

TESIS DOCTORALES

Caracterización de los receptores del activador tisular del plasminógeno (tPA) en cáncer de páncreas

Oriol Roda Noguera

Universidad Pompeu Fabra

Directores: David Andreu (Universidad Pompeu Fabra), Pilar Navarro (Instituto Municipal de Investigación Médica), Barcelona. Universidad Pompeu Fabra, Mayo 2006

El activador tisular del plasminógeno (tPA) es una serín-proteasa componente del sistema plasminógeno-plasmina, responsable de la eliminación de coágulos de fibrina en la sangre. También participa en procesos de migración y remodelación celular, degradando la matriz extracelular. Finalmente, el sistema está implicado en procesos tumorales, especialmente de invasión y metástasis.

Estudios previos han descrito la sobreexpresión de tPA en cáncer de páncreas. Aunque el tPA es una proteína esencialmente soluble, presente en el plasma y el medio extracelular, puede también unirse a la membrana celular a través de ciertos receptores. Éstos aumentan la capacidad catalítica del tPA y la consiguiente producción de plasmina, pero también pueden facilitar otras funciones independientes de aquélla.

En esta tesis nos hemos planteado identificar y caracterizar receptores del tPA que faciliten su acción en la progresión tumoral en cáncer de páncreas. La tesis se divide en los siguientes capítulos.

1. New insights into tPA/Annexin A2 interaction (Roda et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278, 5702-5709).

La anexina A2 (AnxA2), descrita como receptor de tPA en células endoteliales, está también sobreexpresada en células tumorales, lo cual sugiere una posible implicación como receptor de tPA en dicho sistema. Se ha descrito que los residuos 7-12 de AnxA2 (LCKLSL) constituyen una zona de unión

a tPA, en base al efecto inhibidor de un péptido con dicha secuencia sobre la interacción tPA/AnxA2.

En base a dichos datos se diseñó una “peptidoteca” con diversas modificaciones sobre la secuencia LCKLSL consenso, con vistas a una mejor caracterización de la citada interacción tPA/AnxA2 y en especial del papel de los diferentes residuos. Sorprendentemente, el estudio del efecto inhibidor de los diferentes péptidos indicó como único requisito la presencia de una Cys (o también Hcy) en la secuencia. El mecanismo de inhibición se investigó por espectrometría de masas. Los resultados indicaron que la presencia de un grupo tiol en la secuencia del péptido comportaba la unión de éste a la Cys8 de AnxA2, mediante un enlace disulfuro, con lo que el lugar de interacción con tPA quedaba bloqueado. Este resultado confirmaba la importancia de la región N-terminal de AnxA2, en especial de Cys8, para la interacción, pero a la vez ponía en entredicho que el motivo LCKLSL fuera el determinante específico de la interacción tPA/AnxA2.

2. A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells (Roda et al. 2006. *Proteomics* S6: 36-41).

Experimentos realizados en nuestro laboratorio, junto con otros trabajos, sugerían que AnxA2 no es el único receptor de tPA en páncreas. Además, se ha descrito un papel mitogénico de tPA independiente de plasminógeno, sólo explicable en parte por la interacción con AnxA2. Todo ello hacía especialmente relevante la búsqueda de nuevos receptores de tPA

en páncreas, a fin de localizar otras posibles dianas terapéuticas, a ser posible más específicas de páncreas, e identificar el correspondiente mecanismo de señalización.

Para ello se desarrolló un método de captura por afinidad (“*pull-down*”) de proteínas capaces de unirse a tPA-Sefarosa, con posterior análisis proteómico de las mismas por electroforesis bidimensional y análisis de huella peptídica por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las muestras analizadas fueron, por una parte, lisados totales de la línea tumoral pancreática PANC-1, así como una fracción purificada de dominios “*raft*”, ricos en colesterol, en los que se ha ya descrito la presencia de AnxA2. Los resultados se compararon con los obtenidos en un experimento paralelo con células HUVEC, a fin de filtrar únicamente las proteínas específicas de células pancreáticas.

Se identificaron un total de 31 proteínas capaces de unirse a tPA en células tumorales pancreáticas. De ellas se seleccionaron las que, de acuerdo con datos bibliográficos, tenían mayores posibilidades de ser receptores de tPA. Los resultados se validaron por “*western blot*”, para proteínas ya descritas como receptores de tPA en otros tipos celulares (alfa-enolasa, AnxA2, citoqueratinas 8 y 18), o para otras proteínas con posibilidades de serlo (cortactina y galectina 1).

3. Identification of a new tissue-plasminogen activator receptor: galectin-1 mediates tPA functions in pancreatic cancer

Dada su localización en membrana y algunas otras características, la galectina 1 (gal 1), una de las proteínas identificadas en el anterior estudio proteómico, aparecía como un candidato plausible a receptor del tPA. Con todo, su expresión en cáncer de páncreas se ha relacionado siempre con el estroma circundante a la masa tumoral y no con el tumor en sí. En el tercer capítulo de la tesis hemos llevado a

cabo la caracterización bioquímica de la interacción tPA/gal 1, así como la determinación de la expresión de gal1 en células tumorales pancreáticas. Finalmente, hemos llevado a cabo algunos experimentos para determinar la relevancia biológica de dicha interacción.

En primer lugar se analizó por “*western blot*” a expresión de gal 1 en una batería de líneas celulares originarias de tumores pancreáticos, así como una línea de fibroblastos procedentes de un cáncer de pulmón. Ello permitió demostrar la expresión de gal1 en la mayoría de dichas líneas. También se verificó la interacción gal 1/tPA en algunas de ellas mediante un ensayo “*pull down*”.

En segundo lugar, se efectuó un estudio *in vitro* de la interacción, tanto mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore) como por “*pull-down*” con la proteína recombinante. Los resultados se compararon con los obtenidos con AnxA2 y galectina 3 (otra lectina descrita como sobre-expresada en cáncer pancreático) y permitieron concluir que la gal 1 interacciona directamente con tPA, con una afinidad comparable a la de AnxA2 y notablemente superior a la de gal 3.

Se realizaron también estudios de inmunofluorescencia en experimentos de curación de herida en cultivos celulares a fin de determinar la localización de gal 1 y su eventual colocalización con tPA. Los resultados indicaron que gal 1 se expresa esencialmente en el frente de cierre de la herida, lo cual sugiere un posible papel en los procesos de invasión y progresión tumoral. Además, colocaliza con tPA, lo cual añade plausibilidad a la hipótesis de gal 1 como receptor de tPA.

Finalmente, se estudió la activación de la MAP quinasa Erk1/2 inducida por tPA sobre células tratadas con siRNA supresor de gal 1, así como una línea de fibroblastos embrionarios de un ratón “*knock out*” deficiente en gal 1. Los resultados demostraron que la inducción de fosforilación de Erk1/2 por parte de tPA se ve inhibida en las células deficientes en gal 1, lo cual corrobora la implicación de gal 1 en la señalización mitogénica de tPA.