsa o la glàndula adrenal. Els resultats són reproduïbles i és una tècnica menys invasiva que l'arteriografia. La CT pot oferir més informació sobre l'estat de la vena inferior cava tot i que, estudis addicionals poden ser necessaris. Amb la tecnologia espiral, la CT permet una reconstrucció tridimensional, cosa que pot ser d'extrema utilitat per a la planificació de la cirurgia [93,94].

c) Imatge per Ressonància Magnètica (MRI)

La ressonància magnètica, és una modalitat molt útil per a la avaluació de l'afectació de la vena renal o de la vena cava inferior en pacients amb carcinoma renal cel·lular. La possibilitat de produir una imatge tridimensional del tumor pot ser d'incalculable valor, juntament amb els escàners parasagitals i de secció creuada. Però més important que tot això, la MRI (especialment amb l'ús de noves tècniques com la tècnica *Grass*) és capaç de visualitzar el flux a través dels vasos majors i discriminar acuradament entre la presència o absència de trombus a la vena cava inferior. La MRI ha esdevingut el procediment d'elecció per acotar la implicació de la vena renal i/o de la vena cava [95]. Cal destacar també com a avantatge de la tècnica, la seva naturalesa

no invasiva. A la FIGURA 5 es mostra un diagrama que explica les etapes a seguir durant la diagnosi d'un cas de RCC:

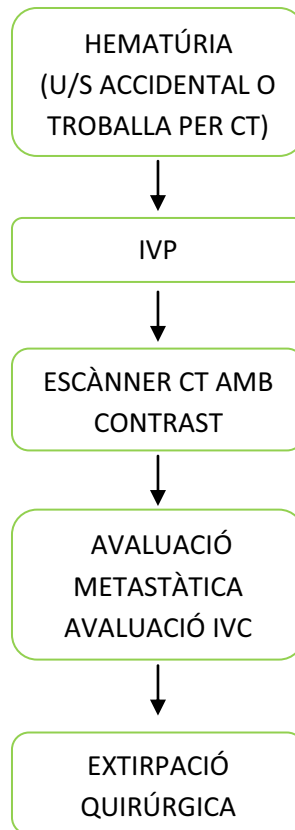


Fig. 5 | Diagnosi del RCC.

On: CT: tomografia computacional,
IVC: vena cava inferior, IVP:
pielografia intravenosa i U/S:
ultrasonografia

2.7 Estadiatge i grau tumoral

a) Estadiatge clínic

Un cop s'ha establert el diagnòstic de carcinoma renal cel·lular, l'atenció ha de recaure sobre l'extensió i les implicacions del mateix, tant en llocs distants com locals. Les metàstasis més comunes derivades d'aquest tipus tumoral es localitzen en nòduls limfàtics, pulmó, ossos, fetge, glàndula adrenal ipsilateral i al ronyó contralateral. La tomografia computacional (CT), és útil per tal d'avaluar llocs on es puguin desenvolupar possibles metàstasis. La radiografia de pit així com la tomografia computacional de pit, s'utilitzen per trobar possibles llocs on es desenvolupen metàstasis pulmonars.

La CT del cervell està normalment reservada a pacients amb símptomes d'implicació a nivell del sistema nerviós central [96].

b) Classificació patològica

Les característiques histològiques dels tumors primaris es tenen en compte pel que fa a la prognosi, malgrat això, l'extensió del tumor en el moment de la resecció sol ser el factor pronòstic més important, encara que, també cal considerar la mida del tumor [97]. Les característiques microscòpiques d'un patró papil·lar, estan associades a una millor prognosi [98]. Per altra banda, diferents subtipus tumorals metastatitzen a llocs diferents i aquells pacients amb tumors composts per cèl·lules clares, tenen una millor taxa de supervivència als cinc anys que aquells composts per cèl·lules granulars (58% davant 46%) [99].

La variant sarcomatoide del carcinoma renal cel·lular, que forma un tumor molt més anaplàsic, presenta la pitjor prognosi amb una taxa de supervivència durant el primer any del 46% dels pacients i una del 37% durant el segon any [100]. L'avaluació de les característiques nuclears també té importància pel que fa a la prognosi, així doncs, un grau tumoral elevat és associat amb una disminució de la taxa de supervivència als 5 anys.

c) Estadiatge patològic

El tret més important pel que fa a la prognosi per un pacient amb carcinoma renal cel·lular és l'estadiatge patològic quan el tumor és diagnosticat i tractat en una etapa primerenca del seu desenvolupament. Estudis prequirúrgics poden donar alguns indicis de l'extensió i l'abast, especialment pel que fa a l'abast a distància, però un estadiatge primerenc acurat, depèn de l'avaluació histològica del tumor extret (Veure FIGURA 6). El mètode més emprat per l'estadiatge patològic de la malaltia avui en dia i que és d'ús general, va ser proposat per Flocks i Kadesky [101] i posteriorment modificat per Robson [102] i es mostra a la següent taula:

TAULA 2. Gradació patològica del Carcinoma Renal Cel·lular

Grau	Característiques
I	El tumor es troba confinat dins la càpsula renal.
II	El tumor envaeix la càpsula renal però es troba confinat dins la Gerota Fascia.
III	El tumor ha envaït els nòduls limfàtics locals, la vena renal ipsolateral o la vena cava inferior.
IV	Existeixen indicis de la presència de metàstasi distal o implicació d'òrgans adjacents diferents a la glàndula adrenal ipsolateral.

Adaptat de Flocks RH i Kadesky MC [101] i Robson CJ et al. [102].

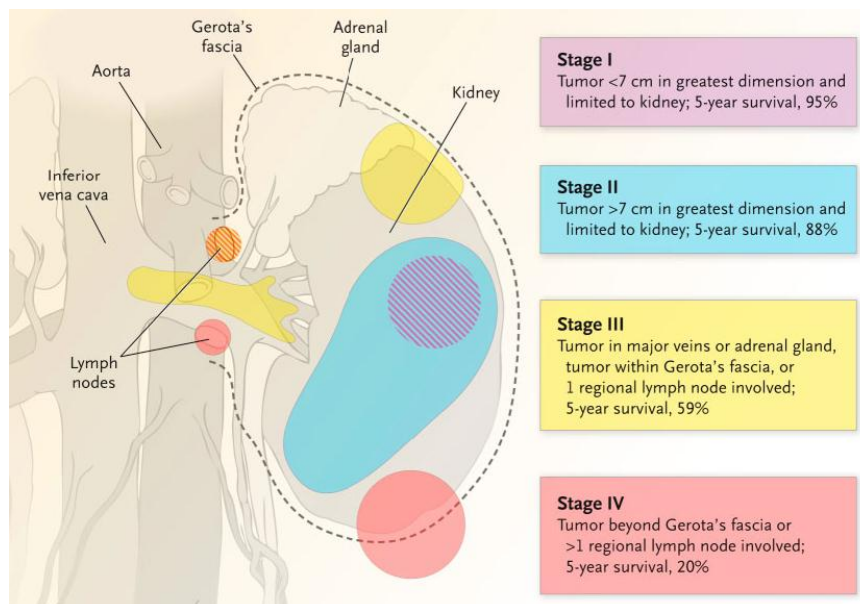


Fig. 6 | Perspectiva general de l'estadiatge patològic i les taxes de supervivència als cinc anys pel càncer renal.

Adaptat de Cohen *et al.* [29]

El sistema de classificació tumoral que s'utilitza en la majoria de tumors sòlids s'anomena TNM i té en compte la mida del tumor i el grau d'invasió local (T), el nombre, mida i localització dels nòduls limfàtics (N), i la presència o absència de metàstasis distants (M). En les següents taules es presenta aquest sistema de classificació amb més detall:

TAULA 3. Definició del TNM per Carcinoma Renal Cel·lular**Tumor (T)**

TX	El tumor primari no pot ser avaluat.
T0	No hi ha evidència de l'existència de tumor primari.
T1	Tumor de 7.0 cm o menor limitat al ronyó.
T2	Tumor de més de 7.0 cm limitat al ronyó.
T3	El tumor s'extén cap a la vena major o envaeix la glàndula adrenal o teixits perifèrics però no la <i>Gerota Fascia</i> .
T3a	El tumor envaeix la glàndula adrenal o teixits perifèrics però no la <i>Gerota Fascia</i> .
T3b	El tumor s'extén cap a les venes renals però no la <i>Gerota Fascia</i> .
T4	El tumor envaeix cap a la <i>Gerota Fascia</i> .

Nòduls limfàtics locals (N)

NX	Nòduls limfàtics locals no poden ser avaluats.
N0	No hi ha metàstasi a nòduls limfàtics locals.
N1	Metàstasi a un únic nòdul limfàtic de 2.0 cm o menor.
N2	Metàstasi en un únic nòdul limfàtic de més de 5.0 cm o de múltiples nòduls cap d'ells més gran de 5.0 cm.
N3	Metàstasi en un nòdul limfàtic de més de 5.0 cm.

Metàstasis distals (M)

MX	La presència de metàstasis distals no pot ser avaluada.
M0	No hi ha metàstasis distals.
M1	Hi ha metàstasis distals.

Adaptat de Fleming D et al [103].

TAULA 4. Agrupació per estadiatge del RCC

Estadiatge			
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3a	N0,N1	M0
	T3b	N0,N1	M0
IV	T4	—	M0
	—	N2,N3	M0
	—	—	M1

Adaptat de Fleming D et al [103]

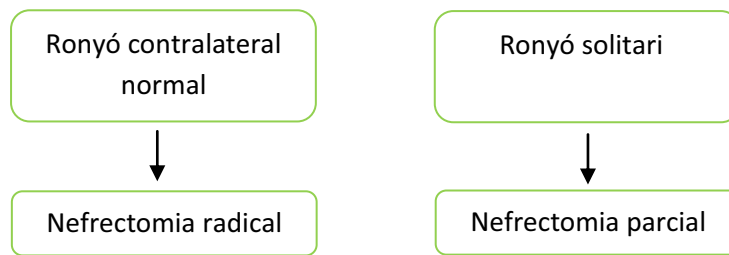
2.8 Tractaments quirúrgics

El tractament elegit pel carcinoma renal cel·lular és l'extracció quirúrgica (Veure FIGURA 7). La nefrectomia radical, consisteix en una lligació de l'arteria renal, la vena renal i una extracció en bloc del ronyó amb la *fascia de Gerota*. El concepte de nefrectomia radical amb l'excisió completa de l'embolcall de *Gerota*, va ser impulsat per Robson i col·legues [104] que varen veure una taxa de supervivència als cinc anys del 66% comparat amb el 48% de la nefrectomia simple. Així doncs, la nefrectomia radical ha esdevingut el procediment a seguir pel tractament de la malaltia. Els resultats són comparables amb la nefrectomia radical per laparoscòpia o oberta.

Grau I



Grau II,III



Grau IV

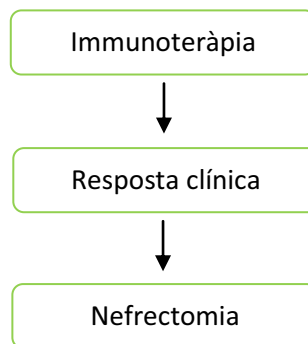


Fig. 7 | Teràpia pel RCC

La nefrectomia parcial ha estat molt utilitzada en els darrers deu anys, pel tractament de tumors petits (de menys de 4 cm) [105,106]. El seguiment després del tractament definitiu depèn també de la mida del tumor [107].

Es disposa, avui en dia, de diverses aproximacions que assegurin portar a terme el procés amb èxit però, independentment de l'aproximació quirúrgica en últim terme triada, cal tenir en compte que la lligació del peduncle vascular és important a l'hora de prevenir una possible disseminació tumoral en el moment de l'operació. Algunes d'aquestes aproximacions quirúrgiques són:

a) Limfadenectomia local

S'ha vist implicació dels nòduls limfàtics regionals o periaòrtics en gairebé el 25% dels pacients amb carcinoma renal cel·lular [108]. En aquests casos, s'acostuma a realitzar juntament amb la nefrectomia una limfadenectomia local. El principal valor de la detecció de la implicació nodular té a veure amb factors pronòstics. Així doncs, aquest factor pot ser important a l'hora de dissenyar

assajos per teràpies adjuvants, ja que la taxa de supervivència als cinc anys en pacients amb afectació de nòduls és substancialment menor a la de pacients amb tumors de grau I o II.

b) Implicació de la vena renal i vena cava inferior

Aproximadament un 5% dels pacients amb carcinoma renal cel·lular presenta implicació de la vena renal o la vena cava inferior. La invasió tumoral de la vena cava inferior o la vena renal, usualment apareix com a un trombus ben vascularitzat cobert per la seva pròpia superfície. Això té una importància cabdal a l'hora de planejar la cirurgia. En aquestes circumstàncies i en absència de metàstasis demostrables, la nefrectomia radical es porta a terme amb una lligació primerenca de l'arteria renal però, sense manipulació de la vena renal.

La taxa de supervivència a cinc anys després d'una nefrectomia radical per pacients de carcinoma renal cel·lular de grau I és aproximadament del 94% mentre que pacients amb lesions de grau II presenten una taxa del 79%. Aquells pacients que presenten afectació de la vena renal o la vena cava inferior, tenen una taxa de supervivència de entre un 25 i un 50%, i pacients amb un nòdul limfàtic afectat o extensió extracapsular tenen taxes d'entre un 12 i un 25% [109].

En pacients als qui s'ha portat a terme l'extracció d'un trombus de la vena renal o la vena cava inferior, las taxes de supervivència a cinc anys són d'entre un 25 i un 50%. Aquells pacients amb un grau IV de la malaltia presenten taxes menors al 5% [110].

TAULA 5. Correlació entre la taxa de supervivència als 5 anys i l'estadiatge patològic en pacients amb RCC

Estadiatge patològic	No. pacients	Supervivència (5anys%)
I	36	51.0
II	54	58.5
Implicació de la vena renal	21	64.0
Implicació de la IVC	7	25.4
III	8	12.3
IV	32	0

IVC= vena inferior cava

Adaptat de Waters WB and Richie JP [111]

2.9 Tractaments mèdics.

Les teràpies mèdiques s'ofereixen principalment a pacients que pateixen o bé carcinoma renal cel·lular metastàtic o bé una vessant de la malaltia avançada. Cal tenir en compte, que molta de l'experiència clínica de la que es disposa ve de pacients amb el subtipus de ccRCC.

Donat que el grau de resposta és baix, la necessitat d'identificar nous agents terapèutics, cada cop és més evident [112].

a) Quimioteràpia

Els nivells de resposta al tractament de quimioteràpia per si sol són baixos amb valors que van d'un 4 a un 6% [113]. La resistència als fàrmacs pot relacionar-se amb l'expressió del MDR, *multidrug resistance transporter*, en cèl·lules del túbul proximal, de on són originaris els subtipus de la malaltia papil·lar o de cèl·lula clara. La quimioteràpia, pot esdevenir més eficient per carcinomes no de cèl·lula clara avançats, particularment pels del subtipus del túbul col·lector [114,115,116]. S'està realitzant un assaig que es troba en fase II dels fàrmacs *Carboplatin* i *Paclitaxel* pel subtipus de RCC de túbul col·lector.

b) Teràpies immunomoduladores

El valor de les teràpies immunomoduladores pels casos de ccRCC es basa en casos de regressió espontània de la malaltia, regressió complerta de la malaltia metastàtica amb teràpies amb citoquines, i resultats primerencs prometedors de trasplantaments al·logènics de cèl·lules mare i vacunes tumorals.

- Interferó α

Aproximadament el 14% dels casos de carcinoma renal cel·lular de cèl·lula clara respon al tractament amb interferó α per si sol. Vàries dosis i rutes han estat utilitzades [117]. La mitjana de duració de la resposta al tractament és de sis mesos i rarament s'excedeix dels dos anys. En la majoria dels casos, el tractament amb interferó α s'utilitza en combinació amb altres agents desenvolupats en diverses aproximacions experimentals.

- Interleuquina-2

La teràpia estàndard pel tractament del RCC avançat és l'ús d'elevades dosis d'interleuquina-2. Aquest tractament, indueix resposta en el 21% dels pacients, comparat amb el 13% de resposta que s'obté en pacients que reben dosis baixes [118]. La mitjana de duració de la resposta és de 54 mesos [119]. La interleuquina-2 també s'utilitza en combinació amb altres fàrmacs, però encara no és clar si això promou l'obtenció de millors resultats. Així doncs, el tractament amb elevades dosis de IL-2 es presenta com a molt efectiu per a un subgrup de pacients que presenten la vessant metastàtica de la malaltia. La identificació de característiques predictives de la resposta a aquest fàrmac podria representar un gran avanç, i s'estan realitzant grans esforços per tal d'identificar pacients amb ccRCC que presenten una resposta a IL-2 lligada a característiques patològiques i a nivells d'expressió de l'anhidrasa carbònica IX (CA IX).

- c) Teràpia adjuvant

Donat l'elevat grau de recurrència del RCC després de la nefrectomia, es fa necessari el desenvolupament d'una aproximació adjuvant especialment per pacients que presenten un alt risc a patir la malaltia en estat avançat. Malgrat tot, la quimioteràpia convencional, l'interferó alfa o la IL-2 [120] no semblen ser efectius com a teràpies adjuvants. S'estan realitzant aproximacions enfocades a desenvolupar vacunes tumorals i un anticòs monoclonal dirigit específicament contra la CA IX.

- d) Teràpies dirigides contra dianes moleculars específiques

Entre els múltiples fàrmacs disponibles per a tractar la vessant metastàtica de la malaltia trobem els inhibidors quinasa: Sunitinib, Sorafenib i Pazopanib (Veure FIGURA 8):

- El Sunitinib ha estat avaluat en base a la seva activitat inhibidora davant 80 quinases diferents, algunes de les quals estan implicades en creixement tumoral, angiogènesi i metastasi [121,122]. Aquest fàrmac és capaç d'inhibir una àmplia varietat de receptors tirosina quinasa incloent

els receptors del VEGF (VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3), receptors PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) (PDGFR α i PDGFR β) i el receptor factor d'*stem cells* (KIT).

- El Sorafenib té com a dianes a un ampli espectre de quinases, però la seva activitat inhibidòria és dèbil si es compara amb el Sunitinib.
- El Tensirolimus, un potent inhibidor de la via de senyalització PI3K/Akt/mTOR és sovint una de les teràpies triades en el tractament del RCC metastàtic amb una mala prognosi [123]. Es tracta d'un anàleg de la Rapamicina que s'uneix a la proteïna d'unió a FK506 (FKBP12). El complex Tensirolimus-FKBP12 s'uneix a mTOR inhibint la seva activitat quinasa per un mecanisme al·lostèric. S'ha observat que aquest fàrmac és capaç de disminuir els nivells de HIF-1 α i VEGF *in vitro* [124]. Un altre anàleg de la rapamicina, Everolimus, també ha estat aprovat pel tractament de RCC [125]. Els pacients amb RCC metastàtic que són resistents al tractament amb Sunitinib i Sorafenib són tractats amb Everolimus com a teràpia de segona línia. Un altre inhibidor de mTOR, el Deferolimus, és un altre anàleg de la rapamicina que encara no ha estat aprovat pel seu ús però que promet ser efectiu.

Donat que el VEGF es troba altament expressat en gran part dels ccRCC, el Bevacizumab, un anticòs neutralitzant, presenta bons resultats pel que fa a la inhibició de l'angiogènesi tumoral. Cal destacar en aquest punt el fet que es creu que totes les teràpies dirigides cap a la inhibició del VEGF actuen principalment a nivell de les cèl·lules endotelials que envolten al tumor més que en el tumor en si mateix [126,127]. Aquestes teràpies, inhibeixen l'angiogènesi tumoral i presenten activitat antitumoral per bloqueig de l'administració d'oxigen i nutrients a les cèl·lules tumorals. Malgrat tots els esforços realitzats al voltant de les dianes dirigides específicament contra VEGF, molts tumors acaben presentant resistència inherent o adquirida a aquests agents. En general els tumors que no són ccRCC, presenten unes taxes de resposta baixes a l'ús d'inhibidors de quinases i inhibidors de mTOR.

Els inhibidors MET estan en fase d'assaig clínic i han demostrat tenir activitat pel subtipus de RCC papil·lar. De la mateixa forma, Sunitinib i Sorafenib inhibeixen el proto-oncògen KIT, el qual es troba sobreexpressat en RCC cromòfob [128].

Marcadors genètics i epigenètics estan emergent com a prometedors biomarcadors que permetran predir la resposta a la teràpia de diversos tumors sòlids. Un major coneixement de la quimioresistència i dels biomarcadors disponibles, permetrà l'elaboració d'una estratificació de pacients que es podran beneficiar o no de la teràpia existent.

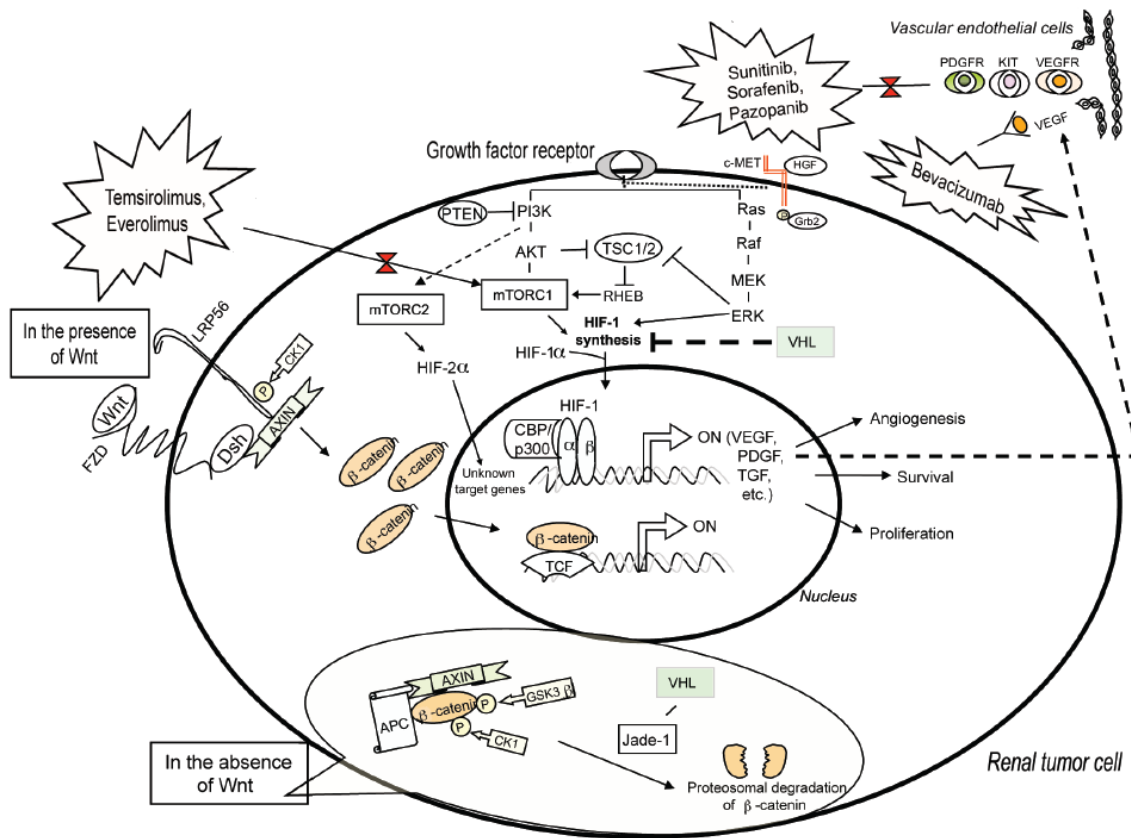


Fig. 8 | Representació esquemàtica d'una selecció de vies de senyalització i de teràpies específiques relacionades amb el RCC. Les cascades de senyalització angiogèniques i de proliferació cel·lular són sobreexpressades en les cèl·lules tumorals de RCC. El VEGF i altres factors de creixement relacionats, són secretats per les cèl·lules tumorals estimulants la senyalització angiogènica en cèl·lules endotelials que envolten el tumor. En resposta a la senyalització per factors de creixement mediada per VEGF, PDGF i receptors KIT, Els efectors PI3K i Ras activen els factors de transcripció HIF, els quals a l'hora promouen l'expressió de gens necessaris per a la proliferació cel·lular i l'angiogènesi en cèl·lules endotelials. A més de les vies angiogèniques, les vies de Wnt i HGF es troben també sobreexpressades en cèl·lules tumorals de RCC. Mentre les teràpies dirigides contra el VEGF pel RCC metastàtic es centren en el bloqueig de la senyalització angiogènica en cèl·lules endotelials que envolten el tumor, els inhibidors de mTOR actuen directament sobre les cèl·lules tumorals, per tal de suprimir el creixement tumoral.

Adaptat de Banumathy et al. [129]

2.10 Biomarcadors en el ccRCC

El caràcter del ccRCC ve marcat per la manca de senyals d'alarma que evidencien la seva aparició, de manera que els tumors es detecten principalment quan ja es troben en fases de la malaltia avançada. És per aquest fet, que es fa necessari trobar un biomarcador no invasiu per a la detecció primerenca de la malaltia, sense haver d'esperar al diagnòstic accidental de la patologia per estudis d'imatge destinats a altres dolences.

S'han seguit dues aproximacions per tal de trobar marcadors tumorals pel RCC: (1) La recerca d'antígens específics pel RCC i (2) La determinació d'alteracions en els nivells d'expressió de molècules que participen en les principals vies metabòliques, respecte els seus nivells en cèl·lules normals.

Per tal abordar la primera estratègia, s'han trobat marcadors antigènics com el RCC-Ma que són específics per cèl·lules del túbul proximal però que no són capaces de distingir cèl·lules malignes de cèl·lules normals i requereixen de la disponibilitat de teixit pel seu anàlisi [130]. Altres marcadors proposats com l'antigen MN/C9, és detectat amb l'anticòs G250; malgrat no es coneix si l'antigen és expressat en estadis primerencs de la malaltia o si és específic pel RCC [131,132]. Altres anticòsos que són específics pel ronyó, tenen limitacions per la manca d'especificitat pel RCC i/o pel requeriment de mostres tissulars per a la seva detecció [133]. Per altres antígens ha estat descrita la seva expressió en casos de RCC però mostren baixa especificitat o són expressats en els darrers estadis de la malaltia [134,135,136]. Respecte la recerca d'intermediaris de les principals vies metabòliques, un isoenzim de la piruvat quinasa ha estat suggerit com a biomarcador; malgrat això, els nivells enzimàtics són variables i presenten baixa sensibilitat pel RCC no metastàtic [137,138,139]. La Vinculina, la ferritina sèrica i altres proteïnes sobreexpressades en la progressió tumoral, han estat suggerides com a biomarcadors [140-145], però presenten manca d'especificitat pel RCC i/o requereixen mostra tissular per a la seva detecció. A més, estudis moleculars i/o citogenètics han demostrat anormalitats genètiques freqüents en RCC. La identificació d'aquestes anormalitats, incloent metilacions en el DNA [146,147], han estat presentades com a eines per a la diagnosi i la classificació clínico-patològica de

la malaltia, malgrat totes elles requereixen de mostra de teixit, cosa que limita el seu ús com a marcador clínic.

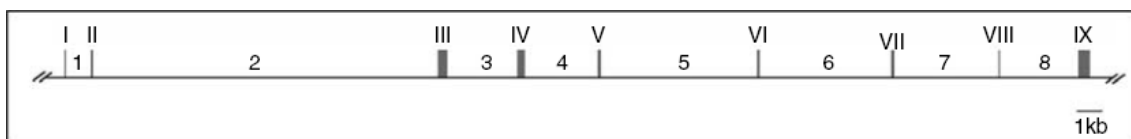
3. El receptor del virus de la hepatitis A-1 (hHAVcr-1)

Amb l'objectiu d'identificar nous marcadors de diagnòstic i progressió del carcinoma renal de cèl·lula clara, subtipus de RCC que presenta una major incidència a la població, al nostre laboratori es va realitzar un estudi comparatiu entre l'expressió de RNAs missatgers de l'àrea tumoral i normal de teixits provinents de pacients amb ccRCC, utilitzant la tècnica de RAP-PCR (*RNA-based arbitrarily primed polymerase chain reaction*). Una de les bandes diferencialment expressada en teixit tumoral respecte el teixit normal, corresponia al gen del receptor del virus de la hepatitis A-1 (hHAVcr-1) [148].

3.1 El gen hHAVcr-1

L'organització genòmica de hHAVcr-1, d'acord amb les bases de dades de GenBank, consisteix en 9 exons que s'estenen en un total de 38.7 kb.

Les anàlisis per la tècnica de FISH demostren que, hHAVcr-1 es troba al cromosoma humà 5q31.1-32.2. Anàlisis computacionals, revelen l'existència d'un pseudogen localitzat al cromosoma 19, malgrat això, les anàlisis per FISH no mostren un senyal específic per hHAVcr-1 a aquest cromosoma [148]. A la FIGURA 9 es pot veure l'organització genòmica deduïda, així com una imatge il·lustrativa de les anàlisis per FISH del gen.



hHAVcr-1 deduced genomic organization				
Exon			Intron	
No.	Size (bp)	Position	No.	Length (bp)
I	39	1-39	1	1,000
II	58	40-97	2	12,700
III	333	98-430	3	2,500
IV	276	431-706	4	3,200
V	108	707-814	5	6,600
VI	56	815-870	6	5,200
VII	115	871-985	7	4,500
VIII	34	986-1019	8	3,000
IX	416	1020-1435	-	-

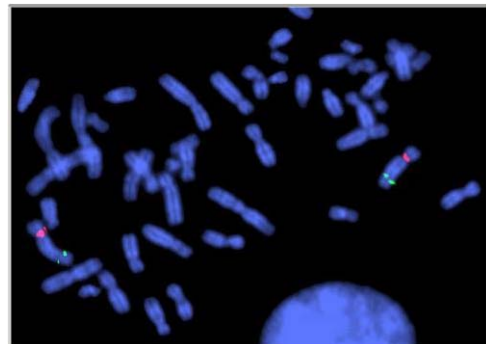
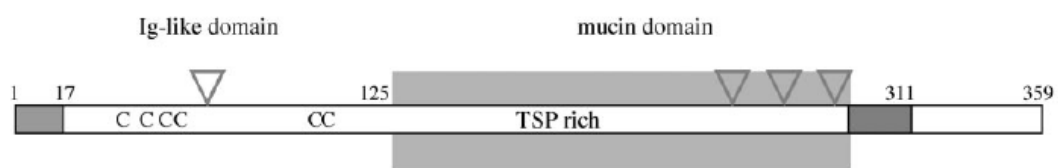


Fig. 9 Organització genòmica de hHAVcr-1 segons la base de dades GenBank i anàlisi de Fish

Adaptat de Vilà et al. [148]

3.2 La proteïna hHAVcr-1

El receptor del virus de la hepatitis A-1 (hHAVcr-1) també conegut com a *Kidney Injure molecule-1* (KIM-1) i *T cell Ig mucin* (TIM-1) [149], és una glicoproteïna de membrana tipus I de 359 aminoàcids que conté, a la seva regió extracel·lular, un domini tipus immunoglobulina amb sis cisteïnes, dos llocs d'N-glicosilació i un domini ric en seqüències en tàndem *Thr/Ser/Pro* característic de les proteïnes O-glicosilades tipus mucina. La seva regió citoplasmàtica és relativament curta i conté dos residus tirosina conservats i un motiu de fosforilació tirosina quinasa, QAEDNIY (Veure FIGURA 10).



Adaptat de Bailly *et al.* [150] Fig. 10 Dominis estructurals de hHAVcr-1

La família de proteïnes KIM/TIM/HAVcr està constituïda per vuit membres en ratolins, sis membres en rata i tres membres en humans [151,152]. El primer homòleg identificat, va ser una proteïna de mico verd africà clonada com a receptor del virus de la hepatitis A -1 (HAVcr-1) [153]. Dos homòlegs humans van ser clonats seguidament, un d'ells provinent de fetge i l'altre de ronyó. Un va ser clonat com homòleg de KIM-1 [154] i l'altre com a homòleg de HAVcr-1. Aquests dos homòlegs humans són idèntics excepte en la regió C-terminal dels seus dominis citoplasmàtics (Veure FIGURA 11).

```
> human KIM-1(a)                334 aa
> human KIM-1(b) (HAVcr-1)     359 aa

MHPQVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCCHYSGAVTSMCWNRGSCSLFTCQNG  60
IVWTNGTHVTYRKDTRYKLLGDLRRDVSLENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITV  120
SLEIVPPKVTTPPIVTTVPVTTVVRTSTTVPTTTTVPTTTVPTTMSIPTTTTVPTTMTVS  180
TTTSVPTTTSIPTTTSVPVTTTVSTFVPPMPLPRQNHEPVATSPSSSPQPAETHPTLQGA  240
IRREPTSSPLYSYTTDGN1TVTESSDGLWNNN2Q3QLFLEHSLLTANTTKGIYAGVCISVL  300

VLLALLGVIIAKKYFFKKEVQQL { RPHKSCIHQRE 334
                           SVSFSSLQIKALQNAVEKEVqaedniyIENSLYATD 359
```

Fig. 11 | Seqüència peptídica d'hHAVcr-1. Es representen els 323 aminoàcids comuns entre les molècules KIM-1a i KIM-1b (hHAVcr-1). La putativa seqüència senyal es troba subratllada. El domini transmembrana es troba doblement subratllat. Els quatre punts d'N-glicosilació putatius es troben requadrats en gris clar i en lletres minúscules es representa el motiu de fosforilació QAEDNIY.

L'Anàlisi de l'estructura genòmica i dels productes de cDNA indica que són variants d'*splicing alternatiu* i revelen que KIM-1 és la forma majoritàriament expressada en fetge [155] mentre que hHAVcr-1 és la forma majoritària en ronyó. La variant provinent de fetge no presenta el motiu de fosforilació tirosina quinasa mentre que la segona variant, majoritàriament expressada en ronyó, conté dos residus tirosina conservats i un motiu de fosforilació tirosina quinasa.

La proteïna hHAVcr-1 es troba altament expressada en cèl·lules epitelials del túbul proximal renal que han patit un dany agut, ja sigui provocat per processos d'isquèmia [156] o per agents tòxics [157], i es localitza principalment a la membrana apical de les cèl·lules proximals que han patit un major dany. També s'expressa en altres condicions on els túbuls proximals són desdiferenciats, incloent el carcinoma renal cel·lular [158], casos de nefrotoxicitat crònica provocada per la ciclosporina [159] i en casos de malaltia renal poliquística [160].

3.3 Funció de hHAVcr-1 al ronyó

Les estructures epitelials en els diferents òrgans desenvolupen diverses i complexes funcions, mostrant diferents respostes al dany cel·lular. L'epiteli renal és particularment susceptible al dany, donat el caràcter del seu subministrament de sang i la seva capacitat de concentrar toxines [161]. Aquest dany, es materialitza en deficiències funcionals per equilibrar els nivells de sals i aigua, en una incapacitat de secretar toxines metabòliques, i en una resposta inflamatòria innata [162]. La secció malmesa de la nefrona pot ser remodelada, portant a un recuperació funcional completa, i representant així, un model general de remodelació epitelial després d'un dany. El dany de la cèl·lula epitelial renal és una característica de moltes malalties renals tant cròniques com agudes. Les característiques morfològiques d'aquest dany a les cèl·lules epitelials del túbul proximal passen per la pèrdua del *brush border* característic de la cèl·lula, la pèrdua de la polaritat cel·lular, la desdiferenciació i l'apoptosi. A mesura que el dany va avançant, les cèl·lules epitelials no viables i necròtiques es van desenganxant de la membrana basal i contribueixen a la obstrucció intraluminal del túbul. Les cèl·lules desdiferenciades que sobreviuen,

difonen sobre la membrana basal, pateixen mitogènesi per acabar rediferenciant i restablint la polaritat epitelial normal, resultant en el correcte funcionament de l'epiteli renal [163].

