

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA

**Expressió diferencial determinant del fenotip
metastàtic en un model d'adenocarcinoma de pulmó
humà**

Mireia Martín Satué

Barcelona 2000

CAPÍTOL III

Expressió de les metal·loproteases de matriu i la regulació de la seva activitat a cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó humà

Un cop establerts els mecanismes d'adhesió a l'endoteli de les cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó (capítols I i II), en el present capítol (en procés de publicació) analitzem la capacitat d'aquestes cèl·lules de degradar la matriu extracel·lular i, per tant, la capacitat de completar la seva migració a través de l'endoteli vascular i la corresponent làmina basal en el procés metastàtic.

Hem analitzat l'expressió i activitat de les principals metal·loproteases responsables d'aquesta degradació (MMP-2, MMP-3 i MMP-9) i dels seus inhibidors (TIMP-1 i TIMP-2), així com la seva regulació en les següents condicions experimentals: *i*) en presència de l'èster de forbol PMA, de l'organomercurial APMA o dels inhibidors EDTA, fenantrolina o captopril; *ii*) en presència d'anticossos contra les cadenes de les integrines beta-1, beta-2, beta-3, beta-5 o alfa-v; *iii*) en presència de diferents components de la matriu extracel·lular (laminina, fibronectina o vitronectina).

Igualment, hem establert un model *in vitro* que permet desglossar el procés de la migració transendotelial de les cèl·lules HAL-8Luc en les seves diferents etapes.

MATERIALS I MÈTODES

Cultiu cel·lular

Les cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó humà HAL-8Luc (metastàtiques) i HAL-24Luc (no metastàtiques) han estat mantingudes en medi RPMI1640 suplementat amb sèrum boví fetal al 10% (v/v), 2mM L-glutamina i 300 µg/ml geneticina en una atmosfera humida de 5% CO₂ a 37°C.

Les cèl·lules endotelials HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) varen ser aïllades per digestió amb col·lagenasa de múltiples segments de cordons umbilicals de nadons nascuts a terme segons el procediment prèviament descrit (Lopez *et al.*, 1993). Aquestes cèl·lules han estat mantingudes en medi 199 suplementat amb sèrum boví fetal al 20% (v/v), 2 mM L-glutamina, 20 mM HEPES, 1 mM piruvat sòdic, 100 u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 100 µg/ml heparina i 30 µg/ml factor de creixement endotelial, en flascons de cultiu prèviament tractats amb 1% (v/v) gelatina durant 2 h a 37°C o, alternativament, amb 10 µg/ml fibronectina. A tots els experiments, les cèl·lules endotelials varen ser utilitzades en els tres primers passis.

Regulació de l'expressió i activitat de metal·loproteases per èster de forbol. Les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc crescudes a un 90-95% de confluència varen ser rentades tres vegades amb medi RPMI1640 lliure de sèrum i incubades a diferents temps (0, 2, 6 i 24 hores) amb 16 nM PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) en medi lliure de sèrum. Es van recollir els sobrenedants als temps preestablerts per estudiar l'expressió de les diferents metal·loproteases mitjançant Western blot així com la seva activitat mitjançant zimografia en gelatina. Les cèl·lules van ser lisades directament en el tampó de lisi emprat en l'extracció d'RNA total (Ultraspec RNA, Biotecx) per l'estudi de l'expressió gènica mitjançant Northern blot.

Regulació de l'expressió i activitat de metal·loproteases per la matriu extracel·lular. Les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc varen ser desenganxades del flascó de cultiu amb 1 mM EDTA en 0.1 M PBS, rentades amb medi RPMI1640 lliure de sèrum, resuspeses en aquest medi suplementat amb diferents components de la matriu extracel·lular a 50 µg/ml (fibronectina, laminina, vitronectina o gelatina) i afegides als flascons de cultiu, on es van incubar durant 24 hores. Alternativament, les cèl·lules varen ser incorporades amb medi lliure de sèrum a flascons de cultiu prèviament tractats durant 2 h a 37°C amb les proteïnes abans esmentades i a la mateixa concentració (50 µg/ml). Al cap de 24 hores es van recollir els sobrenedants per analitzar l'expressió de metal·loproteases mitjançant Western blot així com la seva activitat mitjançant zimografia en gelatina. Les cèl·lules van ser llisades per obtenir RNA.

