

8. APÈNDIX

Apèndix 1. Taules

Taula 1. Funcions de VEGF i receptors.

Nom	Isoformes	Receptor	Funció
VEGF-A	VEGF ₁₂₁ , VEGF ₁₄₅ , VEGF ₁₆₅ ,	VEGFR-1	Migració i proliferació de cèl·lules endotelials
	VEGF ₁₈₃ , VEGF ₁₈₉ , VEGF ₂₀₆	VEGFR-2	Activació de l'angiogènesi
PlGF	PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3	VEGFR-1	Desenvolupament; expressió a placenta Protumorigènic
VEGF-B	VEGF-B ₁₆₇ , VEGF-B ₁₈₆	VEGFR-1	Vascularització coronària i creixement de múscul esquelètic
VEGF-C	---	VEGFR-2	Desenvolupament i manteniment limfàtic
		VEGFR-3	
VEGF-D	---	VEGFR-2	Desenvolupament i manteniment limfàtic
		VEGFR-3	Inducció de l'angiogènesi

Taula 2. Gens diana d'HIF-1

Eritropoiesi

Erythropoietin

Metabolisme del ferro

Transferrin (transport), Transferrin receptor (internalització), Ceruloplasmin

Formació i regulació dinàmica de vasos sanguinis

Vascular endothelial growth factor, Flt-1 (VEGFR-1), Plasminogen activator inhibitor-1, Adrenomedulin, Endothelin-1, Nitric oxide synthase-2, Heme oxygenase 1, α 1 β -adrenergic receptor, ETS-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4, Leptin, PGAR

Metabolisme energètic i de la glucosa

Glucose transporter 1, Glucose transporter 3, Hexokinase 1, Hexokinase 2, Hexokinase 4 (Glucokinase), Phosphofruktokinase L, Aldolase A, Aldolase C, Glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase, Phosphoglycerate kinase 1, Enolase 1, Pyruvate kinase M, Lactate dehydrogenase A, Adenylate kinase 3, UDP-galactose transporter-1, Triosephosphate isomerase, 6-phosphofruktokinase-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4, Stanniocalcin-1

Proliferació cel·lular, diferenciació i viabilitat

Insulin-like growth factor binding protein 1 & 3, Insulin-like growth factor II, Transforming growth factor- β 2, p21, Nip3, Cyclin G2, Differentiated embryo chondrocyte 1, α -fetoprotein, NIX, PDGF-B, HGTD-P, NDRG1, ID2, CAD

Regulació del pH

Carbonic anhydrases 9 & 12

Metabolisme de la matriu

Prolyl-4-hydroxylase- α 1, Collagen type V- α 1

Feedback negatiu

CITED2/p35srj (inhibeix la transactivació d'HIF), PHD, pVHL

Desenvolupament de malalties

CTGF (fibrosi renal), Wt1 (supressor de tumors), DEC1 (progressió tumoral), α v β 3 integrin (migració tumoral)

Altres

MDR1/P-Glycoprotein (resistència a quimioterapèutics), Tyrosine hydroxylase (metabolisme neuronal), T-type calcium channel (senyalització per calci), ROR α (inflamació), CXCR4 (quimiotaxi), GRP94 (reticle endoplasmàtic), hTERT (manteniment de telòmers), MSH2 i MSH6 (reparació de DNA), c-met (migració)

Taula 3. Punts de regulació d'HIF.

ELEMENT REGULADOR	ACTIVITAT	EFFECTE	REGULACIÓ PER FEEDBACK	CAPÍTOL
pVHL	Ubiquitinació d'HIF-1 α	Degradació proteasomal d'HIF-1 α	Negativa	1.4.2.1.
	Reclutament d'HDACs	Repressió de la transactivació d'HIF	pVHL induïda per hipòxia	1.4.3.2.
PHD	Hidroxilació de les prolines 402 i 564 d'HIF-1 α	Promoció de la unió a pVHL i degradació proteasomal d'HIF-1 α	Negativa	1.4.2.1.
	Reclutament d'ING4 per PHD2	Repressió de la transactivació d'HIF	PHDs induïdes per hipòxia	1.4.3.5.
Siah2	Ubiquitinació i degradació proteasomal de PHDs	Estabilització d'HIF-1 α	Positiva	1.4.2.1.
			Siah2 induïda per hipòxia	
OS-9	Promoció de la interacció entre HIF-1 α i PHDs	Promoció de la hidroxilació de prolines i posterior degradació proteasomal	---	1.4.2.1.
ARD1	Acetilació de la lisina 532 d'HIF-1 α (?)	Promoció de la unió a pVHL i degradació proteasomal d'HIF-1 α	Positiva	1.4.2.1.
			ARD1 disminuïda per hipòxia (?)	
CSN5/Jab1	Bloqueig de la interacció d'HIF-1 amb pVHL i p53	Disminució de la degradació proteasomal d'HIF-1 α	---	1.4.2.1.
	Deneddilació de Cul2			1.4.2.3.
Acidosi	Segrestament de pVHL a nucleol	Disminució de la degradació proteasomal i estabilització d'HIF-1 α	---	1.4.2.1.
VDU2	Deubiquitinació d'HIF-1 α	Estabilització d'HIF-1 α	VDU2 és diana de pVHL	1.4.2.1.
SUMO-1	Sumoilació de les lisines 349 i 477 HIF-1 α	Disminució de la degradació proteasomal i transactivació d'HIF	Positiva	1.4.2.2.
			SUMO-1 induïda per hipòxia	

Taula 3 (continuació). Punts de regulació d'HIF.

ELEMENT REGULADOR	ACTIVITAT	EFFECTE	REGULACIÓ PER FEEDBACK	CAPÍTOL
p53	Interacció amb HIF-1 α i competició per p300/CBP	Degradació proteasomal d'HIF-1 α i inhibició de la transactivació d'HIF	Negativa p53 estabilitzada en hipòxia	1.4.2.3.
Hdm2	Interacció amb HIF-1 α	Estabilització d'HIF-1 α i transactivació d'HIF	Positiva Hdm2 induïda per hipòxia	1.4.2.3.
Hsp90	Regulació del correcte plegament d'HIF-1 α	Estabilització d'HIF-1 α i obtenció de forma activable transcripcionalment	---	1.4.2.4.
NO	HIPÒXIA. Inhibició de la cadena respiratòria mitocondrial	Activació de PHD	Negativa	1.4.2.5.
	NORMÒXIA. Modulació de rutes de transcripció del senyal	Degradació proteasomal d'HIF-1 α	iNOS induïda per hipòxia	1.4.4.2.
	S-nitrosació d'HIF-1 α	Estabilització i síntesi d'HIF-1 α	---	
IRE5	Manteniment de la síntesi proteica independent del cap	Transactivació d'HIF-1	---	1.4.2.6.
aHIF	Unió al mRNA d'HIFs	Manteniment de la transcripció d'HIF-1 α en hipòxia	Negativa	1.4.2.6.
Tiorredoxina	Manteniment de l'estat reduït de la	Augment de la velocitat de degradació dels mRNAs dels HIFs	aHIF sobreexpressats en hipòxia	
REF-1	Manteniment de l'estat reduït de la cisteïna 774 d'HIF-1 α	Promoció de la unió d'HIF-1 α a p300/CBP	---	1.4.3.1.
HDAC7	Interacció amb HIF-1 α i translocació a nucli	Transactivació d'HIF-1	---	1.4.3.2.

Taula 3 (continuació). Punts de regulació d'HIF.

ELEMENT REGULADOR	ACTIVITAT	EFFECTE	REGULACIÓ PER FEEDBACK	CAPÍTOL
FIH-1	Hydroxilació de l'asparagina 803 d'HIF-1 α	Impediment de la interacció d'HIF-1 α amb p300/CBP	--	1.4.3.1.
PI3K/Akt	Reclutament d'HDACs Activació de FRAP/mTOR Inhibició de 4E-BP, GSK3 i FOXO4 Expressió de hsp90 i hsp70	Repressió de la transactivació d'HIF Augment de la traducció de proteïna HIF-1 α Estabilització d'HIF-1 α	Inhibició de l'activitat Akt a temps llargs d'hipòxia	1.4.3.3.
MAPK	Promoció de la interacció entre HIF-1 α i p300/CBP	Transactivació d'HIF	Negativa MKP-1 induïda en hipòxia	1.4.3.3.
SAPK	Eliminació de la inhibició del domini C-terminal d'HIF-1 α	Transactivació d'HIF	--	1.4.3.3.
AMPK	Augment / disminució en hipòxia (?)	Transactivació d'HIF	--	1.4.3.4.
ROS	Augment / disminució en hipòxia (?)	Estabilització d'HIF-1 α	--	1.4.3.4.
HIF-3α4	Formació de complexos amb HIFs	Impediment de la unió d'HIFs a HRE	Positiva	1.4.3.6.
CITED2/p35srj	Competició amb HIF-1 α per la interacció amb p300/CBP	Disminució de la transcripció dependent d'HIFs	HIF-3 α 4 inhibida en hipòxia	1.4.3.6.
CITED4	Alteració dels nivells de Fe ²⁺ i ascorbat	Repressió de la transactivació HIF	Negativa	1.4.3.6.
CoCl₂	Unió a HIF- α i Cul-2	Inhibició de l'activitat PHD Alteració de la unió HIF- α -pVHL	CITED2 induïda en hipòxia	1.4.4.1.
Oncogens	Activació	Estabilització d'HIF- α	--	1.4.4.3.
Supressors	Inhibició	Estabilització i activació d'HIF	--	1.4.4.3.

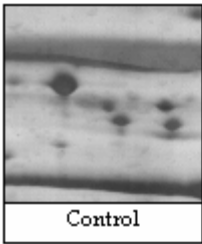
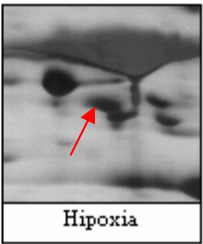
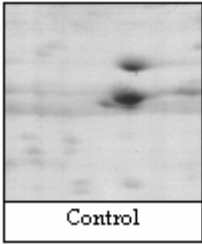
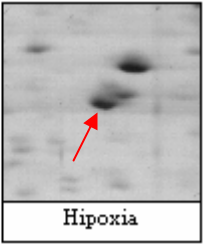
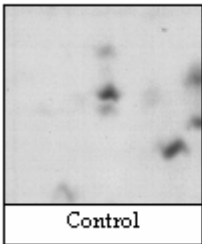
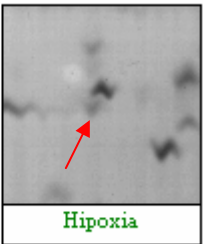
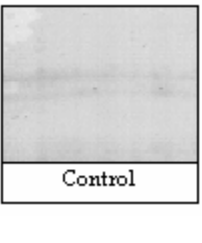

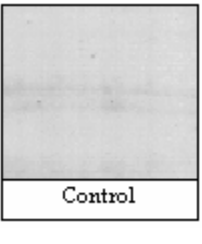
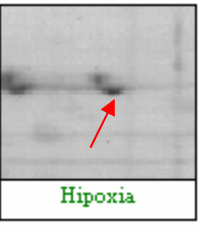
Taula 4. Anticossos primaris

Anticòs anti-	Espècie	Dilució	Temps i T ^a d'incubació	t _{exposició}
Actina (SIGMA[®])	Conill	1 :2000	2 h a T ^a ambient	15'
Cdc42 (Transduction Laboratories)	Ratolí	1 :250	16 h a 4 °C	30'
Dinactina p50 (BD Biosciences)	Ratolí	1:250	16 h a 4 °C	30'
Enolasa (Santa Cruz Biotechnology)	Cabra	1:300	16 h a 4 °C	20'
HA (Hemaglutinina) (Covance)	Ratolí	1 :2000	2 h a T ^a ambient	30'
HIF-1α (Transduction Laboratories)	Ratolí	1 :250	16 h a 4 °C	30'
Iba2 (#750)	Conill	1:200	16 h a 4 °C	30'
Iba2 (#751)	Conill	1:50	16 h a 4 °C	30'
P5 (Abcam)	Conill	1:3000	16 h a 4 °C	1'
Polihistidina (SIGMA[®])	Ratolí	1 :2000	2 h a T ^a ambient	1'
Proteasoma 20S (Abcam)	Conill	1 :1000	16 h a 4 °C	30'
Rac1 (Transduction Laboratories)	Ratolí	1:1000	16 h a 4 °C	30'
RhoA (Santa Cruz Biotechnology)	Ratolí	1:500	16 h a 4 °C	30'
Tubulina (OncogeneTM)	Ratolí	1:500	2 h a T ^a ambient	10'

Taula 5. Anticossos secundaris

Anticòs anti-	Espècie	Dilució
Ratolí (Jackson Immunoresearch)	Cabra	1:50.000
Conill (DakoCytomation)	Porc	1:3000
Cabra (Santa Cruz Biotechnology)	Burro	1:5000

Taula 6. Spots sobreexpressats en hipòxia.

Nº	pl	MW (Da)	Imatges de spots		Volum promig	Relació Hip/Ctrol
91	5.122	48367			Control 0.262 Hipòxia 0.417	1.59
169	5.974	37148			Control 0.148 Hipòxia 0.363	2.45
384	5.204	13476			Control 0.077 Hipòxia 0.170	2.2
460	5.903	67464			Hipòxia 0.201	---
461	5.986	67429			Hipòxia 0.358	---

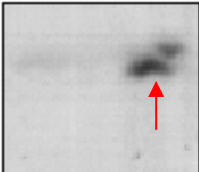
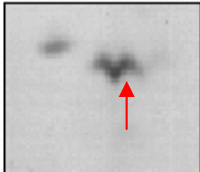
Taula 6 (continuació). Spots sobreexpressats en hipòxia.

Nº	pl	MW (Da)	Imatges		Volum promig	Relació Hip/Ctrol
465	5.091	61017				0.041
466	5.038	62467				0.113
477	6.526	31198				0.121
506	5.702	37062				0.171

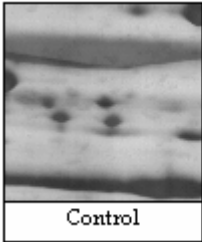
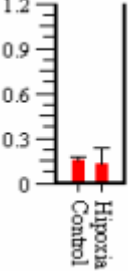
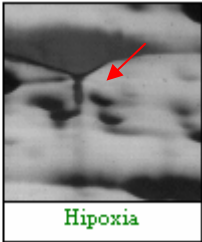
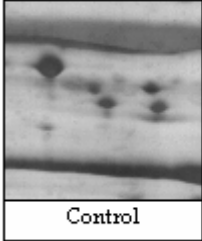
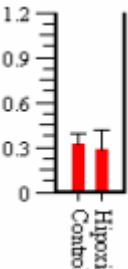
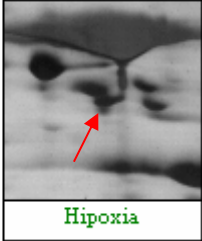
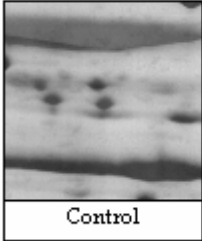
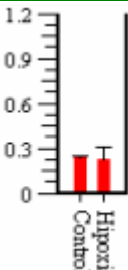
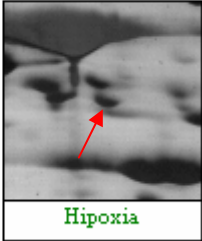
Taula 7. Spots subexpressats en hipòxia.

Nº	pl	MW (Da)	Imatges		Volum promig	Relació Ctrol/Hip
163	5.963	38114				1.52

Taula 8. Spots amb canvis de punt isoelèctric en hipòxia.

Nº	pl	MW (Da)		Volum promig	Relació Hip/Ctrol
359 (Control)	6.297	16840		Control 0.319	1.38
441 (Hipòxia)	6.328			Hipòxia 0.439	

Taula 9. Spots control.

Nº	pl	MW (Da)		Volum promig	Relació Ctrol/Hip
89	5.182	48423			1.18
					
98	5.137	47478			1.09
					
100	5.187	47316			1.03
					

Taula 10. Identificació de proteïnes (*)

Nº	nom	Nº Swiss-prot	Tècnica emprada
91	Protein disulfide isomerase A6 precursor (P5)	Q15084	MALDI-TOF nESI-ITMS/MS
169	No identificada	---	
384	No identificada	---	
460	No identificada	---	
461	No identificada	---	
465	No identificada	---	
466	No identificada	---	
477	Proteasome subunit α type I	P25786	MALDI-TOF nESI-ITMS/MS
506	No identificada	---	
163	α -enolase	P06733	MALDI-TOF nESI-ITMS/MS
359	Hypothetical protein Unnamed protein product	13276639 10434475	MALDI-TOF nESI-ITMS/MS
441	Hypothetical protein Unnamed protein product	13276639 10434475	MALDI-TOF nESI-ITMS/MS
89	Dynactin complex 50 kDa subunit	Q13561	MALDI-TOF nESI-ITMS/MS
98	26s protease regulatory subunit 6A (Proteasome component C2)	P17980	MALDI-TOF
100	26s protease regulatory subunit 6A (Proteasome component C2)	P17980	MALDI-TOF

(*) Col·laboració amb CSIC-IIBB-IDIBAPS

Taula 11. ELISA. Anàlisi de la secreció d'Iba2 al medi extracel·lular

Línia cel·lular	Control	temps d'hipòxia (2% O ₂)				24h normòxia
		30'	2h	4h	24h	
U373 MG	---	---	---	---	+	---
M21	---	---	---	---	---	---

Apèndix 2. Figures.

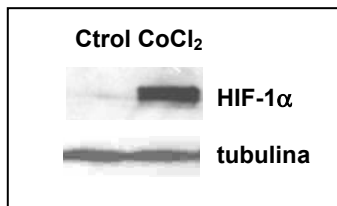


Figura 18. Western Blot.

Inducció d'HIF-1α per estimulació amb CoCl₂ 100μM durant 4 hores en cèl·lules U373 MG, en comparació amb cèl·lules control. Es mostra la tubulina com a control de càrrega proteica.

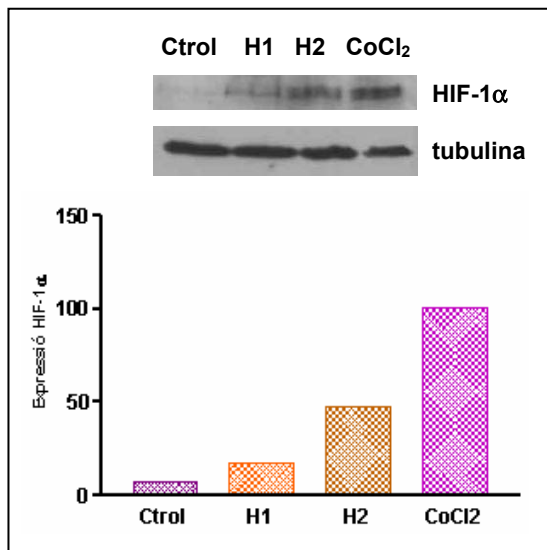


Figura 19. Western Blot.