La proteïna hHAVcr-1 es troba sobreexpressada en pacients amb carcinoma renal cel·lular de cèl·lula clara (ccRCC) [158]. El carcinoma renal cel·lular (RCC), de la mateixa forma que el dany tubular renal, està associat a processos de desdiferenciació cel·lular del túbul proximal. hHAVcr-1, confereix a les cèl·lules epitelials, la capacitat de reconèixer i fagocitar cèl·lules mortes que són presents en un ronyó post-isquèmic i que contribueixen a la obstrucció de la llum del túbul que caracteritza els processos de dany renal agut (AKI). hHAVcr-1 és un receptor fosfatidilserina que reconeix a les cèl·lules apoptòtiques i les redirigeix cap als lisosomes. De la mateixa forma, serveix com a receptor per a lipoproteïnes oxidades. Donades aquestes propietats, la proteïna hHAVcr-1 passa a ser l'únic receptor fosfatidilserina no-mieloid que transforma cèl·lules epitelials en fagòcits semiprofessionals [164,165]. A més d'aquesta facilitació de la neteja del *debris* apoptòtics de la llum del túbul, hHAVcr-1, podria jugar un paper important en limitar la resposta autoimmune al dany, donat que es coneix que en molts sistemes, la fagocitosi dels cossos apoptòtics és un mecanisme per tal de limitar la resposta proinflamatòria.

3.4 *Shedding* d'hHAVcr-1

Nombroses proteïnes transmembrana pateixen processaments proteolítics que tenen com a resultat l'alliberament del domini extracel·lular soluble, altrament anomenat ectodomini, el qual pot presentar funcions de senyalització autocrina i paracrina [166]. Aquest procés que rep el nom de *shedding*, pot ser activat per l'ester de forbol PMA, mitjançant l'activació de la proteïna quinasa C, i té lloc a la regió contigua a la membrana cel·lular. Es tracta d'un procés que pot ser bloquejat per inhibidors de metal·loproteases [167]. No existeix una aparent semblança entre els punts pel que es dona el *shedding* en diferents proteïnes, ni tan sols ha estat identificada una seqüència consens per la que es doni aquest procés preferentment [168]. S'ha hipotetitzat amb la possibilitat que diferents canvis estructurals en les proteïnes, podrien permetre l'accés de la

proteases a les regions pròximes a la membrana d'aquestes proteïnes *alliberades* [169].

El receptor del virus de la hepatitis A-1, i més concretament el seu domini extracel·lular, és alliberat de forma constitutiva dins el medi de cultiu de línies cel·lulars que expressen la proteïna endògena o recombinant. Aquest processament proteolític, té lloc a l'àrea propera a la regió transmembrana i es dona per un mecanisme depenent de metalloproteases [150], essent un procés que es dona tant *in vitro* com *in vivo*, ja que s'ha trobat el fragment de la proteïna a la orina de pacients amb necrosi tubular aguda i RCC (Veure FIGURA 12).

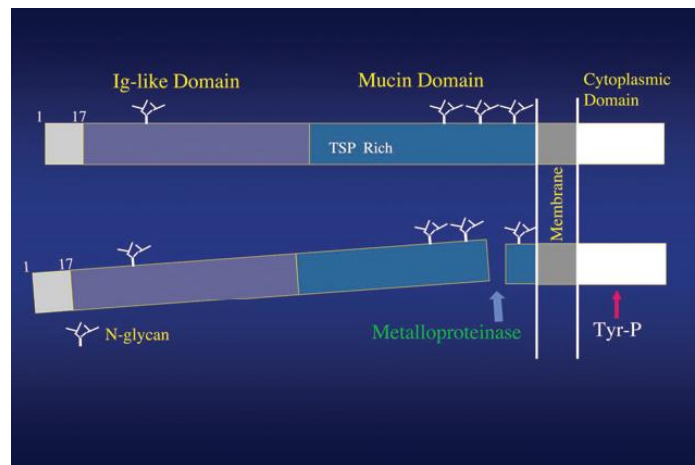


Fig. 12 Estructura de hHAVcr-1 i punt de tall durant el procés de *shedding*.

Adaptat de Bonventre *et al.*[170]

Se sap que el procés de *shedding* d'aquesta proteïna, pot ser activat pel pervanadat, un potent inhibidor de les proteïnes tirosina fosfatases i per tant, molècula capaç de modular els processos cel·lulars dependents de fosforilació de certes proteïnes [171]. És conegut doncs, que el tractament amb pervanadat condueix a l'activació de les MAPKs (*Mitogen-Activates Protein Kinase*) [172,173]. Les MAPKs participen en nombroses vies de senyalització cel·lular i és coneguda la implicació del pervanadat en l'activació de ERK i p38 MAPK en cèl·lules d'adenocarcinoma renal humà 769-P. Donat que el pervanadat activa p38 abans que es detecti el fragment alliberat de hHAVcr-1 i que la inhibició de p38 atenua fortament el *shedding* induït per pervanadat, es creu que la via de p38 participa en el procés de *shedding* accelerat induït per pervanadat en la

proteïna hHAVcr-1. Malgrat L'activació de ERK pel pervanadat, la manca d'efecte amb l'ús de l'inhibidor MEK, suggereix que aquesta via és menys important per la regulació del procés de *shedding* accelerat que p38. De la mateixa forma, es tenen evidències de que la via de ERK (però no la de p38) regula el procés de *shedding* constitutiu de l'ectodomini de hHAVcr-1. La regulació diferencial del *shedding* constitutiu de la molècula per la via de ERK i del *shedding* accelerat per la de p38 suggereix que el procés és de rellevància fisiològica i que es troba estretament regulat.

El fragment de hHAVcr-1 soluble, resultant del procés de *shedding*, constitueix un biomarcador urinari d'elevada sensibilitat en casos de dany tubular humà [174], i es troba sota investigació per esdevenir un biomarcador urinari i de teixit en casos de carcinoma renal cel·lular [175]. Malgrat les múltiples evidències de la seva utilitat clínica, la regulació del mecanisme subjacent al procés es troba poc caracteritzat.

3.5 La proteïna hHAVcr-1 com a biomarcador

Vàries característiques de hHAVcr-1 fan pensar en aquesta proteïna com a un bon biomarcador pel ccRCC:

- És un biomarcador urinari sensible pel dany del túbul proximal.
- hHAVcr-1 presenta especificitat per tumors d'origen renal.
- Es coneix l'existència d'una correlació entre els nivells de hHAVcr-1 en orina i la mida del tumor.
- La detecció de hHAVcr-1 en orina pot ser usat com una eina de mesura no invasiva per la diagnosi del RCC en tots els estadis de la malaltia.
- L'expressió de hHAVcr-1 en els nòduls limfàtics pot servir en el diagnòstic tissular de la malaltia metastàtica.

Per tot això, es pensa en l'ectodomini de hHAVcr-1 com a marcador urinari primerenc d'una malaltia clínicament silent.

4. Vies de senyalització implicades en el desenvolupament del ccRCC

A banda de les vies de senyalització angiogèniques i JAK/STAT de les quals en parlarem amb més detall en apartats posteriors, el ccRCC presenta alteracions en les cascades de senyalització següents:

a) Via PI3K/AKT/mTOR

La proteïna quinasa B (Akt) i el *mammalian target of rapamycin* (mTOR) són claus en processos oncogènics com la proliferació cel·lular, la supervivència i l'angiogènesi. Els inhibidors de mTOR presenten resultats esperançadors en assajos clínics en fase I per ccRCC. La unió autocrina de VEGF i PDGF als seus receptors tirosina quinasa (VEGFR, PDGFR i KIT) en cèl·lules tumorals d'RCC activen a PI3K que a l'hora promou la generació de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3). PIP3 recluta la quinasa citoplasmàtica AKT a la membrana cel·lular, on és activada per fosforilació a dos residus independents per PDK1 i mTOR (TORC2) [176]. L'activació d'AKT inhibeix l'apoptosi per fosforilació i la inactivació de proteïnes pro-apoptòtiques com la procaspasa 9, la proteïna membre de la família bcl2, BAD i ASK1 [177,178]. També inactiva la glicògen sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), la qual normalment fosforilaria i induiria la degradació de proteïnes tals com la ciclina D1 [179], i factors de transcripció promotors de la proliferació com c-myc, β -catenina, c-Jun i Notch. La senyalització des de VEGF i PDGF a través d'AKT també activa mTOR. Aquesta proteïna funciona com a un component de dos complexos diferents: TORC1 (sensible a la rapamicina), que regula positivament la síntesi proteica i el cicle cel·lular i TORC2 (insensible a la rapamicina), que regula la polaritat cel·lular [180,181]. El complex TORC2 també fosforila AKT, activant-la així tant per sobre com per sota de la cascada de senyalització.

Amb tot, es pot concloure dient que la regulació negativa del gen del tumor supressor PTEN està darrera de l'activació d'Akt en diferents tipus de tumors, incloent el RCC [182].

b) Senyalització via Wnt/ β -catenina

Wnts és una família de glicoproteïnes secretades que regulen la proliferació cel·lular, la diferenciació i la migració cel·lular [183]. L'efector últim de la via canònica de senyalització és el coactivador transcripcional β -catenina, que està emergent com a molècula clau en la patogènesi del càncer renal. En cèl·lules normals quiescents, la β -catenina és atrapada per un complex enzimàtic format per caseïna quinasa 1 (CK1), GSK-3 β , la proteïna APC i l'axina. La β -catenina és fosforilada als residus treonina i serina per aquest complex i marcada per a la seva degradació proteasòmica [184]. Wnt regula positivament la β -catenina, inhibint la seva fosforilació, ubiquitinació i degradació. La β -catenina estabilitzada, entra a nucli i juntament amb un membre de la família de factors de transcripció LEF-TCF (*lymphoid enhancer-binding factor 1-T cell specific transcription factor 7*), activa gens com per exemple l'oncogen myc [185]. Myc també mostra una amplificació del nombre de còpies en un grup de ccRCC primaris i RCC papil·lars [186]. Wnt té efectes sobre el creixement cel·lular i la promoció tumoral per activació de la via mTOR. TSC2 és fosforilat seqüencialment per AMPK i GSK3 per a la seva activació i conseqüent inhibició de mTOR. Wnt activa la via de mTOR per inhibició de GSK3 [187].

Existeixen diverses evidències que impliquen la via de senyalització de Wnt en el desenvolupament de RCC. Malgrat mutacions puntuals activants de β -catenina són estranyes en RCC [188], l'augment dels nivells de β -catenina per sobreexpressió induïda, ajuda al desenvolupament de tumors renals en ratolins [189,190]. En un grup de RCC, el promotor del gen APC es troba hipermetilat de forma aberrant [191], proporcionant un mitjà per alliberar la β -catenina nuclear. Peruzzi et al. van descobrir que la β -catenina és degradada per l'activitat de la E3-ubiquitina lligasa de VHL i la pèrdua de VHL permet la senyalització oncogènica de β -catenina dirigida per HGF com una nova diana per VHL, implicant la senyalització via Wnt en la patogènia del càncer renal [192]. Més evidències de l'activació de la via de Wnt en RCC són donades pel recent treball publicat per Kojima *et al.* [193] que descriu la deleció de CXXC4, un gen que codifica per Idax (un inhibidor de la via de Wnt) en casos de RCC agressiu.

Les proteïnes sFRPs, DKK2 i WIF-1 són antagonistes de Wnt i l'expressió d'aquests gens és silenciada per una hipermetilació aberrant en RCC [194,195]. Així doncs, Wnt té un paper dual en la patogènia de RCC. No només indueix la transcripció a través de l'activació de β -catenina, sinó que també estimula la traducció i el creixement cel·lular a través de l'activació de la via mTOR. Linehan *et al.* [196] suggereixen que la pèrdua de VHL podria portar a la repressió combinada de HIFs i β -catenina, que a l'hora contribuiria a la malignitat en ccRCC. Recentment, una proteïna que interactua amb VHL, Jade-1, s'ha descrit com a un nou E3 ubiquitina lligasa que ubiquitina a β -catenina conduint a la seva degradació. Jade-1 és regulat positivament per VHL i es creu que pot actuar com un supressor de tumors renals [190,191]. La pèrdua de VHL comporta una reducció dels nivells de Jade-1 i el conseqüent augment en els nivells de β -catenina, proporcionant un altre mecanisme pel qual la pèrdua de VHL promou la tumorigènesi renal.

c) Transició Epiteli-Mesènquima

A més d'un paper cabdal en la iniciació d'un tumor, la hipòxia també està implicada en la metastasi tumoral. Yang *et al.* han descrit la relació existent entre hipòxia, HIF-1 α i el factor de transcripció Twist [197] segons la qual, la sobreexpressió de Twist porta a la inducció de transicions epiteli-mesènquima (EMT).

El ronyó té un origen mesenquimal i es desenvolupa a través de transicions mesènquima-epitelials per tal de formar estructures epitelials que diferenciaran per formar nefrones madures [198]. En el ccRCC aquesta transició és revertida de forma que el que es dona són transicions epiteli-mesènquima i desdiferenciació.

La EMT és un procés essencial per a que tinguin lloc processos metastàtics. La EMT requereix de la coactivació de diversos receptors de senyalització importants tals com, FGFR, EGFR, HGF i altres proteïnes que porten a l'activació de reguladors transcripcionals com Snail, Slug, ZEB1 i SIP1 que a l'hora regulen canvis en els patrons d'expressió gènica subjacents a processos d'EMT [199]. La diana principal per aquests reguladors és la E-cadherina, que és rellevant pel manteniment d'un fenotip epitelial.

La pèrdua d'E-cadherina, condueix a la dissociació de complexes d'unió epitelial intracèl·lula. El gen de la E-cadherina és hipermetil·lat en l'11% dels RCC primaris [200] però es desconeix si aquest fet es pot associar al potencial metastàtic de la malaltia.

Dos estudis de *microarrays* independents, conclouen que miR-141 i miR-200c es troben significativament infraregulats en ccRCC en comparació amb el teixit renal normal [201]. MiR-141 i miR-200c inhibeixen la EMT afectant directament a ZEB1 i SIP1 que són repressors de la E-cadherina [202,203].

En cèl·lules metastàtiques, aquests miRNAs estan *downregulats* permetent a ZEB1 i SIP1 reprimir a la E-cadherina. SIP1 pot també activar la expressió de la vimentina, un marcador pel ccRCC [204].

Un altra funció important de la E-cadherina és la de segrestar a β -catenina al citoplasma. La repressió de la E-cadherina per Snail i Slug també allibera a la β -catenina, la qual es relocalitza al nucli i activa la transcripció de marcadors mesenquimals tals com la vimentina, FSP1, Snail i Slug entre d'altres.

Recentment s'ha trobat que la desregulació de HIF-1 α en cèl·lules VHL negatives s'uneix a la regulació negativa de la E-cadherina i la inducció de la EMT.

d) Via HGF/MET

El teixit renal és una important font de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) el seu activador, la uroquinasa [205]. Canvis en la expressió i activitat de HGF i el seu receptor c-MET han estat associats preferentment al RCC papil·lar donat que, mutacions oncogèniques en la línia germinal al gen que codifica per c-MET, són responsables d'una forma de RCC papil·lar hereditari [206,207]. Malgrat l'existència de mutacions activants puntuals a *met*, localitzat al cromosoma humà 7, es troben en només un 5-13% de RCC papil·lar esporàdic [8,80] la majoria de RCCs papil·lars mostren trisomies del cromosoma 7 sense mutació de *met*. Inhibidors de MET es troben en assajos clínics pel tractament de RCC i altres tipus de càncer [208].

Algunes de les estratègies terapèutiques per inhibir aquesta via són:

- Inhibició de l'autofosforilació de c-MET
- Bloqueig de la interacció entre HGF i c-MET

- Supressió de la cascada de senyalització de c-MET activat [209].

La unió de HGF a MET porta a la fosforilació de dos residus tirosina situats a l'extrem C-terminal de MET, el qual condueix al reclutament de proteïnes adaptadores com Gab1, Grb2, SHC, STAT3 i PI3K i a l'activació de les vies Ras/MAPK i PI3K/AKT per tal de promoure el creixement de l'RCC i la metàstasi [210].

La fosforilació de MET també indueix la fosforilació en residus tirosina de β -catenina (de forma diferent a la fosforilació en serina/treonina pel complex GSK/APC descrit anteriorment en la via de Wnt) provocant la dissociació entre β -catenina i la E-cadherina seguida de la translocació nuclear de la β -catenina i l'activació transcripcional [211].

Peruzzi *et al.* van demostrar que l'expressió de VHL en cèl·lules de RCC suprimia l'estimulació de la β -catenina via HGF i d'aquesta forma, la pèrdua de VHL a RCC capacitava la senyalització oncogènica de la β -catenina conduïda per HGF.

5. Principis de la senyalització via JAK-STAT

La via de senyalització JAK-STAT (*Janus Tyrosine Kinases-Signal Transducers and Activators of Transcription*) és activada per un gran nombre d'hormones com la prolactina, l'hormona del creixement, la leptina i l'eritropoetina així com, per citoquines i factors de creixement, via els seus receptors. La cascada de senyalització JAK-STAT, participa en la regulació de processos tals com la proliferació cel·lular, la diferenciació, la supervivència i l'apoptosi en diferents òrgans [212]. Així doncs, resulta natural que la desregulació d'aquesta via de senyalització s'associï estretament amb el desenvolupament de processos tumorals.

Les passes inicials necessàries per a l'activació d'aquesta cascada de senyalització per hormones i citoquines, requereixen de la interacció entre molècules de senyalització i dímers dels receptors, que condueixen a la rotació de parts intracel·lulars d'aquests receptors i a la conseqüent activació de receptors associats a JAKs, seguits d'un acoblament de les proteïnes STATs

amb el receptor i la posterior fosforilació, dimerització i translocació nuclear de les mateixes.

Diferents proteïnes JAKs (JAK1, JAK2 i Tyk 2) i proteïnes STATs (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6) participen en la transducció del senyal via JAK/STAT. STAT3 i STAT5 són expressades en molts tipus cel·lulars diferents, essent activades per nombroses hormones, citoquines i factors de creixement, i jugant un paper en diferents respostes biològiques, mentre que, altres proteïnes STAT com STAT1, STAT2, STAT4 i STAT6 s'expressen principalment en tipus cel·lulars específics i participen essencialment en mecanismes de defensa front l'hoste [213,214].

Els dímers d'STAT fosforilats es poden unir a elements de resposta a STAT que es troben als promotors de diversos gens, resultant en la modulació de la transcripció d'aquests gens. Sovint, les proteïnes STAT actuen en la transcripció gènica en cooperació i competició amb NFkB, AP1 i el receptor de glucocorticoids, degut a la co-localització dels seus corresponents llocs d'unió [215,216], aconseguint així, l'obertura d'un diàleg entre diverses cascades de senyalització.

Les proteïnes supressores de la senyalització per citoquines (SOCS) són capaces d'inhibir la senyalització via JAK-STAT. SOCS1 i SOCS3 són els supressors més potents i àmpliament distribuïts amb efectes d'inhibició similars als relacionats amb la senyalització via gp130, Prl (prolactina) i GH (hormona del creixement). Les regions promotores dels gens SOCS1 i SOCS3 tenen elements d'unió funcional per a STAT i l'activació de la via JAK-STAT indueix una ràpida regulació de les proteïnes SOCS per vies dependents d'STAT.

Conseqüentment amb el mecanisme de *feed-back* negatiu, la senyalització via JAK-STAT és inhibida per proteïnes SOCS en associació amb els dominis catalítics de JAKs així com per la unió de SOCs a residus tirosina fosforilats de receptors de citoquines, GH, Prl, leptina i eritropoetina (Epo) els quals actuen com a llocs d'unió per a la senyalització posterior [217,218].

L'activació d'STAT pot ser també inhibida per la interacció directa amb proteïnes inhibidores de proteïnes STAT activades (PIAS) [219].

En alguns casos, l'activació de proteïnes STAT es dona de forma independent a JAKs i implica la senyalització via receptors tirosina quinasa. Aquesta activació és induïda per la interacció directa amb receptors tirosina

quinasa i per la consegüent senyalització amb implicació d'altres quinases com Src. Així per exemple, STAT3 és activada en resposta a la estimulació per EGF, HGF, CSF-1, PDGF i altres factors de creixement i els seus corresponents receptors tirosina quinasa (ErbB-1, ErbB-2, c-met, CSF-1, PDGFR entre altres) que presenten un domini d'unió a STAT3 en els seus dominis citoplasmàtics.

A continuació es definirà en detall cadascun dels elements que componen la cascada de senyalització JAK-STAT activada per la interleuquina-6:

5.1 Interleuquina-6 (IL-6)

La interleuquina-6 (IL-6) és una glicoproteïna transmembrana de 26 kDa de pes molecular, formada per 184 aminoàcids [220]. IL-6, que juga un paper molt important en la resposta immunològica, l'hematopoesi i la inflamació [221,222] també és anomenada com a factor estimulador de cèl·lules- β , interferó- β_2 , factor de creixement d'hibridomes, o factor de creixement de la diferenciació de cèl·lules T citotòxiques.

El gen humà d'IL-6 es localitza al cromosoma 7 a les posicions compreses entre 7p15-7p21 i presenta una estructura similar al gen que codifica pel factor estimulador de colònies de granulòcit, cosa que explica la semblança existent entre ambdues citoquines [223,224].

La IL-6 és produïda principalment per monòcits i macròfags i en un petit percentatge per fibroblasts, cèl·lules endotelials, limfòcits T i B i condrocits. La producció d'IL-6 és estimulada per la interleuquina-1 (IL-1), el interferó (INF), el factor de necrosi tumoral (TNF), lipopolisacàrids i virus DNA i RNA [223].

La Interleuquina-6 és una citoquina multifuncional amb efectes pliotròpics. La seva importància rau en el seu paper en l'estimulació de la diferenciació dels limfòcits B i la inducció de la diferenciació permanent dels limfòcits B en cèl·lules plasmàtiques que produeixen diferents tipus d'immunoglobulines. IL-6 estimula els limfòcits T a la producció de interleuquina-2 (IL-2) i a la síntesi dels seus receptors. Ambdues citoquines, IL-6 i IL-1, activen també els limfòcits T, els quals reconeixen antígens i estimulen la proliferació i la diferenciació de limfòcits citotòxics en presència de IL-2. La IL-6 responsable de l'activació dels

limfòcits T, és alliberada per monòcits [224]. Aquesta citoquina, juntament amb la interleuquina-3 (IL-3) activa la proliferació i diferenciació de cèl·lules progenitores, principalment progenitors megacariòcits [223], però també progenitors macròfag-granulòcit [224]. IL-6 té un efecte directe sobre megacariòcits utilitzant receptors específics i també, de forma similar a la trombopoetina, participa en la síntesi de plaquetes [225]. IL-6 estimula el creixement de queratinòcits, indueix la proliferació de neurones i augmenta la producció de VEGF [221,226]. Donat que és ben conegut el paper d'aquesta citoquina pro-inflamatòria en l'activació i la diferenciació de limfòcits Tc i cèl·lules *Natural Killers* (NK), la via dels efectes anticancerigens d'IL-6 és utilitzada en el desenvolupament de teràpies contra el càncer.

IL-6 pertany juntament amb IL-11, LIF (*leukaemia inhibitory factor*), OSM (*oncostatin M*), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (*cardiotrophin-1*) i CLC (*cardiotrophin-like cytokine*) a una família de interleuquines que rep el nom de interleuquines tipus IL-6. Les citoquines tipus IL-6 s'uneixen a complexos receptors de la membrana plasmàtica que contenen la cadena receptora transductora de senyal gp130 (*glycoprotein 130*). La transducció del senyal implica l'activació dels membres de la família tirosina quinasa JAK, que porten a l'activació de la família de factors de transcripció STAT. Un altra de les vies de senyalització activades per les citoquines tipus IL-6 és la cascada de les MAPK (Veure FIGURA 13).

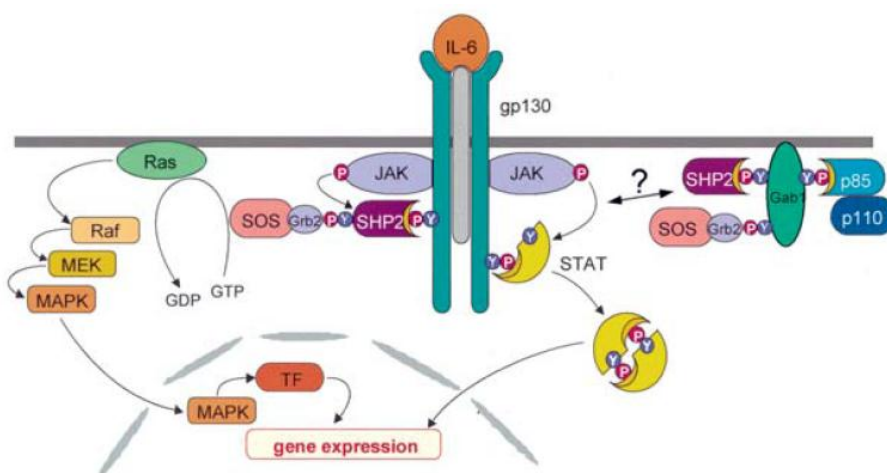


Fig. 13 | Representació de les dues vies de senyalització activades per citoquines tipus IL-6: JAK/STAT i MAPK.

Adaptat de Heinrich *et al.* [227]

a) Complexes receptors formats per citoquines tipus IL-6

Els receptors implicats en el reconeixement de les citoquines tipus IL-6 poden ser dividits en dos grups: els receptors α de no senyalització (IL-6R α , IL-11R α i CNTFR α) i els receptors transductors de senyal (gp130, LIFR, OSMR). Aquest darrer grup, es troba associat a JAKs i arriba a ser fosforilat en residus tirosina en resposta a l'estimulació per citoquines. Cadascuna de les citoquines tipus IL-6 es caracteritza per un cert perfil de reclutament pel receptor que en tots els casos implica, com a mínim, a una molècula gp130. IL-6, IL-11 i CNTF s'uneixen específicament a les seves respectives subunitats receptores α . Només el complex format per citoquina i receptor α , recluta de manera eficaç a la subunitat transductora del senyal. IL-6 i IL-11, són les úniques citoquines tipus IL-6 que senyalitzen via homodímers de gp130. La resta de la família ho fa via heterodímers tals com els formats per gp130 i LIFR o gp130 i OSMR. Malgrat que gp130 és expressada de forma ubíqua, el nombre de cèl·lules que responen a certes citoquines tipus IL-6 és limitada, ja que l'expressió d'altres subunitats receptores, especialment dels receptors α , és molt més restringida i es troba estretament regulada. La funció dels receptors α donant servei a cèl·lules sensibles a determinades citoquines, pot ser portada a terme per la forma soluble d'aquests receptors α deixant anar les seves regions transmembrana i citoplasmàtica. Aquesta és una de les estranyes situacions en les quals un complex format per una citoquina i el seu receptor soluble poden actuar de forma agonista en comptes d'antagonísticament.

Les formes solubles dels receptors de citoquines *in vivo* es formen per proteòlisi limitada (*shedding*) de receptors units a membrana o per translocació d'una forma d'*splicing* alternatiu [228].

En el cas d'IL-6, l'escenari és molt més complex, donat que tant les formes solubles de IL-6R α (sIL-6R α) com les de gp130 (sgp130) es troben presents al sèrum humà. És conegut que la forma soluble de IL-6R α potencia l'activitat antagonista de la forma soluble de gp130. Així doncs, la combinació natural entre sIL-6R α i sgp130 actua com una mena de tampó que modula les respostes sistèmiques a la IL-6 circulant [229].

b) Interacció entre receptor i JAK

Tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, les citoquines de la família d'IL-6 indueixen l'activació de les tirosina quinases de la família JAK. Les cadenes de transducció de senyal gp130, LIFR i OSMR s'uneixen a JAK1, JAK2 i TYK2 [230,231]. D'aquests, se sap que JAK1 juga un paper essencial, ja que en cèl·lules que no presenten JAK1 la transducció de senyal de IL-6 és troba molt malmesa [232,233].

La interacció entre gp130 i JAK1 és molt estreta i de llarga durada: una anàlisi per FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) amb proteïnes de fusió fluorescents va posar en evidència que JAK1 no difon com una proteïna citoplasmàtica típica. La seva mobilitat és 100 cops menor i similar a la de la proteïna transmembrana gp130. Així doncs, la immobilització de gp130 per anticossos porta a la consegüent immobilització de JAK1, indicant que no existeix un ràpid intercanvi de JAK1 entre els diferents receptors.

JAK s'uneix a la regió proximal de membrana dels receptors de citoquines, els quals contenen motius conservats tipus box1 i box2. La deleció dels motius rics en prolina box1 o la mutació de dos residus prolina, impedeix la unió de JAK a gp130, OSMR o LIFR [234,235]. El domini box 2 de gp130, una seqüència dominada per aminoàcids hidrofòbics seguits d'aminoàcids amb càrrega, contribueixen a la unió de JAK. També la regió entre motius box1 i 2 de gp130 demostra tenir una vital importància cosa que posa en evidència que la interacció de superfície amb JAK pot involucrar múltiples punts de contacte amb el receptor.

En contra del que passa amb el motiu de reclutament d'STAT que té un caràcter modular, la regió de reclutament de JAK perd la seva funcionalitat després d'interaccionar amb la cadena receptora de la citoquina.

El receptor no només serveix com a lloc d'acoblament per a JAKs. A més, certs residus de gp130 han demostrat ser essencials per a l'activació de JAK així doncs, s'ha identificat que la substitució de Trp₆₅₂ per alanina (W652A) a la regió box1 no té efecte en l'associació de JAK1 però aboleix la seva activació. De la mateixa manera, la transducció del senyal es malmet si només una sola cadena del dímer gp130 presenta la mutació esmentada [234].

Mutacions amb conseqüències similars, és a dir, que provoquin la no activació de JAK però si la seva associació, han estat descrites per la EpoR [236] indicant que els receptors de citoquines contribueixen en general al procés d'activació de JAK. L'estructura general de JAK es mostra a la FIGURA 14. El domini tirosina quinasa de la regió C-terminal és precedit per un domini pseudoquinasa, que a l'hora està mancat d'activitat catalítica, però que regula l'activitat del domini quinasa [237]. JAK també conté un domini predit SH2 (Src homology 2).

La regió N-terminal de JAK comprèn un domini FERM (*fourpoint-one, enzim, radixin and moesin*) que és cabdal per l'associació amb el receptor. Els dominis FERM comprenen tres subdominis: dominis F1, F2 i F3 que conformen una estructura en forma de trèvol. Es creu que existeix una interacció potencial entre el domini quinasa i el domini FERM. Existeixen alguns treballs que descriuen a altres proteïnes quinases que estan associades amb la transducció de senyal de citoquines tipus IL-6, entre elles destaca la PKC δ (protein kinase C δ), quinasa implicada en la fosforilació en residus serina d'STAT3, que forma un complex amb gp130 després de l'estimulació amb IL-6. PKC δ afavoreix l'associació d'STAT3 amb el receptor, involucrant la fosforilació a Thr₈₉₀ de gp130 [238].

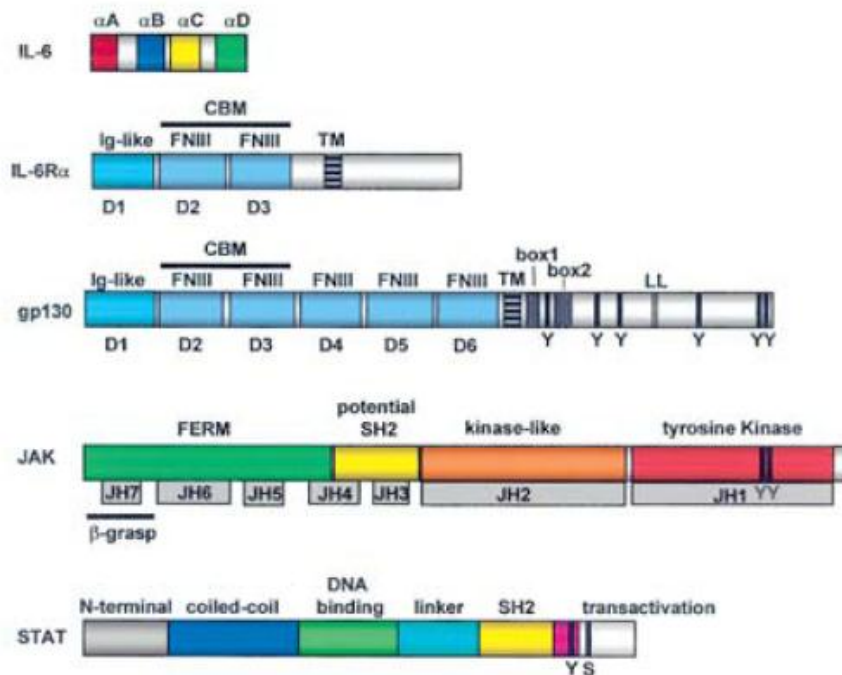


Fig. 14 | Organització estructural dels components de senyalització de les citoquines tipus IL-6. Es mostren residus Tyr i Ser de gp130, JAK i STAT rellevants, que pateixen fosforilacions.

Adaptat de Heinrich *et al.* [227]

5.1.1 Interleuquina-6 com a factor pronòstic

La Interleuquina-6 juga un paper principal en la patogènesi i el desenvolupament del càncer. Així doncs, ajuda al tumor a créixer, a través de la inhibició de l'apoptosi de cèl·lules canceroses i la inducció de l'angiogènesi tumoral [222]. IL-6 està implicada en la regulació del creixement de tumors sòlids de forma paracrina i autocrina [222]. És coneguda també la contribució d'aquesta citoquina a la proliferació de cèl·lules de càncer de colon i d'altres càncers, especialment aquells que es troben en un avançat estat de desenvolupament [239]. D'aquesta forma, les concentracions d'IL-6 depenen del grau tumoral i correlacionen amb la supervivència.

Investigacions actuals s'han centrat en l'ús d'IL-6 com a factor pronòstic pel càncer. Les concentracions d'IL-6 en sèrum, són elevades en pacients amb càncer d'endometri [240], càncer de pulmó [241], càncer de colon [242], càncer de mama [222], i càncer d'ovari [243]. De la mateixa forma, s'ha trobat també una sobreexpressió d'IL-6 i del seu receptor (sIL-6R) en càncer de mama [244] i càncer prostàtic [221] on la concentració d'aquesta interleuquina i del seu receptor es correlacionen amb el grau histològic.