Regulació de l'activitat gelatinolítica per integrines. Les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc desenganxades dels flascons amb 1 mM EDTA en 0.1 M PBS varen ser rentades amb medi lliure de sèrum i resuspeses en aquest mateix medi al qual se li van afegir 20 µg/ml dels següents anticossos: anti-beta-1, anti-beta-2, anti-beta-3, anti-beta-5, anti-alfa-v o els seus corresponents controls isotípics com a controls negatius. Els sobrenedants varen ser recollits a les 24 hores per analitzar l'activitat gelatinolítica mitjançant zimografia en gelatina.

Els sobrenedants varen ser concentrats, en cas necessari, per ultrafiltració mitjançant membranes anisotròpiques (Centricon, Millipore) amb límit d'exclusió de 10 o 30 kDa.

Zimografia en gelatina

Les activitats gelatinolítiques dels diferents medis condicionats varen ser analitzades mitjançant zimografia en gelatina. 30 µl de medi condicionat es van barrejar amb 10 µl de tampó de càrrega (0.250 M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.02% blau bromofenol i 40% glicerol) i, sense bullir, es van sotmetre a electroforesi en gels d'acrilamida al 10% copolimeritzats amb gelatina al 0.1%. L'electroforesi es va dur a terme a 10 mA a 4°C i, un cop finalitzada, els gels varen ser rentats durant 30 min amb 2.5% (v/v) Tritó X-100 i incubats durant 16 h a 37°C en un tampó d'activació (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.5). Un cop tenyits amb una solució de blau Coomassie [1% (p/v) blau Coomassie R en 10% d'àcid acètic i 40% metanol] i rentats amb la mateixa solució mancada de colorant, les activitats gelatinolítiques varen ser detectades en els gels com a bandes clares de degradació sobre un fons blau de gelatina tenyida no degradada.

Per a comprovar que es tractava d'activitat gelatinolítica específica, en alguns casos es va afegir 10 mM EDTA al tampó d'activació ja que a aquesta concentració l'EDTA inhibeix completament l'activitat de totes les gelatinases. També es va analitzar l'efecte de dos inhibidors més, fenantrolina i captopril, que varen ser afegits a diferents concentracions (de 0.1 a 10 mM fenantrolina i de 10 a 14 mM captopril) al tampó d'activació.

Per tal d'identificar totes les formes actives de les proteases, en alguns casos els medis condicionats varen ser tractats abans de ser carregats als gels amb 2 mM APMA (*p-aminophenylmercuric acetate*) durant 2 h a 37°C, compost organomercurial que indueix la conversió del proenzim a formes actives de pes molecular inferior.

Western Blot

Els medis o lisats objecte d'estudi varen ser mesclats en una proporció 3:1 amb el tampó de càrrega detallat a l'apartat anterior. En alguns casos les mostres varen ser desnaturalitzades escalfant-les a 98°C durant 5 min amb 2% 2-mercaptoetanol abans de sotmetre-les a electroforesi en gels de poliacrilamida al 7.5% o al 9%. Els gels varen ser

transferits elèctricament a membranes de nitrocel·lulosa (Optitran BA-S 85, Schleider and Schuell) amb un aparell de transferència del tipus *semidry* (Bio-Rad). A continuació es va procedir a la immunodetecció de proteïnes mitjançant un mètode quimioluminiscent (ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Les membranes varen ser incubades durant tota la nit a 4°C amb un tampó de bloqueig [20 mM Tris-HCl pH 7.2, 160 mM NaCl, 5% (p/v) llet desnatada en pols, 0.001% Tween-20] i durant 1 h a temperatura ambient amb l'anticòs primari corresponent diluït en aquest mateix tampó. Després de varios rentats (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 130 mM NaCl, 0.1% Tween-20) i un nou bloqueig de 2 h, les membranes varen ser incubades 1 h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari corresponent conjugat amb peroxidasa de rave. Després dels rentats finals es va procedir al revelat i autorradiografia de les membranes (Hyperfilm ECL, Amersham LIFE SCIENCE).

Northern Blot

L'RNA total es va obtenir segons una modificació del mètode de Chomczynski i Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) que consisteix en homogenitzar les cèl·lules en una solució (Ultraspec RNA, Biotecx) que conté sals de guanidina, urea i fenol. Després d'una extracció amb cloroform l'RNA total es precipita amb isopropanol i se solubilitza en aigua.