Inducció d'HIF-1α en cèl·lules U373 MG per estimulació amb hipòxia (2% O₂, 4 h), i comparació amb la inducció per cobalt. Es mostra la tubulina com a control de càrrega proteica.

Ctrl: Incubació en normòxia, 4h.

H1: Incubació en hipòxia sense equilibrat del medi.

H2: Incubació en hipòxia amb equilibrat previ del medi.

CoCl₂: Incubació amb CoCl₂ 100 μM, 4h.

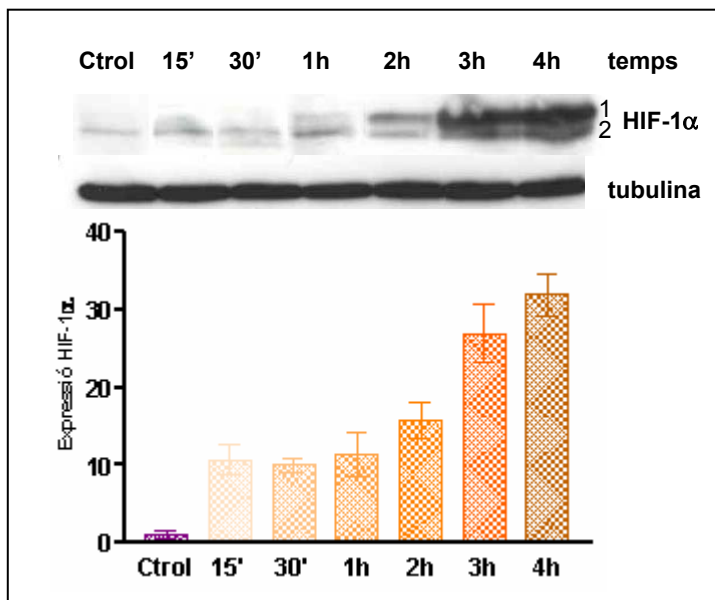


Figura 20. Western Blot.

Inducció d'HIF-1α per incubació de cèl·lules U373 MG en hipòxia (2% O₂) a diferents temps. Es mostra la tubulina com a control de càrrega proteica.

El diagrama de barres representa el promig de 4 experiments independents.

Ctrl: normòxia, 4h.

1: HIF-1α fosforilada.

2: HIF-1α desfosforilada.

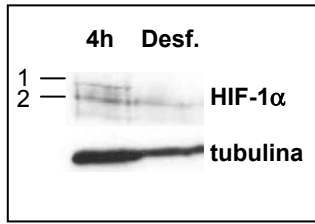


Figura 21. Western Blot.

Comprovació de la fosforilació d'HIF-1 α per tractament d'una mostra induïda per hipòxia (2% O₂, 4h) amb fosfatasa alcalina. Es mostra la tubulina com a control de càrrega proteica.

4h: Incubació d'U373 MG en hipòxia durant 4 hores.

Desf: Desfosforil·lació de la mostra anterior.

1: HIF-1 α fosforilat.

2: HIF-1 α desfosforilat.

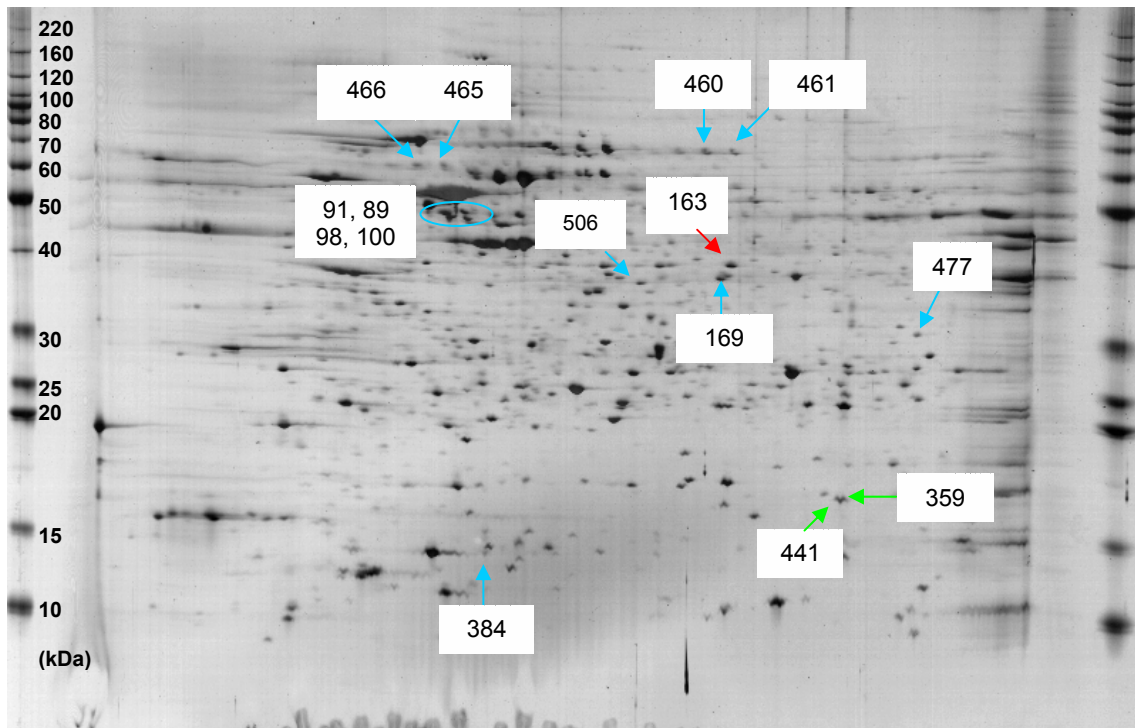


Figura 22. Electroforesi bidimensional d'un extracte proteic total de cèl·lules U373 MG.

Spots seleccionats. En blau es marquen els spots que presenten sobreexpressió en hipòxia; en vermell els que presenten disminució de l'expressió en hipòxia; en verd els que presenten canvis en el punt isoelèctric.

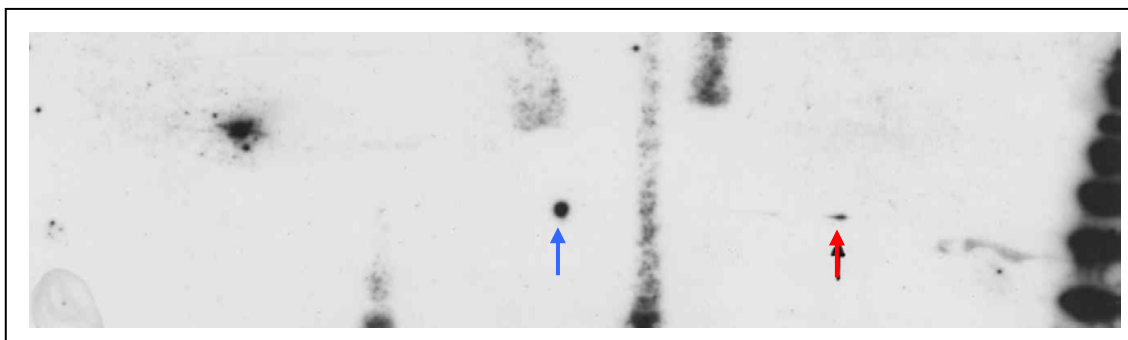


Figura 23. Western blot bidimensional per a Proteasome subunit α type I.

A més de l'spot d'interès (fletxa vermella), l'anticòs en reconeix d'altres a la mateixa alçada de pes molecular (fletxa blava); possiblement es tracti de la mateixa proteïna, però la forma que ens interessa és només una. En un gel monodimensional això quedaria emmascarat.

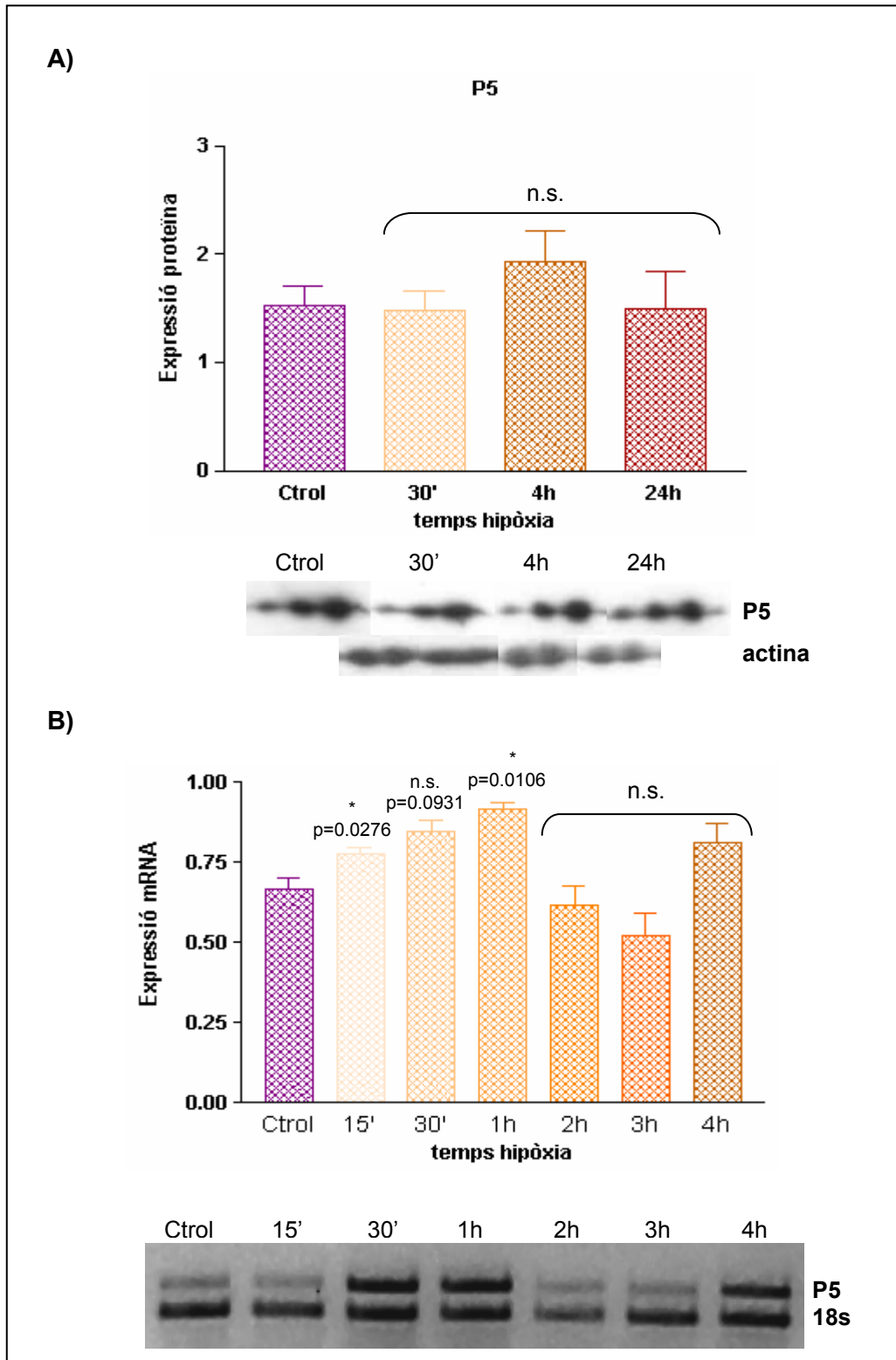


Figura 24. Protein disulfide isomerase A6 precursor (P5).

(A) Anàlisi de l'expressió proteica en funció de la durada de l'estrès hipòxic, amb normalització respecte actina. Mitjana de tres repeticions. (B) Anàlisi de l'expressió de mRNA, en funció de la durada de l'estrès hipòxic, amb normalització respecte 18s. Mitjana de tres repeticions. Els valors són significatius si $p < 0.5$.

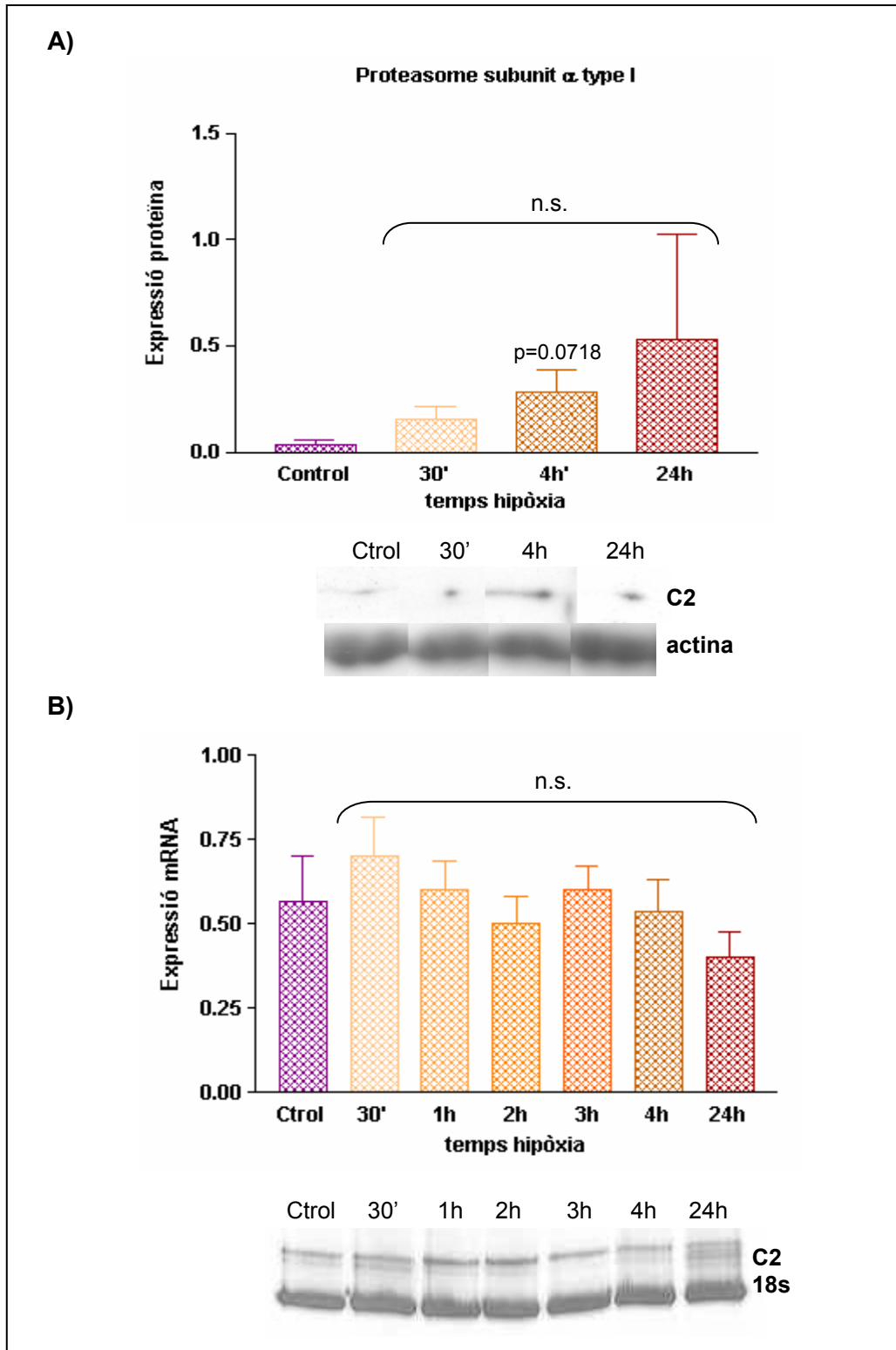


Figura 25. Proteasome subunit α type I (Component C2).

(A) Anàlisi de l'expressió proteica en funció de la durada de l'estrès hipòxic, amb normalització respecte actina. Mitjana de tres repeticions. (B) Anàlisi de l'expressió de mRNA, en funció de la durada de l'estrès hipòxic, amb normalització respecte 18s. Mitjana de tres repeticions. Els valors són significatius si $p < 0.5$.

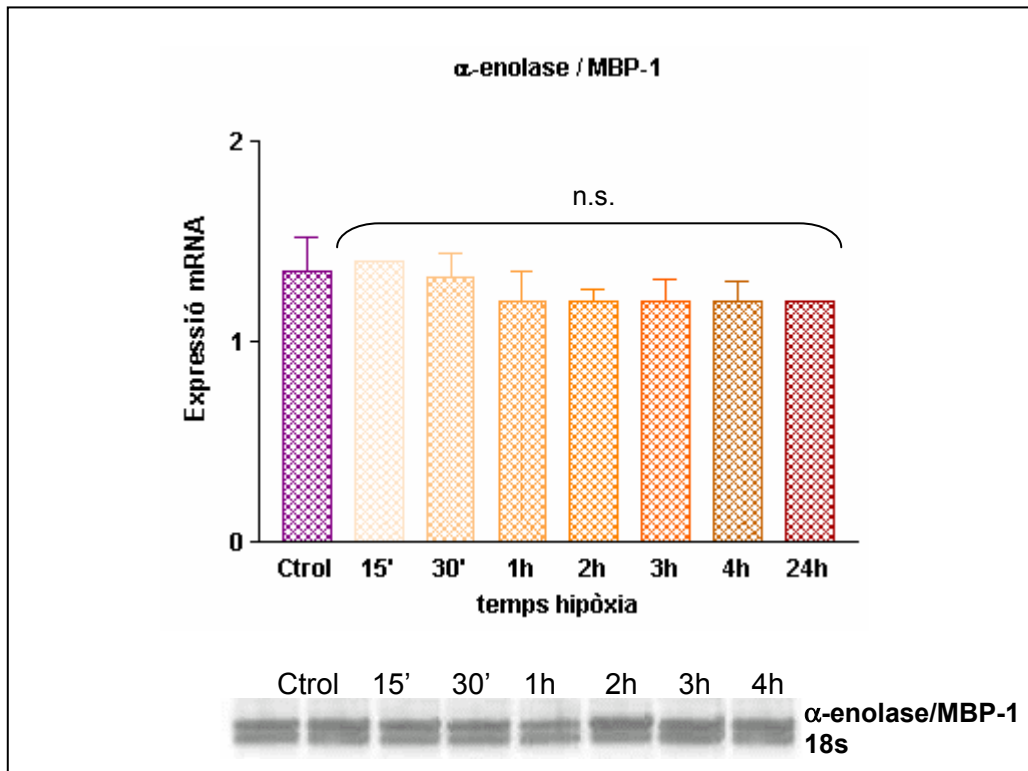


Figura 26. α -enolase/MPB-1.