A continuació es posen com a exemple, per tal d'il·lustrar el paper d'IL-6 com a factor pronòstic del càncer, investigacions realitzades en càncer de colon i càncer de mama:

Estudis recents, posen en evidència el paper rellevant que té IL-6 en el càncer de colon, per exemple, on es coneix que la concentració d'IL-6 en el sèrum de pacients amb aquest tipus de càncer, està associada amb la progressió de la malaltia, el grau histològic o la invasió a la càpsula de *Bowel* [245]. Belluco *et al.* van demostrar no només la presència d'elevats nivells de la citoquina en aquests pacients, sinó també l'associació existent entre aquests nivells i la progressió de la malaltia. Més enllà d'aquestes dades, en el esmentat estudi es demostra com concentracions sèriques d'IL-6 per sobre dels 10 pg/ml poden ser negatives per pacients amb càncer de colon i utilitzades com a factor pronòstic independent. Nikiteas *et al.* [246] han

demostrat que les concentracions sèriques d'IL-6, CRP (*C-Reactive Protein*) i TNF- α són elevades en pacients amb càncer de colon respecte un grup control. Les concentracions sèriques d'aquestes citokines es correlacionen amb la mida del tumor i estan associades a una supervivència curta. El paper de la citokina com a factor pronòstic ha estat confirmat per altres autors com Esfandi *et al.* [247] que han demostrat que el grau del tumor es correlaciona amb els nivells sèrics de la proteïna i també amb la presència d'IL-6 en cèl·lules de càncer de colon.

Zhang *et al.* [248], han demostrat la producció autocrina d'IL-6 per cèl·lules de carcinoma de mama tant *in vivo* com *in vitro*. Concentracions significativament elevades d'IL-6 es troben en pacients amb càncer de mama en estadis avançats, especialment en aquells que desenvolupen metàstasi a fetge. Aquells pacients que presenten elevades concentracions de la citokina en resposta al tractament amb quimioteràpia o hormonoteràpia, tenen un pitjor pronòstic. Aquestes dades indiquen que, els nivells sèrics d'IL-6 són un factor pronòstic independent en pacients amb càncer de mama, especialment en aquells que presenten metàstasi. Elevats nivells d'IL-6 són associats amb una supervivència més curta en comparació amb pacients amb concentracions baixes de la citokina. Els autors han demostrat la correlació existent entre IL-6 i CRP en pacients amb càncer de mama, correlació també observada en pacients amb càncer de colon [246]. Els resultats d'un estudi realitzat per Garcia-Tunon *et al.* [244] posen en evidència que elevades concentracions de la citokina i el seu receptor, es troben associades amb l'estat proliferatiu de les cèl·lules de carcinoma de mama i la sobreexpressió del gen bcl-2.

Aquestes dades, com a exemple del que passa en altres tipus de tumor, suggereixen que la teràpia basada en l'ús d'anticossos monoclonals contra IL-6, podria millorar la supervivència de molts pacients i podria ser emprat com a nova estratègia en el tractament de pacients amb càncer.

5.2 Transductors de senyal i activadors de la transcripció (STATs)

Els transductors de senyal i activadors de la transcripció (STATs) són un grup de factors de transcripció que en la seva forma no fosforilada romanen en estat de latència al citoplasma [249]. Els STATs pateixen fosforilació en els seus

residus tirosina per una varietat de tirosina quinases, incloent ambdós, receptors tirosina quinases (RTKs) i receptors no tirosina quinases (TKs) (Veure FIGURA 15).

Molts receptors de membrana, no tenen activitat tirosina quinasa intrínseca, i per tant, requereixen de la participació de la Janus quinasa (JAKs) [250]. La fosforilació d'STAT pot donar-se també per l'activació de Src i Abl [251,252].

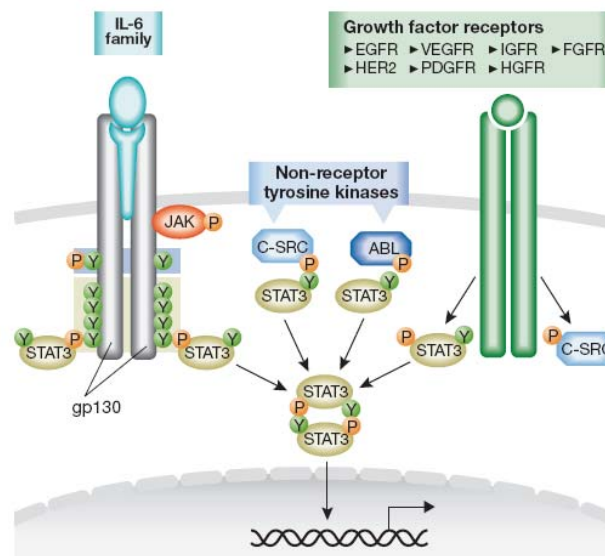


Fig.15 | Senyalització via STAT

Adaptat de Bollrath *et al.* [253]

Es coneix el paper central dels factors de transcripció STAT en la senyalització per citocines tipus IL-6. L'estructura per dominis de les proteïnes STAT comprèn des de l'extrem N- fins a l'extrem C-terminal un domini d'oligomerització, també anomenat domini *coiled-coil*, el domini d'unió a DNA, el domini d'unió, el domini SH2 i el domini de transactivació (Veure FIGURA 14). El coneixement sobre l'estructura de les proteïnes STAT deriva de la cristallització d'STAT4, STAT1 i STAT3 [254-256]. L'activació dels membres de la família STAT requereix de l'associació transitòria d'aquests amb els receptors de citocines [257,258]. Totes les citocines tipus IL-6 són potencialment capaces d'activar STAT3 i, en una menor extensió, STAT1 a través de la subunitat receptora comuna gp130 [228]. En el cas de LIFR i OSMR, s'ha observat activació d'STAT3 i STAT1 així com d'STAT5, essent OSMR l'activador més potent d'STAT5 [259]. Aquesta activació no requereix d'una fosforilació tirosínica del receptor, però és resultat d'una interacció directa entre STAT5 i JAK [260]. En el reclutament dels STATs per receptors activats hi

participen els dominis SH2 i es requereix la fosforilació dels motius tirosina dels receptors [261-263]. Mentre que STAT3 s'uneix a motius fosfo (p) YXXQ (Y₇₆₇ RHQ, Y₈₁₄ FKQ, Y₉₀₅ LPQ i Y₉₁₅ MPQ de gp130; Y₉₈₁ QPQ, Y₁₀₀₁ KPQ i Y₁₀₂₈ RPQ de LIFR) [264-266], STAT1 és reclutat per una seqüència consens més restrictiva pYXPQ (Y₉₀₅LPQ and Y₉₁₅MPQ in gp130) [264]. Després de la unió al receptor, els factors STAT són fosforilats en un únic residu tirosina (Tyr₇₀₁ per STAT1 i Tyr₇₀₅ per STAT3) [267,268]. Això condueix a la formació de dímers d'STAT actius, per la qual cosa també participen els dominis SH2 [269].

Vàries proteïnes STATs pateixen també fosforilació als seus residus serina en el domini de transactivació carboxi terminal donant com a resultat un augment en l'activitat transcripcional [270]. Després de la fosforilació dels residus tirosina i la seva posterior translocació a nucli, les proteïnes STAT s'uneixen als promotors que contenen les seqüències consens TT(N₄)AA i TT(N₅)AA [271].

STAT controla una gran varietat de gens entre els que destaquen aquells implicats en el creixement cel·lular, la supervivència i la funció immunològica [272].

Existeixen set isoformes de proteïnes STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6. D'aquestes isoformes diferents són les quatre i cinc aquelles que es troben actives en una gran varietat de càncers [273]. Malgrat això, donat que STAT1 és un supressor de creixement, no contribueix en processos d'oncogènesi [274], mentre que STAT3 i STAT5 són importants en la progressió del tumor. STAT5 es troba activada i sembla tenir importància en diverses formes de leucèmia [273]. Per altra banda, STAT3 és activa en una àmplia varietat de tipus tumorals incloent leucèmies [275], mielomes [276], càncer de mama [277], càncer de coll [278], càncer de pròstata [279] i melanoma [280].

Existeixen nombroses evidències que defineixen un paper crític de STAT3 en l'oncogènesi [281,282] contribuint mitjançant la prevenció de l'apoptosi cel·lular [283].

5.3 Senyalització via JAK-STAT i carcinogènesi

Una activació alterada de la via JAK-STAT s'ha trobat en múltiples tumors sòlids i en leucèmies [284]. En diferents models experimentals, la tumorigènesi és associada amb una expressió augmentada i/o amb l'activació de JAK1, JAK2 [285] o d'STAT3 i STAT5 [286]. Un mutant constitutivament actiu d'STAT3, ha demostrat que transforma fibroblasts de rata [287] i l'elevada expressió d'STAT5 salvatge al llinatge limfoide induïx leucèmia de cèl·lules T en ratolins [288]. A més, nivells elevats dels corresponents lligands poden ser associats a la carcinogènesi induïda per JAK-STAT: alguns exemples són models animals de pròstata i hiperplàsia de la glàndula mamària amb sobreexpressió local de Prl [289]; en humans la hiperprolactèmia és considerada com a factor de risc en càncer de mama i pròstata [290] o la sobreexpressió de l'hormona del creixement en ratolins transgènics porta a un augment en l'adenocarcinoma de mama [291].

El paper de la cascada JAK-STAT no es limita a la inducció de la carcinogènesi sinó que també existeixen condicions en les que els elements d'aquesta cascada actuen com a tamponadors de l'aparició tumoral: per exemple, el paper predominant de Tyk2 i STAT1 en molts tipus de càncer és antitumorigènic, via regulació de l'apoptosi [292] o l'activació induïda de JAK2 per Prl que prevé de la transició mesenquimal de cèl·lules de càncer de mama actuant com a supressor de la invasió [293].

6. Hipòxia tumoral i angiogènesi

En el moment que els tumors creixen fins a superar els 1 o 2 mil·límetres de diàmetre, deixen enrere les vies de subministrament de sang existents [294] i com a conseqüència, es desenvolupen àrees tissulars amb manca d'oxigen (hipòxia). La presència de regions hipòxiques van ser hipotetitzades, en un principi, en resposta a la observació de que la necrosis augmentava a mesura que augmentava la distància a la vasculatura [295]. La confirmació d'aquesta teoria inicial i la obtenció de mesures més acurades dels nivells d'oxigen tumorals, es va aconseguir mitjançant l'ús d'elèctrodes d'oxigen. D'aquesta forma, es va observar com els nivells d'oxigen en tumors eren molt variables,

amb àrees de tan sols un 0,7% d'oxigen [296]. Per tal de perpetuar el seu continu creixement i la supervivència en un ambient hipòxic, les cèl·lules tumorals, fomenten el creixement de nous vasos sanguinis des de vasos ja existents, en un procés conegut com a angiogènesi [297]. Es demostra així, que els tumors tenen una gran necessitat de vascularització, i en absència d'angiogènesi, el manteniment del tumor no es pot donar [298,299,300].

En resposta a la hipòxia, les cèl·lules tumorals activen diferents vies de senyalització cel·lular i també alguns factors de transcripció, permetent així, la supervivència d'aquestes cèl·lules front l'advers microambient d'un tumor [299]. L'activació d'aquestes vies porta com a conseqüència canvis en l'expressió gènica que permeten la supervivència cel·lular en condicions de baix oxigen, baix nivell de nutrients i d'una elevada acidesa. Així doncs, existeix una gran necessitat d'afavorir el metabolisme de la glucosa i la captació de la mateixa, cosa que es tradueix en una elevada expressió de transportadors de glucosa i d'enzims glicolítics.

Donat el microambient tòxic caracteritzat per la hipòxia i l'acidosi, hi ha una elevada expressió de factors de creixement i vies de supervivència. L'angiogènesi és facilitada per l'alliberament de factors com el VEGF que s'uneix a receptors que es troben a les cèl·lules endotelials vasculars, afavorint la seva migració i el seu creixement. A més, altres factors són alliberats aconseguint la ruptura i la reestructuració de la matriu extracel·lular, permetent així, la migració de les cèl·lules endotelials. D'aquesta forma, els tumors reestructuren la vasculatura local per tal de cobrir les seves necessitats d'oxigen i de nutrients.

Un seguiment clínic pobre, es correlaciona amb la densitat microvascular [300,301] i la hipòxia tumoral [302]. L'explicació a aquest fet és que, malgrat molts tumors estan altament vascularitzats, la vasculatura tumoral és normalment ineficient [303]. El sistema de vascularització tumoral es caracteritza per vasos sanguinis dèbils, patrons de connexió poc eficients, pèrdua d'adherència, i una anormal membrana basal [304]. Aquestes anormalitats, porten a un microambient tumoral que malgrat vascularitzat, es caracteritza per la hipòxia, l'acidosi i la necrosi [304]. Tumors amb un elevat nivell d'hipòxia porten a una pitjor prognosi pels pacients, per una gran varietat de raons: les cèl·lules adaptades a condicions d'hipòxia, tendeixen a sobreexpressar gens associats

amb l'angiogènesi i la metastasi [305], la hipòxia per altra banda, exerceix una pressió selectiva sobre la formació de tumors amb una gran resistència a l'apoptosi [306] i a més, el microambient derivat tendeix a fer augmentar els nivells de mutacions [307,308] en aquests tipus de cèl·lules.

Aquestes adaptacions condueixen a formar un tumor amb un elevat potencial per la supervivència i la metastasi. En aquest sentit, cal afegir que els tumors hipòxics tendeixen a presentar un elevat nivell de resistència al tractament amb fàrmacs i radiació [309,310,311]. Les conseqüències de tot plegat són que el creixement tumoral es veu facilitat per l'angiogènesi i l'adaptació a la hipòxia, i així, la progressió tumoral correlaciona tant amb la hipòxia com amb la vascularització.

Les teràpies antiangiogèniques s'han desenvolupat darrerament en base a la observació de que els tumors sòlids requereixen d'una vascularització per tenir un creixement sostingut [312]. Mitjançant la prevenció del creixement de nous vasos sanguinis, el tumor pot ser deprivat d'oxigen i nutrients i el seu creixement continu pot ser inhibit. És clar doncs, que els tumors presenten un requeriment absolut de vascularització i que una inhibició de l'angiogènesi pot prevenir el creixement del tumor [313,314,315,316]. Existeixen diversos assajos clínics per aquests agents que s'han desenvolupat amb èxit [317,318].

S'ha trobat també que una teràpia combinada d'antiangiogènics amb radiació i quimioteràpia proporciona un augment en la resposta al tractament [319,320,321,322,323,324]. Malgrat l'existència d'aquests assajos clínics desenvolupats amb èxit, molts dels antiangiogènics usats per si sols no semblen ser efectius [325,326]. Una explicació per a aquest fet podria ser que aquestes teràpies sovint estan dirigides contra un únic agent com el VEGF i tal i com s'ha comentat anteriorment, la vascularització és un procés complex que implica una àmplia varietat de factors [327]. En el moment que els fàrmacs siguin desenvolupats amb una major potència, de tal manera que, siguin capaços de bloquejar una gran varietat d'inductors a l'angiogènesi, serà quan els assajos clínics obtindran millors resultats ja sigui emprats per si sols o en combinació amb agents radiactius o quimioterapèutics [328].

6.1 Factor induïble per hipòxia (HIF-1)

El gen induïble per hipòxia HIF-1 és un factor de transcripció heterodimèric format per una subunitat alfa i una beta [329,330]. Ambdues subunitats pertanyen a una família de factors de transcripció que contenen un domini bàsic-hèlix-loop-hèlix (bHLH) i un domini Per/Arnt/Sim (PAS) [329], seqüències importants per la dimerització i la unió a DNA. La subunitat HIF-1 β , també coneguda com el *aryl hydrocarbon nuclear transporter* (ARNT), dimeritza amb varis membres de la família de factors de transcripció bHLH-PAS [331]. Malgrat ambdues subunitats són transcrites, en gran manera de forma contínua, HIF-1 α és degradada ràpidament en condicions normals d'oxigen i és subjecte a una acurada regulació post-traducciona. Per altra banda, HIF-1 β , és expressada constitutivament i no és subjecte a regulació per hipòxia [332].

Després de la translocació a nucli, HIF-1 s'uneix als promotors de gens que contenen elements de resposta a hipòxia i augmenta la seva transcripció [333].

Existeixen tres isoformes de la subunitat alfa, HIF-1 α , HIF-2 α , i HIF-3 α . La isoforma HIF-1 α és la que està millor caracteritzada i sembla ser la més important en la resposta cel·lular a hipòxia [332].

La subunitat HIF-2 α , també coneguda com *endothelial PAS domain protein 1* (EPAS) o *HIF-related factor* (HRF), comparteix un 48% d'analogia de seqüència amb HIF-1 α , és induïble per hipòxia i s'uneix als elements de resposta a hipòxia dels gens induïbles per hipòxia [334,335,336,337].

Malgrat compartir nombroses semblances tant a nivell estructural com funcional, HIF-1 α i HIF-2 α semblen ser induïbles per diferents estímuls [338] i tenen diferents patrons de distribució tissular [339].

La tercera variant, HIF-3 α , també coneguda com a *inhibitory PAS domain* (IPAS), esdevé una forma d'*splicing* alternatiu que elimina el domini de transactivació, i que per la seva unió majoritària a HIF-1 α front HIF-1 β es converteix en un dominant negatiu [340,341].

S'estima que HIF-1 té la capacitat de regular aproximadament seixanta gens [342] (Veure FIGURA 16). Aquests gens poden ser classificats en diferents grups en base als papers fisiològics que juguen, incloent l'angiogènesi, el

creixement, l'apoptosi, el transport d'oxigen, el metabolisme del ferro i el metabolisme energètic [343].

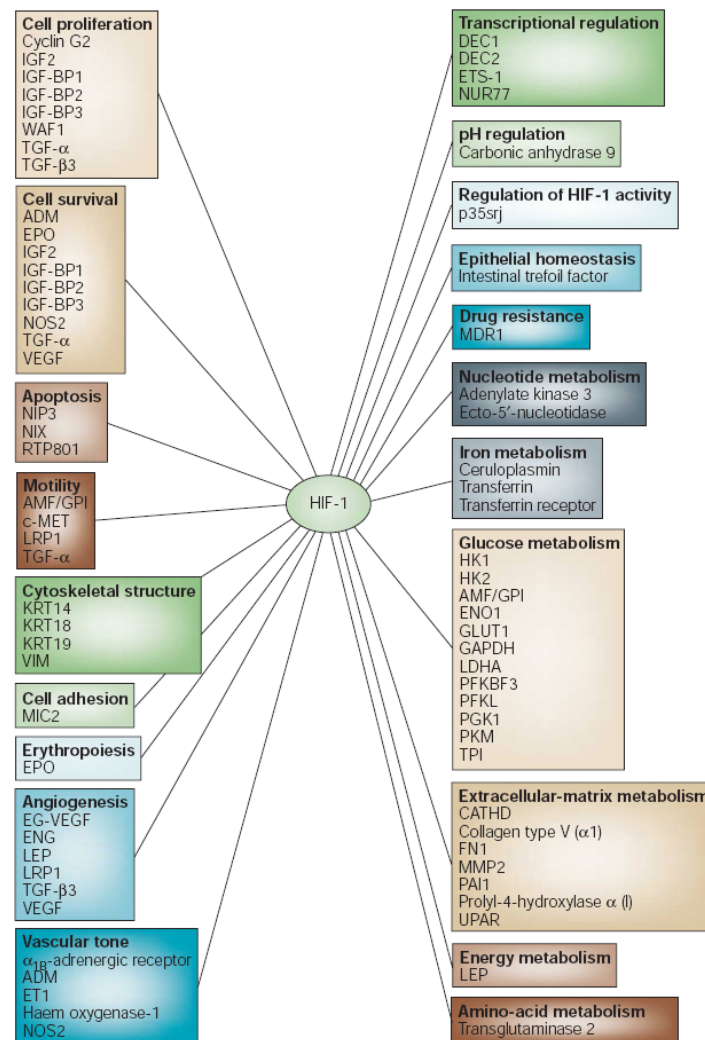


Fig. 16 | Gens transcripcionalment activats per HIF-1.

Adaptat de Semenza *et al.* [342]

Malgrat l'expressió d'alguns d'aquests gèns, tals com el VEGF, estiguin sota control de HIF-1 en una àmplia varietat de tipus cel·lulars, molts són regulats de forma específica per cada tipus cel·lular [342]. Molts d'aquest gèns, juguen papers importants en el creixement i la supervivència cel·lular, són oncogènics i la seva desregulació pot conduir al desenvolupament i progressió d'un tumor. És per això que HIF-1 α es troba sobreexpressat en una àmplia varietat de tipus de càncers [342].

Donada la importància de HIF-1 en la regulació de molts gèns, molts d'ells proteïnes oncogèniques, l'expressió i l'activitat de la subunitat HIF-1 α es troba controlada de forma molt acurada.

Malgrat les evidències existents sobre la regulació de HIF-1 α a nivell d'RNA missatger [343,344,345], els mètodes de regulació més ben documentats fan referència a l'abundància de la subunitat alfa i la regulació transcripcional de HIF-1. La regulació dels nivells de HIF-1 α , com els de les altres proteïnes, es determina per la mesura de la relació entre els nivells de síntesi i degradació de la proteïna. El nivell de síntesi proteica es determina pel càlcul de l'activitat de les vies de senyalització de creixement cel·lular mentre que la degradació es calcula en base a la disponibilitat d'oxigen.

La regulació dels nivells de HIF-1 α i de la seva activitat es dona per modificacions post-traduccionals, i aquestes modificacions inclouen hidroxilacions, acetilacions i fosforilacions. La hidroxilació de múltiples residus facilita la resposta de HIF-1 α a la hipòxia, i afecta al grau de degradació i al nivell d'activació transcripcional. Es coneix que HIF-1 α és acetilat per la acetiltransferasa ARD1, i que això facilita la seva degradació, ja que augmenta la interacció amb VHL [346]. Varis residus de HIF-1 α són fosforilats [347,348]. La funció d'aquesta fosforilació no és completament clara, però sembla que és facilitada per MAPK i probablement doni com a resultat l'activació transcripcional per afavorir la interacció amb CBP/p300.

6.1.1 Regulació de HIF-1 per hipòxia

La característica més destacable en la biologia de HIF és la inducció de la seva subunitat alfa durant la hipòxia. Sota condicions normals d'oxigen i sense una estimulació per senyals de creixement o oncogèniques, els nivells de HIF-1 α *in vitro* són molt baixos, gairebé no detectables. Això és degut a la contínua i ràpida destrucció via degradació proteasòmica en presència d'oxigen que pateix la proteïna.

La degradació de HIF-1 α durant normoxia és extremadament ràpida, i la vida mitjana de la proteïna s'estima en un temps menor als cinc minuts [349,350]. A mesura que el nivell d'oxigen disminueix, la degradació proteasòmica disminueix i la proteïna HIF-1 α s'acumula. D'aquesta forma, HIF-1 és capaç de respondre ràpidament a canvis en la concentració d'oxigen sense haver d'esperar als molt més lents processos de transcripció i traducció proteica.

La destrucció de HIF-1 α en presència d'oxigen és facilitada per supressors tumorals tals com VHL. La pèrdua de VHL, tal i com es dona en la malaltia de *Von Hippel-Lindau*, té com a resultat l'expressió normòxica de HIF-1 α i la reintroducció de VHL salvatge elimina la expressió de HIF-1 α [351]. VHL interacciona físicament amb HIF-1 α en una regió que es coneix com domini de degradació dependent d'oxigen (ODD), facilitant la seva ubiquitinització i la seva degradació proteasòmica [352] (Veure FIGURA 17).

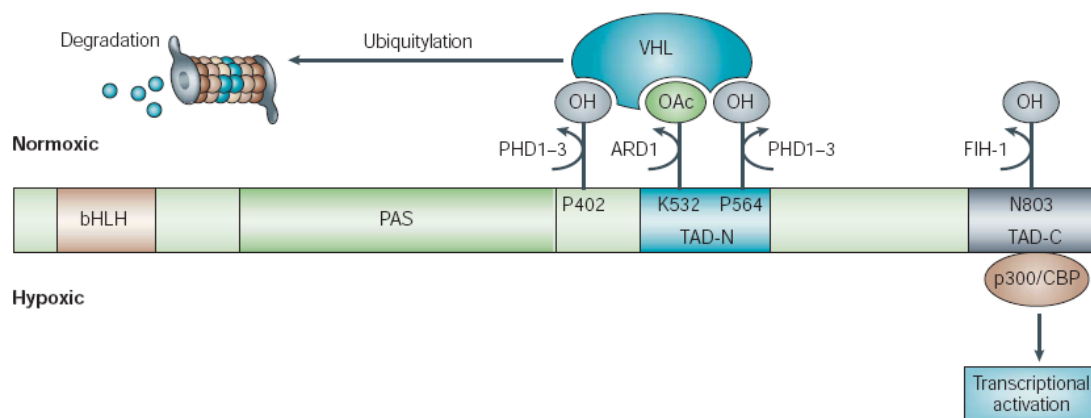


Fig.17 | Regulació de l'activitat de HIF-1 dependent d'O₂

Adaptat de Semenza *et al.* [342]

Malgrat això, se sap que la interacció entre HIF-1 α i VHL només es dona en presència d'oxigen, i que la interacció no es dona durant condicions d'hipòxia o amb tractaments amb quelants de ferro com el CoCl₂. El mecanisme pel qual es determina el nivell d'oxigen esdevé clar amb el descobriment de que VHL només és capaç d'interaccionar amb HIF-1 α quan varis residus prolina conservats es troben en estat hidroxilat [353,354,355]. Els enzims responsables de la hidroxilació dels residus prolina 402 i 564 pertanyen a un grup d'enzims que contenen dominis prolil hidroxilases (PHD). Posteriorment, es va determinar l'existència de tres enzims PHD que comparteixen una gran homologia i que faciliten la hidroxilació de HIF-1 α [356]. En condicions de normòxia, els residus prolina en els dominis ODD es troben completament hidroxilats, facilitant així la interacció amb la E3 ubiquitina ligasa VHL i la destrucció de HIF-1 α . Quan els nivells d'oxigen disminueixen, la hidroxilació als residus prolina també disminueix i la capacitat de VHL d'interaccionar amb HIF-1 α també minva. D'aquesta forma, els enzims PHD

controlen els nivells de degradació de HIF-1 α en resposta a variacions en la disponibilitat d'oxigen.

A més de l'estabilització durant condicions d'hipòxia, se sap que l'activitat transcripcional de HIF-1 també és elevada [357,358] i s'ha determinat també que aquesta és depenent de l'estat d'hidroxilació del residu asparagina 803 en el domini de transactivació de HIF-1 α (TAD). L'enzim determinat com a responsable d'aquesta hidroxilació durant condicions d'hipòxia és l'asparaginil hidroxilasa, també conegut com a factor inhibidor de HIF-1 (FIH-1) [359]. En condicions normals d'oxigen, el residu asparagina 803 és hidroxilat, fent que no sigui possible la interacció entre HIF-1 α i el co-activador transcripcional CBP/p300 [360,361,362,363,364]. Sota condicions d'hipòxia, la hidroxilació de l'asparagina es veu disminuïda, i la interacció amb CBP/p300 augmenta. D'aquesta forma, tant la quantitat de proteïna HIF-1 α com la seva activitat transcripcional es veu augmentada durant la hipòxia.

6.1.2 Regulació de HIF-1 per factors de creixement

A més de la regulació per canvis en els nivells d'oxigen, HIF-1 α és regulat per l'activitat de receptors tirosina quinasa i receptors no tirosina quinasa. Existeixen nombrosos exemples de factors de creixement, hormones i citoquines capaços d'induir HIF-1 α , podent incloure la insulina [365,366,367], l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) [365], *insulin-like growth factor-2* (IGF-2) [368], PDGF [369], EGF [370], HGF [371], TNF α [372], IL-1 β [373,374], angiotensina-2 [369] i trombina [375]. No només HIF-1 α es induït per estimulació per lligand de certs receptors de membrana, sinó que diversos estudis han demostrat que la sobreexpressió o sobrereacció de certs oncògens (TK i RTK) poden també fer augmentar els nivells de HIF-1 α . Exemples d'això són HER2^{NEU} [376], Ras [377,378] o v-Src [379].

A diferència de l'estabilització de HIF-1 α que té lloc durant condicions d'hipòxia, està descrit que la inducció per factors de creixement funcioni via augmentar el nivell de síntesi de la proteïna, cosa que va ser demostrada a través de l'ús del inhibidor de la traducció ciclohexamida i d'experiments de marcatge de pols [380,381,382]. La majoria d'aquests estudis impliquen a membres de la cascada de les quinases involucrant a PI3K, a la serina-treonina quinasa AKT (Protein Kinase B) i a FRAP (FKBP/ proteïna associada a la

rapamicina, també coneguda com mTOR), com a molt importants per aquest augment de síntesi proteica. La importància d'aquestes quinases ha estat comprovada mitjançant l'ús de diversos inhibidors [383,384] i dominants negatius [384]. A més, la pèrdua del supressor tumoral PTEN, un regulador negatiu d'AKT, o la expressió constitutivament activa d'AKT també fan augmentar els nivells de HIF-1 α [384,385]. La inducció de HIF-1 α per c-Src (pp60c-src) [386], v-Src [387], i Ras [388,389] funciona via un augment de la traducció proteica el qual és dependent de la via PI3K/AKT/FRAP.

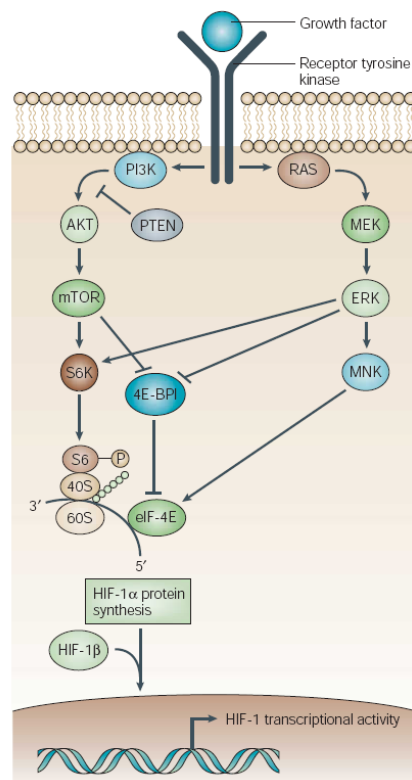


Fig.18 | Regulació de la síntesi proteica de HIF-1 α

Adaptat de Semenza *et al.* [342]

La capacitat de la cascada PI3K/AKT/FRAP d'augmentar el nivell de síntesi de HIF-1 α , probablement depèn de la capacitat de FRAP de fosforilar a dos importants components de la maquinària de la traducció; 4E-BP1 i S6K [390] (Veure FIGURA 18).

Després d'aquesta fosforilació, 4E-BP1 perd la capacitat d'inhibir a eIF-4E, resultant en un augment en el reclutament de la subunitat ribosomal 40S a la estructura 5' terminal del mRNA [390]. A més, FRAP fosforilat activa S6K, la qual permet l'activació de la proteïna S6, resultant en un augment de la transcripció de RNAs missatgers amb un tracte polipiramidínic a 5' [391,392]. La

capacitat d'aquesta via de senyalització per augmentar el nivell de síntesi de HIF-1 α depèn de la presència del 5'-UTR del mRNA de HIF-1 α , donat que la deleció d'aquesta seqüència aboleix els efectes de Heregulina [393].

A més de la regulació de HIF-1 α per aquesta via, s'ha descrit que la via de les MAPK també és important en l'activació de HIF-1 portada a terme per receptor [394]. Malgrat el seu paper en la regulació de HIF-1 α , no està tan ben estudiat com el de PI3K/AKT, l'activació de la MAPK p42/p44 sembla portar a una activació transcripcional de HIF-1 [395]. També s'ha descrit la fosforilació directa de HIF-1 α per MAPK [396], i el resultat d'aquesta fosforilació és un augment en l'activació transcripcional per interrupció de les interaccions amb FIH, el supressor transcripcional de HIF-1 α [390]. A més, s'ha descrit l'activació de les MAPK per hipòxia en diverses línies cel·lulars [395], de manera que, l'activitat de les MAPK augmenta l'activació transcripcional de HIF portada a terme per senyals i induïda per hipòxia.

6.2 STAT3 i l'angiogènesi tumoral

STAT3 és un important facilitador de l'angiogènesi tumoral. L'activació d'STAT3 correlaciona amb la producció de VEGF en una gran varietat de càncers humans entre els que destaquem el de mama, el melanoma i línies cel·lulars de càncer pancreàtic [397,398]. Molts dels factors oncogènics i de creixement capaços d'augmentar la producció de VEGF també resulten en l'activació d'STAT3. Es coneix per exemple, que l'activació de les vies de senyalització EGFR i Src promouen la producció de VEGF [399], i està ben documentat el fet que l'estimulació d'aquestes vies de senyalització desencadenen l'activació d'STAT3 [400,401]. Aquestes dades indiquen l'existència d'una forta correlació entre l'activació d'STAT3 i l'expressió de VEGF en una varietat de tumors.

Vàries publicacions han demostrat que STAT3 és requerit per l'expressió de VEGF en vàries línies cel·lulars tumorals. El bloqueig constitutiu de l'activitat d'STAT3 en cèl·lules tumorals mitjançant un dominant negatiu fa disminuir els nivells basals d'expressió de VEGF [397,398]. A més, s'ha demostrat que STAT3 és necessari per la inducció de VEGF resultant tant de factors de creixement com de tirosina quinases. En cèl·lules transformades amb v-Src hi ha una

elevada expressió de VEGF i una elevada activitat d'STAT3, i el bloqueig d'STAT3 redueix significativament els nivells de VEGF [397]. La inducció de VEGF per IL-6 o gp130 és dependent de la senyalització d'STAT3 [402,403]. A més es requereix STAT3 per la inducció de VEGF per OSM en una línia d'astroglioma [404].

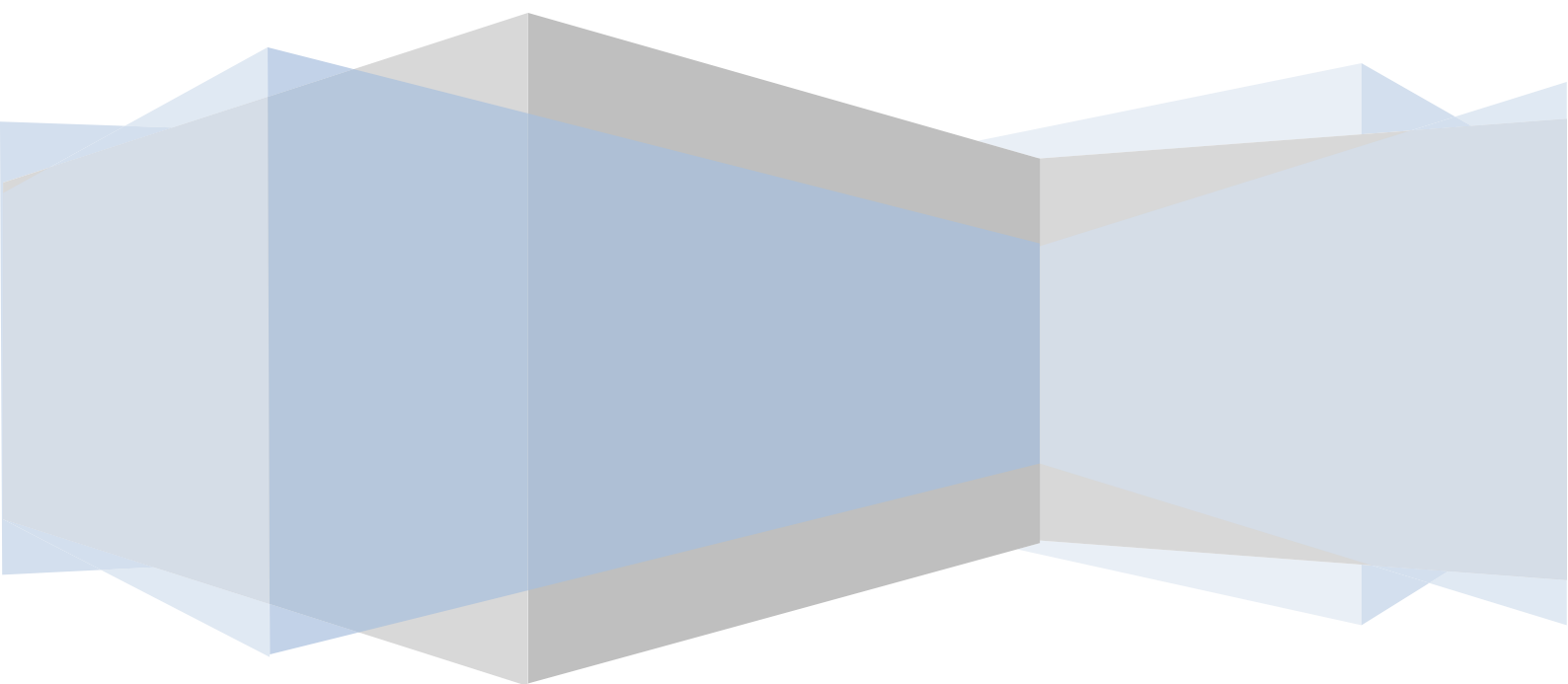
Diversos estudis han posat en evidència que STAT3 augmenta la producció de VEGF per unió o activació del promotor.