(B) Anàlisi de l'expressió de mRNA, en funció de la durada de l'estrés hipòxic, amb normalització respecte 18s. Mitjana de tres repeticions.

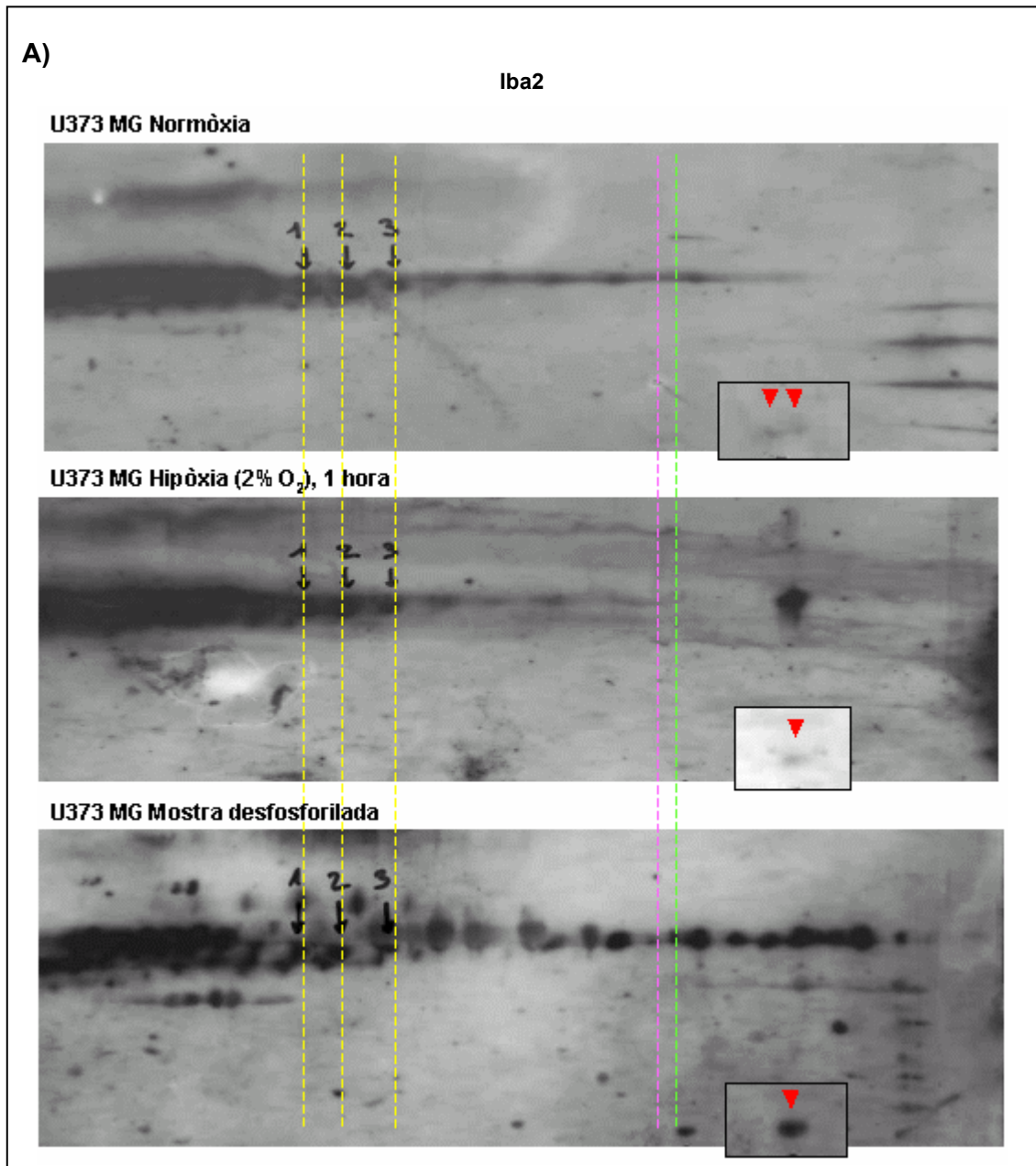


Figura 27. Ionized calcium binding adapter molecule 2 (Iba2).

(A) Anàlisi de la desfosforilació d'Iba2 en hipòxia per Western Blot. Comparació d'una mostra normòxia, una mostra hipòxia i un extracte proteic desfosforilat. Les línies grogues marquen 3 spots de referència; la rosa localitza Iba2 fosforilada; la verda assenyala Iba2 desfosforilada. Es mostren ampliacions de les imatges corresponents als spots. (Continua a la pàgina següent).

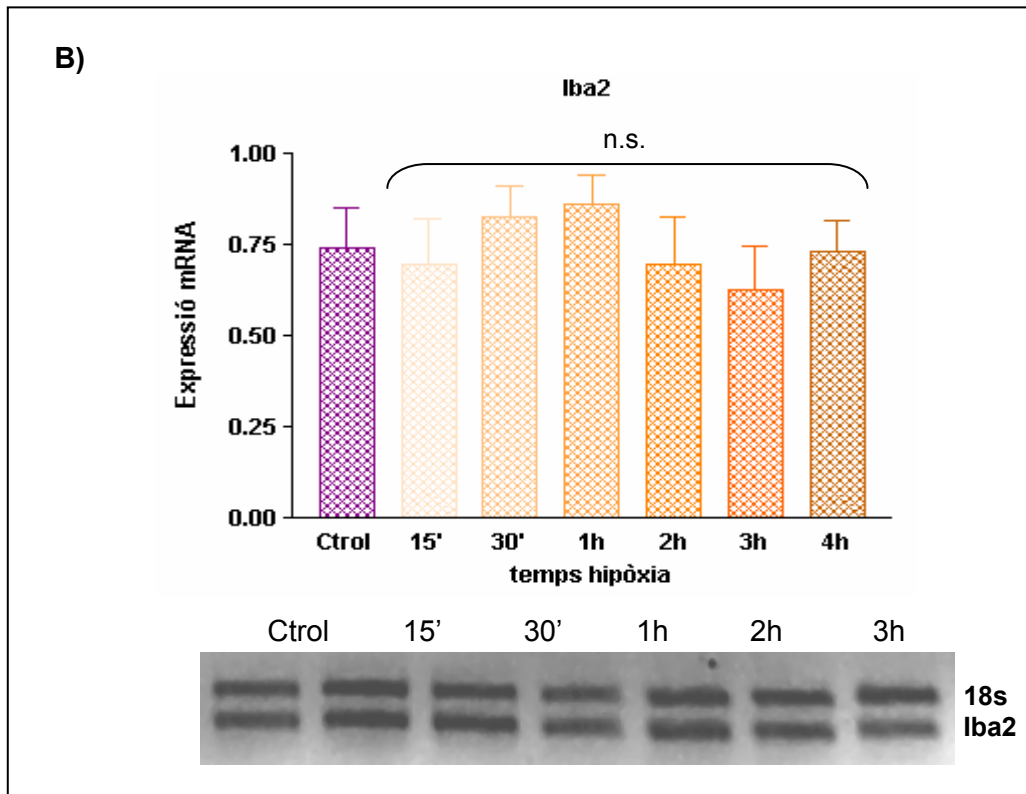


Figura 27 (continuació). Ionized calcium binding adapter molecule 2 (Iba2).

(B) Anàlisi de l'expressió de mRNA, en funció de la durada de l'estrés hipòxic, amb normalització respecte 18s. Mitjana de tres repeticions.

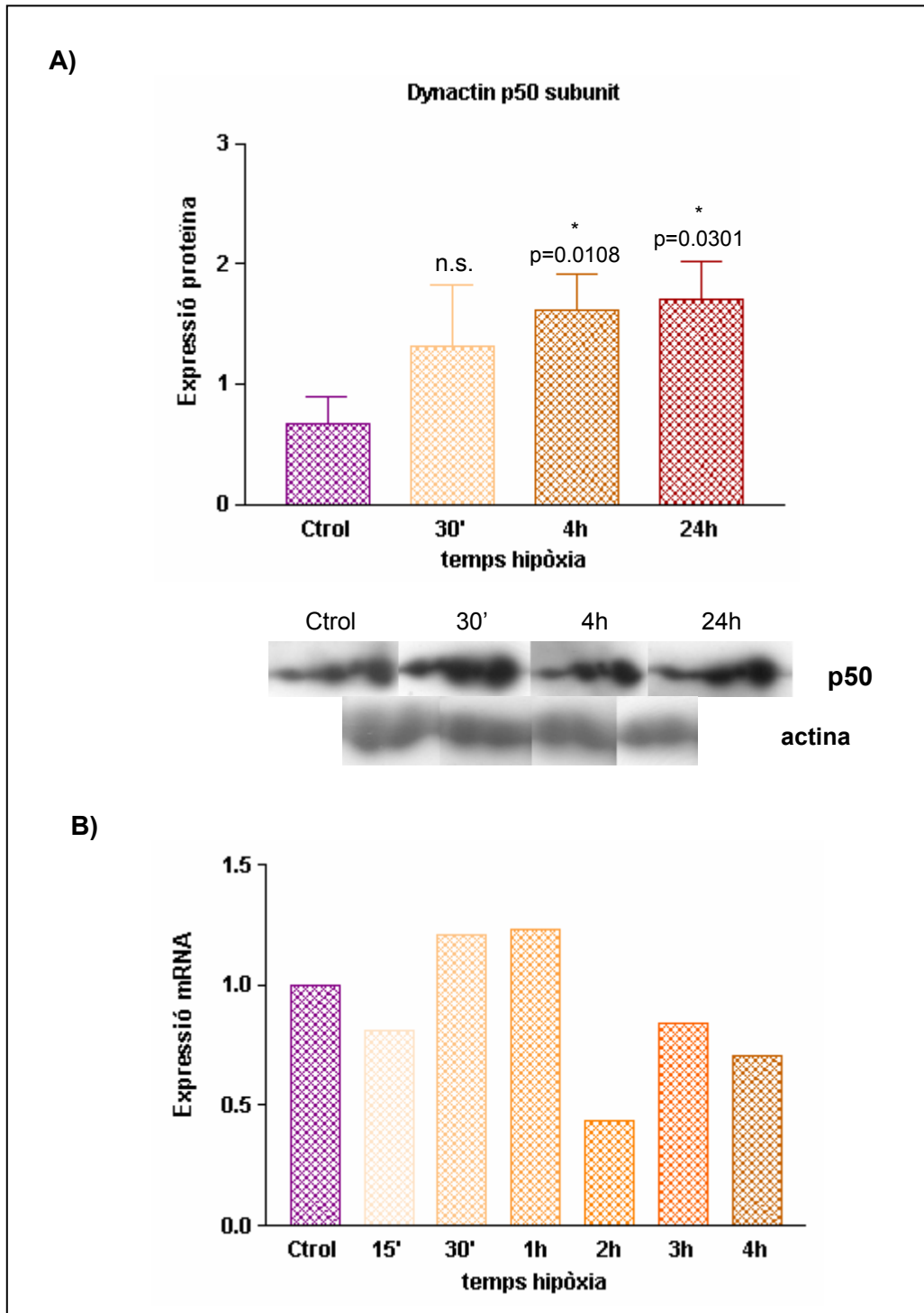


Figura 28. Dynactin p50 subunit.

(A) Anàlisi de l'expressió proteica en funció de la durada de l'estrès hipòxic, amb normalització respecte actina. Mitjana de tres repeticions. Els valors són significatius si $p < 0.5$. (B) Anàlisi de l'expressió de mRNA, en funció de la durada de l'estrès hipòxic; anàlisi per PCR quantitativa (Taqman).

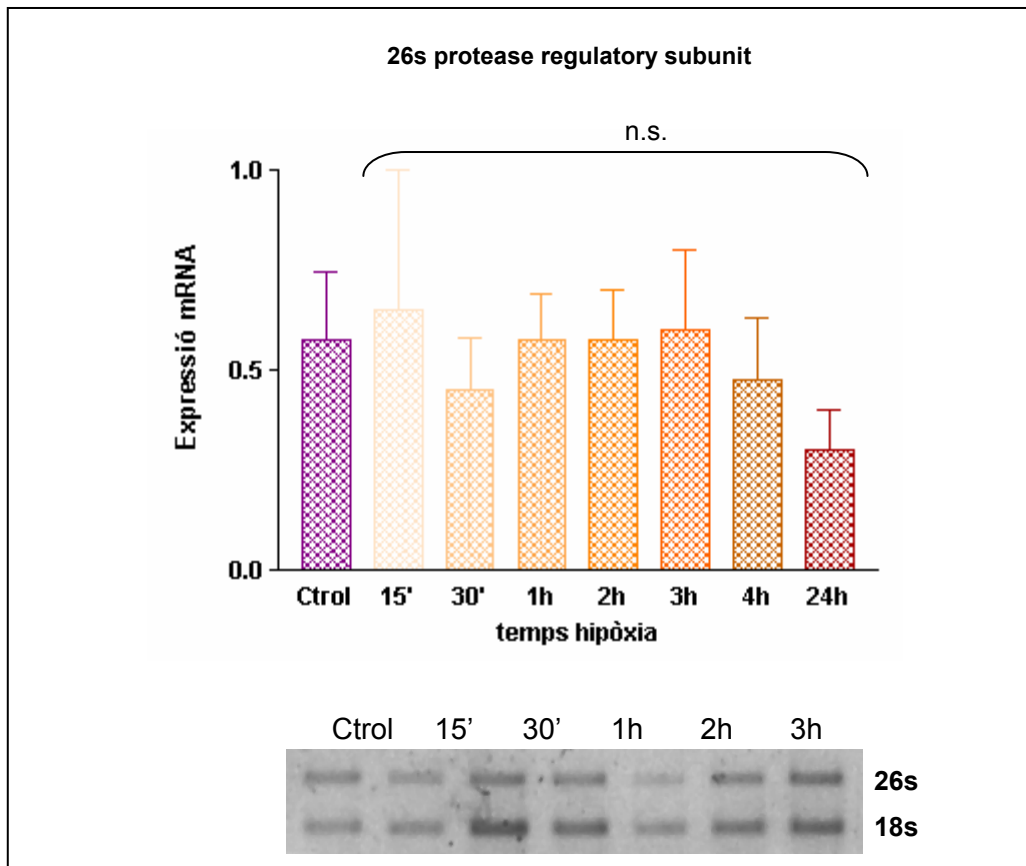


Figura 29. 26s protease regulatory subunit.

(B) Anàlisi de l'expressió de mRNA, en funció de la durada de l'estrés hipòxic, amb normalització respecte 18s. Mitjana de tres repeticions.

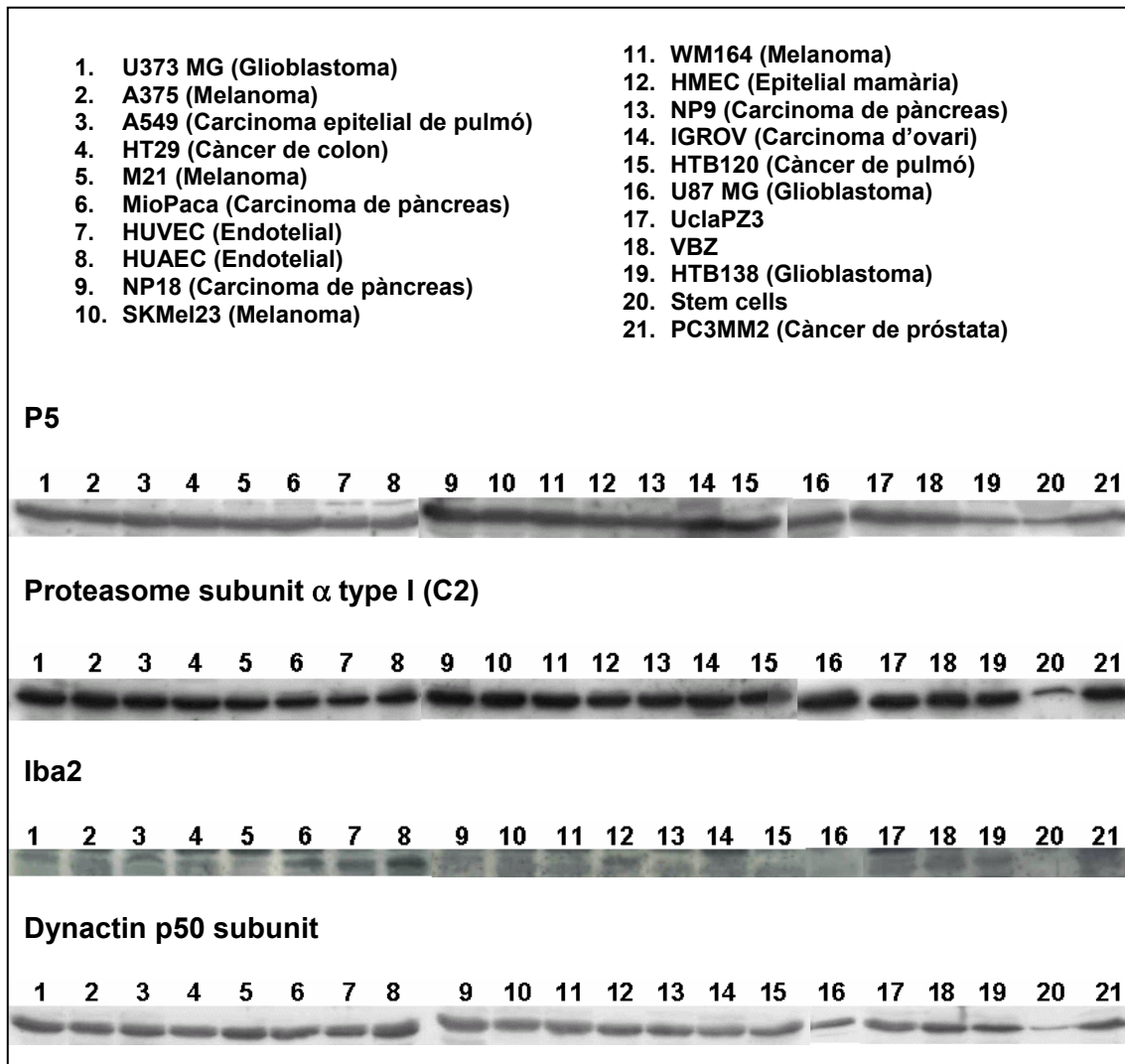


Figura 30. Western Blot.