A més dels efectes sobre VEGF, STAT3 ha estat implicat com a element facilitador de l'angiogènesi per altres mecanismes. Recentment s'ha demostrat que STAT3 regula l'expressió de MMP-2 i MMP-9, importants facilitadors de l'angiogènesi i la metàstasi [405]. També s'ha descrit que STAT3 és necessari per senyalitzar via receptors associats a lligands angiogènics, inclosos bFGFR i VEGFR [406,407].

També es coneix que STAT3 és necessari pel efectes mitogènics del factor angiogènic PDGF [408], per la migració de cèl·lules endotelials i la formació de microvasos [409]. Aquestes dades impliquen que STAT3 facilita l'angiogènesi per sobre d'intervenir en la regulació de VEGF.

Recentment s'ha descrit, que hi ha un requeriment combinat de STAT3 i HIF per obtenir una inducció màxima de VEGF per hipòxia o Src [410]. Aquesta dada, posa en relleu que tant HIF-1 α com STAT3 es requereixen per l'expressió de VEGF .

Material i mètodes



1. Cultius Cel·lulars

1.1 Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars emprades en aquest treball, obtingudes de l'ATCC (*American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA*), són les següents línies derivades de teixit epitelial renal humà i cèl·lules renals embrionàries:

- 769-P (CRL-1933™): Línia derivada d'un adenocarcinoma renal humà primari, aïllada al 1975 d'una dona de 63 anys i d'ètnia caucàsica. La morfologia d'aquestes cèl·lules és globular amb marges poc definits i presenten una ràtio nucli:citoplasma gran. Es tracta de cèl·lules epitelials adherents, que formen una monocapa a la placa de cultiu i tenen la capacitat de créixer en *soft agar*.

- 786-O (CRL-1932™): Línia d'adenocarcinoma renal humà primari, aïllada d'un home de 58 anys d'ètnia caucàsica. Aquestes cèl·lules són també adherents i formen una monocapa en créixer en plaques de cultiu, poden desenvolupar-se en *soft agar*. Aquestes cèl·lules produeixen pèptids tipus hormona paratiroidal (PTH) de la mateixa forma que s'ha trobat en altres línies tumorals derivades de tumors pulmonars o de mama.

- HEK293T (CRL-11268™): Variant de la línia cel·lular HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*), que deriva de cèl·lules embrionàries de ronyó humanes, transformades amb l'antigen T gran del virus SV40. Aquesta transformació, permet la replicació episomal de plasmidis transfectats que continguin l'origen de replicació del SV40 i resulta en l'amplificació de l'expressió dels transgens continguts en ells. Les HEK293T són molt fàcils de cultivar ja que són de creixement ràpid i són àmpliament utilitzades tant en investigació en biologia molecular com per la indústria biotecnològica.

1.2 Manteniment cel·lular

Les cèl·lules van ser cultivades i expandides a una temperatura de 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂, 95% d'aire i 99% d'humitat. El medi de cultiu emprat pel manteniment de totes les cèl·lules amb les que s'ha treballat és el

DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) de BIOLOGICAL INDUSTRIES complementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2mM de L-Glutamina, 1mM de piruvat sòdic, 1mM d'aminoàcids no essencials i 1% d'antibiòtic-antimicòtic. Tots els reactius van ser adquirits a BIOLOGICAL INDUSTRIES excepte el darrer que pertany a GIBCO. En aquelles ocasions en les que s'ha treballat amb cèl·lules transfectades amb un vector dependent de doxiciclina, el medi s'ha complementat amb sèrum fetal boví sense tetraciclina adquirit a P_{AA} Laboratories. Un cop preparat el medi, s'esterilitzava fent-lo travessar filtres de 0,22µm de la casa comercial MILLIPORE.

1.3 Tripsinització

Totes les línies amb les que s'ha treballat, creixen de manera adherent sobre un suport sòlid. La tripsinització s'ha realitzat quan el cultiu ha assolit entre un 80 i un 90% de confluència.

▪ Reactius

- PBS 1x estèril (Veure l'Annex)
- Tripsina-EDTA (al 0,05%) [BIOLOGICAL INDUSTRIES]
- Medi de cultiu complet.

▪ Procediment

- Temperar la tripsina, el PBS i el medi de cultiu a 37°C.
- Rentar la monocapa de cèl·lules amb PBS 1x.
- Retirar el PBS 1x de la placa i afegir la tripsina a les cèl·lules aproximadament en la següent relació volum/àrea: 3 ml/T-25 (25 cm² d'àrea).
- Incubar 2 minuts a 37°C dins l'incubador de cultius.
- Neutralitzar la tripsina amb un volum de medi de cultiu i traspasar les cèl·lules desenganxades a un tub de 15 ml.
- Centrifugar les cèl·lules a 1000 rpm durant 5 minuts.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* amb 1-2 ml de medi.
- Sembrar la quantitat de cèl·lules desitjada en una nova placa i incubar a 37°C en una atmosfera adequada.

1.4 Recompte de cèl·lules

Per sembrar una quantitat concreta de cèl·lules, cal determinar-ne prèviament la concentració. El protocol de comptatge és el següent:

- Reactius
 - Blau de tripà [SIGMA].
 - Cambra de comptatge de *Neubauer*.
- Procediment
 - Agafar una alíquota de la suspensió cel·lular i preparar una dilució 1:10 en Blau de tripà.
 - Omplir la cambra de *Neubauer* amb la dilució preparada, comptar el número de cèl·lules viables (les no tenyides) en els diferents camps i realitzar el càlcul segons la següent fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ cèl./ml} = \text{n}^\circ \text{ cèl. promig dels 4 camps} \times 10 \times 10^4$$

1.5 Conservació de cèl·lules

Les cèl·lules eucariotes es poden conservar congelades en un medi criopreservat i en nitrogen líquid. El protocol de congelació que s'ha seguit en totes les línies cel·lulars ha estat el següent:

- Reactius
 - DMSO [SIGMA]
 - Criotubs de 1,5 ml [NUNC]
- Procediment
 - Tripsinitzar el cultiu cel·lular que ha arribat a confluència i resuspendre'l en 1 ml de medi, comptar el número de cèl·lules.
 - Afegir en un criotub 100 µl de DMSO i refredar en gel fins que aquest solidifiqui.
 - Afegir 900µl de la suspensió cel·lular ($0,5-1 \times 10^6$ cèl·lules totals) al criotub que conté el DMSO.

- Barrejar fins que el DMSO s'hagi liquat, col·locar el criotub en un contenidor especial de congelació (*Mr.Frosty*) [NALGENE] i deixar-ho o/n a -80°C per permetre una congelació gradual de les cèl·lules.
- Transferir el criotub en un tanc de nitrogen líquid.

1.6 Descongelació de cèl·lules

La descongelació de cèl·lules ha de ser un procés ràpid per no perdre viabilitat cel·lular.

▪ Procediment

- Treure les cèl·lules congelades del tanc de nitrogen líquid i descongelar-les en un bany a 37°C fins que només quedi un 10% de cèl·lules congelades.
- Afegir en el vial 1 ml de medi de cultiu fred (a 4°C) i barrejar bé.
- Transferir-ho tot en un tub amb 8 ml de medi fred (a 4°C).
- Centrifugar 5 minuts a 1000 rpm i a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 1 ml de medi.
- Sembrar tota la suspensió cel·lular en una nova placa de cultiu.

1.7 Transfeccions transitòries

La Transfecció consisteix en la introducció d'un DNA plasmídic dins de cèl·lules eucariotes. Existeixen diferents mètodes físico-químics destinats a superar la barrera que suposa la membrana plasmàtica d'aquestes cèl·lules, entre els que destaquen: l'electroporació, la precipitació amb fosfat càlcic o la utilització de liposomes. Per a transfectar les diferents línies cel·lulars amb les que s'ha treballat, s'ha escollit un mètode basat en liposomes, que són sistemes vesiculars artificials de composició fosfolipídica semblant a la de la membrana cel·lular. D'aquesta forma, el liposoma pot unir-se a la membrana plasmàtica afavorint la distribució de les substàncies contingudes al seu interior ja siguin, fàrmacs, virus, DNA etc. En el nostre cas, s'ha utilitzat la transfecció transitòria en aquells casos en els que s'ha necessitat que l'àcid nucleic introduït romangués a la cèl·lula per un curt període de temps (entre 24 i 96 hores) donada la seva no integració al genoma cel·lular. Concretament, s'ha utilitzat el producte *LIPOFECTAMINE™ PLUS* de la casa comercial [INVITROGEN]. Es

tracta d'una barreja liposòmica (3:1) del lípid policatiònic *2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate* (DOSPA) i el lípid neutre *dioleoyl phosphatidyl ethanolamine* (DOPE). El reactiu PLUS s'acomplexa amb el DNA, afavorint el seu empaquetament amb els liposomes i augmentant el rendiment de la transfecció. La transfecció transitòria es caracteritza fonamentalment per dos fets; en primer lloc, el temps en que el DNA exogen es manté en les cèl·lules és curt, entre 3 i 4 dies aproximadament, i en segon lloc, el percentatge de cèl·lules que han incorporat el material genètic extern és també baix, tot i que això dependrà de la línia cel·lular utilitzada.

▪ Reactius

- Reactiu Lipofectamine™ [INVITROGEN]
- Reactiu Plus™ [INVITROGEN]
- Medi OPTI-MEM [GIBCO]
- PBS 1x (Veure l'Annex)

▪ Procediment

- El dia previ a la transfecció, sembrar el número adequat de cèl·lules per tal d'assolir aproximadament el 60% de confluència en el moment de la transfecció (Veure TAULES 6 i 7).
- Preparar la solució A diluint el DNA en el volum adequat de medi OPTI-MEM i afegir-hi la quantitat corresponent de reactiu Plus (Taula 8). Incubar 15 minuts a temperatura ambient.
- Preparar la solució B diluint el reactiu Lipofectamine en OPTI-MEM (Veure TAULA 8).
- Combinar la barreja de DNA-Plus amb el reactiu Lipofectamine preparat en el pas anterior. Incubar-ho 15 minuts a temperatura ambient.
- Rentar les cèl·lules amb PBS 1x temperat a 37°C.
- Afegir a la barreja final de transfecció el volum necessari d'OPTI-MEM per arribar al volum final de la transfecció (Veure TAULA 8) i distribuir-ho bé per tota la placa.
- Incubar les cèl·lules amb els complexos DNA/lípids durant 3 hores al incubador de cultius(37°C i 5% CO₂).

- Rentar les cèl·lules amb PBS 1x.
- Mantenir les cèl·lules amb medi complet a 37°C i 5% CO₂ i assajar l'expressió del DNA exogen a les 16-48h post-transfecció.

TAULES 6 i 7. Quantitat de cèl·lules 786-O/769-P/HEK293T sembrades segons mida de placa

mida placa	nº cèl·lules 786-O/769-P	mida placa	nº cèl·lules HEK293T
96 pous	7.000	96 pous	14.000
24 pous	60.000	24 pous	120.000
6 pous	300.000	6 pous	600.000
60 mm	650.000	60 mm	1,3x10 ⁶
T-25	750.000	T-25	1,5x10 ⁶
100 mm	1,5x10 ⁶	100 mm	3,0x10 ⁶

TAULA 8. Quantitats i volums de transfecció

mida placa	DNA (ug)	PLUS (ul)	LIPOFECTAMINE (ul)	V solució A i B (ul)	V transfecció (ml)
96 pous	0,1	1	0,5	10	0,07
24 pous	0,4	4	1	25	0,25
6 pous	2	6	4	100	1,0
60 mm	5	8	12	250	2,5
T-25	5	10	15	250	2,5
100 mm	12	20	30	750	6

1.8 Transfecció estable i induïble

L'objectiu de la transfecció estable és introduir el DNA transfectat al genoma cel·lular. Aquest fet es dona de forma aleatòria a una petita proporció de les cèl·lules transfectades, les quals són seleccionades per la resistència a un antibiòtic que li confereix el DNA transfectat. Aquest sistema permet una expressió elevada i constitutiva del transgen. Existeixen sistemes que permeten induir l'expressió del transgen o reprimir-la en presència de l'antibiòtic Tetraciclina (Tc) o un dels seus anàlegs com és la Doxiciclina (Dox), transfectant el DNA de forma estable. Els sistemes induïbles més utilitzats en biologia cel·lular són els sistemes Tet dels que existeixen dos tipus: els *Tet-Off* i els *Tet-On*.

A *E. Coli*, la proteïna Tet repressora (TetR) bloqueja la transcripció de gens de l'operó de resistència a tetraciclina en el transposó Tn10. TetR bloqueja la transcripció d'aquests gens per unió a les seqüències tet *operator*

(tetO) en absència de Tc. TetR i tetO proporcionen la base de la regulació transcripcional per l'ús en sistemes experimentals en mamífers. El primer component crític pels sistemes Tet és la proteïna reguladora basada en TetR. Al sistema *Tet-Off*, aquesta proteïna és una fusió dels aminoàcids 1-207 de Tet-R i l'extrem C-terminal del domini d'activació VP16 del virus de *l'Herpes simplex* (AD;[411]). L'addició del domini VP16 converteix al repressor Tet-R en activador transcripcional i la proteïna híbrida resultant és coneguda com el transactivador controlat per tetraciclina (tTA). La proteïna tTA està codificada pel plasmidi regulador *pTet-Off*, que inclou també un gen de resistència a neomicina que permet la selecció de cèl·lules transfectades establement. El sistema Tet-On és similar al *Tet-Off*, però la proteïna reguladora es basa en un repressor Tet "revers" (rTetR) que va ser creat pel canvi de quatre aminoàcids al TetR [412,413]. La proteïna resultant, rtTA (tTA reversa), està codificada pel plasmidi regulador pTet-On.

El segon component crític és el plasmidi que expressa el gen de interès sota el control de l'element de resposta a tetraciclina o TRE. Aquest element TRE, que consisteix en set repeticions directes d'una seqüència que conté el tetO, sol estar localitzat *upstream* del promotor mínim pCMV (promotor del Citomegalovirus). La diferència entre els sistemes *Tet-On* i *Tet-Off* rau en la resposta front la doxiciclina. En el cas de *Tet-Off* és l'absència de doxiciclina el que promou l'expressió del transgen mentre que en el cas de *Tet-On* s'activa l'expressió en presència d'aquest antibiòtic.

En el nostre cas vam voler obtenir la sobreexpressió del gen hHAVcr-1 de forma estable i induïble i vam utilitzar la metodologia induïble *Tet-Off* basada en l'ús del vector pBIG2r.

1.8.1 Sistema *Tet-Off*: pBIG-2r-hHAVcr-1-HA

El principal problema del sistema Tet és que l'elevada expressió de tTA i rtTA provoca toxicitat cel·lular. Per això, es va desenvolupar un altre tipus de sistema basat en la incorporació a la cèl·lula d'un sol vector. És el cas del vector pBIG-2r (7,1 kb), d'expressió autoregulada i bidireccional, en el que el promotor dèbil TK s'utilitza per dirigir l'expressió del transactivador tTA i l'element CMV s'utilitza per dirigir l'expressió del cDNA, en aquest cas en

absència de doxiciclina. Així doncs, tant el transactivador com l'element de resposta es codifiquen en un mateix vector, cosa que simplifica el sistema i assegura l'expressió del transgen mentre s'expressen contínuament baixos nivells del transactivador [414]. A més, el pBIG-2r conté un marcador selectiu que confereix resistència a la Higromicina B per tal d'aconseguir la generació de línies estables.

Un cop obtinguts els constructes es van purificar i transfectar a la línia cel·lular 769-P. Per tal de seleccionar els clons derivats d'aquesta transfecció es va afegir al medi de cultiu 450 µg/ml d'Higromicina B [BOEHRINGER MANNHEIM GmbH] i es van tractar amb 1µg/ml de doxiciclina [SIGMA-ALDRICH] a l'hora de reprimir l'expressió de la proteïna.

▪ Procediment

- Es sembren les línies cel·lulars adequades per a cada cas en una placa de 10 cm de diàmetre i es transfecten amb la construcció pertinent seguint el protocol descrit a l'apartat 6.7.
- Després de 24h de la transfecció, les cèl·lules es tripsinitzen i es sembren repartides en 3 plaques de 10 cm de diàmetre.
- A les 48h, s'afegeix l'antibiòtic de selecció i la doxiciclina per evitar l'expressió del gen transfectat.
- Es canvia el medi amb antibiòtic cada 2-3 dies. Les cèl·lules que no continguin la construcció aniran morint de forma massiva.
- A les 2-3 setmanes post transfecció comencen a aparèixer colònies aïllades resistents a l'antibiòtic.
- S'aïllen les colònies mitjançant cilindres de clonatge i cada colònia es transfereix a un pou d'una placa de 96 pous des de on s'aniran expandint.
- L'expressió del transgen s'ha analitzat per *Western blot*.

1.9 Producció de partícules lentivirals i transducció cel·lular

Els vectors lentivirals permeten introduir de forma molt eficient, integrar i expressar de forma estable, transgens i altres seqüències com *short-hairpin* RNA (*shRNA*), a cèl·lules quiescents i proliferants, tant *in vivo* com *in vitro*. Les

partícules lentivirals es generen mitjançant l'expressió d'elements d'empaquetament del viriò (vectors *Packaging* i *Envelope*, [SIGMA ALDRICH]) en una cèl·lula utilitzada com a “productora de virus”, en el nostre cas cèl·lules HEK293T. Les partícules lentivirals actuaran de vehicle pel DNA d'interès, en el nostre cas es tracta dels vectors pel silenciament de hHAVcr-1 i IL-6 a la línia cel·lular 769-P i els seus respectius controls, mitjançant RNA d'interferència (RNAi) amb diferents seqüències de shRNA (Veure apartat 2.6) i per la sobreexpressió de hHAVcr-1 així com els mutants pel *shedding* de la proteïna a la línia 786-O i els seus respectius controls.

Aquestes partícules, un cop produïdes per les cèl·lules HEK293T són alliberades al medi de cultiu i s'utilitzen per la infecció de les nostres cèl·lules diana. Els *shRNA* són processats per la maquinària cel·lular de les cèl·lules diana, originant el *siRNA* (*small interfering RNA*) corresponent.

▪ Procediment

- El dia abans de la transfecció, es sembren les cèl·lules HEK293T a un 80-90% de confluència en flascons T-25 [NUNC].
- 6 µg de DNA (que contenen els quatre plasmidis: *vector*, *gag-pol*, *envelope* i *transfer* en proporcions 1:1:3:5) es combinen amb 30µl del reactiu de transfecció *Polyetylenimine* [POLYSCIENCES INC] en 600 µL de NaCl (150 mM).
- S'incuba la suspensió durant 20 minuts a temperatura ambient i s'afegeix gota a gota a les cèl·lules HEK293T.
- Les cèl·lules transfectades s'incuben *o/n* a 37°C a l'incubador de cultius.
- Es recullen els sobrenadants de les cèl·lules transfectades i es posen 5 ml de medi fresc (aquest procés s'haurà de repetir a les 48 i 72h post-transfecció).
- Els sobrenadants obtinguts de les cèl·lules transfectades es passen per filtres de 0,22µm [MILLIPORE] i es suplementen amb un 10% de FBS, 8µg/µl de *Polybrene* [SIGMA-ALDRICH] i un 1% d'aminoàcids no essencials [BIOLOGICAL INDUSTRIES].

- Les cèl·lules a infectar es sembren, el dia abans de la infecció, a una densitat de 3×10^5 cèl·lules en un flascó T-25 en un volum de medi de 5ml.
- El medi que conté els virus es va aplicant a les cèl·lules a infectar (aquest procés es repeteix 2 cops amb el medi extret de les cèl·lules HEK293T 48 i 72 hores post-transfecció).
- Passat aquest temps, es treu el medi de les cèl·lules infectades i s'afegeix medi fresc.
- Els transformants es seleccionen durant 5 dies per addició de Puromicina [SIGMA-ALDRICH] a $1 \mu\text{g/ml}$ al medi de cultiu.

1.10 Tractaments cel·lulars

1.10.1 Tractament amb pervanadat

Per tal d'estudiar el procés de *shedding* accelerat de la proteïna hHAVcr-1 a la línia 786-O, s'ha sotmès les cèl·lules a un tractament amb pervanadat [SIGMA-ALDRICH], potent inhibidor de les proteïnes tirosina fosfatases, durant 30 minuts i a una concentració de $50 \mu\text{M}$.

1.11 Assajos funcionals

1.11.1 Assajos d'invasió amb *Transwell*

La invasió tumoral es defineix com la capacitat de les cèl·lules tumorals d'extravasar barreres tissulars tals com la membrana basal. Els assajos d'invasió en pous *Transwell*[®] *culture chamber*, simulen aquesta situació *in vitro* i permeten estudiar la capacitat invasiva de les cèl·lules utilitzant una matriu extracel·lular obtinguda de cèl·lules de sarcoma de ratolí [189] que recobreix la membrana porosa del *Transwell*[®]. En conjunt, aquests assaigs permeten conèixer el potencial invasiu de les cèl·lules, és a dir, la seva capacitat migratòria i la seva capacitat de secretar enzims que degraden la matriu extracel·lular. Aquest tipus d'assaig permet també estudiar l'efecte atraient de determinats factors mitjançant la seva addició al medi (Veure FIGURA 19).

▪ Reactius

- *Transwell*[®] amb filtres de policarbonat amb porus de 8µm [COSTAR].
- *Matrigel*[™] [BD Biosciences].
- Plaques de 24 pous [NUNC].
- Medi DMEM complet (Veure l'Annex).
- Medi sense sèrum fetal.
- Solució de cristall violeta al 1% en H₂O *milli-Q* estèril.
- Solució àcid acètic al 10% en H₂O *milli-Q* estèril.
- Bastonets de les orelles.
- PFA al 4% (Veure l'Annex).
- PBS 1x (Veure l'Annex).
- *Hoescht* 33323 1:200 en PBS.

▪ Procediment

- Deixar el *Matrigel*[™] [BD Biosciences] *o/n* a 4°C en gel.
- Afegir el *Matrigel*[™] (diluït a 1:3 en medi DMEM sense sèrum fetal) a raó de 50 µl per pou amb les plaques col·locades en gel.

- Mantenir les plaques on són disposats els *Transwell*[®] a 37°C durant 30 minuts per tal que el producte solidifiqui.
- Afegir a la part inferior de cada pou 600 µl de medi DMEM amb un 10% de sèrum fetal.
- Tripsinitzar les cèl·lules, rentar-les dos cops amb medi sense sèrum fetal (centrifugar i resuspendre). Sembrar les cèl·lules a una densitat de 1×10^5 cèl·lules/ 100µl.
- Omplir la resta de pous amb 1 ml de PBS 1x (Veure l'Annex).
- Desar les cèl·lules al incubador durant 48h.
- Fixar les cèl·lules amb PFA al 4% durant 30 minuts a temperatura ambient. Afegir 100 µl a dalt i 600 µl a la part de baix del pou.
- Rentar 3 cops amb PBS 1x (Veure l'Annex) i rentar la part de dalt del *Transwell*[®] amb un bastonet de les oïdes.
- Realitzar el comptatge amb dos mètodes complementaris:

- Tinció *Hoescht*: Col·locar el *Transwell*[®] damunt un portaobjectes on hem disposat 50µl de *Hoescht* 33323 diluït en PBS 1x i deixar-ho a la cambra fosca durant 10 minuts. Rentar amb PBS 1x i comptar a través del microscopi de fluorescència [Olympus FV1000].

- Incubació amb Cristall Violeta diluït al 1% en H₂O: Posar 100 µl de solució a la part de dalt del *Transwell*[®] i 600 µl a la part de baix. Deixar-ho 30 minuts a temperatura ambient. Rentar amb PBS 1x, retallar la membrana, dissoldre-la amb àcid acètic al 10% fins que la membrana quedi transparent. Es mesura l'absorbància a 590 nm [BioTek Elx800].

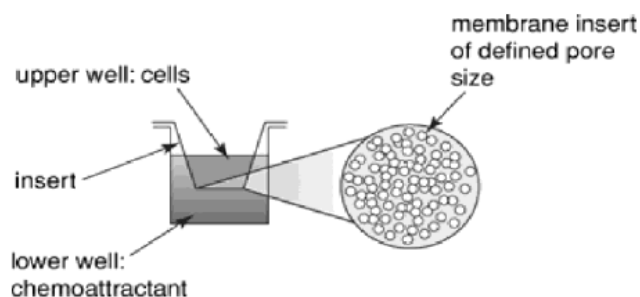


Fig. 19 | Cambra *Transwell*

2. Manipulació del RNA

2.1 Extracció de RNA total

L'extracció de RNA s'ha portat a terme mitjançant l'ús del *RNeasy Mini kit* [QIAGEN]. Aquest mètode es basa en l'ús de columnes cromatogràfiques d'afinitat que eviten la manipulació de substàncies tòxiques, com el fenol i el cloroform, utilitzats en el mètode clàssic d'extracció [415]. Aquest *kit* suposa un estalvi important de temps i permet el processament d'un nombre més elevat de mostres mantenint la reproductibilitat. En l'extracció de RNA de cèl·lules, es parteix d'una placa de 10cm de diàmetre on es sembren un milió de cèl·lules i es segueixen les recomanacions del fabricant. La qualitat i puresa dels extractes de RNA obtinguts són suficients per utilitzar-los en diverses aplicacions tals com RT-PCR i RT-qPCR.

2.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

L'amplificació del DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa o PCR, s'ha convertit en un procediment bàsic en el laboratori de biologia molecular. Cada reacció d'amplificació s'ha optimitzat de manera individualitzada, tenint en compte, el disseny específic de cada *primer*, l'establiment de la temperatura d'anellament (T_a) òptima per a cada parella de *primers*, el número de cicles de la reacció i la concentració de Mg^{2+} . L'elecció de la polimerasa a emprar, dependrà de l'aplicació concreta del producte de la PCR. Així doncs, quan el nostre objectiu ha estat la visualització del producte de la PCR en un gel d'agarosa s'ha utilitzat la *EcoTaq* d'[ECOGEN], en canvi, en aquells protocols on ha estat de vital importància preservar la fidelitat de l'amplificació, s'ha optat per la utilització d'una polimerasa amb activitat correctora o *proofreading* com la *Pfu* de [PROMEGA].

A continuació, s'indiquen unes condicions estàndard que s'usaran com a punt de partida previ a l'optimització de les condicions ideals per a cada cas concret.

- Reactius

- Taq polimerasa amb el seu corresponent tampó.

- $MgCl_2$ 50 mM
 - dNTP mix (dATP,dTTP,dGTP,dCTP; equimolars a 10 mM)
 - *ependorfs* per PCR de paret fina
 - *Primers forward* i *reverse** a 10 μ M
 - H_2O *milli-Q* estèril
- * Els *primers* van ser dissenyats mitjançant el programa informàtic Primer3 disponible a: ([http:// www.frodo.wi.mit.edu/](http://www.frodo.wi.mit.edu/))

▪ Procediment

- Preparar la següent reacció en gel fins a 50 μ l:

Component	Concentració final
Aigua <i>milli-Q</i>	Fins a V final
DNA motlle #	x μ l
10x Taq buffer*	1x
$MgCl_2$ 50 mM	1,5 mM
dNTPs mix 10 mM	200 μ M
<i>forward primer</i> 10 μ M	1 μ M
<i>reverse primer</i> 10 μ M	1 μ M
EcoTaq	1-2,5 U

Les quantitats de DNA motlle varien segons es tracti de DNA genòmic (25-100 ng) o DNA plasmídic (0,1-1ng).

* Subministrat amb la DNA polimerasa específica utilitzada.

- Col·locar cada reacció en el termociclador i executar el programa de PCR. Condicions tipus:

94°C	5 min	} 30 cicles
94°C	30 seg	
$T_a^\#$	30 seg	
72°C	1min/kb DNA	
72°C	5 min	
4°C	∞	

$^\pm$ La T_a normalment és 5°C per sota de la T_m dels primers.

2.3 RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

La transcripció inversa-PCR o RT-PCR permet amplificar un mRNA fins a un cDNA de doble cadena. La tècnica consta de dues etapes, primer la transcripció inversa (RT) a partir del mRNA utilitzant un primer antisentit específic o un oligo-dT i en segon lloc, l'amplificació per PCR de la cadena de cDNA sintetitzada en la primera etapa. Tot i que tradicionalment aquestes dues etapes s'han realitzat separatament, existeixen *kits* comercials que permeten dur a terme ambdues reaccions en un sol tub. S'ha utilitzat el *kit Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* de [INVITROGEN] que consisteix en una barreja dels enzims *Superscript II H-Reverse Transcriptase* i *Platinum Taq*, una *Taq* DNA polimerasa acomplexada amb un anticòs que inhibeix l'activitat polimerasa a temperatura ambient però que permet la recuperació d'aquesta activitat després de la desnaturalització a 94°C durant la PCR. Aquest *Hot start* automàtic permet incrementar la sensibilitat, l'especificitat i el rendiment de la reacció de PCR. S'han seguit les instruccions subministrades per la casa comercial. Per l'experiment de *microarray* d'RNA el cDNA s'ha sintetitzat mitjançant l'ús del *One Cycle cDNA Synthesis kit* [AFFYMETRIX].

En aquelles ocasions en les que s'ha necessitat un cDNA d'elevada puresa, principalment en els casos en els que el cDNA era necessari per tal de realitzar un experiment de RT-qPCR, s'ha utilitzat el *High capacity cDNA archive kit* d'[APPLIED BIOSYSTEMS]. Els volums necessaris de cadascun dels components del *kit* així com, les condicions en les que s'han dut a terme les reaccions es detallen a continuació:

▪ Reactius

- RT Buffer
- dNTP's mix
- Random Primers
- H₂O *milli-Q* estèril
- RT 50 U/μl

▪ Procediment

- Barrejar 1μg de RNA amb H₂O *milli-Q* estèril fins a un volum de 10 μl.
- Afegir els components de la mix de PCR fins a un volum final de 20 μl.

- Afegir els tubs al termociclador i executar el següent programa:

25°C 10 min

37°C 120 min

2.4 RT-qPCR (*Quantitative Reverse Transcription-Polymerase chain reaction*)

La RT-PCR quantitativa o a temps real (RT-qPCR) és una variant de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que permet amplificar i quantificar el producte generat a cada cicle d'amplificació. Aquesta quantitat de producte està directament relacionada amb la quantitat de cadenes de cDNA existents al inici del procés de la PCR. Per tal de detectar en temps real els productes de PCR, s'inclou a la reacció una molècula fluorescent de tal manera que un augment en la fluorescència ens indica un augment proporcional de la quantitat de DNA.

La PCR a temps real, consta d'una fase exponencial on la quantitat del producte de PCR es duplica a cada cicle. No obstant, a mesura que avança la reacció es van consumint els diferents components de la reacció fins que arriben a ser limitants. A partir d'aquí, la reacció de PCR entra a la fase *plateau*. Inicialment, la fluorescència es manté a uns nivells no detectables tot i que existeix una acumulació del producte de la PCR de forma exponencial. Finalment, l'acumulació de producte de la PCR produeix un senyal de fluorescència detectable. El cicle on té lloc aquest procés és el que s'anomena *CT* (*threshold cycle*). Aquest valor de *CT* depèn de la quantitat de cDNA present al inici de la reacció.

Durant aquest treball experimental, s'han utilitzar com a molècules fluorescents les sondes *TaqMan*® [APPLIED BIOSYSTEMS]. Aquestes sondes són oligonucleòtids que porten unides dos tipus de molècules: un fluorocrom a l'extrem 5' i un reductor de l'emissió o *quencher* a l'extrem 3'. Mentre la sonda es manté intacta, la proximitat del *quencher* absorbeix la fluorescència emesa pel fluorocrom. Quan la *Taq* polimerasa arriba a l'extrem 5' allibera el fluorocrom gràcies a la seva activitat exonucleasa distanciant-lo del *quencher*, moment en el qual el fluorocrom emet fluorescència. D'aquesta manera el sistema esdevé altament específic ja que el fluorocrom només emet fluorescència quan s'amplifica la cadena d'interès.

La PCR a temps real, permet tant una quantificació absoluta del nombre de còpies de cada mRNA com una quantificació relativa. En aquest treball s'ha utilitzat la quantificació relativa que es basa en el mètode de comparació de CT. Aquesta tècnica utilitza un control endogen com element normalitzador i es basa en el càlcul de la relació que hi ha entre el CT del gen problema i el CT del control endogen que serveix per a normalitzar la quantitat de cDNA afegit a la reacció. A més, aquest valor es pot utilitzar per a la comparació relativa de les diferents quantitats entre les diferents mostres problemes. Per tal d'aconseguir-ho, es tracta de designar una de les mostres com a calibrador. El calibrador és una mostra que serveix com a base per referenciar els resultats, és el que s'anomena valor 1 d'expressió.

La quantitat de la mostra problema normalitzada pel control endogen i relativa al calibrador, ve donada per la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

On :

$\Delta CT = CT \text{ gen problema} - CT \text{ control endogen}$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ mostra problema} - \Delta CT \text{ calibrador}$

A continuació es descriu el protocol que s'ha seguit:

▪ Reactius

- 2x *Taqman® Universal PCR Master Mix* [APPLIED BIOSYSTEMS].
- 20x *Assays on Demand™ Gene Expression Assay Mix*.(Veure TAULA 9)

TAULA 9. SONDES *Taqman* EMPRADES EN RT-qPCR

Gen	Codi identificador sonda
SNAI 2	Hs00950344_m1
SMARCA 1	Hs00161922_m1
JUP	Hs00158408_m1
ANPEP	Hs00174265_m1
GLUT 1	Hs00892681_m1
VEGFA	Hs00900055_m1
HIF-1A	Hs00153153_m1
PPIA	Hs99999904_m1
IL-6	Hs00985639_m1

- cDNA.
- H₂O *RNase free*.
- Plaques de 96 pous [APPLIED BIOSYSTEMS].
- Tapa per a plaques de 96 pous [APPLIED BIOSYSTEMS].

▪ Procediment

- Diluir el cDNA a 1:50 o 1:100.
- Preparar la següent reacció a un volum final de 20 µl :

Component	V final
2x Taqman Universal PCR Master Mix	10 ul
20x Assays on Demand Gene Expression Assay Mix	1 ul
Aigua RNase free	4 ul
cDNA	5 ul

- Centrifugar la placa.
- Col·locar la placa a l'aparell de PCR quantitativa (*7500 Real Time PCR System* d'APPLIED BIOSYSTEMS) i executar la PCR:

50°C	2 min	} 50 cicles
95°C	10 min	
95°C	15 seg	
60°C	1 min	
4°C	∞	

- Anàlisi dels resultats.