Expressió de proteïna en diferents línies cel·lulars. (Continua a la pàgina següent).

	P5	C2	Iba2	p50
1. U373 MG (Glioblastoma)	++	++	+	++
2. A375 (Melanoma)	++	++	(+)	++
3. A549 (Carcinoma epitelial de pulmó)	++	++	+	++
4. HT29 (Càncer de colon)	++	++	+	++
5. M21 (Melanoma)	++	++	(+)	++
6. MioPaca (Carcinoma de pàncreas)	++	++	+	++
7. HUVEC (Endotelial)	++	++	+	++
8. HUAEC (Endotelial)	++	++	+	++
9. NP18 (Carcinoma de pàncreas)	++	++	(+)	++
10. SKMel23 (Melanoma)	++	++	(+)	++
11. WM164 (Melanoma)	++	++	(+)	++
12. HMEC (Epitelial mamària)	++	++	+	++
13. NP9 (Carcinoma de pàncreas)	++	++	(+)	++
14. IGROV (Carcinoma d'ovari)	++	++	(+)	++
15. HTB120 (Càncer de pulmó)	++	++	(+)	++
16. U87 MG (Glioblastoma)	++	++	-	++
17. UclaPZ3	++	++	(+)	++
18. VBZ	++	++	(+)	++
19. HTB138 (Glioblastoma)	++	++	-	++
20. Stem cells	++	++	-	++
21. PC3MM2 (Càncer de pròstata)	++	++	(+)	++

Figura 30 (continuació). Expressió de proteïna en diferents línies cel·lulars.

- : no s'expressa.

(+) / + / ++ : s'expressa (quantitats creixents).

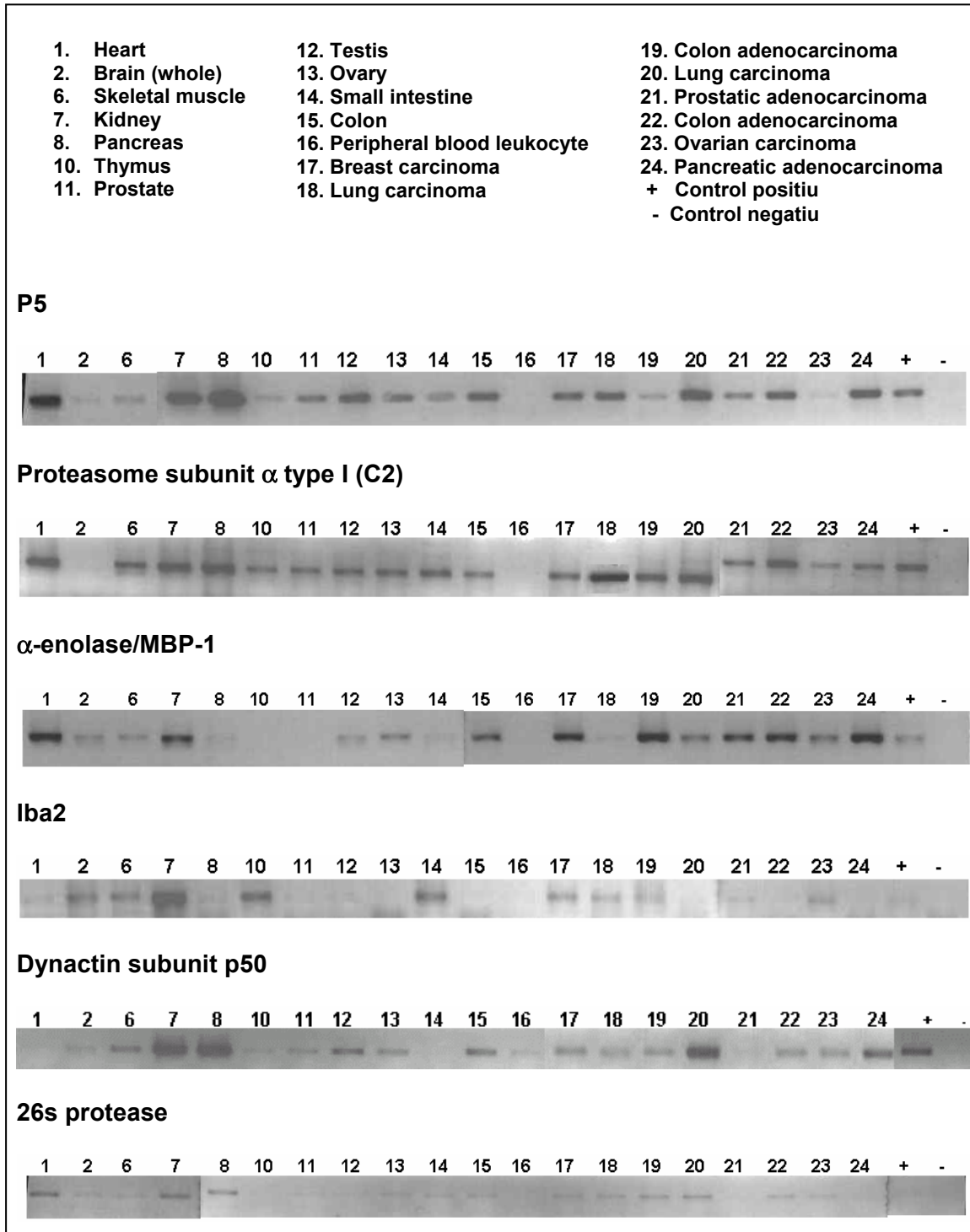


Figura 31. Expressió de mRNA en diferents teixits. (Continua a la pàgina següent).

	P5	C2	α -enolase	Iba2	p50	26s Protease
1. Heart	+++	++	+++	++	+++	++
2. Brain (whole)	+	-	++	++	++	++
6. Skeletal muscle	+	++	++	++	++	++
7. Kidney	+++	++	++	+++	+++	++
8. Pancreas	+++	++	+++	(+)	+++	++
10. Thymus	+	++	++	(+)	+	-
11. Prostate	++	++	++	(+)	+	+
12. Testis	++	++	++	(+)	++	+
13. Ovary	++	++	++	-	+	+
14. Small intestine	++	++	++	(+)	(+)	++
15. Colon	++	++	++	+	++	++
16. Peripheral blood leukocyte	+	+	-	-	(+)	-
17. Breast carcinoma	++	++	+++	+	+	+
18. Lung carcinoma	++	++	++	++	+	++
19. Colon adenocarcinoma	++	++	+++	-	++	++
20. Lung carcinoma	+++	++	+++	-	+	++
21. Prostatic adenocarcinoma	++	++	++	(+)	+	+
22. Colon adenocarcinoma	++	++	++	-	ND	+
23. Ovarian carcinoma	+	++	++	-	++	+
24. Pancreatic adenocarcinoma	+++	++	+++	++	++	+

Figura 31 (continuació). Expressió de mRNA en diferents teixits.

- : no s'expressa.

(+) / + / ++ / +++ : s'expressa (quantitats creixents).

ND: no determinat.

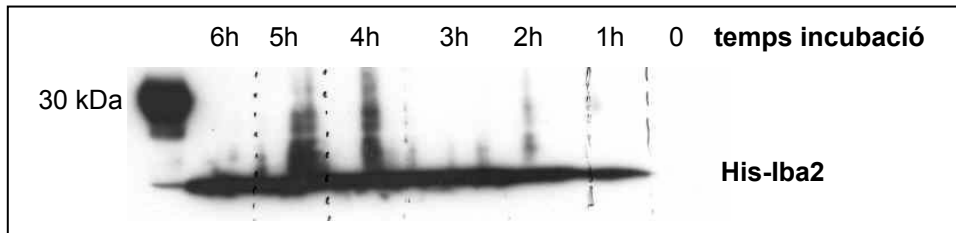


Figura 32. Western Blot.

Expressió d'His-Iba2 per BL21 a diferents temps d'incubació. La proteïna es detecta entre els 20 i 30 kDa, ja que al seu pes molecular (17 kDa) s'addiciona el de la prolongació d'histidines.

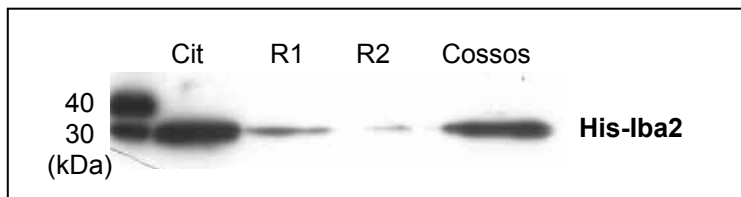


Figura 33. Western Blot.

Localització cel·lular d'His-Iba2 en BL21. La proteïna s'observa aparentment a 30 kDa perquè el % d'acrilamida utilitzat en aquest cas no permeté una major separació.

Cit = citoplasma; R1 i R2 = rentats; Cossos = cossos d'inclusió.

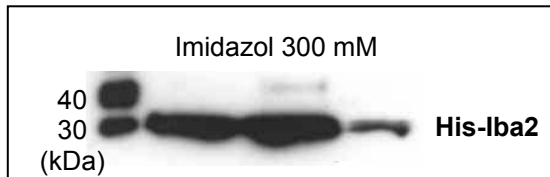


Figura 34. Western Blot.

Elució d'His-Iba2. Fraccions corresponents a l'elució amb imidazol 300 mM. La resta de fraccions no mostra cap banda.

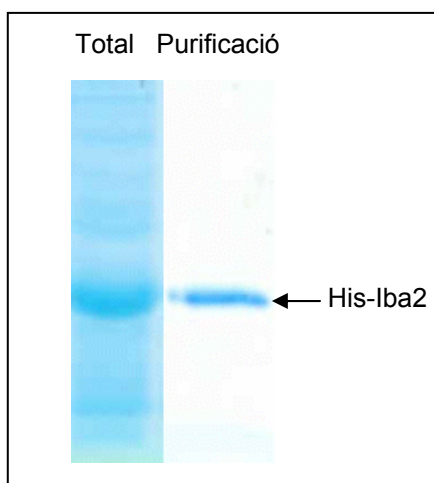


Figura 35. Tinció amb Coomassie Blue.

Comparació d'un extracte proteic citoplasmàtic de BL21-pET28b-Iba2 induït amb IPTG amb el resultat d'una purificació en columna de níquel del mateix extracte.

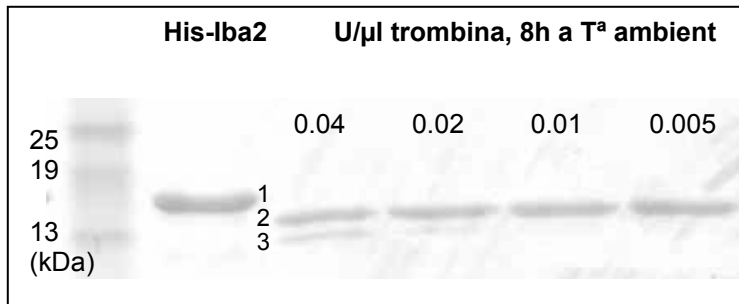


Figura 36. Tinció amb Coomassie Blue.

Optimització de la digestió amb trombina d'His-Iba2.

1: His-Iba2.

2: Iba2.

3: Iba2 sobredigerida.



Figura 37. Tinció amb Coomassie Blue.

A: Iba2 purificada.

B: Digestió d'His-Iba2 abans de la purificació; es veu com ha estat incompleta.

C: His-Iba2 abans de la digestió amb trombina.

1: His-Iba2.

2: Iba2.

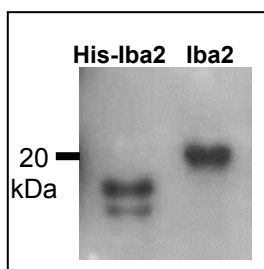


Figura 38. Western Blot.

Detecció d'Iba2 recombinant amb l'anticòs policlonal de conill anti-Iba2 #750.

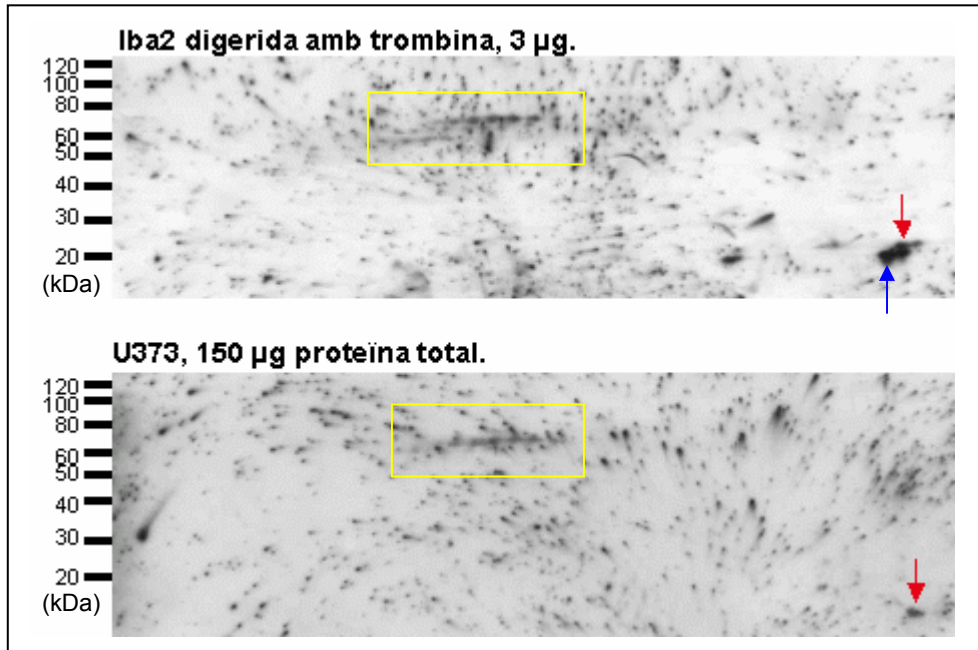


Figura 39. Western Blot bidimensional.

Detecció d'Iba2 recombinant i d'un extracte proteic total de cèl·lules de mamífer amb l'anticòs policlonal de conill anti-Iba2 #750. La fletxa vermella mostra l'spot corresponent a Iba2. L'spot assenyalat amb la fletxa blava correspon a una sobredigestió de la proteïna. El requadre groc mostra un conjunt de spots corresponents a la trombina (72 kDa), que també detecta l'anticòs. S'observa molt background.

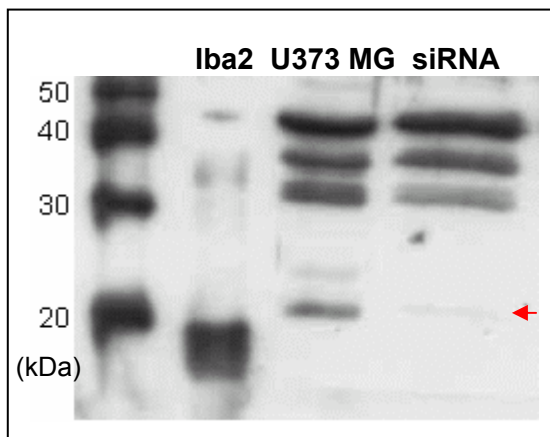


Figura 40. Western Blot.

Detecció d'Iba2 amb l'anticòs policlonal de conill anti-Iba2 #751. La fletxa assenjala la banda corresponent a Iba2 en extractes proteics de cèl·lules de mamífer (U373 MG); aquesta presenta un pes lleugerament major que la proteïna recombinant (Iba2). La confirmació de la identitat de la banda s'obtingué al observar la desaparició d'aquesta després d'una

incubació amb un RNA d'interferència contra Iba2. Les tres bandes superiors corresponen a inespecificitats de l'anticòs.

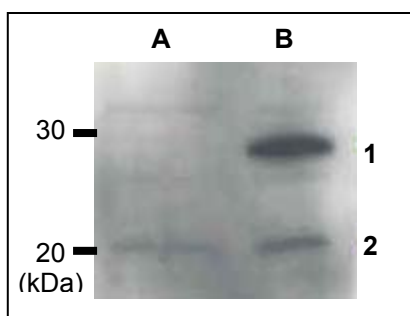


Figura 41. Western Blot.

Detecció d'extractes proteics totals de cèl·lules de mamífer amb l'anticòs policlonal de ratolí.

A: Extracte total de cèl·lules U-373.

B: Extracte total de cèl·lules U-373 transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

1: HA-Iba2.

2: Iba2.

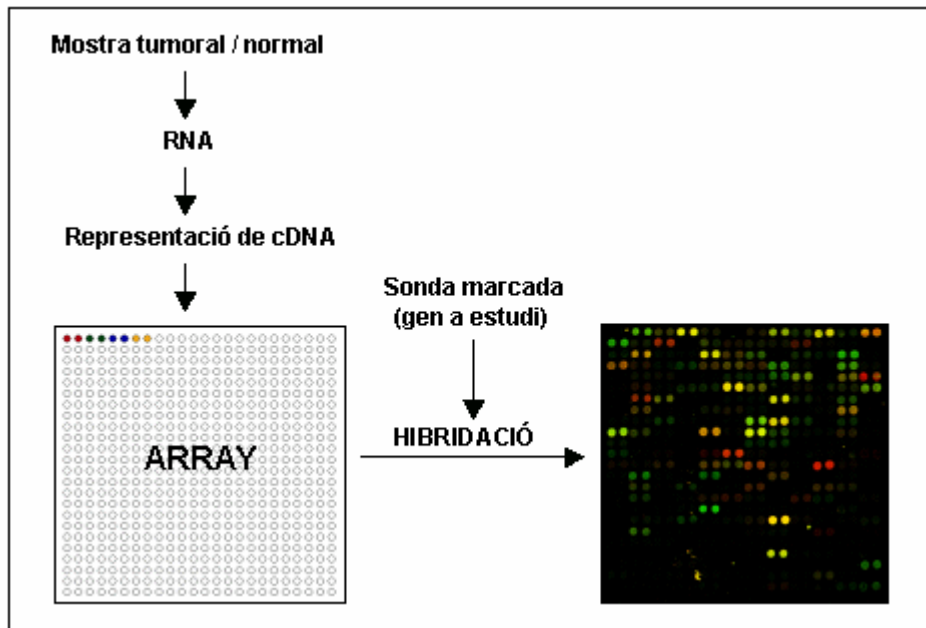


Figura 42. Representació esquemàtica del funcionament d'un xip de DNA invertit. En els xips comuns cada punt de l'array conté un sol gen; en el xip invertit cada punt conté un conjunt representatiu de tots els cDNAs d'una mostra complexa com pot ser un tumor. Llavors la sonda es limita a un sol gen, que és el que volem estudiar. (Tecnologia desenvolupada per l'IRO (Institut de Recerca Oncològica), l'Institut català d'oncologia i Merck-LBI).