2.5 Microarrays d'RNA

L'objectiu principal de l'anàlisi per microarray d'RNA, en el nostre cas, és el de determinar gens diferencialment expressats com a resultat de la sobreexpressió o el silenciament de hHAVcr-1. L'experiment, s'ha dut a terme utilitzant l'*array Human Exon 1.0 array (Affymetrix GeneChip® array)* que proporciona una cobertura completa del genoma humà.

La selecció d'aquests gens s'ha basat en l'aplicació d'un model d'anàlisi lineal, tal i com es descriurà més endavant, que selecciona els gens per a cada comparació després d'una correcció pels efectes tècnics derivats del propi procés de sobreexpressió i silenciament del gen. L'experiment s'ha realitzat al servei de genòmica de la UCTS (Unitat Científic-Tècnica de Suport) de l'IR-HUVH i l'anàlisi estadística al servei de bioinformàtica de la UCTS de l'IR-HUVH.

▪ Procediment

- Sintetitzar el cDNA de doble cadena a partir dels extractes d'RNA total de la línia 769-P modificada per a la sobreexpressió i el silenciament d'hHAVcr-1, utilitzant el *One Cycle cDNA Synthesis kit* [AFFYMETRIX].
- Sintetitzar el cRNA antisentit marcat amb biotina utilitzant el mateix *kit* i partint de 5 µg d'RNA total i del *oligo dT primer* següent: 5'GGCCAGTGA-ATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)24
- Purificar els cRNAs utilitzant les columnes del *kit GeneChip® Sample Cleanup Module* [AFFYMETRIX]
- Fragmentar 20 µg de cRNA a 94°C durant 30 minuts en 40 µl de Tampó A (Veure l'Annex).
- Afegir les mostres fragmentades al cocktail d'hibridació (Veure l'Annex).
- Equilibrar l'*array* de sondes a temperatura ambient i prehibridar amb tampó d'hibridació 1x (Veure l'Annex) a 45°C durant 10 minuts amb rotació.
- Hibridar amb 200µl de la barreja el *Human Exon 1.0 array* (*Affymetrix GeneChip® array*) a 45°C durant 16 h amb rotació.
- Rentar els *GeneChips* i marcar-los amb estreptavidina ficoeritrina segons el protocol de *EukGE-WS2-v5* proporcionat per [AFFYMETRIX].
- Escanear els *GeneChip®* en un *Agilent G3000 Gene Array Scanner*.

2.5.1 Anàlisi estadística

▪ Pre-processament

Els valors d'expressió obtinguts dels arxius .CEL van ser processats utilitzant el mètode RMA [416] que consta de tres nivells de processament:

- fase 1: correcció de fons.
- fase 2: Normalització.
- fase 3: Sumarització a nivell d'exons.

Seguidament, els valors d'exó corresponents a cadascun dels gens són promitjats per tal d'aconseguir un únic valor per cada gen. S'han utilitzat llindars conservadors per tal de reduir possibles falsos negatius.

▪ Selecció de gens diferencialment expressats

La selecció dels gens està basada en un model d'anàlisi lineal amb moderació empírica de *Bayes* de la variància estimada. A la pràctica, aquest és un mètode similar a l'ús d'un "*t-test*" amb una millor estimació de la variància [417]. Aquells gens amb un *p*-valor ajustat de menys de 0,01 i un *Fold Change* de com a mínim 2 són considerats com a diferencialment expressats. L'ajust del *p*-valor es va portar a terme basant-nos en un estricte control del *False Discovery Rate* (FDR) proporcionat per mètode Benjamini & Hochberg [418].

La representació dels gens diferencialment expressats s'ha fet mitjançant diagrames Volcano (que representen el menor *p*-valor (Y) versus el *Fold Change* en escala logarítmica (X)). La representació dels perfils diferencials es realitza mitjançant els diagrames *Heatmap*, que són diagrames rectangulars on es representa l'expressió de cada gen seleccionat (files) a cada mostra (columnes) utilitzant una escala de color que va de valors baixos a valors alts d'expressió. Els gens que mostren un perfil similar entre condicions, són agrupats en un diagrama que proporciona una idea de grups de gens que poden ser simultàniament sobreexpressats o infraexpressats i poden potencialment estar co-regulats.

▪ Anàlisi de la significança biològica

L'anàlisi pel *Gene Ontology* (GOA) està basada en un sistema de sobrerrepresentació [419] que determina si els gens que són trobats i catalogats com a diferencialment expressats, semblen ser més o menys freqüents de lo normal en algunes de les categories del GO que podrien estar relacionades amb els processos biològics implicats en l'anàlisi. Una anàlisi similar mitjançant el programa IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*), s'ha utilitzat per establir quines

vies moleculars són afectades pels gens seleccionats i també per tal de representar les relacions que apareixen entre gens.

- *Software* utilitzat

Totes les anàlisis estadístiques, excepte l'IPA, s'han realitzat utilitzant el llenguatge estadístic R i les llibreries desenvolupades per l'anàlisi de dades d'un *microarray* pel *Bioconductor Project* ([http:// www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Els principals mètodes i eines s'han utilitzat tal i com es descriu [420]. L'anàlisi IPA s'ha realitzat utilitzant l'eina *Ingenuity Pathways Tool*, disponible a <http://www.ingenuity.com>

2.6 Mecanismes de *knock-down* gènic: *shRNA*

El RNA d'interferència (RNAi) és un mecanisme de regulació de l'expressió gènica per silenciament, conservat evolutivament i present en nombroses espècies d'organismes eucariotes. És un sistema que utilitza seqüències curtes de doble cadena de RNA (dsRNA) que participen en la degradació o repressió de la transcripció d'una seqüència homòloga de RNA diana de manera específica. Aquest sistema, pot ser induït eficientment tant *in vitro* com *in vivo*, mitjançant l'aplicació directa de *small interfering RNAs* (siRNAs) o per l'expressió mitjançant vectors virals o no virals de *short hairpin RNAs* (shRNAs). Aquesta, és doncs, una eina molt emprada avui en dia en estudis genòmics funcionals i presenta un gran potencial terapèutic [421].

2.6.1 *shRNA*

Els *shRNAs* contenen seqüències de DNA formades per seqüències *sense* i *antisense* unides per una seqüència central (específica per a cada gen), que estructuralment forma un bucle (*hairpin*). Un cop introduït a la cèl·lula el vector que conté el *shRNA*, es transcriu gràcies al seu promotor (generalment s'utilitza un promotor diana de la Polimerasa III). El RNA resultant, segueix el sistema de processament endogen de la cèl·lula eucariota, es processa per la RNasa III citoplasmàtica *DICER*, produint-se el *siRNA* corresponent, que serà el que produirà l'acció de silenciament gènic.

En aquest cas, les seqüències de *shRNA* utilitzades per hHAVcr-1 i IL-6, pertanyen a la llibreria de RNAi contra gens humans *MISSION[®] shRNA Bacteria Glycerol stock* [SIGMA-ALDRICH] (Veure TAULA 10). El control emprat és una seqüència no relacionada amb cap gen humà anomenada *MISSION[®] non target shRNA control*. Els clons de *shRNA* van ser adquirits a la casa comercial i les partícules lentivirals van ser produïdes mitjançant transfecció a la línia cel·lular HEK293T (Veure apartat 1.9).

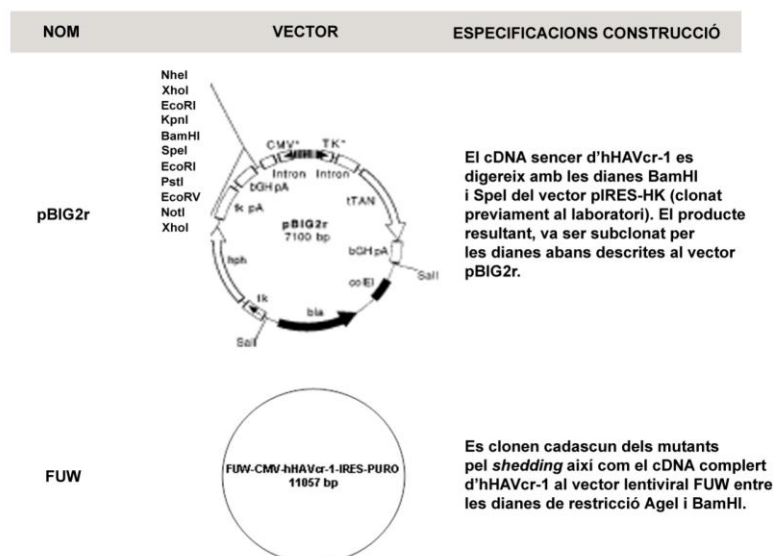
TAULA 10. SEQÜÈNCIES *shRNA* EMPRADES EN EL SILENCIAMENT DE hHAVcr-1 I IL-6

shRNA	ID	SEQÜÈNCIA
hHAVcr-1 (seqüència 851)	TRCN0000060768	CCGGGCCTTTGGAATAACAATCAAACCTCGA GTTTGATTGTTATTCCAAAGGCTTTTTG
hHAVcr-1 (seqüència 572)	TRCN0000060769	CCGGCGACGACAATGACTGTTTCAAACCTCGA GTTGAAACAGTCATTGTCGTCGTTTTTG
IL-6 (seqüència 636)	TRCN0000059205	CCGGCATCTCATTCTGCGCAGCTTTCTCGA GAAAGCTGCGCAGAATGAGATGTTTTTG
IL-6 (seqüència 211)	TRCN0000059207	CCGGCAGAACGAATTGACAAACAACCTCGA GTTTGTTGTCAATTCGTTCTGTTTTTG

3. Manipulació del DNA

3.1 Vectors i construccions

Els vectors i construccions utilitzats en aquest treball es detallen a continuació:



3.2 Electroforesi d'àcids nucleics

3.2.1 Electroforesi en gels d'agarosa:

Els materials d'electroforesi utilitzats han estat principalment cubetes tipus minigel i mitjà de les cases comercials [BIO-RAD] i [ECOGEN] i fonts d'electroforesi de la casa comercial [BIO-RAD]. Les mostres a carregar es dilueixen a 1:10 en tampó de càrrega 10x compostat per: 50% de Glicerol, 0,21% de Blau de bromofenol, 0,21% de *Xylene cyanol* FF i 0,2M EDTA pH 8,0.

3.2.1.1 Electroforesi analítica

Per visualitzar el resultat de les digestions de DNA, l'amplificació d'àcids nucleics o la purificació d'àcids nucleics, s'ha utilitzat l'electroforesi en gels d'agarosa [*agarosa estándar grado medio*, ECOGEN] preparats en tampó TAE 1x (Veure TAULA 1 Annex). El percentatge d'agarosa dels gels pot oscil·lar entre el 0,7 i el 2,5% (p/v) en funció de la grandària dels fragments a visualitzar. Per tal d'observar el DNA en el transil·luminador, s'incorpora el bromur d'etidi directament al gel a una concentració final de 0,5 µg/ml. L'electroforesi es resol a voltatges de entre 70 i 115V.

3.2.1.2 Electroforesi preparativa

En aquelles electroforesis on el que es pretén és la purificació del DNA d'interès a partir del gel per a una posterior aplicació, s'ha utilitzat agarosa de màxima puresa [*molecular biology grade agarose*, PROMEGA]. En aquests casos, es treballa amb dimensions i volums de càrrega més grans, entre 50 i 100 µl per pou i l'electroforesi es resol a voltatges més baixos entre 40 i 60 V, durant temps més llargs.

3.3 Clonatges

El clonatge de DNA mitjançant l'enginyeria del DNA recombinant és la principal eina emprada per alterar el patró cel·lular d'expressió gènica de forma regulada. L'objectiu és la inserció d'un fragment de DNA (o gen) d'interès (que codifica per a una proteïna, domini proteic, *siRNA* etc.) dins un vector que, un cop introduït a la cèl·lula pels mecanismes detallats anteriorment, assegura

l'expressió del gen en estudi. El protocol de clonatge utilitzat en aquest treball inclou les següents fases:

- Digestió del insert i del vector amb els que es vol fer el clonatge.
- Purificació del insert i el vector.
- Lligació.
- Transformació del producte de lligació en bacteris competents.
- Identificació de les colònies recombinants per PCR i seqüenciació.
- Preparació del DNA plasmídic.

3.3.1 Digestions

L'eina bàsica que permet la manipulació de la informació genètica són els enzims de restricció, o endonucleases de restricció, que poden reconèixer una seqüència característica i palindròmica de nucleòtids dins una molècula de DNA i tallar-la en aquest punt concret, anomenat lloc o diana de restricció. El tall origina uns extrems que es podrien relligar reconstruint la diana de restricció. L'estratègia consisteix en digerir vector i insert amb els mateixos enzims (o amb enzims que originin extrems compatibles) per la seva posterior lligació. El insert pot provenir tant d'una amplificació de PCR, tenint en compte que els primers emprats han d'amplificar les dianes de restricció adequades als extrems del producte d'amplificació, com d'una digestió d'un vector preexistent. En aquest darrer cas parlem d'un subclonatge.

Tots els reactius i enzims necessaris per les digestions realitzades es van adquirir a [NEW ENGLAND BIOLABS] i a [ROCHE]. Les digestions poden ser simples (utilitzant un sol enzim de restricció) o dobles. En el cas de digestions simples el producte es va purificar tal i com s'especifica a l'apartat 3.3.2.1. Els productes de les digestions dobles es van purificar per electroforesi en gel d'agarosa per visualitzar-lo i seguint el protocol especificat a l'apartat 3.3.2.2. El volum final de la reacció dependrà de la quantitat d'enzim emprat ja que aquest prové d'una solució amb glicerol i el percentatge final d'aquest component no

pot excedir en un 5% ja que provocaria la inhibició de la reacció de digestió. La digestió consta dels següents components:

▪ Reactius

- Fins a 10 µg de DNA diana.
- 3U/µg de DNA (1 unitat enzimàtica es defineix com la quantitat necessària d'enzim per digerir 1 µg de DNA en 1h a 37°C).
- BSA (1% del volum final de la reacció i només per a certs enzims).
- Buffer 10x (10% del volum final), el recomanat per a cada enzim.
- Aigua milli-Q estèril (fins a completar el volum necessari).

▪ Procediment

- Incubar les reaccions *o/n* a 37°C o a RT en funció de l'enzim emprat.
- Comprovar per electroforesi en gel d'agarosa que la digestió ha estat completa abans de continuar el clonatge (Veure apartat 3.2.1).
- La digestió es pot guardar a -20°C fins a la seva utilització.

Les digestions dobles són possibles sempre que el tampó dels dos enzims sigui compatible. En cas de no ser així, la digestió s'ha de realitzar de forma seqüencial.

3.3.2 Purificació del DNA

3.3.2.1 Producte de PCR

Els productes de PCR es van purificar amb el *High Pure PCR Purification kit* [ROCHE] seguint les especificacions del fabricant. Aquest protocol es basa en l'ús d'unes columnes de polímer capaç de retenir el DNA en determinades condicions. Amb aquest sistema es poden purificar fragments de DNA entre 0,1 i 10 kb de grandària. S'han seguit les instruccions indicades pel fabricant.

3.3.2.2 Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

Els fragments de DNA resolts electroforèticament en un gel d'agarosa es poden recuperar i purificar a partir del gel per utilitzar-se en posteriors aplicacions. En primer lloc, es separa electroforèticament el DNA d'interès en un gel d'agarosa-BrEt (Veure apartats 3.2.1.1 i 3.2.1.2). En segon lloc es retalla

la banda a recuperar amb una fulla de bisturí estèril, sota llum ultraviolada. Per a purificar el DNA de la banda d'agarosa escindida, s'utilitza l'*Agarose gel DNA extraction kit* de [ROCHE], basat en la utilització de pols de sílica que reté adsorbit el DNA en presència de sals catióniques. S'ha seguit el protocol suggerit pel fabricant.

3.3.3 Lligació

Un cop comprovades la puresa i la concentració del DNA purificat mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa i la mesura espectrofotomètrica, es procedeix amb el protocol de lligació. S'ha d'optimitzar la relació insert (I)/vector (V) (normalment s'ha utilitzat una relació molar I:V de 3:1). La quantitat final de insert es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$\frac{\text{Quantitat de V (ng) x mida de l'I (kb)}}{\text{Mida del V (kb)}} \times \text{relació molar} = \text{ng d'I}$$

▪ Procediment

- Afegir volums de vector i insert a la proporció adequada.
- Afegir 1µl de tampó T4 [New England Biolabs].
- Afegir 1 U d'enzim T4 lligasa [New England Biolabs].
- Afegir aigua *milli-Q* estèril fins a un volum final de 10 µl.
- La reacció es porta a terme a 16°C durant 16h en un temociclador *Perkin Elmer 2400*[®] [PERKIN-ELMER].

3.3.4 Transformació de bacteris competents

Els bacteris competents poden incorporar DNA exogen en un procés denominat transformació. El mètode emprat per a la transformació és el que s'anomena de xoc tèrmic, utilitzant els bacteris *One-Shot*[®] *TOP10 d'E.coli*, de la casa comercial [INVITROGEN], fets competents químicament i que ofereixen una eficiència de transformació de 10⁷-10⁸ cfu/µg.

▪ Procediment

- Descongelar en gel una alíquota de bacteris competents.

- Afegir a la suspensió de *One-Shot*®TOP10 2 µl d'una lligació de producte de PCR o bé de 2-5µl d'una lligació estàndard i barrejar suaument.
- Incubar un mínim de 30 minuts en gel.
- Realitzar el xoc tèrmic incubant la barreja a 42°C durant 30 segons.
- Transferir immediatament la barreja al gel.
- Afegir 250 µl de medi SOC* prèviament temperat a 37°C.
- Incubar a 37°C amb forta agitació (200-225 rpm) durant 1 hora.
- Sembrar 100-250µl en una placa amb medi selectiu per identificar els bacteris transformants i incubar la placa *o/n* a 37°C.

*El medi SOC és un medi especial emprat per a la incubació de cèl·lules competents immediatament després de la transformació, per tal de permetre l'expressió de gens de resistència transferits abans d'exposar les cèl·lules a les condicions selectives.

3.3.5 Identificació de les colònies recombinants i seqüenciació

La identificació de les colònies recombinants es va dur a terme mitjançant una reacció convencional de PCR (Veure apartat 2.2) amb el DNA extret a partir de la pròpia colònia i els *primers* específics per a cada gen clonat a testar.

Les seqüències s'han realitzat al Servei de Seqüenciació Automàtica de la Unitat Científico-Tècnica de Suport (UCTS) de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (IR-HUVH) mitjançant l'analitzador *ABI PRISM 310 Genetic Analyser* [APPLIED BIOSYSTEMS]. Per a les reaccions de seqüència s'ha utilitzat *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* [APPLIED BIOSYSTEMS]. Les condicions de la reacció de seqüència s'ha optimitzat pel PERKIN ELMER *Gene Amp PCR System 2400*.

▪ Reactius

- | | |
|---|---|
| - <i>Big Dye</i> [APPLIED BIOSYSTEMS] | - H ₂ O <i>milli-Q</i> estèril |
| - <i>Big Dye sequencing buffer</i> [APPLIED BIOSYSTEMS] | - <i>Primer</i> específic 5µM |
| - Etanol | |

▪ Procediment

a) Reacció de seqüència

- Preparar la següent reacció fins a un volum final de 20 µl:

Component	Concentració final
<i>Big Dye</i>	2 ul
<i>Big Dye Sequencing Buffer</i>	1 ul
<i>Primer</i> 5 uM	1 ul
DNA motlle #	x ul
Aigua <i>milli-Q</i> estèril	fins a 20 ul

Producte PCR 200 ng; Plasmidi 1ug

- Col·locar la reacció al termociclador i executar el següent programa:

94°C	3 min	
94°C	10 seg	} 25 cicles
T _a (50-55°C)	5 seg	
72°C	4 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

b) Precipitació de la reacció de seqüència

- Afegir a la reacció: 16µl H₂O *milli-Q* i 64 µl Etanol al 95%
- *Vortexar*, precipitar 15 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar 20 minuts a 14000rpm.
- Rentar el *pellet* amb 250 µl d'etanol al 70%.
- Centrifugar 10 min a 14000 rpm.
- Assecar les mostres.

3.3.6 Preparació del DNA plasmídic

Per a la obtenció de DNA plasmídic a partir d'un cultiu bacterià d'*E. Coli* s'ha utilitzat el *kit* comercial *Wizard® plus SV Minipreps Purification System* [PROMEGA]. A partir de 5 ml de cultiu s'obté un rendiment de 15-20 µg de DNA de

prou puresa i qualitat per a ser utilitzat directament en reaccions de seqüenciació automàtica i digestions enzimàtiques. Aquest *kit* es basa en el mètode de lisi alcalina i en l'adsorció del DNA a una resina especial. S'han seguit les instruccions subministrades pel fabricant i a continuació se'n detallen les principals:

- Recollida i resuspensió de les cèl·lules bacterianes.
- Lisi alcalina.
- Neutralització i precipitació proteica i del DNA genòmic.
- Unió del DNA plasmídic a la resina de la columna.
- Rentats de la columna per centrifugació.
- Elució.

En ocasions on el requeriment de DNA plasmídic és elevat, com per exemple trasficcions o digestions preparatives, es procedeix a purificar el DNA recombinant partint de cultius d'*E.coli* en volums més elevats (entre 400 i 500 ml). A tal efecte, s'ha utilitzat el *kit Nucleobond® AX-500* [MACHERY-NAGEL] seguint el protocol recomanat per la casa comercial.

3.4 Mutagènesi dirigida

La mutagènesi dirigida *in vitro* és una tècnica de gran valor a l'hora d'estudiar la relació estructura-funció d'una proteïna o identificar regions intramoleculares d'interès. Per introduir mutacions puntuals de manera ràpida en DNA de doble cadena s'ha utilitzat el *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit* [STRATAGENE] seguint les instruccions del fabricant. Com a DNA motlle s'utilitza un vector plasmídic que conté el insert d'interès i, com a *primers*, dos oligonucleòtids sintètics que contenen la mutació desitjada, cadascun d'ells complementari a cada una de les cadenes oposades del plasmidi. Mitjançant la *Pfu DNA polymerase* s'estenen els *primers* generant, un nou plasmidi de doble cadena que conté la mutació. Per eliminar el DNA parental, s'afegeix a la mescla l'enzim de restricció *Dpn I*, endonucleasa específica de DNA metilat i hemimetilat. Així s'aconsegueix seleccionar el DNA mutat que serà transformat en la soca de bacteris *One-Shot® TOP10 d'E.Coli* de la casa comercial [INVITROGEN]. D'algunes de les colònies crescudes se n'extraurà el DNA plasmídic i es seqüenciarà per confirmar la presència de la mutació.

A continuació es detallen les condicions d'amplificació utilitzades en la mutagènesi de la proteïna hHAVcr-1. L'estratègia consisteix en incorporar la diana de l'enzim de restricció *NdeI* a banda i banda de la regió que es vol deletar. Com a DNA motlle s'utilitza la seqüència de hHAVcr-1 a la que se li han incorporat les dianes de restricció *BamHI*.

▪ Reactius

- *Pfu DNA polymerase* i el seu corresponent tampó [PROMEGA].
- dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; equimolars a 10 mM).
- *ependorfs* per PCR de paret fina.
- *Primers mutats forward i reverse* a 10 µM.
- H₂O *milli-Q* estèril.
- *Dnp I* 10 U/µl [ROCHE]
- *One-Shot® TOP10* [INVITROGEN]

▪ Procediment

- Preparar la següent reacció a volum final de 50 µl

Components	Concentració final
Aigua <i>milli-Q</i> estèril	fins a 50 µl
10x <i>Reaction buffer</i>	5 µl
dsDNA motlle	25-50 ng
<i>primer forward</i>	125 ng
<i>primer reverse</i>	125 ng
<i>DNTPs mix</i>	8 µl
<i>Pfu DNA polymerase</i>	1 µl

- Col·locar les reaccions al termociclador i executar la PCR:

95°C	30 seg	} 10 cicles
95°C	30 seg	
55°C	1 min	
68°C	5 min #	
4°C	∞	

2 min/kb de plasmidi

TAULA 11. PRIMERS EXPERIMENT MUTAGÈNESI DIRIGIDA

MUTACIÓ	PRIMER	SEQÜÈNCIA
Δ246-274	<i>Forward I</i>	5'-GCAATAAGGAGAGAACCCCATATGACCAGCTCACCATTGTAC-3'
	<i>Reverse I</i>	5'-GTACAATGGTGA GCTGGTCATATGGGGTTCTCTCCTTATTGC-3'
	<i>Forward II</i>	5'-TGGATTAACAATCAAACCTCATATGCAA CTGTTCCCTAGAA CAT-3'
	<i>Reverse II</i>	5'-ATGTTCTAGGAA CAGTTGCATATGAGTTTGATTGTTATTCCA -3'
Δ267-278	<i>Forward I</i>	5'- GTGACAGAGTCTTCAGATCATATGGGCCTTTGGAATAACAAT-3'
	<i>Reverse I</i>	5'- ATTGTTATTCCAAAGGCCCATATGATCTGAAGA CTCTGTCAC-3'
	<i>Forward II</i>	5'- CAAACTCAACTGTTCCCTACATATGGAACATAGTCTACTGACG-3'
	<i>Reverse II</i>	5'- CGTCAGTAGACTATGTTCCATATGTAGGAACAGTTGAGTTTG-3'

- Afegir 1µl de l'enzim de restricció *Dpn I* a la reacció de PCR i incubar *o/n* a 37°C.
- Transformar per xoc tèrmic una alíquota dels bacteris competents *One-Shot®TOP10* amb 2µl de la reacció de PCR digerida (veure protocol 3.3.4).
- Sembrar tot el volum de la transformació en plaques de LB-agar amb l'antibiòtic adequat per seleccionar els bacteris transformats.
- L'endemà es piquen colònies, s'aïlla el plasmidi i es seqüencia.
- Aquelles colònies positives es digereixen amb l'enzim de restricció *NdeI*.
- Es fan córrer en un gel d'agarosa, retallem i purifiquem banda.
- Transformar bacteris competents amb el producte de la lligació.
- Picar colònies, seqüenciar i amplificar amb els primers HAVR *BamHI* HA i HAVR HA *AgeI*.

Components	Concentració	94°C	2 min	} 35 cicles
<i>10x HIFI Buffer</i>	5 ul	94°C	30 seg	
<i>Mg₂SO₄ 4,5 mM</i>	1,5 ul	52°C	30 seg	
<i>dNTPs 1,25 mM</i>	8 ul	68°C	90 seg	
<i>primer forward 2 uM</i>	5 ul	68°C	7 min	
<i>primer reverse 2 uM</i>	5 ul	68°C	7 min	
<i>Aigua</i>	24 ul	4°C	∞	
<i>Taq Platinum</i>	0,5 ul			
<i>Plasmidi</i>	1 ul			

- Retallar banda, purificar i clonar al vector *TOPO®TA cloning vector* [INVITROGEN].
- Picar colònies, preparar minipreps, sequenciar i purificar seqüències.

- Digerir amb els enzims *BamHI* i *AgeI* i purificar el producte de la digestió.
- Clonar els productes de les tres reaccions de mutagènesi en el vector lentiviral de sobreexpressió *FUW*.

4. Manipulació de proteïna

4.1 Extracció de proteïna a partir de cultius cel·lulars

Els extractes de proteïnes obtinguts a partir de cèl·lules en cultiu s'han dut a terme seguint sempre el mateix protocol.

▪ Reactius

- Tampó de lisi (Veure l'Annex)
- Inhibidors de proteases (leupeptina 5 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml i PMSF 200 mM)
- PBS 1x (Veure l'Annex)

▪ Procediment

- Suplementar el tampó de lisi amb els inhibidors de proteases en el moment de la utilització.
- Descartar el medi de cultiu i rentar les cèl·lules tres vegades amb PBS 1x fred.
- Afegir el volum adequat de tampó de lisi fred a la placa (500µl / placa de 60 mm de diàmetre) i rascar les cèl·lules, sobre gel, per desprendre-les de la placa.
- Transferir les cèl·lules parcialment lisades a un *ependorf* i passar-les per una xeringa de 21Gx20 en gel 10 vegades.
- Mantenir el lisat en gel durant 30 minuts per permetre una lisi complerta.
- Centrifugar durant 30 minuts a 4°C i 15000 rpm. El sobrenedant es considera el lisat total.
- Aliquotar el lisat i guardar-lo a -80°C.

La concentració de proteïna s'ha valorat amb el *kit DC Protein Assay* [BIO-RAD] seguint les especificacions del fabricant.

4.2 Anàlisi de proteïnes per SDS-PAGE i Western blot

4.2.1 Electroforesi en gel de poliacrilamida

L'electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE) és probablement la tècnica analítica més emprada per separar i caracteritzar proteïnes. La xarxa formada per la barreja d'acrilamida/bis-acrilamida polimeritzada, permet separar les proteïnes segons la seva càrrega, forma i mida, quan s'exposen a un camp elèctric. L'SDS-PAGE permet separar les proteïnes exclusivament pel seu pes molecular. La presència d'SDS, un detergent anfipàtic amb un cap aniónic i una cua lipofílica, desnatura les proteïnes de manera que es perd la seva estructura tridimensional donant lloc a proteïnes lineals. A més, l'SDS s'uneix de forma no covalent a les proteïnes amb una ràtio aproximada d'una molècula d'SDS per cada dos aminoàcids, conferint a la proteïna una càrrega neta negativa.

S'ha utilitzat el sistema d'electroforesi vertical *mini-PROTEAN3* de la casa comercial BIO-RAD. Segons el pes molecular de les proteïnes a resoldre, s'han utilitzat minigels de entre 7.5 i 15% de poliacrilamida, i s'ha treballat sota condicions desnaturitzants.

▪ Reactius

- Tampó de càrrega o de Laemmli 3x (Veure l'Annex).
- Tampó d'electroforesi (Veure l'Annex).

▪ Procediment

- Preparar els gels de poliacrilamida (Veure TAULA 12).
- Preparar les mostres de proteïna diluint-les en tampó de càrrega 3x, bullir-les 5 minuts i posar-les en gel.
- Muntar els gels en la cubeta d'electroforesi, cobrir amb el tampó d'electroforesi i carregar les mostres de proteïna als pous.
- Córrer les mostres a amperatge constant, 20 mA/gel, fins que surti el front.

TAULA 12. Detall dels components i volums necessaris per preparar el gel separador i el concentrador

	GEL SEPARADOR				GEL CONCENTRADOR	
	7,5%	10%	12%	15%		
30% acril / 0,8% bis	3,75 ml	5,0 ml	6,0 ml	7,5 ml	30% acril / 0,8% bis	0,65 ml
4x Tris-Cl /SDS, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	4x Tris-Cl /SDS, pH 6,8	1,25 ml
Aigua	7,5 ml	6,25 ml	5,25 ml	3,75 ml	Aigua	3,05 ml
10% PA	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	10% PA	0,025 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	TEMED	0,01 ml

4.2.2 Electrotransferència de proteïnes. *Western blot*

4.2.2.1 Transferència de proteïnes

Les proteïnes separades per SDS-PAGE es poden electrotransferir a una membrana que permetrà la detecció de la proteïna d'interès mitjançant l'ús d'anticossos i un sistema de revelat adequat.

▪ Reactius

- Tampó de transferència (Veure l'Annex)
- Metanol.
- H₂O destil·lada.
- Membranes *WESTRAN*[®]-*PVDF* [SCHLEICHER&SCHUELL]

▪ Procediment

- Després de l'electroforesi, equilibrar els gels en tampó de transferència.
- Activar la membrana *WESTRAN*[®]-*PVDF* submergint-la durant 5 segons en metanol. Rentar-la amb aigua destil·lada 3 cops.
- Equilibrar la membrana en tampó de transferència.
- Muntar la transferència seguint les instruccions de l'aparell i transferir a 400 mA durant 90 min.
- Desmuntar la transferència i procedir a la immunodetecció.

4.2.3 Immunodetecció

▪ Reactius

- Llet en pols descremada
- BSA
- Tween-20 [SIGMA-ALDRICH]
- PBS 1x (Veure l'Annex)
- Anticossos primaris i secundaris (Veure TAULES 13 i 14)
- ECL Plus [AMERSHAM]

▪ Procediment

- Bloquejar la membrana durant 1 hora a temperatura ambient amb 5% de llet (o BSA en funció de l'anticòs primari emprat) i 0,1% *Tween-20* en PBS 1x.
- Incubar *o/n* a 4°C amb l'anticòs primari en la solució de bloqueig.
- Rentar la membrana amb 0,1% *Tween-20* en PBS 1x durant 10 minuts, repetir fins a un total de tres vegades.
- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari adequat durant 1 hora a temperatura ambient.
- Rentar la membrana amb 0,1% *Tween-20* en PBS 1x durant 10 minuts, repetir una vegada més i fer un darrer rentat amb PBS 1x.
- Revelar mitjançant el sistema de detecció ECL plus seguint les instruccions del fabricant.

TAULES 13 i 14. Anticossos primaris i secundaris emprats en experiments de Western blot

Anticòs primari	Origen	Proveïdor / Referència	Condicions Western blot	
			Concentració de treball	Temps
hHAVcr-1	ratolí	R&D systems	1:250	<i>o/n</i> 4°C
HA	rata	Roche	1:100	RT 1h
Actina	conill	Sigma-Aldrich	1:100	RT 1h
pSTAT3 Y	ratolí	Cell Signalling	1:300	<i>o/n</i> 4°C
pSTAT3 S	conill	Cell Signalling	1:300	<i>o/n</i> 4°C
pSTAT3 t	ratolí	Cell Signalling	1:300	<i>o/n</i> 4°C
gp130	conill	Santa Cruz Biotech	1:300	<i>o/n</i> 4°C

Anticòs secundari	Origen	Proveïdor / Referència	Condicions Western blot	
			Concentració de treball	Temps
Anti-rabbit	Goat	Dako	1:2000	RT 1h
Anti-mouse	Goat	Dako	1:2000	RT 1h
Anti-rat	Goat	Sigma-Aldrich	1:2000	RT 1h

4.3 Immunofluorescència i microscopia confocal

Les immunodeteccions s'han dut a terme sobre cèl·lules senceres, prèviament transfectades, i amb anticossos secundaris marcats amb diferents fluorocroms, per tal de permetre la visualització per microscòpia confocal. La microscòpia de fluorescència confocal permet l'obtenció d'imatges de fines seccions òptiques, molt útils a l'hora de localitzar molècules en dues o tres dimensions, permetent, reconstruccions tridimensionals en els estudis de colocalització de proteïnes, en les mesures de concentració d'ions intracel·lulars o en l'estudi del transport intracel·lular.

Les cèl·lules s'han sembrat sobre cobreobjectes circulars [MENZEL-GLASER DECKGLASER] en plaques de 24 pous i la immunodetecció s'ha realitzat 24 hores després de la sembra. Les imatges han estat captades al servei de microscòpia confocal de l'UCTS de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, mitjançant el microscopi confocal espectral FV1000 Olympus i utilitzant el *software* FV-10-ASW 2.0 Olympus.

4.3.1 Sistema de detecció amb paraformaldehid

El sistema de fixació amb paraformaldehid (PFA), permet una fixació menys agressiva que la que ofereixen altres sistemes com per exemple els basats en l'ús d'alcohols tals com el metanol, permetent així, una millor preservació dels antígens.