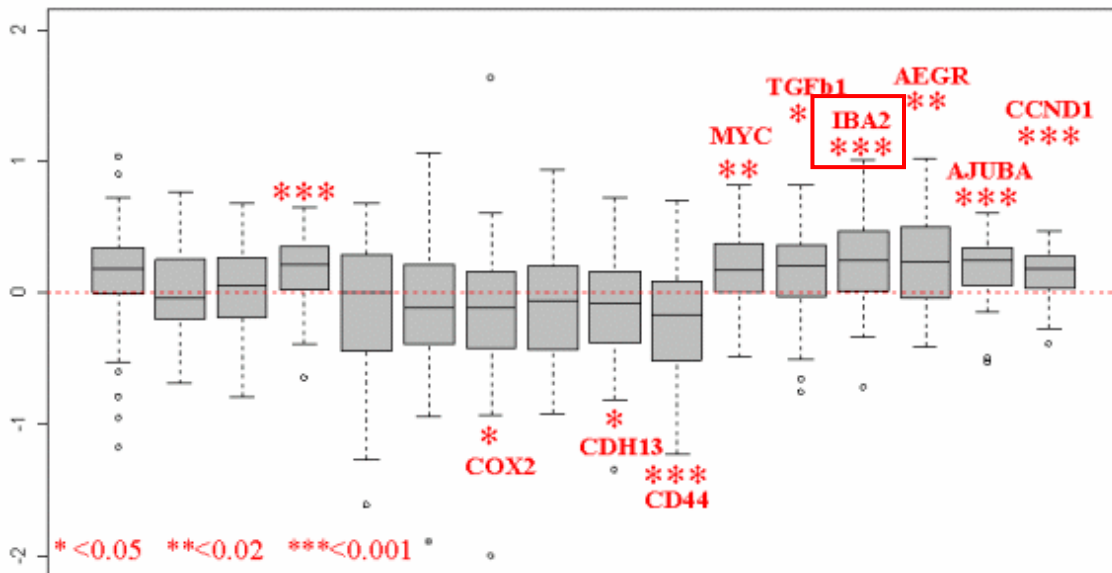


Figura 43. Comparació de l'expressió gènica en càncer colorectal vs. teixit normal amb un xip de DNA invertit.

Els gràfics representen la relació de l'expressió de cada gen en mostres tumorals respecte la seva parella normal. La situació de les caixes per sobre de la línia vermella indica sobreexpressió en tumors; per sota, expressió disminuïda. Com a validació del mètode, assenyalar que gens com *myc* ja es troben descrits com a sobreexpressats en tumors en la bibliografia; igualment, *CDH13*, *COX2* i *CD44* també s'han descrit anteriorment com a subexpressats en tumors.

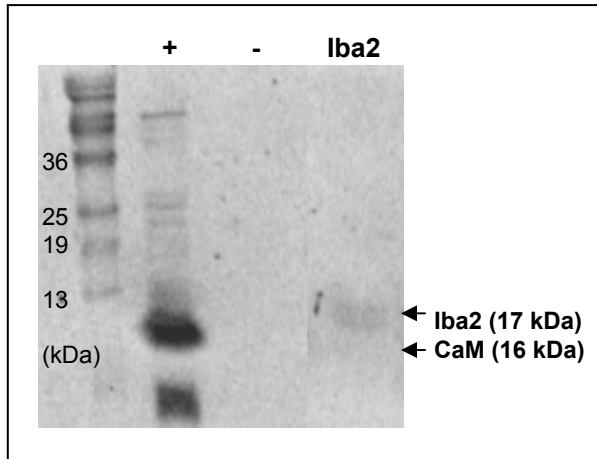


Figura 44. Unió a calci d'Iba2 ("calcium blotting").

+: Control positiu. Calmodulina (CaM).

- : Control negatiu. Avidina.

Iba2: Iba2 recombinant purificada.

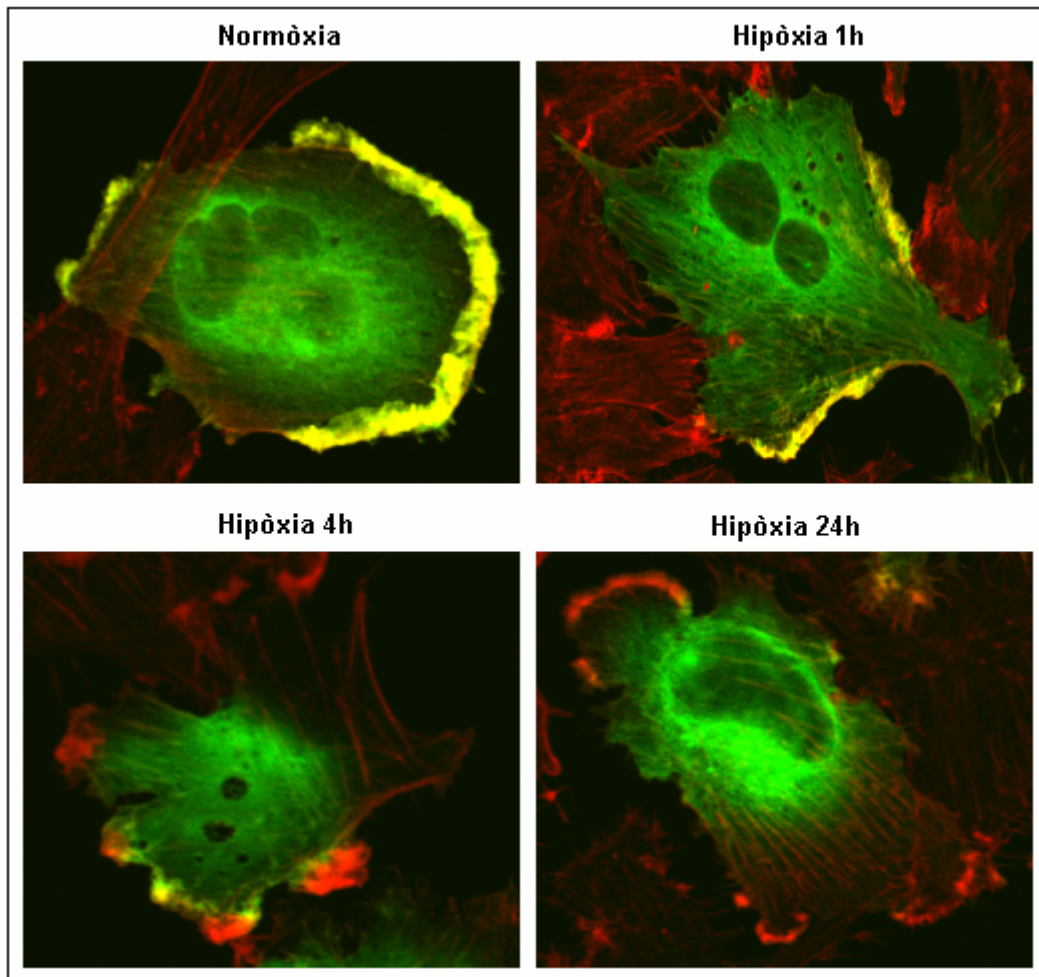


Figura 45. Immunohistoquímica.

Detecció d'Iba2 (verd) i actina (vermell), i colocalització de totes dues proteïnes (groc) en cèl·lules U373 MG transfectades amb pcDNA-HA-Iba2. Les transfeccions control amb pcDNA-HA, així com les cèl·lules no transfectades no donen senyal per a HA-Iba2 (no es mostren els resultats).

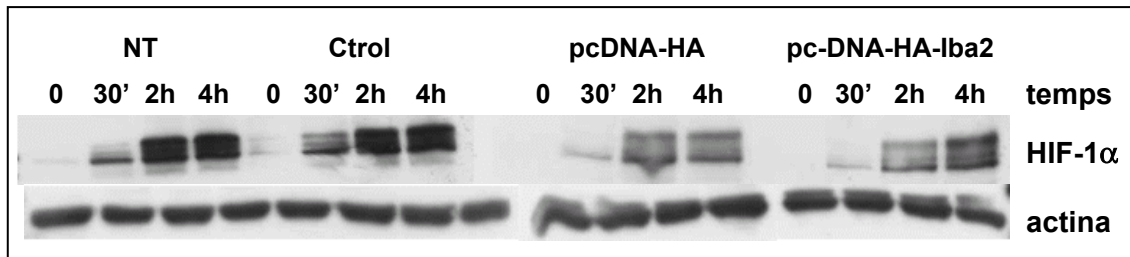


Figura 46. Western Blot.

Anàlisi dels efectes de la sobreexpressió d'HA-Iba2 sobre la inducció d'HIF-1 α per hipòxia. Es mostra l'actina com a control de càrrega proteica.

NT: Cèl·lules no tractades.

Ctrl: Cèl·lules tractades amb el protocol de transfecció.

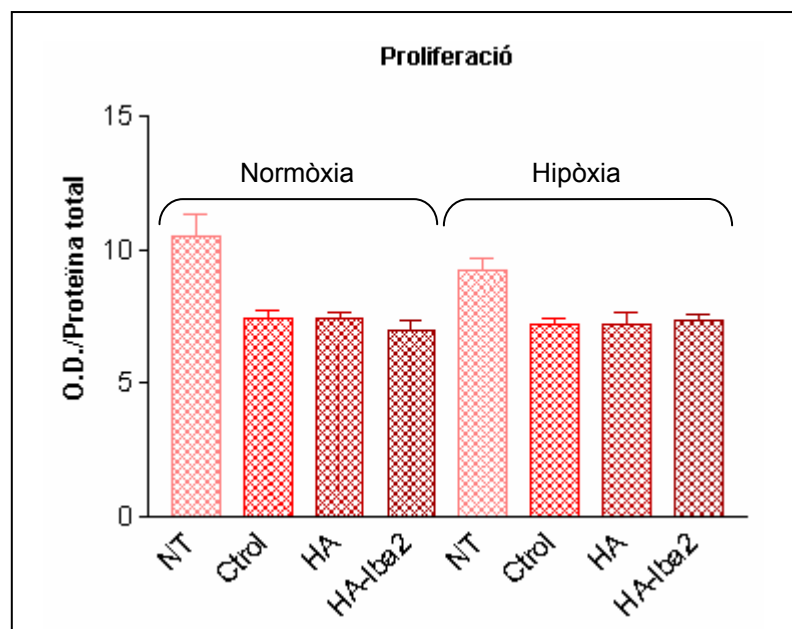


Figura 47. Proliferació de cèl·lules U373 MG.

Mitjana de dos assajos. Els valors d'absorbància estan normalitzats respecte la quantitat total de proteïna cel·lular.

NT: Cèl·lules no tractades.

Ctrl: Cèl·lules tractades amb el protocol de transfecció.

HA: Transfecció amb pcDNA-HA.

HA-Iba2: Transfecció amb pcDNA-HA-Iba2.

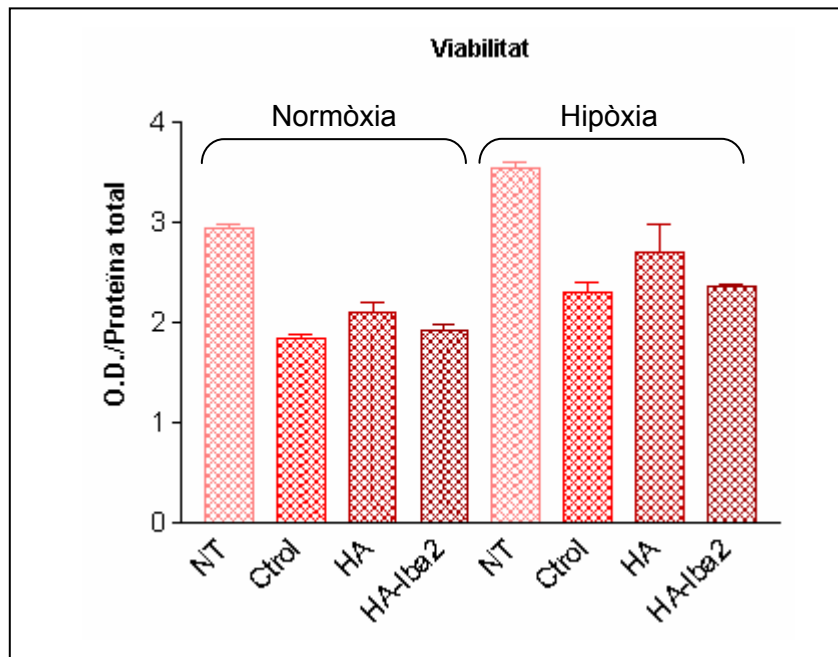


Figura 48. Viabilitat de cèl·lules U373 MG.

Mitjana de dos assajos. Els valors d'absorbància estan normalitzats respecte la quantitat total de proteïna cel·lular.

NT: Cèl·lules no tractades.

Ctròl: Cèl·lules tractades amb el protocol de transfecció.

HA: Transfecció amb pcDNA-HA.

HA-Iba2: Transfecció amb pcDNA-HA-Iba2.

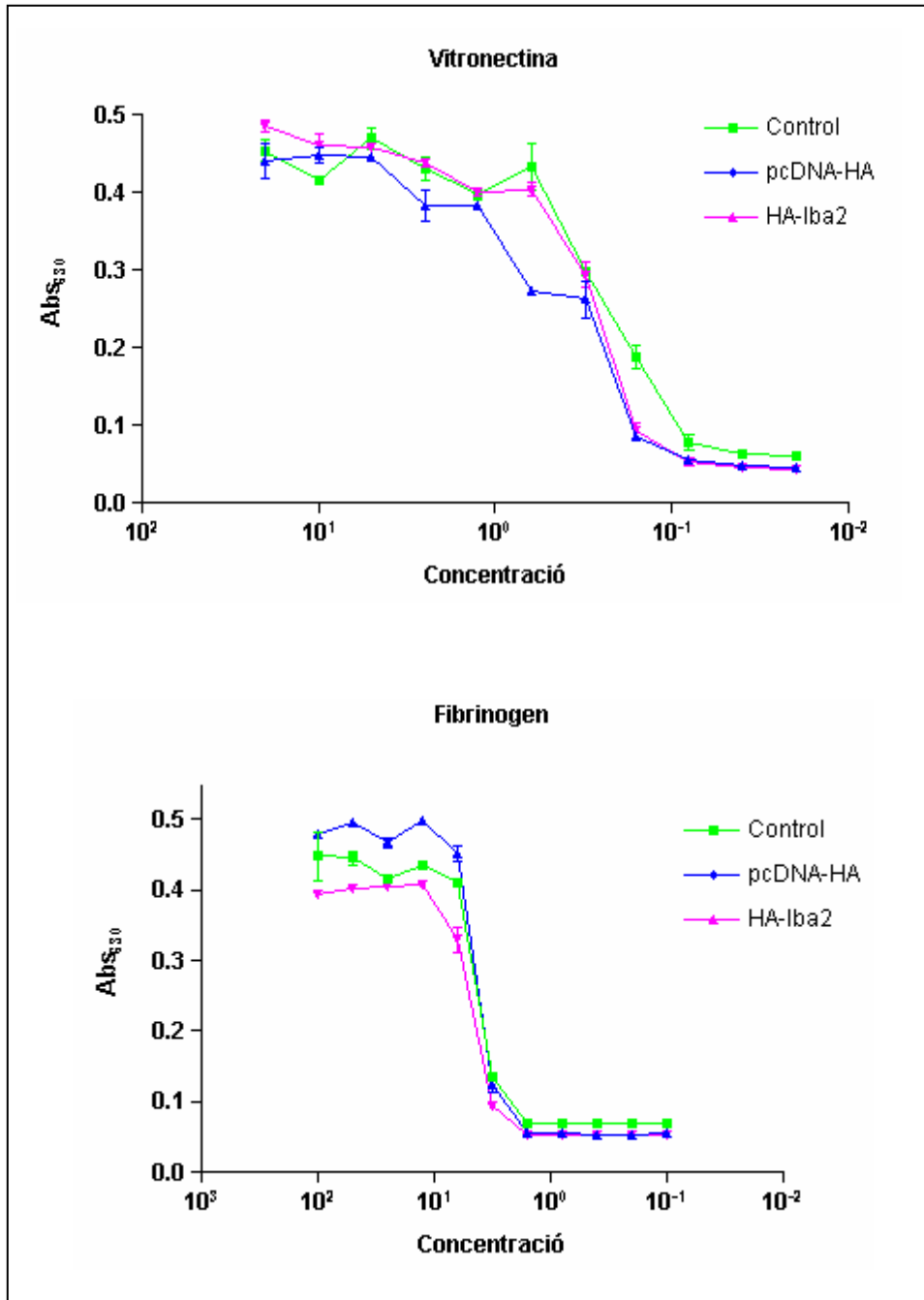


Figura 49. Adhesió de cèl·lules U373 MG a diferents matrius proteiques.

Els gràfics són representatius de tres assajos diferents, i són iguals per a condicions d'hipòxia i normòxia.

Control: Cèl·lules tractades amb el protocol de transfecció.

pcDNA-HA: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA.

HA-Iba2: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

(Continua en la pàgina següent).

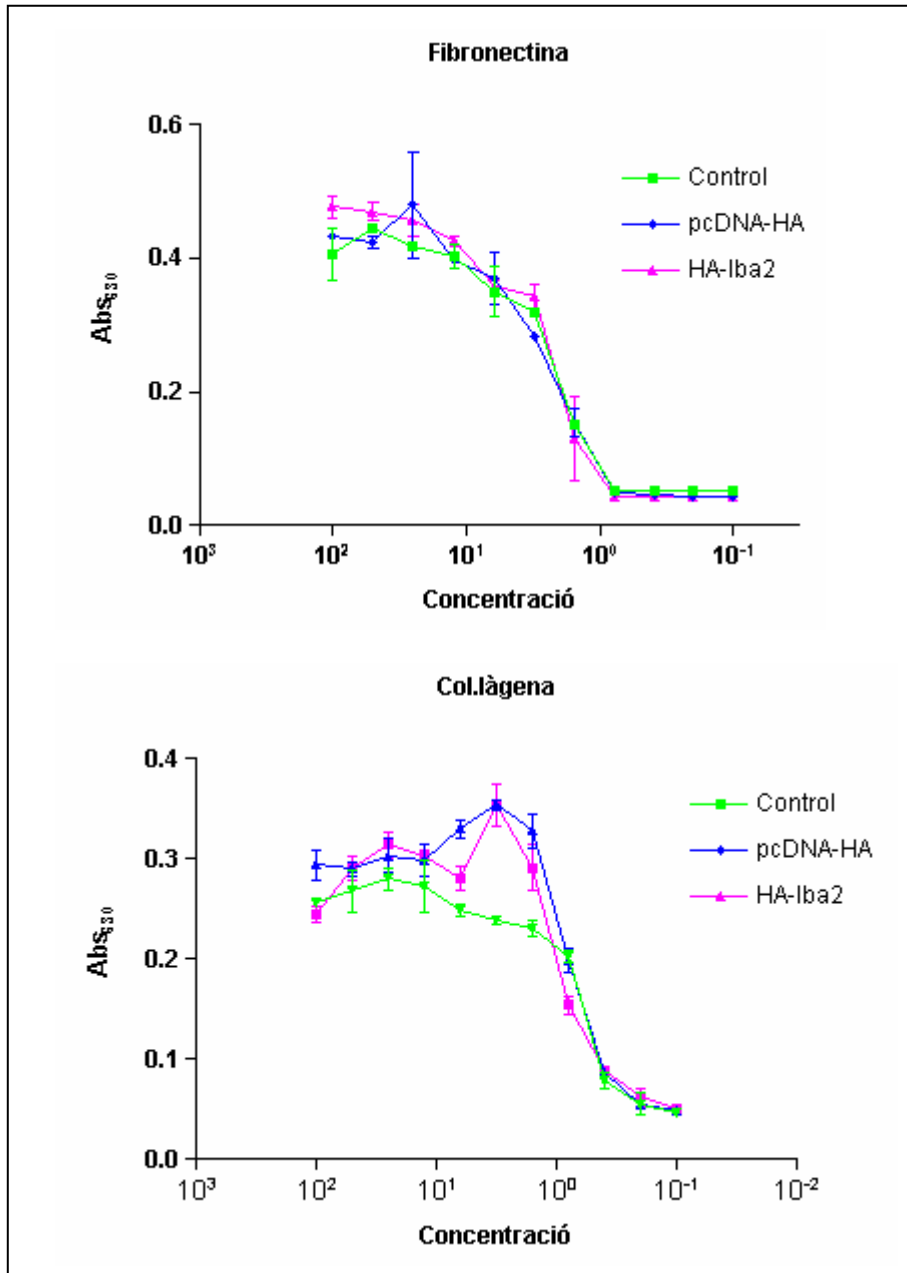


Figura 49 (continuació). Adhesió de cèl·lules U373 MG a diferents matrius proteiques.

Els gràfics són representatius de tres assajos diferents, i són iguals per a condicions d'hipòxia i normòxia

Control: Cèl·lules tractades amb el protocol de transfecció.

pcDNA-HA: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA.

HA-Iba2: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

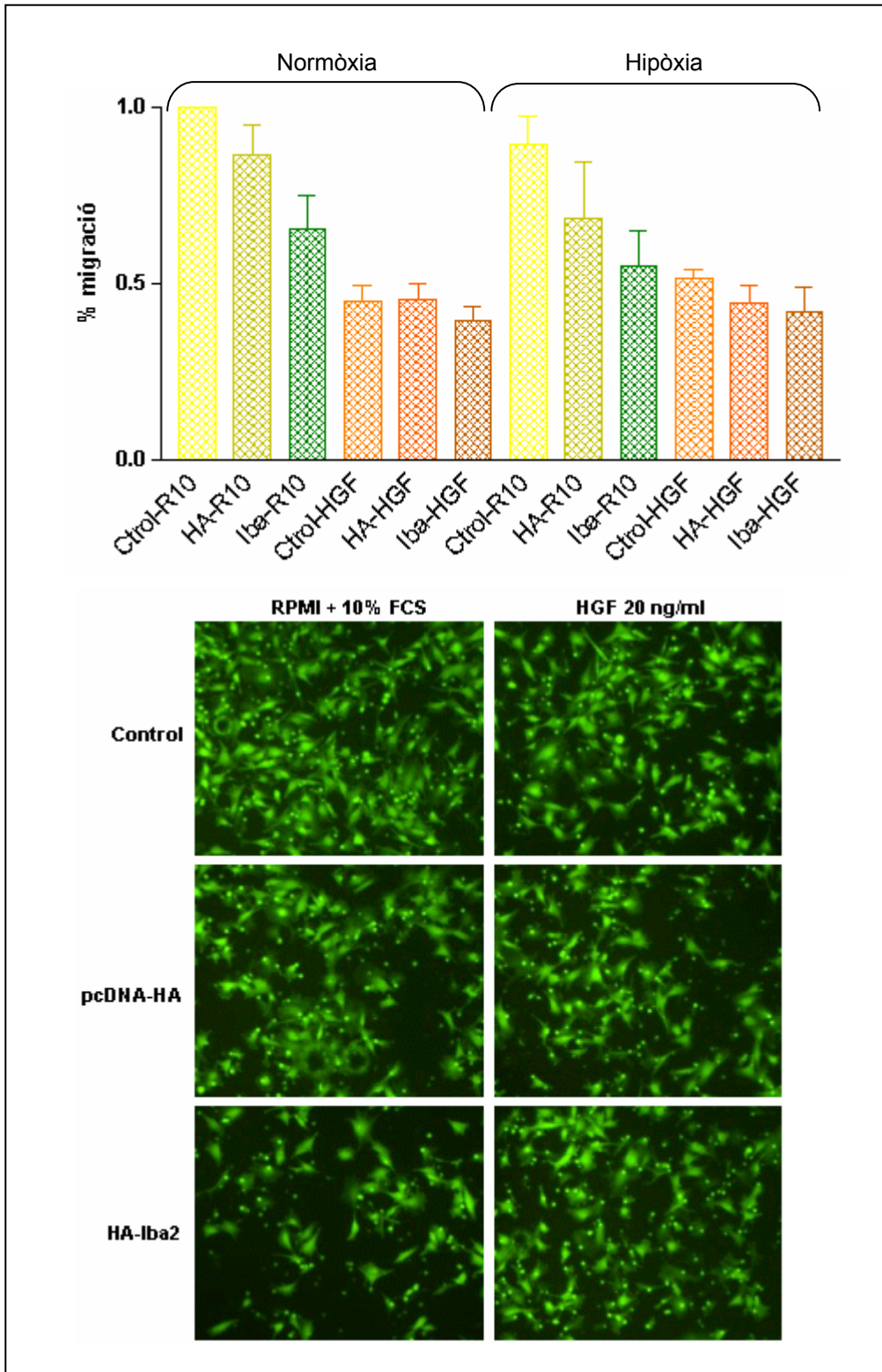


Figura 50. Migració de cèl·lules U373 MG.

Es mostren imatges representatives de cada condició (igual per a normòxia i hipòxia).

Ctrl: Cèl·lules tractades amb el protocol de transfecció.

HA: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA.

Iba: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

R10: Incubació amb RPMI + 10% FCS.

HGF: Incubació amb HGF 20 ng/ml.

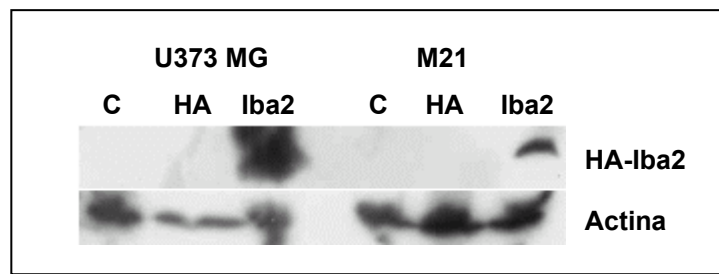


Figura 51. Western Blot.

Comprovació de l'expressió proteica d'HA-Iba2 en cèl·lules U373 MG i M21 establiment transfectades amb pcDNA-HA i pcDNA-HA-Iba2.

C: Control (cèl·lules no transfectades).

HA: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA.

Iba2: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

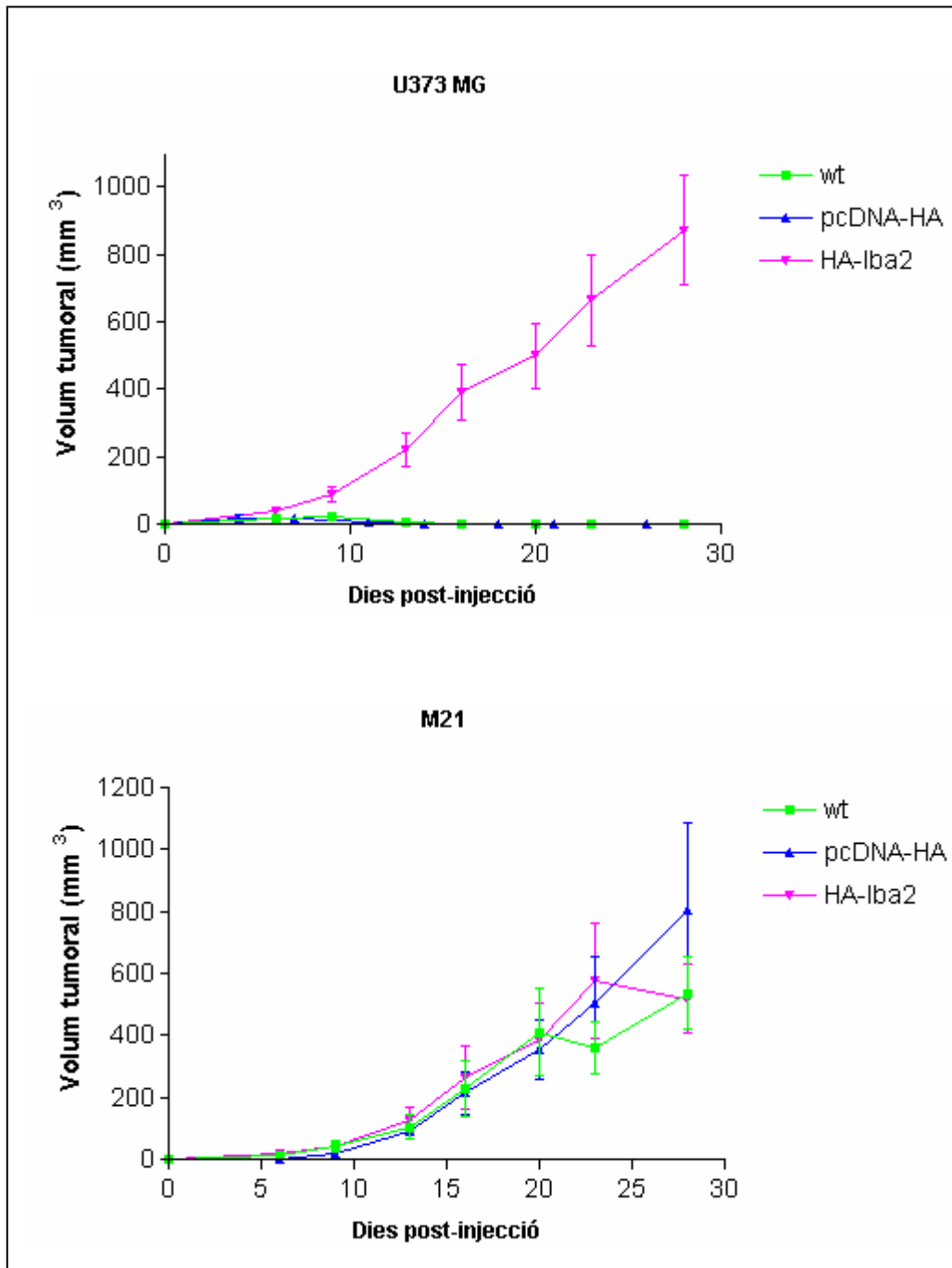


Figura 52. Creixement tumoral *in vivo* de cèl·lules U373 MG i M21.

Increment del volum tumoral en funció del temps.

wt: Cèl·lules no transfectades.

pcDNA-HA: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA.

HA-Iba2: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

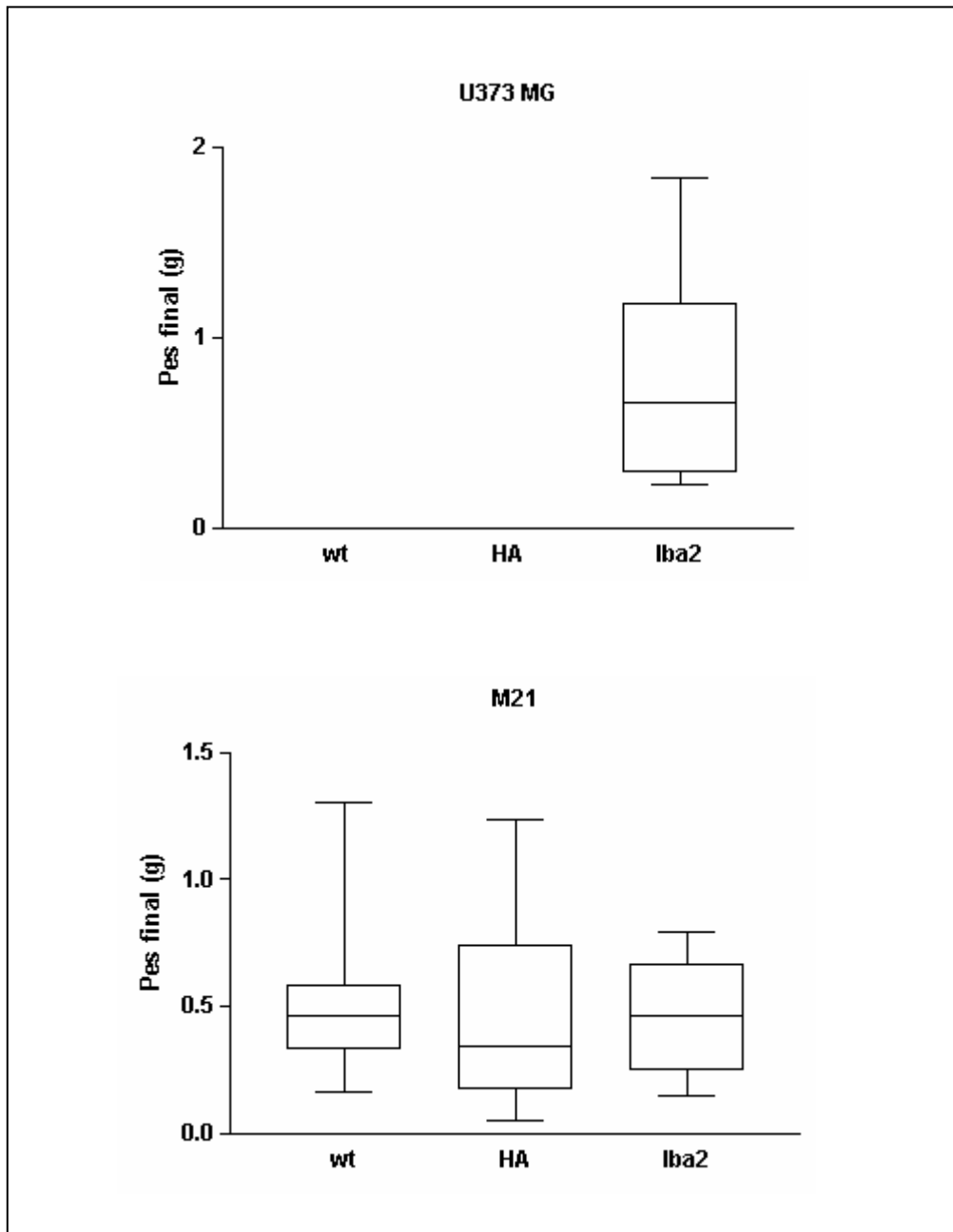


Figura 53. Creixement tumoral *in vivo* de cèl·lules U373 MG i M21.

Pes tumoral al final de l'experiment.

wt: cèl·lules no transfectades.

HA: cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA.

Iba2: cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

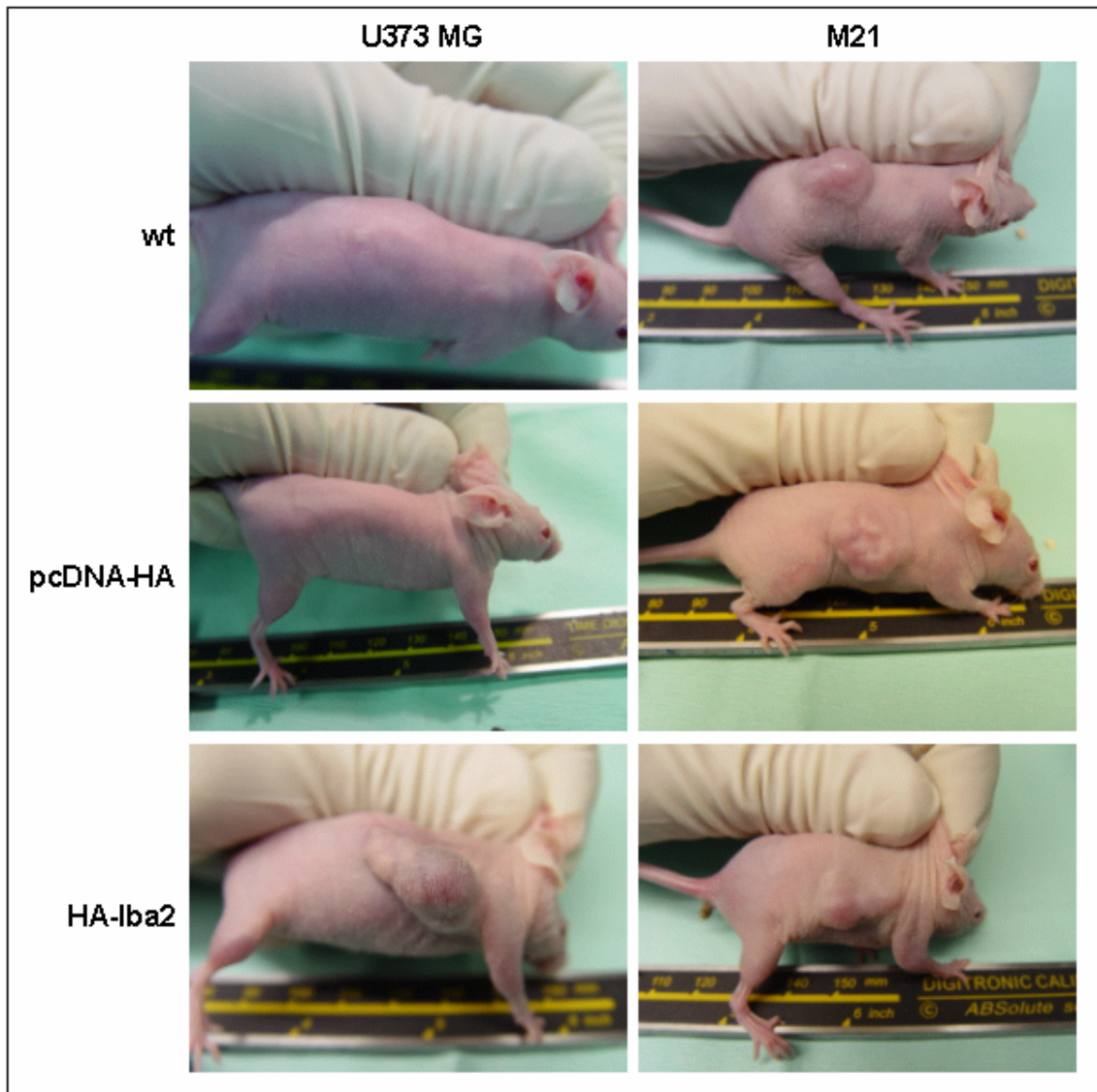


Figura 54. Creixement tumoral *in vivo* de cèl·lules U373 MG i M21.