▪ Reactius

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| - PBS 1x | - HOESCHT 33323 [SIGMA |
| - PFA 4%. | ALDRICH] |
| - NH ₄ Cl 50 mM. | - Fluoromount G |
| - Metanol 10% -20°C. | [SOUTHERNBIOTECH] |
| - BSA - 1% PBS. | - Anticòs primari i secundari. |

▪ Procediment

- Rentar les cèl·lules amb PBS 1x fred per tal d'eliminar les restes de medi de cultiu.
- Fixar les cèl·lules amb PFA 4% a temperatura ambient durant 30 minuts.

- Rentar les cèl·lules amb PBS 1x.
- Incubar les cèl·lules amb NH_4Cl 50mM durant 30 minuts a temperatura ambient per tal de bloquejar els grups aldehid.
- Rentar les cèl·lules amb PBS 1x.
- Permeabilitzar les cèl·lules amb metanol fred al 10% durant 10 minuts.
- Rentar les cèl·lules amb PBS 1x.
- Bloquejar les unions inespecífiques amb 1% BSA en PBS 1x durant 30 minuts a temperatura ambient.
- Incubar les cèl·lules amb l'anticòs o anticossos primaris a les concentracions indicades* o/n 4°C.
- Rentar les cèl·lules 5 minuts amb PBS 1x fins a un total de tres vegades.
- Incubar les cèl·lules amb l'anticòs o anticossos secundaris a les concentracions indicades* durant 1 hora a temperatura ambient i en cambra fosca i humida.
- Rentar les cèl·lules 5 minuts amb PBS 1X fins a un total de tres vegades.
- Incubar les cèl·lules durant 10 minuts amb *HOESCHT* 33323 al 10% en PBS per tal de contratenyir els nuclis.
- Muntar les cèl·lules amb el *Fluoromount G* i mantenir-les a 4°C i a les fosques fins que es visualitzin al microscopi.

* Tant els anticossos primaris com els secundaris es dilueixen en solució de bloqueig. Veure les condicions de treball a les TAULES 15 i 16.

TAULES 15 I 16. Anticossos emprats en els experiments d'Immunocitoquímica

Anticòs Primari	Origen	Proveïdor/ Referència	Condicions ICQ	
			Concentració de treball	Temps
hHAVcr-1	ratolí	R&D Systems	1:250	<i>o/n</i> 4°C
IL-6	ratolí	R&D Systems	1:100	<i>o/n</i> 4°C
pSTAT3 Y	ratolí	Cell Signalling	1:100	<i>o/n</i> 4°C
pSTAT3 S	conill	Cell Signalling	1:100	<i>o/n</i> 4°C
gp130	conill	Santa Cruz Biotech	1:100	<i>o/n</i> 4°C

Anticòs Secundari	Origen	Proveïdor/ Referència	Condicions ICQ	
			Concentració de treball	Temps
Alexa-Fluor 468	ratolí	Invitrogen	1:350	RT 1h
Alexa-Fluor 488	conill	Invitrogen	1:300	RT 1h

4.4 ELISA de mostres plasmàtiques i sobrenadants de línies cel·lulars renals per a la detecció d' IL-6 i hHAVcr-1.

La tècnica *Quantikine IL-6 Immunoassay* [R&D Systems] és un mètode d'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) en fase sòlida, dissenyat per tal de mesurar IL-6 en sobrenadants de cèl·lules en cultiu, sèrum i plasma.

Aquest assaig utilitza la tècnica d'immunoassaig enzimàtic quantitatiu on un anticòs monoclonal específic per IL-6 és unit a una microplaca de 96 pous. Els estàndards i mostres són pipetejats als pous i qualsevol presència d'IL-6 és unida per l'anticòs immobilitzat. Després dels diversos rentats que ajuden a eliminar qualsevol substància no unida, l'enzim policlonal específic per IL-6 unit enzimàticament, s'afegeix als pous. A continuació es realitza un rentat per eliminar les substàncies no unides al reactiu anticòs-enzim, una solució substrat s'afegeix als pous i el color apareix de forma proporcional a la quantitat de IL-6 unida en el primer pas. L'aparició del color s'atura i es mesura la intensitat del color. Per tal de mesurar l'absorbància es va utilitzar el lector de plaques [BIOTEK ELx800] a 450 nm amb una correcció de l'absorbància a 540 nm. La concentració de IL-6 en cada mostra va ser calculada mitjançant una corba estàndard i va ser expressada en termes absoluts en (pg/ml). El mateix

sistema s'ha utilitzat per avaluar els nivells de hHAVcr-1 a l'orina de pacients amb ccRCC.

▪ Reactius

- Microplaca de 96 pous amb anticòs anti-IL-6 unit.
- Conjugat IL-6.
- Estàndards d'IL-6.
- Diluent RD1W.
- Diluent calibrador RD5T(per mostres de sobrenadants).
- Diluent calibrador RD6F(per mostres de plasma).
- Tampó de rentat.
- Reactiu de color A.
- Reactiu de color B.
- Solució *d'stop*.
- Tires adhesives per cobrir els pous.
- Mostres de sobrenadants de cèl·lules en cultiu, plasma i orina de pacients amb càncer renal.

▪ Mostres

- Les mostres de plasma i orina de pacients amb càncer renal, van ser recollides asèpticament abans i després de sotmetre als pacients a una nefrectomia radical i es van emmagatzemar a -80°C després de centrifugar-les durant 15 minuts a 1000 g.

- Les mostres de sobrenadants de línies cel·lulars d'adenocarcinoma renal humà van ser recollides, les partícules i restes cel·lulars es van eliminar mitjançant una centrifugació i van ser emmagatzemades a -20°C.

▪ Procediment

Abans de començar l'experiment, cal que tots els reactius i mostres a utilitzar a l'assaig siguin portats a temperatura ambient.

- Preparar tots els reactius i els estàndards de treball seguint les instruccions del fabricant.
- Afegir 100 µl del diluent de l'assaig RD1W a cada pou.
- Afegir 100 µl de cada estàndard, mostra o control per pou. Tapar amb les tires adhesives i incubar durant dues hores a temperatura ambient.

- Aspirar cada pou i rentar, repetint el procés tres cops fent un total de quatre rentats. Després del darrer rentat, treure qualsevol resta de tampó de rentat per aspiració o decantació.
- Afegir 200 µl del conjugat IL-6 a cada pou. Tapar amb una nova tira adhesiva i incubar durant dues hores a temperatura ambient.
- Repetir el procés d'aspiració i rentat descrits en el quart pas.
- Afegir 200 µl de Solució de substrat a cada pou. Incubar durant 20 minuts a temperatura ambient. Protegir de la llum.
- Afegir 50 µl de solució d'*stop* a cada pou. El color dels pous canvia del blau al groc.
- Determinar la densitat òptica de cada pou en els següents 30 minuts.

4.5 Anàlisi de l'expressió de proteïnes en mostres humanes

4.5.1 Selecció de casos

Es van revisar dades clíniques i patològiques de 168 pacients amb masses renals tractades, per nefrectomia parcial o nefrectomia radical, entre Gener del 2002 i Desembre del 2005 a l'Hospital Vall d'Hebrón. Les dades clíniques d'aquests pacients es poden veure a l'apartat 1.2 de Resultats. Es disposava de dades clíniques tals com data de diagnosi, informació demogràfica, estadiatge clínic, grau *Führman* etc. per 98 pacients amb ccRCC. Es va avaluar l'expressió de la proteïna hHAVcr-1 en les regions normals i tumorals de cada pacient, atenent a la distribució del total de la proteïna en diferents compartiments subcel·lulars (membrana i citosol). Es van incloure, com a control de l'estudi, 10 mostres de RCC papil·lar i 5 mostres d'oncocitomes així com 5 mostres de glomerulopatia de canvis mínims. Per l'estudi sobre la participació de la hipòxia en l'expressió de la proteïna, es van recollir 5 mostres normals i tumorals de pacients amb ccRCC abans del clampatge de l'arteria renal que té lloc durant la cirurgia.

4.5.2 Construcció de *Microarrays* de teixit

L'objectiu de la construcció dels *microarrays* de teixit (*TMA*s) era el de poder estudiar l'expressió de la proteïna hHAVcr-1 en el màxim grup de mostres de teixit renal en un sol experiment. Així doncs, es va construir un

microarray de teixit tumoral renal d'un total de 98 pacients de ccRCC. Les mostres incloses en aquest estudi van ser proporcionades pel Departament de Patologia de l'Hospital Vall d'Hebrón. La construcció de cadascun dels *TMA*s es va realitzar mitjançant l'ús del *Advanced Tissue Arrayer* [CHEMICON INTERNATIONAL], que permet muntar múltiples mostres de teixit en un sol bloc de parafina. El patòleg, analitzant les seccions tissulars tenyides amb Hematoxilina-Eosina, va identificar quines eren les àrees normals, tumorals i transicionals d'interès per a cada pacient. Per cadascuna d'aquestes àrees, en van realitzar tres perforacions diferents de 1,2 mm de diàmetre que es van incloure en un bloc de parafina receptor. D'aquesta forma es van anar construint *TMA*'s que recullen mostres dels 98 pacients de ccRCC. El servei de Patologia va realitzar també els talls histològics que posteriorment es van analitzar per immunohistoquímica.

4.5.3 Immunohistoquímica

Les tècniques d'immunohistoquímica (IHQ) ens permeten la identificació de determinats antigens, en aquest cas, sobre mostres de talls tissulars procedents de tumors renals. L'aplicació directa d'anticossos monoclonals o policlonals sobre mostres de teixit, permet la localització microanatòmica relacionada amb els nivells d'expressió i la seva correlació amb paràmetres morfològics, augmentant així la sensibilitat i especificitat de l'estudi.

Els talls de mostres tissulars, *TMA*s i biòpsies, van ser fixades en formaldehid, integrades en parafina i es van tallar seccions de 5 µm per elaborar les immunohistoquímiques. El protocol per la immunotinció dels talls histològics es detalla a continuació:

▪ Reactius

- Xilè
- Etanol
- H₂O *milli-Q* estèril
- PBS 1x
- PBS-T (Veure l'Annex)
- Tampó citrat [DAKO]
- DakoPen [DAKO]
- *Peroxidase-Blocking Solution* [DAKO]
- Sèrum normal de cavall.
- Anticòs primari.

- *Dako Real EnVision HRP Rabbit/Mouse* [DAKO]
- *DAB* [DAKO]
- Hematoxilina de *Harris* [DAKO]
- *DPX Mountant for histology* [SIGMA-ALDRICH]

▪ Procediment

- Deixar els portaobjectes en un forn d'incubació a 55°C durant tota la nit per tal que les mostres deixin anar l'excés de parafina. Per aquest fi, es col·locaran protegides i en posició vertical.
- *Desparafinat*: El procés de *desparafinació* consta de tres etapes seqüencials:
 - 3 rentats en xilè de 15 minuts cadascun.
 - 1 rentat en etanol al 100% de 10 minuts.
 - 1 rentat de 5 minuts en etanol al 100%.
- *Hidratació*: Aquest procés consta de set etapes:
 - 45 segons en etanol al 100%
 - 45 segons en etanol al 95%
 - 45 segons en etanol al 85%
 - 45 segons en etanol al 70%
 - 45 segons en etanol al 50%
 - 45 segons en etanol al 30%
 - 45 segons en H₂O o PBS 1x.
- Rentats:
 - 5 minuts en PBS-T (PBS + 0,5% *TritóX-100* o 0,1% *Tween-20*)
- *Desemmascarament* de l'epítip:
 - Tractar les mostres amb tampó citrat 10 mM pH6.0 al microones durant 5 minuts a màxima potència.
 - Deixar refredar a temperatura ambient fins a aproximadament 70°C.
 - Incubar durant 15 minuts les mostres al microones a màxima potència.
 - Deixar refredar a temperatura ambient.
 - Rentar durant 5 minuts amb H₂O *milli-Q*.
 - Rentar durant 5 minuts amb PBS 1x.

- *Immunotinció:*
 - Assecar els portes al voltant del talls i dibuixar un cercle al voltant de la mostra amb el *DakoPen*.
 - Bloquejar la peroxidasa endògena durant 10 minuts amb 100 µl de 3% *Peroxidase-Blocking Solution* a les fosques.
 - Rentar durant 5 minuts en PBS-T.
 - Bloquejar els llocs inespecífics amb 70 µl de 10% *Normal Horse Serum*; 0,1% *Tween-20* en PBS durant 1h a temperatura ambient.
 - Treure l'excés suaument i incubar el teixit durant 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs primari, en les condicions posades a punt en cada cas (Veure T_{AULA} 17)
 - Rentar dos cops durant 5 minuts en PBS-T.
 - Incubar el teixit amb dues gotes del sistema *Dako Real EnVision HRP Rabbit/Mouse* durant 40 minuts a temperatura ambient.
 - Rentar tres cops durant 5 minuts en PBS-T.
 - Assecar els portes al voltant del talls.
 - Revelar incubant amb *DAB* durant 5 minuts. El *DAB* es prepara mantenint la proporció de 1 ml de tampó B (*Dako Real Substrate Buffer*) amb 20 µl de *DAB (Buffer C, DAB+ Crhomogen x50)*.
 - Rentar durant 5 minuts en PBS.
 - Contratenyir els nuclis amb hematoxilina de Harris durant 45 segons.
 - Rentar abundantment amb H₂O destil·lada.
- *Deshidratació:*
 - Incubar amb H₂O
 - 45 segons en etanol al 30%
 - 45 segons en etanol al 50%
 - 45 segons en etanol al 70%
 - 45 segons en etanol al 85%
 - 45 segons en etanol al 95%
 - 45 segons en etanol al 100%
 - 2 exposicions de 3 minuts en xilè.
- *Muntatge:*
 - Muntar els portes amb medi de muntatge orgànic DPX [Fluka].

TAULA 17. Anticossos emprats en els experiments d'Immunohistoquímica

Anticòs Primari	Origen	Proveïdor/ Referència	Condicions IHQ	
			Concentració de treball	Temps
hHAVcr-1	ratolí	R&D Systems	1:250	<i>o/n</i> 4°C
IL-6	ratolí	R&D Systems	1:100	<i>o/n</i> 4°C
pSTAT3 Y	ratolí	Cell Signalling	1:100	<i>o/n</i> 4°C
pSTAT3 S	conill	Cell Signalling	1:100	<i>o/n</i> 4°C

4.5.4 Quantificació de l'expressió de hHAVcr-1 en teixit

L'expressió d'hHAVcr-1 va ser avaluada de forma semiquantitativa pel sistema del *HScore*, basat en el càlcul del percentatge de cèl·lules epitelials tenyides i la intensitat de tinció per cada cas. Es va calcular la expressió total de hHAVcr-1 així com en el citosol i la membrana cel·lular. L'*HScore* es va calcular segons la fórmula següent: $Hscore = 1 \times (\% \text{ tinció dèbil}) + 2 \times (\% \text{ tinció moderada}) + 3 \times (\% \text{ tinció intensa})$ amb una puntuació que pot variar entre 0 i 300. La puntuació de la intensitat es defineix com : 0= la tinció a les cèl·lules no s'aprecia, 1=intensitat de tinció dèbil, 2= intensitat de tinció intermèdia, 3= intensitat de tinció forta. Per a cada cas es va obtenir la mitjana de les tres mostres recollides i es van realitzar les anàlisis estadístiques pertinents.

4.5.5 Anàlisi estadística

Les associacions entre la expressió d'hHAVcr-1 total, citosòlica i de membrana amb els diferents paràmetres clínico-patològics es van realitzar emprant el test no-paramètric *Mann-Whitney U*. Les relacions entre l'expressió citosòlica i membranosa en mostres normals i tumorals van ser avaluades amb el test de *Wilcoxon*. La supervivència sense recurrència de la malaltia va ser calculada des del moment de la cirurgia fins el moment de l'aparició de la recidiva local o distant. L'estimació de la supervivència per les corbes de *Kaplan Meier* van ser comparades utilitzant el test *log rank*. Les anàlisis multivariants es van realitzar utilitzant el model de regressió de *Cox* per tal de determinar la importància pronostica independent del paràmetres clínico-patològics. L'anàlisi estadística es va realitzant emprant el *software* SPSS 12.0.

4.6 Assaig Luciferasa

És un assaig funcional d'activitat que serveix per avaluar la capacitat d'activació o inhibició de la transcripció de diferents elements promotors, en el nostre cas del promotor del gen NFkB. El promotor d'aquest gen es fusiona al gen reporter de la Luciferasa, mitjançant un subclonatge al plasmidi *pGL3-Basic vector* (cedit pel grup de la Dra. Rosanna Paciucci, IRHUVH). El gen *Firefly Luciferase (Photinus Pyralis)* codifica per un enzim capaç de catalitzar la reacció d'oxidació per la que es genera una emissió de llum detectable. La quantitat de llum es mesura per un luminòmetre (Clarity™ Microplate Luminometer, BioTek) i, és proporcional a l'estat d'activació del promotor del gen d'estudi.

Per la mesura Luciferasa, es va utilitzar el sistema *Dual-Luciferase® Reporter assay System* [PROMEGA]. Aquest sistema, incorpora a més del substrat de la Luciferasa, un segon substrat per l'enzim *Renilla Luciferase (Renilla Reformis)*. El substrat de la reacció catalitzada per aquest segon enzim inactiva el primer, de forma que atura l'emissió lumínica. Al nostre cas, el gen de la *Renilla* es troba sota el control del promotor constitutiu TK, aportant un control normalitzador sobre l'eficiència de la transfecció de les diferents condicions experimentals.

Els assajos es van realitzar en plaques de 12 pous i cada condició experimental va ser mesurada per triplicat. Els extractes cel·lulars es van aconseguir per *scraping* a 4°C utilitzant el tampó *Lysis buffer 1x* (70 µl/pou). Per a cada punt es va aplicar el 50% del llisat cel·lular a una placa de 96 pous de fons opac. La lectura lumínica es va realitzar de manera automatitzada mitjançant un luminòmetre Clarity Bio-Tek segons el següent procediment:

▪ Procediment

- Afegir 30 µl de substrat del gen *Firefly: Luciferase Assay Reagent (LAR)*.
- Agitar mecànicament durant 10 seg.
- Presa de la mesura de luminescència.
- Afegir 20 µl de substrat del gen *Renilla: Stop and Glo® Reagent*.
- Mesurar la luminescència.

Taula 1 Annex:

TAMPONS GENERALS			
NOM	COMPOSICIÓ		COMENTARIS
H ₂ O - DEPC	DEPC	0,1% (v/v)	Remenar bé i deixar actuar o/n en una campana de fums. Autoclavar per inactivar el DEPC.
PBS 1x	NaCl	137 mM	Esterilitzar a l'autoclau.
	KCl	2,5 mM	
	Na ₂ PO ₄	10 mM	
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM	
TBS 1x	Tris-HCl pH 8,0	10 mM	Esterilitzar a l'autoclau.
	NaCl	150 mM	
TAE 1x	Tris base	40 mM	Ajustar el pH a 8,1 i autoclavar.
	Àcid acètic	2 mM	
	EDTA	0,2 mM	
PBS-T	PBS	1x	
	Tween-20	0,1% (v/v)	

Taula 2 Annex:

MEDIS I TAMPONS PER A BACTERIS			
NOM	COMPOSICIÓ		COMENTARIS
MEDI LB (PER A 1L)	Tryptona [DIFCO] Extracte de llevat [DIFCO] NaCl	10g 10g 5g	Ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i autoclavar.
LB-agar (PER A 1L)	Medi LB pH 7,4 Agar [DIFCO]	1l 15g	Autoclavar per esterilitzar. Deixar refredar fins a uns 50°C i afegir, si cal, l'antibiòtic d'elecció. Distribuir la mescla en plaques i deixar solidificar. Guardar a 4°C.
AMPICIL·LINA	Ampicil·lina [GIBCO]	50 mg/ml	Diluir l'Ampicil·lina en H ₂ O <i>milli-Q</i> estèril. Aliquotar i guardar a -20°C.

Taula 3 Annex:

TAMPONS PER SDS-PAGE I WESTERN BLOT

NOM	COMPOSICIÓ	COMENTARIS	
Tris-HCl 4x pH 6,8	Tris-HCl pH 6,8 SDS	0,5 M 0,4% (w/v)	Filtrar el Tris-HCl amb filtre de 0,45 µm abans d'afegir el SDS. Guardar a 4°C
Tris-HCl 4x pH 8,8	Tris-HCl pH 8,8 SDS	1,5 M 0,4% (w/v)	Filtrar el Tris-HCl amb filtre de 0,45 µm abans d'afegir el SDS. Guardar a 4°C
Tampó d'electroforesi 5x	Tris base Glicina SDS	125 mM 0,96 M 0,5% (w/v)	Guardar a 4°C. Diluir a la concentració de treball 1x amb aigua destil·lada.
Tampó de transferència 3x	Tris base Glicina SDS	172 mM 1,32 M 11,8 mM	Guardar a 4°C. Diluir a la concentració de treball 1x amb aigua destil·lada i afegir metanol al 20% (v/v).
Tampó de Laemmli 3x	Tris-HCl pH 6,8 Glicerol SDS B-mercaptoetanol Blau de bromofenol	188 mM 30% (v/v) 6% (v/v) 15% (v/v) 0,02% (w/v)	Guardar a temperatura ambient.
Tampó de lisi	Tritó X-100 HEPES pH 7,4 EGTA DTT B-Glicerolfosfat Glicerol NaVO ₄	1% (v/v) 20 mM 2 mM 1 mM 50 mM 10% (v/v) 1 mM	Afegir PMSF, inhibidors de proteases i B-mercaptoetanol abans d'utilitzar.

Taula 4 Annex:

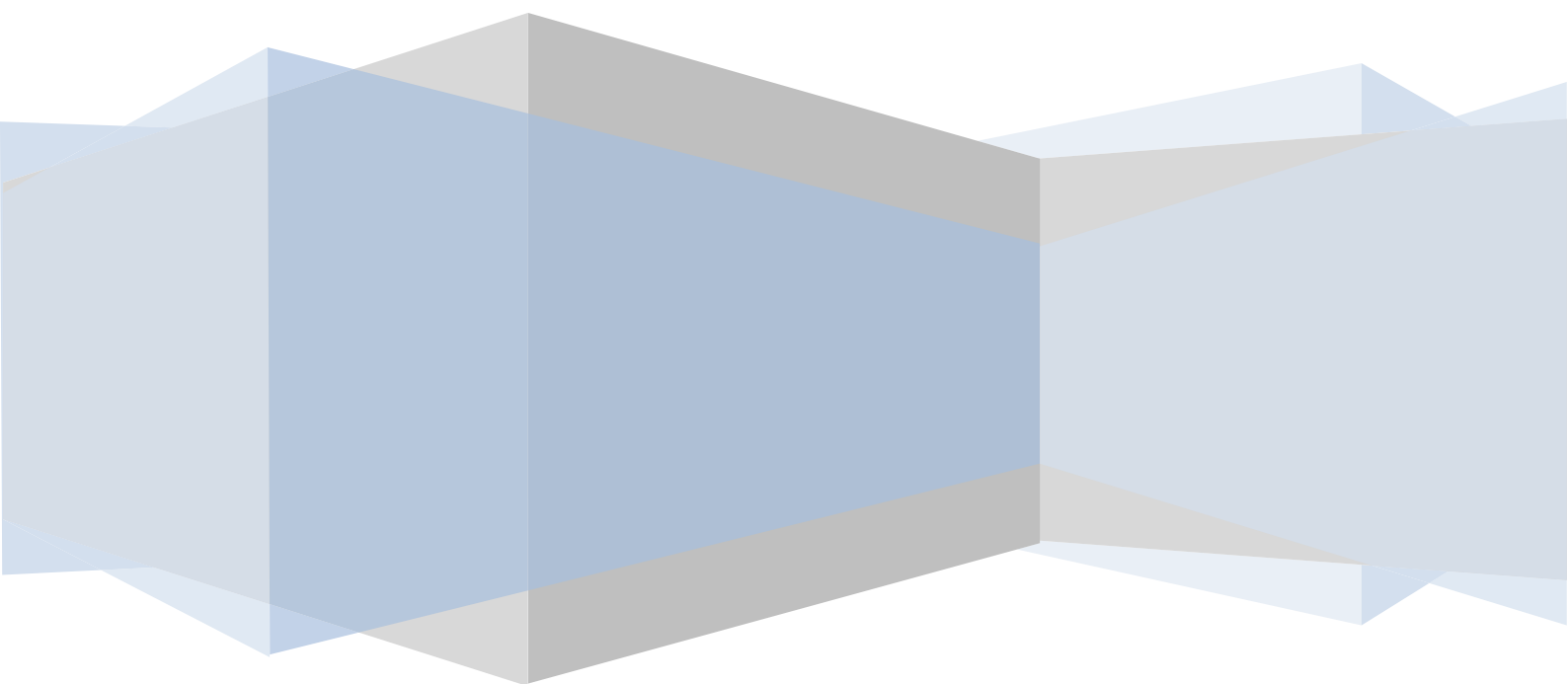
MEDI DE CULTIU CEL·LULAR

NOM	COMPOSICIÓ	COMENTARIS	
MEDI DMEM (0,5 l)	DMEM [BIOLOGICAL INDUSTRIES]	0,5 l	Filtrar amb filtres de 0,22 µm [MILLIPORE]
	FBS [BIOLOGICAL INDUSTRIES]	10% (v/v)	
	FBS tetracycline free [PAA]	10% (v/v)	
	MEM EAGLE Non essential aminoacid solution 100x	1% (v/v)	
	Solució L-Glutamina 200 mM	1% (v/v)	
	Solució Piruvat sòdic 100 mM [BIOLOGICAL INDUSTRIES]	1% (v/v)	
Solució antibiòtic-antimicòtic 100 mM [GIBCO]	1% (v/v)		

Taula 5 Annex:

TAMPONS EXPERIMENT <i>MICROARRAYS</i> RNA		
NOM	COMPOSICIÓ	
TAMPÓ A	Tris-Acetata pH 8,1	40 mM
	KOAc	100 mM
	Mg(OAc) ₂	30 mM
COCKTAIL D'HIBRIDACIÓ	Oligonucleòtid control B2	50 pM
	Control d'hibridació eucariotes BioB	1,5 pM
	Control d'hibridació eucariotes BioC	5 pM
	Control d'hibridació eucariotes BioD	25 pM
	Cre	100 pM
	<i>Herring sperm</i> DNA	0,1 mg/ml
	BSA acetilat	0,5 mg/ml
TAMPÓ D'HIBRIDACIÓ 1x	MES	100 mM
	[Na ⁺]	1 M
	EDTA	20 mM
	Tween-20	0,01% (v/v)

Resultats



AVÍS IMPORTANT

El text d'aquest capítol ha estat retirat seguint instruccions de l'autora de la tesi, en existir participació d'empreses, existir conveni de confidencialitat o existeix la possibilitat de generar patents

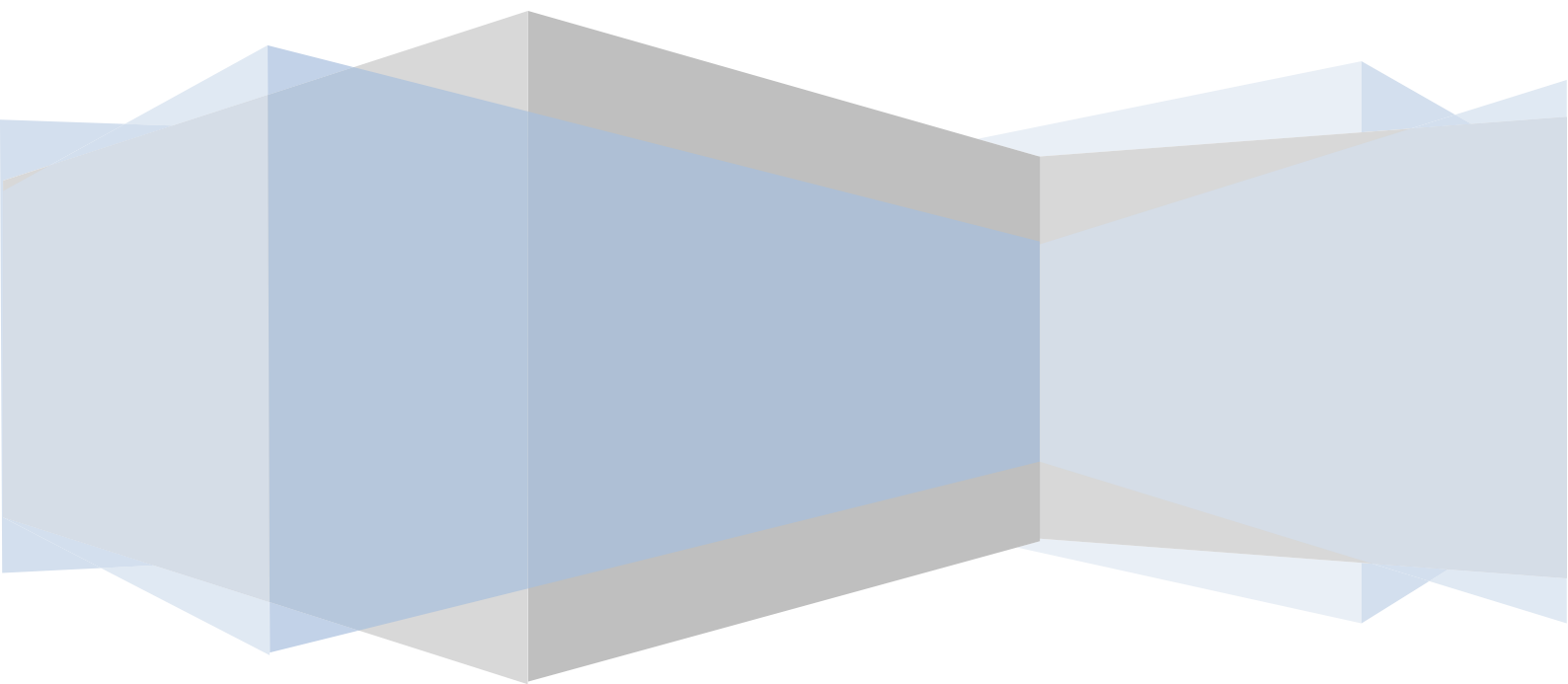
AVISO IMPORTANTE

El texto de este capítulo ha sido retirado siguiendo instrucciones de la autora, al existir participación de empresas, convenio de confidencialidad o la posibilidad de generar patentes.

IMPORTANT NOTICE

The text of this chapter has been withdrawn on the instructions of the author, as there is participation of undertakings, confidentiality agreement or the ability to generate patent

Discussió



AVÍS IMPORTANT

El text d'aquest capítol ha estat retirat seguint instruccions de l'autora de la tesi, en existir participació d'empreses, existir conveni de confidencialitat o existeix la possibilitat de generar patents

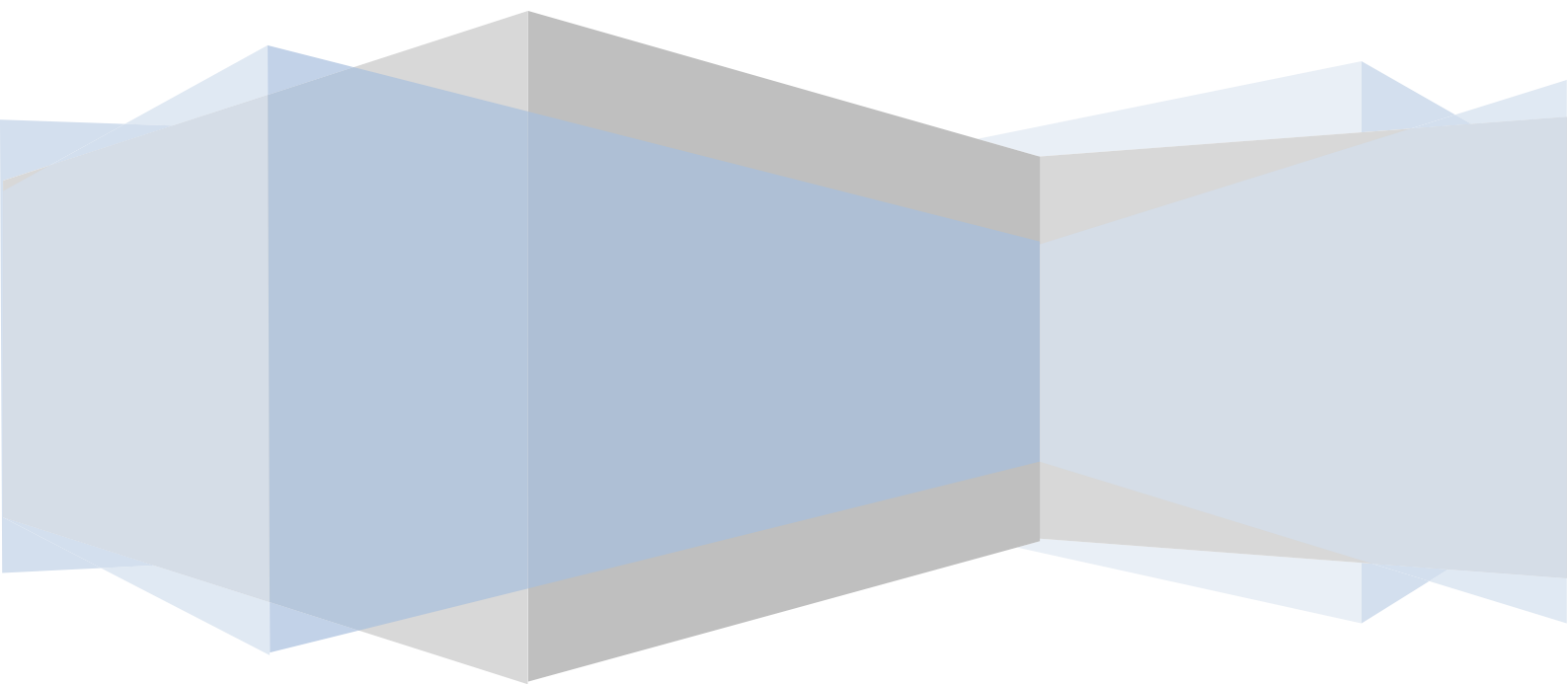
AVISO IMPORTANTE

El texto de este capítulo ha sido retirado siguiendo instrucciones de la autora, al existir participación de empresas, convenio de confidencialidad o la posibilidad de generar patentes.