Imatge representativa de cada grup d'animals.

wt: Cèl·lules no transfectades.

pcDNA-HA: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA.

HA-Iba2: Cèl·lules transfectades amb pcDNA-HA-Iba2.

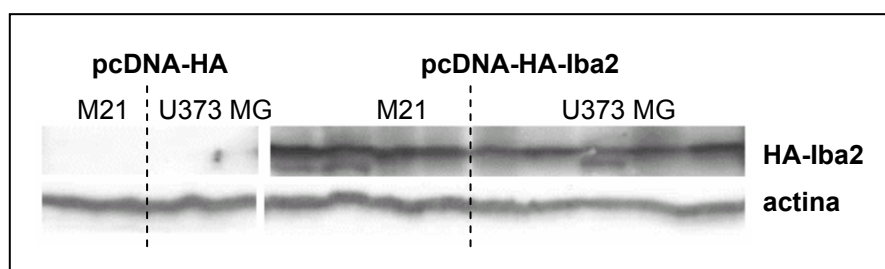


Figura 55. Western Blot.

Expressió d'HA-Iba2 en tumors de cèl·lules U373 MG i M21.

pcDNA-HA: Cèl·lules transfectades amb vector pcDNA-HA

pcDNA-HA-Iba2: Cèl·lules transfectades amb vector pcDNA-HA-Iba2

Apèndix 3. Entrada a Swiss-prot de les proteïnes identificades.

Es mostra la seqüència proteica i de cDNA, i en aquesta darrera s'assenyala la localització dels encebadors utilitzats per a les reaccions de PCR.

Protein disulfide isomerase A6 precursor (P5).

Entry information		
Entry name	PDIA6_HUMAN	
Primary accession number	Q15084	
Secondary accession number	Q99778	
Entered in Swiss-Prot in	Release 35, November 1997	
Sequence was last modified in	Release 35, November 1997	
Annotations were last modified in	Release 49, January 2006	
Name and origin of the protein		
Protein name	Protein disulfide-isomerase A6 [Precursor]	
Synonyms	EC 5.3.4.1 Protein disulfide isomerase P5 Thioredoxin domain-containing protein 7	
Gene name	Name: PDIA6 Synonyms: TXNDC7	
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]	
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
Comments		
<ul style="list-style-type: none"> • CATALYTIC ACTIVITY: Catalyzes the rearrangement of -S-S- bonds in proteins. • SUBCELLULAR LOCATION: Endoplasmic reticulum lumen (<i>By similarity</i>). • SIMILARITY: Belongs to the protein disulfide isomerase family. • SIMILARITY: Contains 2 thioredoxin domains. 		
Sequence information		
Length: 440 AA [This is the length of the unprocessed precursor]	Molecular weight: 48121 Da [This is the MW of the unprocessed precursor]	CRC64: 06895409F0265D7C [This is a checksum on the sequence]
<pre> 10 20 30 40 50 60 MALLVLGLVS CTFFLAVNGL YSSSDDVIEL TPSNFNREVI QSDSLWLVEF YAPWCGHCQR 70 80 90 100 110 120 LTPWKKAAT ALKDVVKVGA VDADKHHSLG GQYGVQGFPT IKIFGSKNR PEDYQGGRTG 130 140 150 160 170 180 EAIVDAALSA LRQLVKDRLG GRGGYSSGK QGRSDSSSKK DVIELTDDSF DKNVLDSEDV 190 200 210 220 230 240 WMVEFYAPWC GHCKNLEPEW AAAASEVKEQ TKGKVKLAAV DATVNQVLAS RYGIRGFPTI 250 260 270 280 290 300 KIFQKGESPV DYDGRTRSD IVSRALDLFS DNAPPELLE IINEDIKRT CEEHQLCVVA 310 320 330 340 350 360 VLPHILDTGA AGRNSYLEVL LKLADKYKKK MWGWLWTEAG AQSELETALG IGGFGYPAMA 370 380 390 400 410 420 AINARKMKFA LLKGSFSEQG INEFLRELSF GRGSTAPVGG GAFPTIVERE PWDGRDGELP 430 440 VEDDIDLSDV ELDDLKDEL </pre>		
		Q15084 in FASTA format

Sequence 1323 BP; 342 A; 264 C; 387 G; 330 T; 0 other; 738784218 CRC32;

```

atggctctcc tgggtgctcgg tctggtgagc tgtaccttct ttctggcagt gaatggtctg      60
tattcctcta gtgatgatgt gatcgaatta actccatcaa attcaaccg agaagttatt      120
cagagtgata gtttgtggct tgtagaattc tatgctccat ggtgtggtca ctgtcaaaga      180
ttaacaccag aatggaagaa agcagcaact gcattaaaag atgttgtcaa agttggtgca      240
gttgatgcag ataagcatca ttccctagga ggtcagtatg gtgttcaggg atttcttacc      300
attaagatth ttggatccaa caaaaacaga ccagaagatt accaagggtg cagaactggt      360
gaagccattg tagatgctgc gctgagtgct ctgcccagc tcgtgaagga tgcctcggg      420
ggacggagcg gaggatacag ttctggaaaa caaggcagaa gtgatagttc aagtaagaag      480
gatgtgattg agctgacaga cgacagcttt gataagaatg ttctggacag tgaagatgtt      540
tggatggttg agttctatgc tccttgggtg ggacactgca aaaacctaga gccagagtgg      600
gctgccgcag cttcagaagt aaaagagcag acgaaaggaa aagtgaact ggcagctgtg      660
gatgctacag tcaatcaggt tctggcctcc cgatacggga ttagaggatt tcctacaatc      720
aagatatttc agaaaggcga gtctcctgtg gattatgacg gtggcggac aagatccgac      780
atogtgtccc gggcccttga tttgttttct gataacgccc cacctcctga gctgcttgag      840
attatcaacg aggacattgc caagaggacg tgtgaggagc accagctctg tgttgtggct      900
gtgctgcccc atatccttga tactggagct gcaggcagaa attcttatct ggaagtctt      960
ctgaagtggc cagacaaaata caaaaagaaa atgtgggggt ggctgtggac agaagctgga      1020
gcccagttctg aacttgagac cgcttggggg attggagggt ttgggtaccc cgccatggcc      1080
gcatcaatg  cacgcaagat gaaatttgct ctgctaaaag gctcctcag tgagcaaggc      1140
atcaacgagt ttctcagggg gctctctttt gggcgtggct ccacggcacc tgtaggaggc      1200
ggggctttcc ctaccatcgt tgagagagag ccttgggacg gcagggatgg cgagcttccc      1260
gtggaggatg acattgacct cagtgatgtg gagcttgatg acttagggaa agatgagttg      1320
tga
    
```

Proteasome subunit α type I (C2).

Entry information									
Entry name	PSA1_HUMAN								
Primary accession number	P25786								
Secondary accession number	Q9BRV9								
Entered in Swiss-Prot in	Release 22, May 1992								
Sequence was last modified in	Release 22, May 1992								
Annotations were last modified in	Release 49, January 2006								
Name and origin of the protein									
Protein name	Proteasome subunit alpha type 1								
Synonyms	EC 3.4.25.1 Proteasome component C2 Macropain subunit C2 Multicatalytic endopeptidase complex subunit C2 Proteasome nu chain 30 kDa prosomal protein PROS-30								
Gene name	Name: PSMA1 Synonyms: PROS30, PSC2								
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]								
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.								
Comments									
<ul style="list-style-type: none"> FUNCTION: The proteasome is a multicatalytic proteinase complex which is characterized by its ability to cleave peptides with Arg, Phe, Tyr, Leu, and Glu adjacent to the leaving group at neutral or slightly basic pH. The proteasome has an ATP-dependent proteolytic activity. CATALYTIC ACTIVITY: Cleavage of peptide bonds with very broad specificity. PATHWAY: Involved in an ATP/ubiquitin-dependent non-lysosomal proteolytic pathway. SUBUNIT: The proteasome is composed of at least 15 non identical subunits which form a highly ordered ring-shaped structure. SUBCELLULAR LOCATION: Cytoplasmic and nuclear. ALTERNATIVE PRODUCTS: <ul style="list-style-type: none"> Display all isoform sequences in FASTA format Alternative splicing [2 named forms] <table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Short</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Isoform ID P25786-1</td> <td>This is the isoform sequence displayed in this entry.</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Long</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Isoform ID P25786-2</td> <td>Features which should be applied to build the isoform sequence: VSP_005279.</td> </tr> </tbody> </table> SIMILARITY: Belongs to the peptidase T1A family [view classification]. 		Name	Short	Isoform ID P25786-1	This is the isoform sequence displayed in this entry .	Name	Long	Isoform ID P25786-2	Features which should be applied to build the isoform sequence: VSP_005279.
Name	Short								
Isoform ID P25786-1	This is the isoform sequence displayed in this entry .								
Name	Long								
Isoform ID P25786-2	Features which should be applied to build the isoform sequence: VSP_005279.								
Sequence information									
Length: 263 AA	Molecular weight: 29556 Da	CRC64: 3F159C5BCEFE8DED [This is a checksum on the sequence]							
<pre> 10 20 30 40 50 60 MFRNQYDNDV TVWSPQGRIH QIEYAMEAVK QGSATVGLKS KTHAVLVALK RAQSELAHQ 70 80 90 100 110 120 KKILHVDNHI GISIAGLTAD ARLLCNFMRQ ECLDSRFVFD RPLPVSRLVS LIGSKTQIPT 130 140 150 160 170 180 QRYGRRPYGV GLLIAGYDDM GPHIFQTCPS ANYFDCRAMS IGARSQSART YLERHMSEFM 190 200 210 220 230 240 ECNLNELVKH GLRALRETLF AEQDLTKNV SIGIVGKDL EFTIYDDDDVS PFLEGLEERP 250 260 QRKAQPAQPA DEPAEKAD E P MEH </pre>		P25786 in FASTA format							

Sequence 810 BP; 234 A; 163 C; 185 G; 228 T; 0 other; 1943058577 CRC32;

atgcagctca	gcaaggtgaa	gtttcgaaat	cagtatgaca	atgatgtcac	tgtttggacc	60
gcccagggca	ggattcatca	aattgaatat	gcaatggaag	ctgttaaaca	aggttcagcc	120
acagttggtc	tgaaatcaaa	aactcatgca	gttttggttg	cattgaaaag	ggcgcaatca	180
<u>gagcttgcag</u>	ctcatcagaa	aaaaattctc	catgttgaca	accatattgg	tatctcaatt	240
goggggctta	ctgctgatgc	tagactgtta	tgtaatttta	tgcgtcagga	gtgtttggat	300
tccagatttg	tattogatag	accactgcct	gtgtctogtc	ttgtatctct	aattggaagc	360
aagaccocaga	taccaacaca	acgatatggc	oggagaccat	atggtgttgg	tctccttatt	420
gctggttatg	atgatatggg	ccctcacatt	ttccaaacct	gtccatctgc	taactatttt	480
gactgcagag	ccatgtocat	tggagccogt	tccaatcag	ctcgtactta	cttggagaga	540
catatgtctg	aatttatgga	gigttaattta	aatgaactag	ttaaacaatgg	tctgcgtgcc	600
ttaagagaga	cgcttcctgc	agaacaggac	ctgactacaa	agaatgtttc	cattggaatt	660
gttggtaaag	acttggagtt	tacaatctat	gatgatgatg	atgtgtctcc	attcctggaa	720
gtcttgaag	aaagaccaca	gagaaaggca	cagcctgctc	aacctgctga	tgaacctgca	780
gaaaaggctg	atgaaccaat	ggaacattaa				810

α -Enolase/MBP-1

Entry information	
Entry name	ENOA_HUMAN
Primary accession number	P06733
Secondary accession numbers	P22712 Q16704 Q658M5 Q6GMP2 Q71V37 Q7Z3V6 Q8WU71 Q9UM55
Entered in Swiss-Prot in	Release 06, January 1988
Sequence was last modified in	Release 07, April 1988
Annotations were last modified in	Release 49, January 2006
Name and origin of the protein	
Protein name	Alpha-enolase
Synonyms	EC 4.2.1.11 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase Non-neural enolase NNE Enolase 1 Phosphopyruvate hydratase C-myc promoter-binding protein MBP-1 MPB-1 Plasminogen-binding protein
Gene name	Name: ENO1 Synonyms: ENO1L1, MBPB1, MPB1
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
Comments	
<ul style="list-style-type: none"> • FUNCTION: Multifunctional enzyme that, as well as its role in glycolysis, plays a part in various processes such as growth control, hypoxia tolerance and allergic responses. May also function in the intravascular and pericellular fibrinolytic system due to its ability to serve as a receptor and activator of plasminogen on the cell surface of several cell-types such as leukocytes and neurons. • FUNCTION: MBP1 binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor. May be a tumor suppressor. • CATALYTIC ACTIVITY: 2-phospho-D-glycerate = phosphoenolpyruvate + H₂O. • COFACTOR: Magnesium. Required for catalysis and for stabilizing the dimer. • PATHWAY: Glycolysis. • SUBUNIT: Mammalian enolase is composed of 3 isozyme subunits, alpha, beta and gamma, which can form homodimers or heterodimers which are cell-type and development-specific. ENO1 interacts with PLG in the neuronal plasma membrane and promotes its activation. The C-terminal lysine is required for this binding (<i>By similarity</i>). • SUBCELLULAR LOCATION: Cytoplasmic. Can translocate to the plasma membrane in either the homodimeric (alpha/alpha) or heterodimeric (alpha/gamma) form. ENO1 is localized to the M-band. The MBP1 isoform is nuclear. • ALTERNATIVE PRODUCTS: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Alternative initiation <i>Comment:</i> 2 isoforms, alpha-enolase (shown here) and MBP-1, are produced by alternative initiation. It is uncertain whether the initiation site for MBP1 is at Met-93 or Met-96. • TISSUE SPECIFICITY: The alpha/alpha homodimer is expressed in embryo and in most adult tissues. The alpha/beta heterodimer and the beta/beta homodimer are found in striated muscle, and the alpha/gamma heterodimer and the gamma/gamma homodimer in neurons. • DEVELOPMENTAL STAGE: During ontogenesis, there is a transition from the alpha/alpha homodimer to the alpha/beta heterodimer in striated muscle cells, and to the alpha/gamma heterodimer in nerve cells. • INDUCTION: Induced in diffuse large cell lymphoma (DLCL) after treatment with the natural biological agent, Bryo1. • DISEASE: ENO1 is identified as an autoantigen in Hashimoto's encephalopathy (HE) a rare autoimmune disease associated with Hashimoto's thyroiditis (HT) [MIM:140300]. HT is a disorder in which destructive processes overcome the potential capacity of thyroid replacement leading to hypothyroidism. • DISEASE: Antibodies against alpha-enolase are present in sera from patients with cancer-associated retinopathy syndrome (CAR), a progressive blinding disease which occurs in the presence of systemic tumor growth, primarily small-cell carcinoma of the lung and other malignancies. • MISCELLANEOUS: Used as a diagnostic marker for many tumors and, in the heterodimeric form, alpha/gamma, as a marker for hypoxic brain injury after cardiac arrest. Also marker for endometriosis. • SIMILARITY: Belongs to the <i>enolase family</i>. • CAUTION: Ref.3 sequence differs from that shown due to frameshifts. 	

Sequence information						
Length: 433 AA		Molecular weight: 47038 Da		CRC64: B2029684C33140B5 [This is a checksum on the sequence]		
10	20	30	40	50	60	
SILKIHAREI	FDSRGNPTVE	VDLFTSKGLF	RAAVPSGAST	GIYEALELRD	NDKTRYMGKG	
70	80	90	100	110	120	
VSKAVEHINK	TIAPALVSKK	LVNTEQEKID	KLMIEMDGTG	NKSKEGANAI	LGVSLAVCKA	
130	140	150	160	170	180	
GAVEKGVPLY	RHIADLAGNS	EVILPVPAPN	VINGGSHAGN	KLAMQEFMIL	PVGAANFREA	
190	200	210	220	230	240	
MRIGAEVYHN	LKNVIKEKYG	KDATNVGDEG	GFAPNILENK	EGLELLKTAI	GKAGYTDKVV	
250	260	270	280	290	300	
IGMDVAASEF	FRSGKYDLDF	KSPDDPSRYI	SPDQLADLYK	SFIKDYPVVS	IEDPFDQDDW	
310	320	330	340	350	360	
GAWQKFTASA	GIQVVGDDLT	VTNPKRIAKA	VNEKSCNCLL	LKVNQIGSVT	ESLQACKLAQ	
370	380	390	400	410	420	
ANGWGMVSH	RSGETEDTFI	ADLVVGLCTG	QIKTGAPCRS	ERLAKYNQLL	RIEBELGSKA	
430						
KFAGRNERNP	LAK					

P06733 in FASTA format

Sequence 1305 BP; 324 A; 325 C; 370 G; 286 T; 0 other; 1855230484 CRC32;

```

atgtctattc tcaagatcca tgccagggag atctttgact ctgcgggaa tcccactgtt 60
gaggttgatc tcttcacctc aaaaggtctc ttcagagctg ctgtgccag tgggtgttca 120
actggtatct atgaggccct agagctccgg gacaaatgata agactcgcta tatggggaag 180
ggtgtctcaa aggcgtgttg gcacatcaat aaaactattg cgcctgccct ggttagcaag 240
aaactgaacg tcacagaaca agagaagatt gacaaaactga tgatcgagat ggatggaaca 300
gaaaataaat ctaagtttgg tgcgaacgcc attctggggg tgtcccttgc cgtctgcaaa 360
gctggtgccc ttgagaaggg ggtccccctg taccgccaca tcgctgactt ggctggcaac 420
tctgaagtca tcoctgccag cccggcgttc aatgtcatca atggcgttc tcatgctggc 480
aacaagctgg ccattgcagga gttcatgata ctcccagtcg gtgcagcaaa cttcagggaa 540
gccatgcgca ttggagcaga ggtttaccac aacctgaaga atgtcatcaa ggagaaatat 600
gggaaagatg ccaccaatgt gggggatgaa ggogggtttg ctccaacat cctgggagaat 660
aaagaaggcc tggagctgct gaagactgct attgggaaag ctggctacac tgataagggtg 720
gtcatcggca tggacgtagc ggccctccag tcttccaggt ctgggaagta tgacctggac 780
ttcaagtctc ccgatgaccc cagcaggtac atctcgctg accagctggc tgacctgtac 840
aagtcttca tcaaggacta cccagtggtg tctatcgaag atcccttga ccaggatgac 900
tggggagctt ggcagaagt caccagccagt gcaggaatcc aggtagtggg ggatgatctc 960
acagtgacca acccaaagag gatcgccaag gccgtgaacg agaagtcctg caactgcctc 1020
ctgctcaaag tcaaccagat tggctccgtg accagctctc ttcaggcgtg caagctggcc 1080
caggccaatg gttggggcgt catggtgtct catcgttcgg gggagactga agataccttc 1140
atcgtgacc tggttgtggg gctgtgcact gggcagatca agactggtgc cccttgccga 1200
tctgagcgtc tggccaagta caaccagctc ctcagaattg aagaggagct gggcagcaag 1260
ctaagtttg ccggcagga cttcagaaac ccttggcca agtaa 1305

```

Ionized calcium binding adapter molecule 2 (Iba2).

Entry information	
Entry name	Q9H9G0_HUMAN
Primary accession number	Q9H9G0
Secondary accession numbers	None
Entered in TrEMBL in	Release 16, March 2001
Sequence was last modified in	Release 16, March 2001
Annotations were last modified in	Release 25, October 2003
Name and origin of the protein	
Protein name	Hypothetical protein FLJ12783
Synonyms	None
Gene name	None
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
Sequence information	
Length: 150 AA	Molecular weight: 17034 Da
CRC64: D461443CB9D90320 [This is a checksum on the sequence]	
10	20
30	40
50	60
70	80
90	100
110	120
130	140
150	
MSGELSNRFQ GGFAPGLLKA RQERRLABIN RELLCDQKYS DEENLPEKLT AFKEKYMbfd LNNEGEIDLm SLKRMMEKLG VPkThLEMkK MISEVTGGVS DTISYRDFVN MMLGKRSAVL KLVMFEGKA NESSPKVGP PPERDIASLP	
Q9H9G0 in FASTA format	

Sequence 453 BP; 130 A; 101 C; 137 G; 85 T; 0 other; 4163736789 CRC32;

```

atgtcgggcg agctcagcaa caggttccaa ggaggggaagg cgttoggctt gctcaaagcc      60
cggcaggaga ggaggctggc cgagatcaac cgggagcttc tgtgtgacca gaagtacagt      120
gatgaagaga acctccaga aaagctcaca gccttcaaag agaagtacat ggagtttgac      180
ctgaacaatg aaggcgagat tgacctgatg tctttaaaga ggatgatgga gaagcttggt      240
gtccccaaga cccacctgga gatgaagaag atgatctcag aggtgacagg aggggtcagt      300
gacactatat cctaccgaga ctttgtgaac atgatgctgg ggaaacggtc ggctgtcctc      360
aagttagtca tgatgttga aggaaaagcc aacgagagca gcccgaagcc agttggcccc      420
cctccagaga gagacattgc tagcctgccc tga                                     453
    
```

Dynactin complex 50 kDa subunit.

Entry information																																																																																					
Entry name	DCTN2_HUMAN																																																																																				
Primary accession number	Q13561																																																																																				
Secondary accession numbers	Q86YN2 Q9BW17																																																																																				
Entered in Swiss-Prot in	Release 35, November 1997																																																																																				
Sequence was last modified in	Release 44, July 2004																																																																																				
Annotations were last modified in	Release 49, January 2006																																																																																				
Name and origin of the protein																																																																																					
Protein name	Dynactin subunit 2																																																																																				
Synonyms	Dynactin complex 50 kDa subunit 50 kDa dynein-associated polypeptide p50 dynamitin DCTN-50																																																																																				
Gene name	Name: DCTN2 Synonyms: DCTN50																																																																																				
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]																																																																																				
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.																																																																																				
Comments																																																																																					
<ul style="list-style-type: none"> FUNCTION: Modulates cytoplasmic dynein binding to an organelle, and plays a role in prometaphase chromosome alignment and spindle organization during mitosis. May play a role in synapse formation during brain development. SUBUNIT: Subunit of dynactin, a multiprotein complex associated with dynein. Interacts with BICD2 (<i>By similarity</i>). Interacts with MAPRE1. SUBCELLULAR LOCATION: Cytoplasmic and membrane-associated. 																																																																																					
Sequence information																																																																																					
Length: 400 AA	Molecular weight: 44100 Da																																																																																				
CRC64: 0A95AE95C0BB270F [This is a checksum on the sequence]																																																																																					
<table border="0"> <tr> <td>10</td><td>20</td><td>30</td><td>40</td><td>50</td><td>60</td> </tr> <tr> <td>ADPKYADLPG</td><td>IARNEPDVYE</td><td>TSDLPEDDQA</td><td>EFDAAELTST</td><td>SVEHIIVNPN</td><td>AAYDKFKDKR</td> </tr> <tr> <td>70</td><td>80</td><td>90</td><td>100</td><td>110</td><td>120</td> </tr> <tr> <td>VGTKGLDFSD</td><td>RIGTKRRTGY</td><td>ESGEYEMLGE</td><td>GLGVKETPQQ</td><td>KYQRLLEHVQ</td><td>ELTTEVEKIK</td> </tr> <tr> <td>130</td><td>140</td><td>150</td><td>160</td><td>170</td><td>180</td> </tr> <tr> <td>TTVKESATEE</td><td>KLTPVLLAKQ</td><td>LAALKQQLVA</td><td>SHLEKLLGPD</td><td>AAINLTDPDG</td><td>ALAKRLLLQL</td> </tr> <tr> <td>190</td><td>200</td><td>210</td><td>220</td><td>230</td><td>240</td> </tr> <tr> <td>EATKNSKGGG</td><td>GKKTGTTPD</td><td>SSLVTYELHS</td><td>RPEQDKFSQA</td><td>AKVAELEKRL</td><td>TELETAVRCD</td> </tr> <tr> <td>250</td><td>260</td><td>270</td><td>280</td><td>290</td><td>300</td> </tr> <tr> <td>QDAQNPLSAG</td><td>LQGACLMEV</td><td>ELLQAKVSAL</td><td>DLAVLDQVEA</td><td>RLQSVLGKVN</td><td>EIAKHKASVE</td> </tr> <tr> <td>310</td><td>320</td><td>330</td><td>340</td><td>350</td><td>360</td> </tr> <tr> <td>DADTQSKVHQ</td><td>LYETIQRWSP</td><td>IASTLPELVQ</td><td>RLVTIKQLHE</td><td>QAMQFGQLLT</td><td>HLDTTQQMIA</td> </tr> <tr> <td>370</td><td>380</td><td>390</td><td>400</td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>NSLKDNTLL</td><td>TQVQTTMREN</td><td>LATVEGNFAS</td><td>IDERMKKLKG</td><td></td><td></td> </tr> </table>		10	20	30	40	50	60	ADPKYADLPG	IARNEPDVYE	TSDLPEDDQA	EFDAAELTST	SVEHIIVNPN	AAYDKFKDKR	70	80	90	100	110	120	VGTKGLDFSD	RIGTKRRTGY	ESGEYEMLGE	GLGVKETPQQ	KYQRLLEHVQ	ELTTEVEKIK	130	140	150	160	170	180	TTVKESATEE	KLTPVLLAKQ	LAALKQQLVA	SHLEKLLGPD	AAINLTDPDG	ALAKRLLLQL	190	200	210	220	230	240	EATKNSKGGG	GKKTGTTPD	SSLVTYELHS	RPEQDKFSQA	AKVAELEKRL	TELETAVRCD	250	260	270	280	290	300	QDAQNPLSAG	LQGACLMEV	ELLQAKVSAL	DLAVLDQVEA	RLQSVLGKVN	EIAKHKASVE	310	320	330	340	350	360	DADTQSKVHQ	LYETIQRWSP	IASTLPELVQ	RLVTIKQLHE	QAMQFGQLLT	HLDTTQQMIA	370	380	390	400			NSLKDNTLL	TQVQTTMREN	LATVEGNFAS	IDERMKKLKG		
10	20	30	40	50	60																																																																																
ADPKYADLPG	IARNEPDVYE	TSDLPEDDQA	EFDAAELTST	SVEHIIVNPN	AAYDKFKDKR																																																																																
70	80	90	100	110	120																																																																																
VGTKGLDFSD	RIGTKRRTGY	ESGEYEMLGE	GLGVKETPQQ	KYQRLLEHVQ	ELTTEVEKIK																																																																																
130	140	150	160	170	180																																																																																
TTVKESATEE	KLTPVLLAKQ	LAALKQQLVA	SHLEKLLGPD	AAINLTDPDG	ALAKRLLLQL																																																																																
190	200	210	220	230	240																																																																																
EATKNSKGGG	GKKTGTTPD	SSLVTYELHS	RPEQDKFSQA	AKVAELEKRL	TELETAVRCD																																																																																
250	260	270	280	290	300																																																																																
QDAQNPLSAG	LQGACLMEV	ELLQAKVSAL	DLAVLDQVEA	RLQSVLGKVN	EIAKHKASVE																																																																																
310	320	330	340	350	360																																																																																
DADTQSKVHQ	LYETIQRWSP	IASTLPELVQ	RLVTIKQLHE	QAMQFGQLLT	HLDTTQQMIA																																																																																
370	380	390	400																																																																																		
NSLKDNTLL	TQVQTTMREN	LATVEGNFAS	IDERMKKLKG																																																																																		
Q13561 in FASTA format																																																																																					

Sequence 1221 BP: 356 A; 299 C; 334 G; 232 T; 0 other; 1877092984 CRC32;

```

atggcggacc ctaaatacgc cgacottccc ggcattgccca ggaatgagcc agatgtttat 60
gaaactagcg acctacctga ggatgatcaa gcgaggttccg atgcgtttgc acaagagctg 120
gaggagctga caagcacaag tgtggaacac atcattgtca atcctaagtc tgcctatgac 180
aagtcaagg acaagagagt ggggacaaag ggacttgatt tctcagatcg tattggaaaa 240
accaagagga caggatataa atctggagaa tatgagatgc ttggagaggg tctgggagtg 300
aaggagacac cccagcaaaa gtaccagcgc ctactgcatg aggtccaaga gctgacaact 360
gaagtggaaa aaatcaagac gacagtgaag gagtcagcca cagaggagaa gctgacccct 420
gtgttgctgg ctaaacagct ggcagccctg aagcagcagc tggttgcttc ccacctggag 480
aagctgctgg gaccagatgc tgcfaatcaac cttaocgacc ccgatggcgc cctggctaag 540
cgcctactac tgcagctgga agcaacaaag aacagcaaaag ggggatcagg gggaaaaacc 600
actgggagccc ccccagatag cagccttgtc acttatgaac tacattctcg gcctgagcag 660
gacaagttct ctcaagctgc caaagtgcga gaacttgaaa agcgcctgac agagctggag 720
acagctgtac gttgtgatca ggatgctcag aatccccctt ctgcaggtct acaggagacc 780
tgtctcatgg agactgtaga gctgttgcaa gcaaagggtga ggcgccctaga ccttgcagtt 840
ttggatcaag tggaggctcg gctacagagt gtccctgggaa aggtgaacga gattgccaaag 900
cataaagcct ctgtagaaga tgcagataca caaagcaagg tgcaccagct atatgaaact 960
atacagcct ggagcccat tgcctccacc ctccctgagc tggtgagag tgggtgcacc 1020
atcaagcagc tgcacgagca agccatgcag ttgggtcagc tccctgacaca cttggatacc 1080
accagcagca tgattgctaa ttccctggaag gacaatacca cctcttgac ccaggtgcag 1140
acaaccatgc gtgaaaacct ggccacagtt gaggggaact ttgccagcat tgatgaacgg 1200
atgaagaagc tgggaaagtg a
    
```

26s protease regulatory subunit 6A.

Entry information	
Entry name	PR66A_HUMAN
Primary accession number	P17980
Secondary accession number	Q96HD3
Entered in Swiss-Prot in	Release 16, November 1990
Sequence was last modified in	Release 41, February 2003
Annotations were last modified in	Release 49, January 2006
Name and origin of the protein	
Protein name	26S protease regulatory subunit 6A
Synonyms	TAT-binding protein 1 TBP-1 Proteasome subunit P50
Gene name	Name: PSMC3 Synonyms: TBP1
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
Comments	
<ul style="list-style-type: none"> • FUNCTION: The 26S protease is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins. The regulatory (or ATPase) complex confers ATP dependency and substrate specificity to the 26S complex (<i>By similarity</i>). • FUNCTION: Interacts with the human immunodeficiency virus tat transactivator. Specifically suppresses tat-mediated transactivation. Probably involved in ATP hydrolysis. It is possible that proteins MSS1 and TBP-1 compete with each other to regulate the interaction with the transcriptional complex with the HIV gene, thereby influencing gene expression in both directions. • SUBUNIT: May form a heterodimer with a related family member. • INTERACTION: Q9Y4K3:TRAF6; NbExp=1; IntAct=EBI-359720, EBI-359276; • SUBCELLULAR LOCATION: Cytoplasmic and nuclear (<i>Potential</i>). • SIMILARITY: Belongs to the AAA ATPase family. 	
Sequence information	
Length: 439 AA	Molecular weight: 49204 Da
CRC64: 0E443465DDDEBB0B [This is a checksum on the sequence]	
<pre> 10 20 30 40 50 60 MNLLPNIESP VTRQEKMATV WDEAEQDGIG EEVLK MSTEE IIQRTRLLDS EIKIMKSEVL 70 80 90 100 110 120 RVTHELQAMK DKIKENSEKI KVNKTLPLYLV SNVIELLDVD PNDQEEDGAN IDLDSQRK GK 130 140 150 160 170 180 CAVIKTSTRQ TYFLPVIGLV DAEKLPKPGDL VGVNKDSYLI LETLPTEYDS RVKAMEVDER 190 200 210 220 230 240 PTEQYSDIGG LDKQIQELVE AIVLPMNHKE KFENLGIQPP KGVL MYGPPG TGR TLLARAC 250 260 270 280 290 300 AAQTKATFLK LAGPQLVQMF IGDGAKLVRD AFALAKEKAP SIIFIDELDA IGTKRFDSEK 310 320 330 340 350 360 AGDREVQRTM LELLNQLDGF QPNTQVKVIA ATNRVDILDP ALLRSGRLDR KIEFEMPNEE 370 380 390 400 410 420 ARARIMQIHS RKMNVSPDVN YEELARCTDD FNGAQCKAVC VEAGMIALRR GATELTHEDY 430 MEGILEVQAK KKANLQYYA </pre>	P17980 in FASTA format

Sequence 1215 BP; 317 A; 311 C; 366 G; 221 T; 0 other; 1433203053 CRC32;

atgtccacgg	aggagatcat	ccagcgcaca	cggctgctgg	acagtgagat	caagatcatg	60
aagagtgaag	tgttgagagt	cacccatgag	ctccaagcca	tgaaggacaa	gataaaagag	120
aacagtgaga	aaatcaaagt	gaacaagacc	ctgccgtacc	ttgtctccaa	cgtcacogag	180
ctcctggatg	ttgatcctaa	tgaccaagag	gaggatgggtg	ccaatattga	cctggactcc	240
cagaggaagg	gcaagtgtgc	tgtgatcaaa	acctctacac	gacagacgta	cttccttcoct	300
gtgattgggt	tggtggatgc	tgaaaagcta	aagccaggag	acctggtggg	tgtgaacaaa	360
gactcctatc	tgatcctgga	gacgctgccc	acagagtatg	actcgcgggt	gaaggccatg	420
gaggtagacg	agaggcccac	ggagcaatac	agtgacattg	ggggtttggg	caagcagatc	480
caggagctgg	tggaggccat	tgtcttgcca	atgaaccaca	aggagaagtt	tgagaacttg	540
gggatccaac	<u>ctccaaaagg</u>	<u>ggtgctgatg</u>	tatgggcccc	cagggacggg	gaagaccctc	600
ctggccccgg	<u>cctgtgcgcg</u>	<u>acagactaag</u>	gccaccttcc	taaagctggc	tggccccag	660
ctggtgcaga	tgttcattgg	agatgggtgcc	aagctagtcc	gggatgcctt	tgccctggcc	720
aaggagaaaag	cgccctctat	catcttcatt	gatgagttgg	atgccatcgg	caccaagcgc	780
tttgacagtg	agaaggctgg	ggaccgggag	gtgcagagga	caatgctgga	gcttctgaac	840
cagctggatg	gcttccagcc	caacacccaa	gttaaggtaa	ttgcagccac	aaacagggtg	900
gacatcctgg	accccgccct	cctccgctcg	ggccgccttg	accgcaagat	agagttcccg	960
atgcccattg	aggaggcccg	ggccagaatc	atgcagatcc	actcccgaaa	gatgaatgtc	1020
agtcctgacg	tgaactacga	ggagctggcc	cgctgcacag	atgactcaa	tggggcccag	1080
tgcaaggctg	tgtgtgtgga	ggcgggcatg	atcgcactgg	ccaggggtgc	cacggagctc	1140
acccacgagg	actacatgga	aggcatcctg	gaggtgcagg	<u>ccaagaagaa</u>	<u>agccaaccta</u>	1200
<u>caatactacg</u>	<u>cctag</u>					1215