IMPORTANT NOTICE

The text of this chapter has been withdrawn on the instructions of the author, as there is participation of undertakings, confidentiality agreement or the ability to generate patent

Conclusions



1. La proteïna hHAVcr-1 es troba sobreexpressada en el Carcinoma Renal Cel·lular de cèl·lula clara (ccRCC). Aquesta sobreexpressió es manifesta tant a la part normal com a la part tumoral de mostres de pacients amb ccRCC.
2. hHAVcr-1 no s'expressa a la part normal de mostres de pacients amb altres carcinomes renals cel·lulars com els papil·lars i els oncocitomes ni en mostres controls de pacients amb Glomerulopatia de canvis mínims suggerint que, l'expressió de hHAVcr-1 al teixit normal de mostres de ccRCC és una qüestió intrínseca a aquest tipus de malaltia.
3. L'expressió constitutiva anormal de la proteïna hHAVcr-1 en ronyons normals no danyats, manté les cèl·lules del túbul proximal en un estat de desdiferenciació, estadiatge primerenc en el desenvolupament del ccRCC.
4. La localització cromosòmica del gen hHAVcr-1, la seva expressió a l'epiteli del túbul proximal normal de pacients amb ccRCC i la seva sobreexpressió en ccRCC, implica la proteïna en el desenvolupament d'aquest tipus de tumor.
5. Els tumors classificats com a avançats o disseminats, presenten nivells elevats de la proteïna al citosol respecte els nivells presents de la mateixa a membrana. Respecte el grau *Führman* els pacients que presenten un grau elevat mostren nivells elevats de la proteïna a citosol. En pacients d'alt risc, hi ha una distribució més citosòlica que membranosa malgrat no ser aquesta relació estadísticament significativa.
6. Existeix una correlació entre graus elevats de la malaltia i nivells augmentats de l'ectodomini proteolitzat de hHAVcr-1 a l'orina de pacients amb ccRCC.
7. La baixa tinció de la proteïna a membrana es correlaciona amb un procés de *shedding* actiu, nivells elevats de la proteïna a l'orina i una major malignitat del tumor.
8. La correlació existent entre la capacitat de *shedding* i la malignitat tumoral, així com la capacitat invasiva de les cèl·lules 786-O que expressen el mutant amb *shedding* actiu, demostren com la capacitat augmentada de *shedding* indueix un fenotip més invasiu *in vitro* i tumors més agressius *in vivo*.

9. La sobreexpressió de hHAVcr-1 condueix a la sobreexpressió d'IL-6 a la línia d'adenocarcinoma renal humà 769-P.

10. La sobreexpressió d'IL-6 promou l'activació de la cascada de senyalització JAK-STAT que convergeix en l'entrada a nucli de la proteïna pSTAT3 (fosforilada als seus residus serina 727 i tirosina 705).

11. La via de senyalització JAK-STAT es troba activada en pacients amb ccRCC.

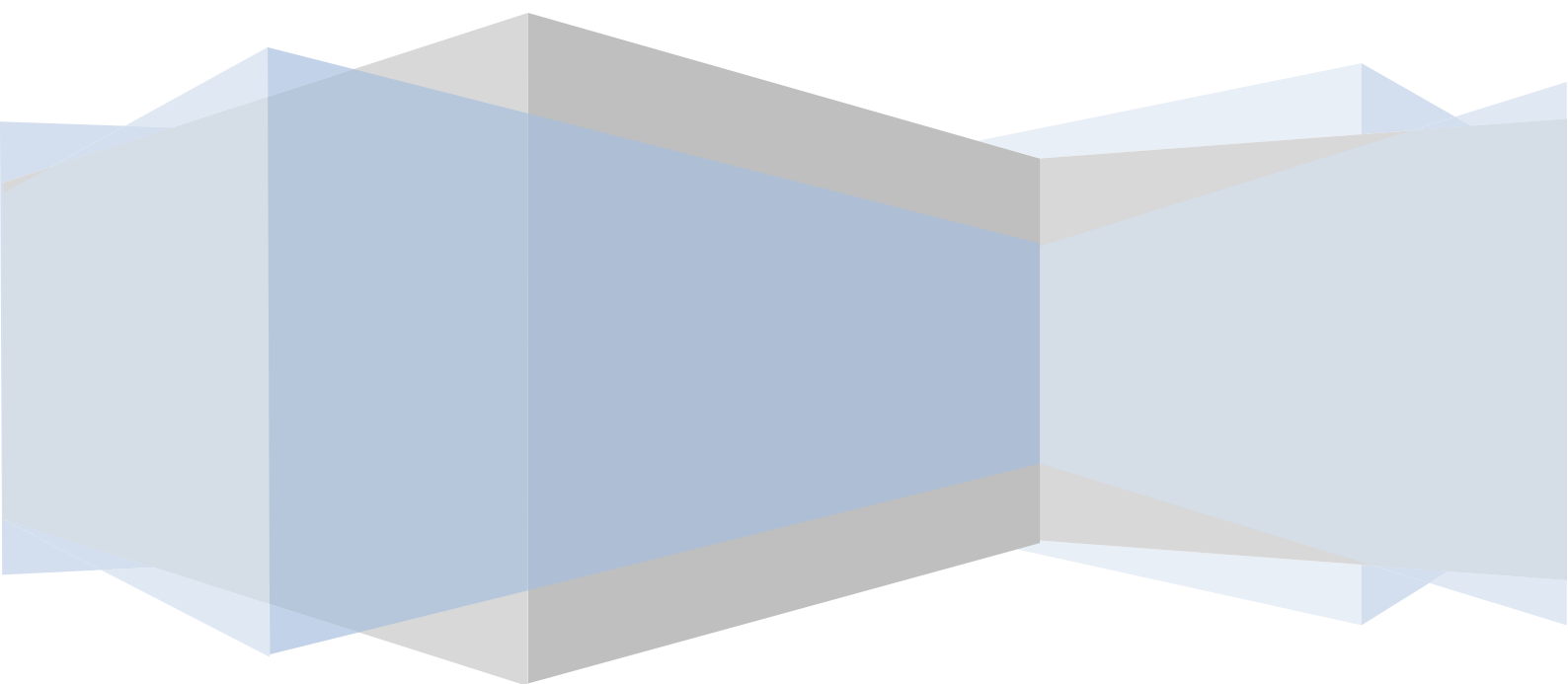
12. La proteïna pSTAT3 Serina727 constitueix un factor pronòstic de la malaltia independent al grau *Führman*, l'estadiatge clínic o el grup de risc al que pertanyi el pacient.

13. El silenciament d'hHAVcr-1 va acompanyat d'una disminució en els nivells de RNA missatger del factor induïble per hipòxia HIF-1 i a més indueix la regulació negativa de dos dels gens diana de HIF-1, el VEGFA i GLUT1.

14. hHAVcr-1 a través de la sobreexpressió d'IL-6 és capaç de regular transcripcionalment HIF-1 α .

15. hHAVcr-1 induiria l'activació transcripcional d'IL-6 que a l'hora provocaria l'activació de la cascada de senyalització JAK-STAT que acaba amb la fosforilació i entrada a nucli de la proteïna STAT3. Aquesta, un cop a nucli, induiria l'activació transcripcional de HIF-1 α que acabaria provocant la generació d'un fenotip cel·lular maligne per activació de la transcripció de gens tals com VEGFA i GLUT1.

Bibliografia



1. Drucker, BJ. Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer treatment reviews* 2005; **31**: 536-545.
2. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition . Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR et al. Editors Hamilton(ON): BC Decker ; 2003.
3. Zbar B, Klausner R, Linehan WM. Studying cancer families to identify idney cancer genes. *Annu Rev Med* 2003; **54**: 217-33.
4. Lineham WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney *J Urol* 2003; **170**: 2163-72.
5. Linehan WM, Zbar B. Focus on kidney cancer. *Cancer Cell* 2004;**6**: 223-8.
6. Eble JN, Sauter G, Epstein JI. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs.Lyon: WHO, IARC press; 2004.
- 7.Hansel D.E, Genetic alterations and histopathologic findings in familial renal cell carcinoma. *Histol. Histopathol* 2006; **21**: 437-444.
8. Storkel S., Eble J.N., Adlakha K., Amin M., Blute M.L., Bostwick D.G.,Darson M., Delahunt B. and Iczkowski K.Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; **80**, 987-989.
9. Fuhrman S.A., Lasky L.C. and Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*1982; **6**, 655-663.
10. Srigley J.R., Hutter R.V., Gelb A.B., Henson D.E., Kenney G., King B.F., Raziuddin S. and Pisansky T.M. Current prognostic factors--renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC) *Cancer* 1997; **80**, 994-996.
11. McGregor D.K., Khurana K.K., Cao C., Tsao C.C., Ayala G., Krishnan B., Ro J.Y., Lechago J. and Truong L.D. Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: the use of the monoclonal antibody 'Renal Cell Carcinoma Marker'. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001; **25**, 1485-1492.
12. Avery A.K., Beckstead J., Renshaw A.A. and Corless C.L. Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* 2000; **24**, 203-210.
13. Taki A., Nakatani Y., Misugi K., Yao M. and Nagashima Y. Chromophobe renal cell carcinoma: an immunohistochemical study of 21 Japanese cases. *Mod. Pathol.* 1999; **12**, 310-317.
14. Pitz S., Moll R., Storkel S. and Thoenes W. Expression of intermediate filament proteins in subtypes of renal cell carcinomas and in renal oncocytomas. Distinction of two classes of renal cell tumors. *Lab. Invest.*1987; **56**, 642-653.
15. Delahunt B. and Eble J.N. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod. Pathol.*1997; **10**, 537-544.
16. Zbar B., Brauch H., Talmadge C. and Linehan M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 1987; **327**, 721-724.
17. Presti J.C. Jr., Moch H., Gelb A.B., Huynh D. and Waldman F.M. Initiating genetic events in small renal neoplasms detected by comparative genomic hybridization. *J. Urol.* 1998; **160**, 1557-1561

18. Presti J.C. Jr., Rao P.H., Chen Q., Reuter V.E., Li F.P., Fair W.R. and Jhanwar S.C. Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res.* 1991; **51**, 1544-1552.
19. Yamakawa K., Morita R., Takahashi E., Hori T., Ishikawa J., and Nakamura Y. A detailed deletion mapping of the short arm of chromosome 3 in sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1991 ;**51**, 4707-4711.
20. Latif F., Tory K., Gnarr J., Yao M., Duh F.M., Orcutt M.L., Stackhouse T., Kuzmin I., Modi W. and Geil L. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; **260** , 1317-1320.
21. Shuin T., Kondo K., Torigoe S., Kishida T., Kubota Y., Hosaka M., Nagashima Y., Kitamura H., Latif F. and Zbar B. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel- Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1994 ; **54**, 2852-2855.
22. van den Berg A., Hulsbeek M.F., de Jong D., Kok K., Veldhuis P.M., Roche J. and Buys C.H. Major role for a 3p21 region and lack of involvement of the t(3;8) breakpoint region in the development of renal cell carcinoma suggested by loss of heterozygosity analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; **15**, 64-72.
23. Velickovic M., Delahunt B. and Grebe S.K. Loss of heterozygosity at 3p14.2 in clear cell renal cell carcinoma is an early event and is highly localized to the FHIT gene locus. *Cancer Res.* 1999; **59**, 1323-1326.
24. Dulaimi E., De C. II, Uzzo R.G., Al-Saleem T., Greenberg R.E., Polascik T.J., Babb J.S., Grizzle W.E. and Cairns P. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; **10**, 3972-3979.
25. Oda H., Nakatsuru Y. and Ishikawa T. Mutations of the p53 gene and p53 protein overexpression are associated with sarcomatoid transformation in renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1995; **55**, 658-662.
26. Wu S.Q., Hafez G.R., Xing W., Newton M., Chen X.R. and Messing E. The correlation between the loss of chromosome 14q with histologic tumor grade, pathologic stage, and outcome of patients with nonpapillary renal cell carcinoma. *Cancer* 1997; **77**, 1154-1160.
27. Kondo K., Yao M., Kobayashi K., Ota S., Yoshida M., Kaneko S., Baba M., Sakai N., Kishida T., Kawakami S., Uemura H., Nagashima Y., Nakatani Y. and Hosaka M. PTEN/MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal-cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 2001; **91**, 219-224.
28. Presti J.C. Jr., Wilhelm M., Reuter V., Russo P., Motzer R. and Waldman F. Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinoma of the kidney. *J. Urol* 2002; **167**, 1464-1468.
29. Cohen H.T., McGovern F.J. Renal cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; **353**, 23.
30. Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; **260**, 1317-20.
31. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004; **22**:4991-5004.
32. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1995; **1**, 822-6.
33. Chen F, Kishida T, Duh FM, et al. Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1995; **55**, 4804-7.

34. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**, 10595-9.
35. Pause A, Lee S, Worrell RA, et al. The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**, 2156-61.
36. Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, et al. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 1998; **18**, 732-41.
37. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen- dependent proteolysis. *Nature* 1999; **399**, 271-5.
38. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 2001; **292**, 464-8.
39. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; **292**, 468-72.
40. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; **295**, 858-61.
41. Clifford SC, Cockman ME, Smallwood AC, et al. Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* 2001; **10**, 1029-38.
42. Hoffman MA, Ohh M, Yang H, Kico JM, Ivan M, Kaelin WG Jr. von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* 2001; **10**, 1019-27.
43. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* 2003; **1**, E83.
44. Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N, Iliopoulos O. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors. *Mol Cancer Res* 2004; **2**, 89-95.
45. Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1998; **1**, 959-68.
46. Feldman DE, Spiess C, Howard DE, Frydman J. Tumorigenic mutations in VHL disrupt folding in vivo by interfering with chaperonin binding. *Mol Cell* 2003; **12**, 1213-24.
47. Zhou MI, Wang H, Ross JJ, Kuzmin I, Xu C, Cohen HT. The von Hippel-Lindau tumor suppressor stabilizes novel plant homeodomain protein Jade-1. *J Biol Chem* 2002; **277**, 39887-98.
48. Zhou MI, Wang H, Foy RL, Ross JJ, Cohen HT. Tumor suppressor von Hippel-Lindau (VHL) stabilization of Jade-1 protein occurs through plant homeodomains and is VHL mutation dependent. *Cancer Res* 2004; **64**, 1278-86.
49. Zhou MI, Foy RL, Chitalia VC, et al. Jade-1, a candidate renal tumor suppressor that promotes apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**, 11035-40.
50. Beck SD, Patel MI, Snyder ME, et al. Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004; **11**, 71-7.
51. Motzer RJ, Bacik J, Mariani T, Russo P, Mazumdar M, Reuter V. Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology. *J Clin Oncol* 2002; **20**, 2376-81.

52. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol* 1997; **10**, 537-44.
53. Gunawan B, von Heydebreck A, Fritsch T, et al. Cytogenetic and morphologic typing of 58 papillary renal cell carcinomas: evidence for a cytogenetic evolution of type 2 from type 1 tumors. *Cancer Res* 2003; **63**, 6200-5.
54. Zbar B, Glenn G, Lubensky I, et al. Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *J Urol* 1995; **153**, 907-12.
55. Lubensky IA, Schmidt L, Zhuang Z, et al. Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-met mutations share a distinct morphological phenotype. *Am J Pathol* 1999; **155**, 517-26.
56. Schmidt L, Duh FM, Chen F, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET protooncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997; **16**, 68-73.
57. Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, et al. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**, 11445-50.
58. Zhuang Z, Park WS, Pack S, et al. Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1998; **20**, 66-9.
59. Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, et al. Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 1998; **17**, 733-9.
60. Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**, 3387-92.
61. Zbar B, Klausner R, Linehan WM. Studying cancer families to identify kidney cancer genes. *Annu Rev Med* 2003; **54**, 217-33.
62. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* 2002; **30**, 406-10.
63. Kiuru M, Launonen V, Hietala M, et al. Familial cutaneous leiomyomatosis is a twohit condition associated with renal cell cancer of characteristic histopathology. *Am J Pathol* 2001; **159**, 825-9.
64. Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, et al. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet* 2004; **74**, 153-9.
65. Meloni AM, Dobbs RM, Pontes JE, Sandberg AA. Translocation (X;1) in papillary renal cell carcinoma: a new cytogenetic subtype. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **65**, 1-6.
66. Sidhar SK, Clark J, Gill S, et al. The t(X;1)(p11.2;q21.2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene PRCC to the TFE3 transcription factor gene. *Hum Mol Genet* 1996; **5**, 1333-8.
67. Weterman MA, Wilbrink M, Geurts van Kessel A. Fusion of the transcription factor TFE3 gene to a novel gene, PRCC, in t(X;1)(p11;q21)-positive papillary renal cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**, 15294-8.
68. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003; **27**:612-24.

69. Peyromaure M, Misrai V, Thiounn N, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: analysis of 61 cases. *Cancer* 2004; **100**, 1406- 10.
70. Birt AR, Hogg GR, Dube WJ. Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons. *Arch Dermatol* 1977; **113**, 1674-7.
71. Weirich G, Glenn G, Junker K, et al. Familial renal oncocytoma: clinicopathological study of 5 families. *J Urol* 1998; **160**, 335- 40.
72. Toro JR, Glenn G, Duray P, et al. Birt-Hogg-Dube syndrome: a novel marker of kidney neoplasia. *Arch Dermatol* 1999; **135**, 1195-202.
73. Zbar B, Alvord WG, Glenn G, et al. Risk of renal and colonic neoplasms and spontaneous pneumothorax in the Birt-Hogg- Dube syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; **11**, 393-400.
74. Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Cell* 2002; **2**,157-64.
75. Khoo SK, Kahnoski K, Sugimura J, et al. Inactivation of BHD in sporadic renal tumors. *Cancer Res* 2003; **63**, 4583-7.
76. da Silva NF, Gentle D, Hesson LB, Morton DG, Latif F, Maher ER. Analysis of the Birt-Hogg-Dube (BHD) tumour suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma and colorectal cancer. *J Med Genet* 2003; **40**, 820-4.
77. Ljungberg, B. Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opi Urol* 2007;**17**: 303-308.
78. Grossman E, Messerli FH. Diuretics and renal cell carcinoma- what is the risk/benefit ratio?. *Kidney Int* 1999; **56**:1603-4.
79. Bretan PN, Busch MP, Hricak H, Williams RD. Development of acquired renal cysts and renal cell carcinoma: case reports and review of the literature . *Cancer* 1986; **57**, 1871.
80. McDougall ML, Weilling LW, Wiegmann TB. Renal adenocarcinoma and acquired cystic disease in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1987; **9**, 166-71.
81. Cohen AJ, Li FP, Berg S. et al. Hereditary renal cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med.* 1979; **301**, 592-5.
82. Drabkin HA, Bradley C, Hart I. et al. Translocation of c-myc in the hereditary renal cell carcinoma associated with a t(3:8) (p14.2;q24.13) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; **82**, 69804.
83. Carroll PR, Murty VVS, Reuter V. et al. Abnormalities at chromosome region 3p12-14 characterize clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987; **26**, 253-9.
84. Yoshida MA, Ohyashiki K, Ochi H. et al. Rearrangement of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986; **19**, 351-4.
85. Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature.* 1987; **327**, 721-4.
86. Rukstalis DB, Bublely GJ, Donahue JP. et al. Regional loss of chromosome 6 in two urological malignancies. *Cancer Res.* 1989; **49**, 5087-90.
87. Kaelin WG Jr, Maher ER. The VHL tumour-supressor gene paradigm . *Trends Genet.* 1998; **14**, 423-6.
88. Gorospe M, Egan JM, Zbar B. et al. Prospective function of Von-Hippel Lindau protein against impaired protein processing in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 1999; **19**, 1289-300.

89. Stebbins CE, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of the VHL-Elongin C- Elongi B complex: implications for VHL tumor supressor function. *Science*. 1999;284:455-6.
90. Gibbons RP, Monte JE, Correa RJ, Mason JT. Manifestations of renal cell carcinoma. *Urology*. 1976; **8**: 201-6.
91. Chrisholm GD, Roy RR,. The systemics effects of malignant renal tumors. *Br J Urol*.1971; **43**:687-700.
92. Lang EK, Asymptomatic space-pccupying lesions of the kidney:a programmed sequential aproach and its impact on quality and cost of health care. *South Med J*.1977; **70**: 277-85.
93. Chernoff DM, Silverman SG, Kikinis R. et al. Three dimensional imaging and display of renal tumors using spiral CT: a potential aid to partial nephrectomy. *Urology*. 1994;**43**:125-9.
94. Wirth SL, Novick AC. 3-dimensional volume rendered computerized tomography for preoperative evaluation and intraoperative treatment of patients undergoing nephron sparing surgery. *J Urol*. 1999; **161**: 1097-102.
95. Karstaedt N, McCullough DL, Wolfman NT, Dyer RB. Magnetic resonance imaging of the renal mass. *J Urol*. 1986; **136**:566-70.
96. Staunderherz A, Steiner B, Puig S. Is there a diagnostic role for bone scanning of patients with a high pretest probability for metastatic renal cell carcinoma? *Cancer*. 1999;**85**(1):153-5.
97. Kinouchi T, Saiki S, Meguro N. et al. Impact of tumor size on the clinical outcomes of patients with Robson Stage I renal cell carcinoma. *Cancer*. 1999;**85**:689-95.
98. Mancilla-Jimenez R, Stanley RJ, Blath RA. Papillary renal cell carcinoma: a clinical, radiologic and pathologic study of 34 cases. *Cancer* 1976;**38**:2469-80.
99. Renshaw AA, Richie JP. Subtypes of renal cell carcinoma. Different onset and sites of metastatic disease. *Am J Clin Pathol*. 1999;**111**(4):539-43.
100. Cangiano T, Liao J, Naitoh J. et al. Sarcomatoid renal cell carcinoma: biologic behavior, prognosis, and response to combined surgical resection and immunotherapy. *J Clin Oncol*. 1999; **17**(2):523-8.
101. Flocks RH, Kadesky MC. Malignant neoplasms of the kidney : an analysis of 353 patients followed five years or more. *J Urol*. 1958;**79**:196.
102. Robson CJ. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol*. 1963;**89**:37.
103. Fleming D, Cooper JS, Henson DE, et al, editors. *AJCC Cancer Staging Manual* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 231-4.
104. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Trans Am Assoc Genitourin Surg*. 1968;60: 122-9.
105. Novick AC. Nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma. *Br J Urol*. 1998;**82**(3):321-4.
106. Van Poppel H, Bamelis B, Oyen R, Baert L. Partial nephrectomy for renal cell carcinoma can achieve long-term tumor control. *J Urol*. 1998;**160**:674-8.
107. Levy DA, Slaton JW, Swanson DA, Dinney CP. Stage specific guidelines for surveillance after radical nephrectomy for local renal cell carcinoma. *J Urol*. 1998; **159**: 1163-7.
108. Skinner D, Colvin RB, Vermillion CD. et al. Diagnosis and management of renal cell carcinoma: a clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*. 1971; **28**:1165-77.
109. Lichtn MR, Novick AC, Goormastic M. Nephron-sparing surgery in incidental versus suspected renal cell carcinoma. *J Urol*. 1994;**152**:39-42.

110. Scheff P, Novick AC, Straffon RA, Stewart BH. Surgery for renal cell carcinoma extending into inferior vena cava. *J Urol*. 1978; **120**:28-31.
111. Waters WB, Richie JP. Agressive surgical approach to renal cell carcinoma: review of 130 cases. *J Urol*. 1979; **122**:306-9
112. Motzer RJ. Renal cell carcinoma: a priority malignancy for development and study of novel therapies. *J Clin Oncol* 2003; **21**:1193-4.
113. Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma:1983-1993. *Semin Oncol* 1995; **22**:42-60.
114. Gollob JA, Upton MP, DeWolf WC, Atkins MB. Long-term remission in a patient with metastatic collecting duct carcinoma treated with taxol/carboplatin and surgery. *Urology* 2001; **58**:1058.
115. Peyromaure M, Thiounn N, Scotte F, Vieillefond A, Debre B, Oudard S. Collecting duct carcinoma of the kidney: a clinicopathological study of 9 cases. *J Urol* 2003; **170**:1138-40.
116. Milowsky MI, Rosmarin A, Tickoo SK, Papanicolaou N, Nanus DM. Active chemotherapy for collecting duct carcinoma of the kidney: a case report and review of the literature. *Cancer* 2002; **94**:111-6.
117. Small EJ, Motzer RJ. Interferon for renal cell carcinoma. In: Belldegrun A, Ritchie AWS, Figlin RA, Oliver RTD, Vaughan ED, eds. Renal and adrenal tumors. New York: *Oxford University Press*, 2003:381-7.
118. Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**:3127-32.
119. Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am* 2000; **6**:Suppl 1: S55-S57.
120. Clark JI, Atkins MB, Urba WJ, et al. Adjuvant high-dose bolus interleukin-2 for patients with high-risk renal cell carcinoma: a cytokine working group randomized trial. *J Clin Oncol* 2003; **21**:3133-40.
121. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, et al. Safety, pharmacokinetic and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2006; **24**:25-35.
122. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:327-37.
123. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; **356**:2271-81.
124. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuglio D, Desideri M, Cognetti F, Zupi G, et al. Antiangiogenic potential of the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res* 2006; **66**:5549-54
125. Houghton PJ. Everolimus. *Clin Cancer Res* 2010; **16**:1368-72.
126. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**:579-91.
127. Mulders P. Vascular endothelial growth factor and mTOR pathways in renal cell carcinoma: differences and synergies of two targeted mechanisms. *BJU Int* 2009; **104**:1585-9.

128. Heng DY, Choueiri TK. Non-clear cell renal cancer: features and medical management. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; **7**:659-65.
129. Banumathy G, Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy* 2010 **10**:7, 658-664.
130. McGregor DK, Khurana KK, Cao C, Tsao CC, Ayala G, Krishnan B, Ro JY, Lechago J, Truong LD: Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: The use of the monoclonal antibody 'Renal Cell Carcinoma Marker.' *Am J Surg Pathol* 2001; **25**:1485–1492.
131. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, de la Taille A, Stifelman MD, Emanuel ER, Bagiella E, Rubin MA, Katz AE, Olsson CA, Sawczuk IS: The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer* 1999; **86**: 492–497.
132. Li G, Passebosch-Faure K, Lambert C, Gentil-Perret A, Blanc F, Oosterwijk E, Mosnier JF, Genin C, Tostain J: The expression of G250/mn/CA9 antigen by flow cytometry: Its possible implication for detection of micrometastatic renal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 89–92.
133. Mulders P, Bleumer I, Oosterwijk E: Tumor antigens and markers in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 2003; **30**: 455–465.
134. de la Taille A, Cao Y, Sawczuk IS, Nozemu T, d'Agati V, McKiernan JM, Bagiella E, Buttyan R, Burchardt M, Olsson CA, Bander N, Katz AE: Detection of prostate-specific membrane antigen expressing cells in blood obtained from renal cancer patients: A potential biomarker of vascular invasion. *Cancer Detect Prev* 2000; **24**: 579–588.
135. Rebhandl W, Handisurya A, Memaran N, Felberbauer FX, Aberle J, Paya K, Strobl B, Horcher E: Expression of cytokeratin-18-related tissue polypeptide-specific (TPS) antigen in Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* 2001; **37**: 357–364.
136. Yoshida N, Ikemoto S, Narita K, Sugimura K, Wada S, Yasumoto R, Kishimoto T, Nakatani T: Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002; **86**: 1396–1400.
137. Wechsel HW, Petri E, Bichler KH, Feil G: Marker for renal cell carcinoma (RCC): The dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). *Anticancer Res* 1999; **19**: 2583–2590.
138. Oremek GM, Sapoutzis N, Kramer W, Bickeboller R, Jonas D: Value of tumor M2 (Tu M2-PK) in patients with renal carcinoma. *Anticancer Res* 2000; **20**: 5095–5098.
139. Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA: Tumor M2 pyruvate kinase in plasma of patients with urological tumors. *Tumour Biol* 2001; **22**: 282–285.
140. Kuroda N, Naruse K, Miyazaki E, Hayashi Y, Yoshikawa C, Ashida S, Moriki T, Yamasaki Y, Numoto S, Yamamoto Y, Yamasaki I, Hiroi M, Shuin T, Enzan H: Vinculin: Its possible use as a marker of normal collecting ducts and renal neoplasms with collecting duct system phenotype. *Mod Pathol* 2000; **13**: 1109–1114.
141. Hotakainen K, Ljungberg B, Paju A, Rasmuson T, Alfthan H, Stenman UH: The free beta-subunit of human chorionic gonadotropin as a prognostic factor in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002; **86**: 185–189.
142. Huang S, Rhee E, Patel H, Park E, Kaswick J: Urinary NMP22 and renal cell carcinoma. *Urology* 2000; **55**: 227–230.

143. Tuzel E, Kirkali Z, Yorukoglu K, Mungan MU, Sade M: Metallothionein expression in renal cell carcinoma: Subcellular localization and prognostic significance. *J Urol* 2001; **165**: 1710–1713.
144. Miyata Y, Koga S, Nishikido M, Hayashi T, Kanetake H: Relationship between serum ferritin levels and tumour status in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int* 2001; **88**: 974–977.
145. Sherief MH, Low SH, Miura M, Kudo N, Novick AC, Weimbs T: Matrix metalloproteinase activity in urine of patients with renal cell carcinoma leads to degradation of extracellular matrix proteins: Possible use as a screening assay. *J Urol* 2003; **169**: 1530–1534.
146. Willers CP, Siebert R, Bardenheuer W, Lux A, Michaelis S, Seeber S, Luboldt HJ, Opalka B, Schutte J: Genetic instability of 3p12–p21-specific microsatellite sequences in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1996; **77**: 524–529.
147. Battagli C, Uzzo RG, Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Krassenstein R, Al-Saleem T, Greenberg RE, Cairns P: Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Cancer Res* 2003; **63**: 8695–8699.
148. Vilà MR, Kaplan G, Feigelstock D, Nadal M, Morote J, Porta R, Bellmunt J, Meseguer A: Hepatitis A virus receptor blocks cell differentiation and is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Kidney International* 2004; **65**: 1761–1773.
149. Zhang Z, Humphreys BD, Bonventre JV. Shedding of the urinary biomarker Kidney Injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP Kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 2704–2714.
150. Bailly V, Zhang Z, Meier w, Cate R, Sanicola M, Bonventre JV. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 39739–39748.
151. Kuchroo VK, Meyers JH, Umetsu DT *et al*. TIM family of genes in immunity and tolerance. *Adv Immunol* 2006; **91**: 227–249
152. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S *et al*. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* 2005; **11**: 362–369.
153. Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y., and Feinstone, S. M. *EMBO J*. 1996; **15**: 4282–4296.
154. Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L., Sanicola, M. *J. Biol. Chem*. 1998; **273**, 4135–4142.
155. Thadhani, R., Pascual, M., and Bonventre, J. V. *N. Engl. J. Med*. 1996; **334**, 1448–1460.
156. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V *et al*. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998; **273**: 4135–4142.
157. Ichimura T, Hung CC, Yang SA *et al*. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**: F552–F563.
158. Han WK, Alinani A, Wu CL *et al*. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1126–1134

159. Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C *et al.* Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F131–F139.
160. Kuehn EW, Park KM, Somlo S, Bonventre JV: Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **291**: F456-F464.
161. Bonventre, J.V. 2003. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J. Am. Soc Nephrol.* **14**:S55–S61.
162. Kelly, K.J., et al. 1996. Intercellular adhesion molecule-1 deficient mice are protected against renal ischemia. *J. Clin. Invest.* **97**:1056–1063.
163. Sheridan, A. M., and Bonventre, J. V. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 2000; **9**, 427–434.
164. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD *et al.* Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008; **118**: 1657–1668.
165. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; **407**: 784–788.
166. Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. *Biochem. J.* 1997 **321**, 265–279.
167. Werb, Z., and Yan, Y. *Science* 1998 **282**, 1279–1280.
168. Pang S, Chubb AJ, Schwager sl, Ehlers MR, Sturrock ED, Hooper NM: roles of the juxtamembrane and extracellular domains of angiotensin-converting enzyme in ectodomain shedding. *Biochem J.* 2001;**358**: 185-192.
169. Althoff K, Mullberg J, Aasland D, Voltz N, Kallen K, Grotzinger J, Rose-John S: Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins . *Biochem J* 2001;**353**: 663-672
170. Bonventre J. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**: 3265–3268.
171. Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ, Ramachandran C: Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem* 1997; **272**:843-851.
172. Daum G, Kalmes A, Levkau B, Wang Y, Davies MG, Clowes AW: Pervanadate inhibits mitogen-activated protein kinase kinase-1 in a p38MAPK-dependent manner. *FEBS Lett* 1998; **427**:271-274.
173. Zhao Z, Tan Z, Diltz CD, You M, fisher EH: Activation of mitogen activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 1996; **271**: 22251-22255.
174. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thashani R, Bonventre JV: Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury *Kidney Int* 2002;**62**:237-244.
175. Lin F, Zhang PL, Yang XJ, Shi J, Blasick T, Han WK, Wang HL, Shen SS, The BT, Bonventre JV: Human kidney injury molecule-1 (hKIM-1): A useful immunohistochemical marker for diagnosing renal cell carcinoma and ovarian clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; **31**: 371-381.

176. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol* 2010; **7**:277-85.
177. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; **278**:687-9.
178. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001; **21**:893-901.
179. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998; **12**:3499-511.
180. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; **124**:471-84.
181. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; **18**:1926-45.
182. Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A, Marumo K, Murai M. Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Ann Oncol* 2005; **16**:928-33.
183. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; **31**:99-109.
184. Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**:997-1014.
185. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; **127**:469-80.
186. Furge KA, Chen J, Koeman J, Swiatek P, Dykema K, Lucin K, et al. Detection of DNA copy number changes and oncogenic signaling abnormalities from gene expression data reveals MYC activation in highgrade papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2007; **67**:3171-6.
187. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 2006; **126**:955-68.
188. Kim YS, Kang YK, Kim JB, Han SA, Kim KI, Paik SR. beta-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas. *Pathol Int* 2000; **50**:725-30.
189. Sansom OJ, Griffiths DF, Reed KR, Winton DJ, Clarke AR. Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse. *Oncogene* 2005; **24**:8205-10.
190. Saadi-Kheddouci S, Berrebi D, Romagnolo B, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Kahn A, et al. Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene. *Oncogene* 2001; **20**:5972-81.
191. Battagli C, Uzzo RG, Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Krassenstein R, et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Cancer Res* 2003; **63**:8695-9.
192. Peruzzi B, Athauda G, Bottaro DP. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:14531-6.
193. Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S, Joraku A, Oikawa T, Kawai K, et al. Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene* 2009; **28**:297-305.
194. Awakura Y, Nakamura E, Ito N, Kamoto T, Ogawa O. Methylation-associated silencing of SFRP1 in renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2008; **20**:1257-63.

195. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Kawakami K, et al. Wnt antagonist gene DKK2 is epigenetically silenced and inhibits renal cancer progression through apoptotic and cell cycle pathways. *Clin Cancer Res* 2009; **15**:5678-87.
196. Linehan WM, Rubin JS, Bottaro DP. VHL loss of function and its impact on oncogenic signaling networks in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41**:753-6.
197. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; **10**:295-305.
198. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:699-712.
199. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**:131-42.
200. Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG, Al-Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:3972-9.
201. Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant downregulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol* 2008; **216**:418-27.
202. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; **10**:593-601.
203. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; **9**:582-9.
204. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008; **22**:894-907.
205. Peruzzi B, Jean-Baptiste L, Bottaro DP. The Role of Hepatocyte Growth Factor Pathway Signaling in Renal Cell Carcinoma. In: Bukowski RM, Figlin RA, Motzer RJ, Eds. *Renal Cell Carcinoma: Humana Press* 2009; **327**.
206. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997; **16**:68-73.
207. Schmidt LS, Nickerson ML, Angeloni D, Glenn GM, Walther MM, Albert PS, et al. Early onset hereditary papillary renal carcinoma: germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the met protooncogene. *J Urol* 2004; **172**:1256-61.
208. Giubellino A, Linehan WM, Bottaro DP. Targeting the Met signaling pathway in renal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; **9**:785-93.
209. Toschi L, Janne PA. Single-agent and combination therapeutic strategies to inhibit hepatocyte growth factor/ MET signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; **14**:5941-6.
210. Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**:2207-14.

211. Monga SP, Mars WM, Padiaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, et al. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 2002; **62**:2064-71.
212. Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005; **18**: 243-249.
213. Akira S. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 2000; **19**: 2607-2611.
214. Li L, Shaw PE. Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J Biol Chem* 2002; **277**: 17397-17405.
215. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; **374**: 1-20.
216. Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 2006; **71**: 713-721.
217. Auernhammer CJ, Melmed S. The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1735-1740.
218. Yang XP, Schaper F, Teubner A, Lammert F, Heinrich PC, Matern S, Siewert E. Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo. *J Hepatol* 2005; **43**: 704-710.
219. Mitchell TJ, John S. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology* 2005; **114**: 301-312.
220. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther.* 2006; **8** (Suppl 2): S2.
221. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, et al. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem.* **2005**; 95: 497-505.
222. Salgado R, Junius S, Benoy I, et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer.* 2003; **103**: 642-646.
223. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W, et al. *Cytokiny. Immunologia. Warszawa, Wyd Nauk PWN.* 2002; **15**: 198-205.
224. Robak T. *Biologia i farmakologia cytokin. Warszawa, Wyd Nauk PWN,* 1995; **9**:122-133.
225. Hsu HC, Lee YM, Tsai WH, et al. Circulating levels of thrombopoietic and inflammatory cytokines in patients with acute myeloblastic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Oncology.* 2002; **63**: 64-69.
226. Huang SP, Wu MS, Shun CT, et al. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci.* 2004; **11**: 517-527.
227. Heinrich P.C, Behrmann I, Haan S, Hermanns H.M, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 2003; **374**, 1–20.
228. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. IL-6-type cytokine signalling through the gp130/JAK/STAT pathway. *Biochem. J.* 1998; **334**, 297–314.
229. Müller-Newen, G., Küster, A., Hemmann, U., Keul, R., Horsten, U., Martens, A., Graeve, L., Wijdenes, J. and Heinrich, P. C. Soluble interleukin-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on interleukin-6 responses. *J. Immunol.* 1998; **161**, 6347–6355.

230. Lütticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T. et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase JAK1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994; **263**, 89–92.
231. Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF–LIF–OSM–IL-6 β receptor components. *Science*; **263**, 92–95.
232. Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R. and Kerr, I. M. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* 1995; **14**, 1421–1429.
233. Rodig, S. J., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D., King, K. L., Sheehan, K. C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E. M., Jr. and Schreiber, R. D. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998; **93**, 373–383.
234. Haan, C., Heinrich, P. C. and Behrmann, I. Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem. J.* 2002; **361**, 105–111.
235. Lai, C. F., Ripperger, J., Morella, K. K., Wang, Y., Gearing, D. P., Fey, G. H. and Baumann, H. Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**, 14847–14850.
236. Huang, L. J., Constantinescu, S. N. and Lodish, H. F. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell.* 2001; **8**, 1327–1338.
237. O’Shea, J. J., Gadina, M. and Schreiber, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002; **109** (suppl.), S121–S131.
238. Novotny-Diermayr, V., Zhang, T., Gu, L. and Cao, X. Protein kinase C δ associates with the interleukin-6 receptor subunit glycoprotein (gp) 130 via Stat3 and enhances STAT3–gp130 interaction. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**, 49134–49142.
239. Brozek W, Bises G, Girsch T, et al. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumor progression. *Eur J Cancer.* 2005; **41**: 2347-2354.
240. Bellone S, Watts K, Cane S, et al. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005; **98**: 92-98.
241. Songur N, Kuru B, Kalkan F, et al. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumor.* 2004; **90**: 196-200.
242. Belluco C, Nitti D, Frantz M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2000; **7**: 133-138.
243. Zakrzewska I, Pozański J. Changes of serum IL-6 and CRP after chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. *Pol Merk Lek.* 2001; **11**: 210-213.
244. Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz A, et al. IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. *Histopathology.* 2005; **47**: 82-89.

245. Kamińska J, Nowacki MP, Kowalska M, et al. Clinical significance of serum cytokine measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I – an independent prognostic factor. *Tumor Biol.* 2005; **26**: 186-194.
246. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M. Serum IL-6, TNF α and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications. *World J Gastroenterol.* 2005; **11**: 1639-1643.
247. Esfandi F, Mohammadzadeh Ghobadloo S, Basati G. Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2006; **244**: 76-78.
248. Zhang G, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res.* 1999; **19**: 1427-1432.
249. Levy, D. E., and J. E. Darnell, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3** :651-62.
250. Buettner, R., L. B. Mora, and R. Jove. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* .2002; **8**: 945-54.
251. Danial, N. N., A. Pernis, and P. B. Rothman. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science* 1995; **269**:1875-7.
252. Yu, C. L., D. J. Meyer, G. S. Campbell, A. C. Lerner, C. Carter-Su, J. Schwartz, and R. Jove. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* .1995;**269**:81-3.
253. Bollrath J, Greten FR. IKK/NF- κ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep.* 2009; **10**(12): 1314–1319.
254. Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, Jr, J. E. and Kuriyan, J. Structure of the N-terminal protein interaction domain of STAT4. *Science* 1998; **279**,1048–1052.
255. Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, Jr, J. E. and Kuriyan, J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell.*1998; **93**, 827–839.
256. Becker, S., Groner, B. and Müller, C. W. Three-dimensional structure of the Stat3 β homodimer bound to DNA. *Nature* 1998; **394**, 145–151.
257. Fu, X. Y. and Zhang, J. J. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. *Cell.*1993;**74**, 1135–1145.
258. Greenlund, A. C., Farrar, M. A., Viviano, B. L. and Schreiber, R. D. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* 1994;**13**, 1591–1600.
259. Lai, C. F., Ripperger, J., Morella, K. K., Wang, Y., Gearing, D. P., Fey, G. H. and Baumann, H. Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**, 14847–14850.
260. Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K. and Hirano, T. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene.*1997;**14**, 751–761
261. Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, Jr, J. E. and Yancopoulos, G. D. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science.* 1995; **267**,1349–1353.

262. Heim, M. H., Kerr, I. M., Stark, G. R. and Darnell, Jr, J. E. (1995) Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* .1995; **267**, 1347–1349.
263. Hemmann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grötzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, Jr, J. E., Graeve, L. et al. Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of Stat factor activation. *J. Biol. Chem.* 1996;**271**, 12999–13007.
264. Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C. and Graeve, L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130. 1. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J. Biol. Chem.* 1996. **271**, 12991–12998.
265. Kuropatwinski, K. K., De Imus, C., Gearing, D., Baumann, H. and Mosley, B. Influence of subunit combinations on signaling by receptors for oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**, 15135–15144.
266. Tomida, M., Heike, T. and Yokota, T. Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, differentiation, and growth arrest of myeloid leukemic cells. *Blood*. 1999; **93**, 1934–1941.
267. Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M. and Darnell, Jr, J. E. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science*.1993;**261**, 1744–1746.
268. Kaptein, A., Paillard, V. and Saunders, M. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J. Biol. Chem.*1996; **271**, 5961–5964.
269. Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D. and Darnell, Jr, J. E. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* .1994;**76**, 821–828.
270. Wen, Z., and J. E. Darnell, Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.*1997; **25**:2062-7.
271. Seidel, H. M., L. H. Milocco, P. Lamb, J. E. Darnell, Jr., R. B. Stein, and J. Rosen. Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 ;**92**:3041-5.
272. Yu, H., and R. Jove. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*.2004;**4**: 97-105.
273. Buettner, R., L. B. Mora, and R. Jove. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* .2002;**8**: 945-54.
274. Bromberg, J. F., C. M. Horvath, Z. Wen, R. D. Schreiber, and J. E. Darnell, Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* .1996;**93**:7673-8.
275. Gouilleux-Gruart, V., F. Gouilleux, C. Desaint, J. F. Claisse, J. C. Capiod, J. Delobel, R. Weber-Nordt, I. Dusanter-Fourt, F. Dreyfus, B. Groner, and L. Prin. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 1996;**87**: 1692-7.

276. Catlett-Falcone, R., T. H. Landowski, M. M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J. L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W. S. Dalton, and R. Jove. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;**10**:105-15.
277. Garcia, R., T. L. Bowman, G. Niu, H. Yu, S. Minton, C. A. Muro-Cacho, C. E. Cox, R. Falcone, R. Fairclough, S. Parsons, A. Laudano, A. Gazit, A. Levitzki, A. Kraker, and R. Jove. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;**20**:2499-513.
278. Grandis, J. R., S. D. Drenning, Q. Zeng, S. C. Watkins, M. F. Melhem, S. Endo, D. E. Johnson, L. Huang, Y. He, and J. D. Kim. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:4227-32.
279. Ni, Z., W. Lou, E. S. Leman, and A. C. Gao. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2000;**60**: 1225-8.
280. Niu, G., T. Bowman, M. Huang, S. Shivers, D. Reintgen, A. Daud, A. Chang, A. Kraker, R. Jove, and H. Yu. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 2002; **21**:7001-10.
281. Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;**19**:2474-88.
282. Bromberg, J., and J. E. Darnell, Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*.2000;**19**:2468-73.
283. Catlett-Falcone, R., T. H. Landowski, M. M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J. L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W. S. Dalton, and R. Jove. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;**10**:105-15.
284. Gouilleux-Gruart V, Debierre-Grockiego F, Gouilleux F, Capiod JC, Claisse JF, Delobel J, Prin L. Activated Stat related transcription factors in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997; **28**:83-88.
285. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997; **278**: 1309-1312.
286. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 97-105.
287. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; **98**: 295-303.
288. Kelly JA, Spolski R, Kovanen PE, Suzuki T, Bollenbacher J, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Lee S, Jenkins NA, Copeland NG, Morse HC 3rd, Leonard WJ. Stat5 synergizes with T cell receptor/antigen stimulation in the development of lymphoblastic lymphoma. *J Exp Med* 2003; **198**: 79-89.
289. Kindblom J, Dillner K, Sahlin L, Robertson F, Ormandy C, Tornell J, Wennbo H. Prostate hyperplasia in a transgenic mouse with prostate-specific expression of prolactin. *Endocrinology* 2003; **144**: 2269-2278.
290. Harvey PW, Everett DJ, Springall CJ. Hyperprolactinaemia as an adverse effect in regulatory and clinical toxicology: role in breast and prostate cancer. *Hum Exp Toxicol* 2006; **25**: 395-404.

291. Tornell J, Carlsson B, Pohjanen P, Wennbo H, Rymo L, Isaksson O. High frequency of mammary adenocarcinomas in metallothionein promoter-human growth hormone transgenic mice created from two different strains of mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; **43**: 237-242.
292. Stoiber D, Kovacic B, Schuster C, Schellack C, Karaghiosoff M, Kreibich R, Weisz E, Artwohl M, Kleine OC, Muller M, Baumgartner-Parzer S, Ghysdael J, Freissmuth M, Sexl V. TYK2 is a key regulator of the surveillance of B lymphoid tumors. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1650-1658.
293. Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, Ealley EL, Nevalainen MT, RuiH. Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells. *Oncogene* 2005; **24**:746-760.
294. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004; **9**, Suppl 1:2-10.
295. Thomlinson, R. H., and L. H. Gray. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; **9**, 539-49.
296. Vaupel, P., K. Schlenger, C. Knoop, and M. Hockel. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991; **51**, 3316-22.
297. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**, 1182-6.
298. Folkman, J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol*; 2003; **13**, 159-67.
299. Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**, 38-47.
300. Kerbel, R., and J. Folkman. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**, 727-39.
301. Weidner, N., J. P. Semple, W. R. Welch, and J. Folkman. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; **324**, 1-8.
302. Hockel, M., and P. Vaupel. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**, 266-76.
303. Carmeliet, P., and R. K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**, 249-57.
304. Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; **307**, 58-62.
305. Rofstad, E. K. Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int J Radiat Biol* 2000; **76**, 589-605.
306. Graeber, T. G., C. Osmanian, T. Jacks, D. E. Housman, C. J. Koch, S. W. Lowe, and A. J. Giaccia. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; **379**, 88-91.
307. Yuan, J., and P. M. Glazer. Mutagenesis induced by the tumor microenvironment. *Mutat Res* 1998; **400**, 439-46.
308. Yuan, J., L. Narayanan, S. Rockwell, and P. M. Glazer. Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res* 2000; **60**, 4372-6.

309. Brizel, D. M., R. K. Dodge, R. W. Clough, and M. W. Dewhirst. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 1999; **53**, 113-7.
310. Durand, R. E. The influence of microenvironmental factors during cancer therapy. *In Vivo* 1994; **8**, 691-702.
311. Gray, L. H., A. D. Conger, M. Ebert, S. Hornsey, and O. C. Scott. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; **26**, 638-48.
312. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**, 1182-6.
313. Folkman, J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**, 159-67.
314. Hanahan, D., and J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**, 353-64.
315. Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**, 38-47.
316. Kerbel, R., and J. Folkman. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**, 727-39.
317. Kabbinar, F., H. I. Hurwitz, L. Fehrenbacher, N. J. Meropol, W. F. Novotny, G. Lieberman, S. Griffing, and E. Bergsland. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 60-5.
318. Yang, J. C., L. Haworth, R. M. Sherry, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, S. M. Steinberg, H. X. Chen, and S. A. Rosenberg. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**, 427-34.
319. Gorski, D. H., H. J. Mauceri, R. M. Salloum, S. Gately, S. Hellman, M. A. Beckett, V. P. Sukhatme, G. A. Soff, D. W. Kufe, and R. R. Weichselbaum. Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. *Cancer Res* 1998; **58**, 5686-9.
320. Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinar. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **350**, 2335-42.
321. Klement, G., S. Baruchel, J. Rak, S. Man, K. Clark, D. J. Hicklin, P. Bohlen, and R. S. Kerbel. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000; **105**, R15-24.
322. Lee, C. G., M. Heijn, E. di Tomaso, G. Griffon-Etienne, M. Ancukiewicz, C. Koike, K. R. Park, N. Ferrara, R. K. Jain, H. D. Suit, and Y. Boucher. Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 2000; **60**, 5565-70.
323. Mauceri, H. J., N. N. Hanna, M. A. Beckett, D. H. Gorski, M. J. Staba, K. A. Stellato, K. Bigelow, R. Heimann, S. Gately, M. Dhanabal, G. A. Soff, V. P. Sukhatme, D. W. Kufe, and R. R. Weichselbaum. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature* 1998; **394**, 287-91.

324. Teicher, B. A., S. A. Holden, G. Ara, E. A. Sotomayor, Z. D. Huang, Y. N. Chen, and H. Brem. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994; **57**, 920-5.
325. Blagosklonny, M. V. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* 2004; **5**, 13-7.
326. Ferrara, N., H. P. Gerber, and J. LeCouter. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**, 669-76.
327. Kerbel, R., and J. Folkman. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**, 727-39.
328. Huang, J., J. S. Frischer, A. Serur, A. Kadenhe, A. Yokoi, K. W. McCrudden, T. New, K. O'Toole, S. Zabski, J. S. Rudge, J. Holash, G. D. Yancopoulos, D. J. Yamashiro, and J. J. Kandel. Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2003; **100**, 7785-90.
329. Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue, and G. L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**, 5510-4.
330. Wang, G. L., and G. L. Semenza. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; **270**, 1230-7.
331. Masson, N., and P. J. Ratcliffe. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J Cell Sci* 2003; **116**, 3041-9.
332. Huang, L. E., and H. F. Bunn. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem* 2003; **278**, 19575-8.
333. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**, 721-32.
334. Ema, M., S. Taya, N. Yokotani, K. Sogawa, Y. Matsuda, and Y. Fujii-Kuriyama. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**, 4273-8.
335. Flamme, I., T. Frohlich, M. von Reutern, A. Kappel, A. Damert, and W. Risau. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 1997; **63**, 51-60.
336. Tian, H., S. L. McKnight, and D. W. Russell. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; **11**, 72-82.
337. Wiesener, M. S., H. Turley, W. E. Allen, C. Willam, K. U. Eckardt, K. L. Talks, S. M. Wood, K. C. Gatter, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and P. H. Maxwell. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 1998; **92**, 2260-8.
338. Brusselmans, K., F. Bono, P. Maxwell, Y. Dor, M. Dewerchin, D. Collen, J. M. Herbert, and P. Carmeliet. Hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem* 2001; **276**, 39192-6.
339. Wiesener, M. S., J. S. Jurgensen, C. Rosenberger, C. K. Scholze, J. H. Horstrup, C. Warnecke, S. Mandriota, I. Bechmann, U. A. Frei, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, S. Bachmann, P. H. Maxwell, and K. U. Eckardt. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *Faseb J* 2003; **17**, 271-3.

340. Makino, Y., R. Cao, K. Svensson, G. Bertilsson, M. Asman, H. Tanaka, Y. Cao, A. Berkenstam, and L. Poellinger. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001; **414**, 550-4.
341. Makino, Y., A. Kanopka, W. J. Wilson, H. Tanaka, and L. Poellinger. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* 2002; **277**, 32405-8.
342. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**, 721-32.
343. Schofield, C. J., and P. J. Ratcliffe. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**, 343-54.
344. Jiang, B. H., F. Agani, A. Passaniti, and G. L. Semenza. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997; **57**, 5328-35.
345. Thornton, R. D., P. Lane, R. C. Borghaei, E. A. Pease, J. Caro, and E. Mochan. Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J* 2000; **350 Pt 1**, 307-12.
346. Jeong, J. W., M. K. Bae, M. Y. Ahn, S. H. Kim, T. K. Sohn, M. H. Bae, M. A. Yoo, E. J. Song, K. J. Lee, and K. W. Kim. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; **111**, 709-20.
347. Minet, E., T. Arnould, G. Michel, I. Roland, D. Mottet, M. Raes, J. Remacle, and C. Michiels. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 2000; **468**, 53-8.
348. Richard, D. E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux, and J. Pouyssegur. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; **274** 32631-7.
349. Huang, L. E., Z. Arany, D. M. Livingston, and H. F. Bunn. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996; **271**, 32253-9.
350. Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue, and G. L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**, 5510-4.
351. Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, and P. J. Ratcliffe. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; **399**, 271-5.
352. Tanimoto, K., Y. Makino, T. Pereira, and L. Poellinger. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J* 2000; **19**, 4298-309.
353. Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, and W. G. Kaelin, Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001; **292**, 464-8.
354. Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; **292**, 468-72.

355. Yu, F., S. B. White, Q. Zhao, and F. S. Lee. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**, 9630-5.
356. Masson, N., and P. J. Ratcliffe. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci* 2003; **116**, 3041-9.
357. Jiang, B. H., J. Z. Zheng, S. W. Leung, R. Roe, and G. L. Semenza. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997; **272**, 19253-60.
358. Pugh, C. W., J. F. O'Rourke, M. Nagao, J. M. Gleadle, and P. J. Ratcliffe. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997; **272**, 11205-14.
359. Lando, D., D. J. Peet, D. A. Whelan, J. J. Gorman, and M. L. Whitelaw. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; **295**, 858-61.
360. Bhattacharya, S., C. L. Michels, M. K. Leung, Z. P. Arany, A. L. Kung, and D. M. Livingston. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 1999; **13**, 64-75.
361. Ema, M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger, and Y. Fujii-Kuriyama. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J* 1999; **18**, 1905-14.
362. Hewitson, K. S., L. A. McNeill, M. V. Riordan, Y. M. Tian, A. N. Bullock, R. W. Welford, J. M. Elkins, N. J. Oldham, S. Bhattacharya, J. M. Gleadle, P. J. Ratcliffe, C. W. Pugh, and C. J. Schofield. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 2002; **277**, 26351-5.
363. Lando, D., D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw, and R. K. Bruick. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; **16**, 1466-71.
364. Lando, D., D. J. Peet, D. A. Whelan, J. J. Gorman, and M. L. Whitelaw. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; **295**, 858-61.
365. Stiehl, D. P., W. Jelkmann, R. H. Wenger, and T. Hellwig-Burgel. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; **512**, 157-62.
366. Treins, C., S. Giorgetti-Peraldi, J. Murdaca, G. L. Semenza, and E. Van Obberghen. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**, 27975-81.
367. Zelzer, E., Y. Levy, C. Kahana, B. Z. Shilo, M. Rubinstein, and B. Cohen. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *Embo J* 1998; **17**, 5085-94.
368. Feldser, D., F. Agani, N. V. Iyer, B. Pak, G. Ferreira, and G. L. Semenza. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; **59**, 3915-8.
369. Richard, D. E., E. Berra, and J. Pouyssegur. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; **275**, 26765-71.
370. Zhong, H., K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M. M. Georgescu, J. W. Simons, and G. L. Semenza. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human

prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; **60**, 1541-5.

371. Tacchini, L., P. Dansi, E. Matteucci, and M. A. Desiderio. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2001; **22**, 1363-71.

372. Hellwig-Burgel, T., K. Rutkowski, E. Metzen, J. Fandrey, and W. Jelkmann. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; **94**, 1561-7.

373. Stiehl, D. P., W. Jelkmann, R. H. Wenger, and T. Hellwig-Burgel. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; **512**, 157-62.

374. Thornton, R. D., P. Lane, R. C. Borghaei, E. A. Pease, J. Caro, and E. Mochan. Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J* 2000; **350 Pt 1**, 307-12.

375. Gorlach, A., I. Diebold, V. B. Schini-Kerth, U. Berchner-Pfannschmidt, U. Roth, R. P. Brandes, T. Kietzmann, and R. Busse. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; **89**, 47-54.

376. Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon, and G. L. Semenza. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; **21**, 3995-4004.

377. Chen, C., N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, and A. Maity. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; **276**, 9519-25.

378. Mazure, N. M., E. Y. Chen, K. R. Laderoute, and A. J. Giaccia. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 1997; **90**, 3322-31.

379. Jiang, B. H., F. Agani, A. Passaniti, and G. L. Semenza. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997; **57**, 5328-35.

380. Fukuda, R., K. Hirota, F. Fan, Y. D. Jung, L. M. Ellis, and G. L. Semenza. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; **277**, 38205-11.

381. Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon, and G. L. Semenza. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; **21**, 3995-4004.

382. Treins, C., S. Giorgetti-Peraldi, J. Murdaca, G. L. Semenza, and E. Van Obberghen. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**, 27975-81.

383. Stiehl, D. P., W. Jelkmann, R. H. Wenger, and T. Hellwig-Burgel. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; **512**, 157-62.

384. Zhong, H., K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M. M. Georgescu, J. W. Simons, and G. L. Semenza. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; **60**, 1541-5.
385. Zundel, W., C. Schindler, D. Haas-Kogan, A. Koong, F. Kaper, E. Chen, A. R. Gottschalk, H. E. Ryan, R. S. Johnson, A. B. Jefferson, D. Stokoe, and A. J. Giaccia. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; **14**, 391-6.
386. Karni, R., Y. Dor, E. Keshet, O. Meyuhas, and A. Levitzki. Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression under normoxia. *J Biol Chem* 2002; **277**, 42919-25.
387. Jiang, B. H., F. Agani, A. Passaniti, and G. L. Semenza. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997; **57**, 5328-35.
388. Chen, C., N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, and A. Maity. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; **276**, 9519-25.
389. Mazure, N. M., E. Y. Chen, K. R. Laderoute, and A. J. Giaccia. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 1997; **90**, 3322-31.
390. Bilton, R. L., and G. W. Booker. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation. *Eur J Biochem* 2003; **270**, 791-8.
391. Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 2001; **15**, 807-26.
392. Vivanco, I., and C. L. Sawyers. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**, 489-501.
393. Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon, and G. L. Semenza. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; **21**, 3995-4004.
394. Fukuda, R., K. Hirota, F. Fan, Y. D. Jung, L. M. Ellis, and G. L. Semenza. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; **277**, 38205-11.
395. Minet, E., T. Arnould, G. Michel, I. Roland, D. Mottet, M. Raes, J. Remacle, and C. Michiels. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 2000; **468**, 53-8.
396. Richard, D. E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux, and J. Pouyssegur. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; **274**, 32631-7.
397. Niu, G., K. L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L. M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, and H. Yu. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002; **21**, 2000-8.

398. Wei, D., X. Le, L. Zheng, L. Wang, J. A. Frey, A. C. Gao, Z. Peng, S. Huang, H. Q. Xiong, J. L. Abbruzzese, and K. Xie. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2003; **22**, 319-29.
399. Ellis, L. M., C. A. Staley, W. Liu, R. Y. Fleming, N. U. Parikh, C. D. Bucana, and G. E. Gallick. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. *J Biol Chem* 1998; **273**, 1052-7.
400. Bromberg, J. F., C. M. Horvath, D. Besser, W. W. Lathem, and J. E. Darnell, Jr. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 1998; **18**, 2553-8.
401. Garcia, R., T. L. Bowman, G. Niu, H. Yu, S. Minton, C. A. Muro-Cacho, C. E. Cox, R. Falcone, R. Fairclough, S. Parsons, A. Laudano, A. Gazit, A. Levitzki, A. Kraker, and R. Jove. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001; **20**, 2499-513.
402. Funamoto, M., Y. Fujio, K. Kunisada, S. Negoro, E. Tone, T. Osugi, H. Hirota, M. Izumi, K. Yoshizaki, K. Walsh, T. Kishimoto, and K. Yamauchi-Takahara. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000; **275**, 10561-6.
403. Wei, L. H., M. L. Kuo, C. A. Chen, C. H. Chou, K. B. Lai, C. N. Lee, and C. Y. Hsieh. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003; **22**, 1517-27.
404. Repovic, P., C. Y. Fears, C. L. Gladson, and E. N. Benveniste. Oncostatin-M induction of vascular endothelial growth factor expression in astrogloma cells. *Oncogene* 2003; **22**, 8117-24.
405. Xie, T. X., D. Wei, M. Liu, A. C. Gao, F. Ali-Osman, R. Sawaya, and S. Huang. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 2004; **23**, 3550-60.
406. Bartoli, M., D. Platt, T. Lemtalsi, X. Gu, S. E. Brooks, M. B. Marrero, and R. B. Caldwell. VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *Faseb J* 2003; **17**, 1562-4.
407. Scheidegger, K. J., J. Du, and P. Delafontaine. Distinct and common pathways in the regulation of insulin-like growth factor-1 receptor gene expression by angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1999; **274**, 3522-30.
408. Bowman, T., M. A. Broome, D. Sinibaldi, W. Wharton, W. J. Pledger, J. M. Sedivy, R. Irby, T. Yeatman, S. A. Courtneidge, and R. Jove. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**, 7319-24.
409. Yahata, Y., Y. Shirakata, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Sayama, Y. Hanakawa, M. Detmar, and K. Hashimoto. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for VEGF-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *J Biol Chem* 2003.
410. Gray, M. J., J. Zhang, L. M. Ellis, G. L. Semenza, D. B. Evans, S. S. Watowich, and G. E. Gallick. HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 2005.
411. Triezenberg, S. J., R. C. Kingsbury, and S. L. McKnight. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* 1988; **2**:718-29.

412. Gossen, M., and H. Bujard. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* 1995;**19**:213-6; discussion 216-7.
413. Hillen, W., and C. Berens. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 1994;**48**:345-69.
414. Strathdee, C. A., M. R. McLeod, and J. R. Hall. Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 1999; **229**:21-9.
415. Chomczynski, P., and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;**162**:156-9.
416. Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003. **4**:249-264
417. Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004.
418. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B*. **57**: 289-300.
419. Falcon S, Gentleman R 2007, Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*. Jan 15;**23**(2):257-8.
420. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. R. Gentleman, V. Carey, W. Huber, R. Irizarry, and S. Dudoit, editors. *Springer-Verlag, New-York, USA*. 2005.
421. Ma, Y., C. Y. Chan, and M. L. He. RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;**13**:5169-79.
422. Mandriota, S. J. *et al.* HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 2002;**1**,459–468.
423. M, Tsukamoto Y, Uchida T, Kashima K, Akizuki S, Takeuchi I, Sato F, et al. High-resolution analysis of DNA copy number alterations and gene expression in renal clear cell carcinoma. *J Pathol* 2007; **213**:392–401.
424. Alimov A, Sundelin B, Bergerheim U, Pavlenko M, Pisa P, Zetterberg A, Larsson C, Lagercrantz S. Molecular cytogenetic characterization shows higher genetic homogeneity in conventional renal cell carcinoma compared to other kidney cancers. *Int J Oncol* 2004;**25**:955–60.
425. Rigola MA, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R. Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;**137**:49–53.
426. Moch H, Presti JC, Jr., Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;**56**:27–30.
427. Sanjmyatav J, Schubert J, Junker K. Comparative study of renal cell carcinoma by CGH, multicolor-FISH and conventional cytogenetic banding analysis. *Oncol Rep* 2005;**14**:1183–7.
428. Chen M, YeY, Yang H, Tamboli P, Matin S, Tannir NM, Wood CG, GuJ, Wu X. Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Int. J. Cancer* 2009;**125**, 2342–2348.

429. Beroukhin R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, Linhart D, Worrell RA, Moch H, Rubin MA, Sellers W, Meyerson M, Linehan WM, Kaelin Jr WG, Signoretti S. Patterns of gene expression and copy-number alterations in VHL disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney *Cancer Res.* 2009;**69**(11):4674–4681.
430. Zhang Z, Wondergem B, Dykema K. A Comprehensive Study of Progressive Cytogenetic Alterations in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and a New Model for ccRCC Tumorigenesis and Progression. *Adv Bioinformatics.* 2010:428325.
431. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for estrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 1995;**48**(9):876-878.
432. Barclay, A. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; **96**, 14672–14674.
433. Jentoft, N. *Trends Biochem. Sci* 1990; **15**, 291–294.
434. Zuk, A., Bonventre, J. V., Brown, D., and Matlin, K. S. *Am. J. Physiol.* 1998;**275**, C711–C731.
435. Klein, G., Langegger, M., Timpl, R., and Ekblom, P. *Cell.* 1988; **55**, 331–341
436. Goligorsky, M. S., Lieberthal, W., Racusen, L., and Simon, E. E. *Am. J. Physiol.* 1993; **264**, F1–F8.
437. Leca, G., Mansur, S. E., and Bensussan, A. *J. Immunol.* 1995; **154**, 1069–1077.
438. Leung, K. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; **260**, 734–739.
439. Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G. I., Jutila, M. A., and Kishimoto, T. K. *Cell* 1998;**92**, 809–818.
440. Nybroe, O., Linnemann, D., and Bock, E. *J. Neurochem.* 1989; **53**, 1372–1378.
441. Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M. J. *J. Cell Biol.* 1997;**139**, 1861–1872.
442. Montgomery, A. M., Becker, J. C., Siu, C. H., Lemmon, V. P., Cheresch, D. A., Hancock, J. D., Zhao, X., and Reisfeld, R. A. *J. Cell Biol.* 1996; **132**, 475–485.
443. Beer, S., Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C., and Altevogt, P. *J. Cell Sci.* 1999;**112**, 2667–2675.
444. Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechttersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K., and Altevogt, P. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**, 15490–15497.
445. Apostolidis PA, Lindsey S, Miller WM, Papoutsakis ET. The proposed megakaryocytic regulon of p53: the genes engaged to control cell cycle and apoptosis during megakaryocytic differentiation. *Physiol Genomics.* 2012
446. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, Legrand C, Pan J, Rameau P, Jouni D, Bluteau O, Mercher T, Leon C, Gachet C, Debili N, Vainchenker W, Raslova H, Chang Y. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun.* 2012; **3**:717.
447. Dos Santos Hidalgo G, Meola J, Rosa E Silva JC, Paro de Paz CC, Ferriani RA. TAGLN expression is deregulated in endometriosis and may be involved in cell invasion, migration, and differentiation. *Fertil Steril.* 2011; **96**(3):700-3.

448. Martin TA, Jiang WG. Claudin-16/paracellin-1, cloning, expression, and its role in tight junction functions in cancer and endothelial cells. *Methods Mol Biol.* 2011;**762**:383-407.
449. Larkin SE, Holmes S, Cree IA, Walker T, Basketter V, Bickers B, Harris S, Garbis SD, Townsend PA, Aukim-Hastie C Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression.. *Br J Cancer.* 2012;**106**(1):157-65.
450. Kim K, Kim JH, Moon JB, Lee J, Kwak HB, Park YW, Kim N. The transmembrane adaptor protein, linker for activation of T cells (LAT), regulates RANKL-induced osteoclast differentiation. *Mol Cells.* 2012;**33**(4):401-6.
451. Ishizaka A, Mizutani T, Kobayashi K, Tando T, Sakurai K, Fujiwara T, Iba H. Double Plant Homeodomain (PHD) Finger Proteins DPF3a and -3b Are Required as Transcriptional Co-activators in SWI/SNF Complex-dependent Activation of NF- κ B RelA/p50 Heterodimer. *J Biol Chem.* 2012;**287**(15):11924-33.
452. Bhoopathi P, Gorantla B, Sailaja GS, Gondi CS, Gujrati M, Klopfenstein JD, Rao JS. SPARC Overexpression Inhibits Cell Proliferation in Neuroblastoma and Is Partly Mediated by Tumor Suppressor Protein PTEN and AKT. *PLoS One.* 2012;**7**(5):e36093.
453. Lai KK, Shang S, Lohia N, Booth GC, Masse DJ, Fausto N, Campbell JS, Beretta L. Extracellular matrix dynamics in hepatocarcinogenesis: a comparative proteomics study of PDGFC transgenic and Pten null mouse models. *PLoS Genet.* 2011;**7**(6):e1002147
454. Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, Torres Cabala CA, Grimm EA, Kusewitt DF. Slug Expression during Melanoma Progression. *Am J Pathol*; 2012.
455. Noda T, Yamamoto H, Takemasa I, Yamada D, Uemura M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. PLOD2 induced under hypoxia is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Liver Int.* 2012;**32**(1):110-8.
456. Li D, Peng Z, Tang H, Wei P, Kong X, Yan D, Huang F, Li Q, Le X, Li Q, Xie K. KLF4-mediated negative regulation of IFITM3 expression plays a critical role in colon cancer pathogenesis. *Clin Cancer Res.* 2011;**17**(11):3558-68.
457. Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, Wallace DM, Deshmukh N, Chaudhri S, Adams DH, Lee SP. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *Eur Urol.* 2012;**61**(2):385-94.
458. Laurell H, Bouisson M, Berthelemy P, Rochaix P, Dejean S, Besse P, Susini C, Pradayrol L, Vaysse N, Buscail L. Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *World J Gastroenterol.* 2006;**12**(21):3344-51.
459. Li XQ, Li L, Xiao CH, Feng YM. NEFL mRNA expression level is a prognostic factor for early-stage breast cancer patients. *PLoS One.* 2012;**7**(2):e31146.
460. Wu D, Wang H, Li Z, Wang L, Zheng F, Jiang J, Gao Y, Zhong H, Huang Y, Suo Z. Cathepsin B may be a potential biomarker in cervical cancer. *Histol Histopathol.* 2012;**27**(1):79-87.
461. Ueo T, Imayoshi I, Kobayashi T, Ohtsuka T, Seno H, Nakase H, Chiba T, Kageyama R. The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development.* 2012;**139**(6):1071-82.

462. Ritchie MF, Zhou Y, Soboloff J. WT1/EGR1-mediated control of STIM1 expression and function in cancer cells. *Front Biosci.* 2011;**17**:2402-15.
463. Hodge, D.R., Hurt, E.M., and Farrar, W.L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur. J. Cancer.* 2005;**41**:2502–2512.
464. Chiu, J.J., Sgagias, M.K., and Cowan, K.H. Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 1996; **2**:215–221.
465. Conze, D., et al.. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001; **61**:8851–8858.
466. Hong, D.S., Angelo, L.S., and Kurzrock, R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer.* 2007; doi:10.1002/cncr.22999.
467. Schafer, Z.T, Brugge, J.S. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest.* 2007; **117**:3660-3663.
468. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2002; **21**: 2000–2008.
469. Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon SH, Yang YM, Lee JW, Choi S, Park JW, Ye SK, Chung MH. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J.* 2005;**19**: 1296–1298.