25 µg d'RNA total de cadascuna de les condicions experimentals varen ser sotmesos a electroforesi en gels desnaturalitzants d'agarosa a l'1.2% que contenien formaldehid a l'1.8% i varen ser transferits a membranes de niló (Hybond-N⁺, Amersham International). Les membranes varen ser hibridades amb sondes de cDNA marcades amb ³²P en una solució de 50% formamida, 5 x SSC (20 x SSC: 3M Clorur sòdic, 0.3M Citrat sòdic, pH 7.0), 50 mM fosfat sòdic pH 6.5, 250 µg/ml DNA d'esperma de salmó, 10 x solució Denhart (0.2% Ficoll 400, 0.2% polivinilpirrolidona, 0.2% BSA) i 10% dextrà sulfat durant tota la nit a 42°C. Es varen fer dos rentats de 10 min a temperatura ambient amb 2 x SSC, 0.1% SDS i un rentat d'1 h a 68°C amb 0.2 x SSC, 0.1% SDS. Per últim, les membranes varen ser autorradiografiades mitjançant la seva exposició a películes del tipus Hyperfilm MP (Amersham). Les membranes varen ser deshibridades bullint-les durant 2 min amb 0.1 x SSC, 0.1% SDS i rehibridades amb el cDNA de la β-actina humana marcada amb ³²P que es va utilitzar com a control de la integritat i de la quantitat d'RNA afegit.

Obtenció de les sondes de cDNA

Les sondes de cDNA varen ser obtingudes mitjançant transcripció reversa i PCR a partir d'RNAm de les cèl·lules humanes de limfoma histiocític U937 pel cas de l'MMP-3, MMP-9 i TIMP-1 i utilitzant RNAm de les cèl·lules HAL-8Luc per l'MMP-2 i β-actina o de fibroblasts humans per TIMP-2.

La transcripció reversa es va dur a terme a partir de 500 ng de cadascun dels RNAm utilitzant la transcriptasa reversa del virus de la leucèmia murina de Moloney i

hexadesoxinucleòtids arbitraris. A partir d'aquest material s'efectuà l'amplificació específica per a cada sonda mitjançant PCR utilitzant els encebadors i les condicions d'anillament especificats a la següent taula:

| Sonda | Encebadors (5'-3') | Temperatura hibridació (°C) | Longitud (pb) Posició nucleòtids | Accés GenBank |
|-----------------|--|-----------------------------|-------------------------------------|---------------|
| MMP-2 | F: actgaggactacgaccgacagaagaagtat R: gagccagggccagctcagca | 60 | 1039 911 a 1950 | J03210 |
| MMP-3 | F: aaatatctagaaaactactacgacc R: gagtgtgactcgagtcacag | 55 | 1448 149 a 1597 | X05232 |
| MMP-9 | F: attcctcagtgccggaggcgtcatgtacc R: ctccactcctcccttctc | 65 | 1009 1251 a 2260 | J05070 |
| TIMP-1 | F: tccagcggccagagagacac R: gggcaggattcaggctatct | 65 | 665 16 a 681 | M12670 |
| TIMP-2 | F: tgatcagggccaaagcggctcagtgagaag R: gcttatgggtcctcagatgc | 53 | 534 401 a 935 | J05593 |
| β -actina | F: cactgcctggcaccagca R: acaggttaagcctggctgcc | 53 | 729 992 a 1721 | X00351 |

Les seqüències amplificades varen ser clonades en el plàsmid pCRII (Invitrogen) i seqüenciades pel mètode del dideoxi (17 Sequencing kit, Pharmacia). Aquests cDNAs varen ser marcats amb [α - 32 P]dATP (3000Ci/mmol) utilitzant el fragment Klenow de la DNA Polimerasa d'*E. coli* i hexadesoxirribonucleòtids de seqüència aleatòria (Oligolabelling kit, Pharmacia).

Citometria de flux

Les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc en creixement exponencial varen ser desenganxades dels flascons de cultiu mitjançant tripsinització o, alternativament, amb 1 mM EDTA en 0.1 M PBS, rentades 2 cops amb 0.1 M PBS pH 7.4, 0.1% BSA, 0.01% azida sòdica i incubades durant 20 min a temperatura ambient amb els següents anticossos monoclonals contra cadenes β o α de les integrines humanes utilitzats a concentracions de saturació determinada per titulació dels mateixos: anti- β_1 , - β_2 , - β_5 , - α_v . A continuació les cèl·lules varen ser rentades 2 cops amb l'esmentat tampó i es van incubar durant 20 min a temperatura ambient amb l'anticòs secundari IgG anti-ratolí conjugat amb fluoresceïna (DAKO) diluït 1:20. Després de 2 últims rentats, es va determinar la intensitat de fluorescència mitjançant citometria de flux en un citòmetre Epics XL-MCL.

Com a control es van utilitzar cèl·lules incubades només amb l'anticòs secundari,

així com amb els corresponents controls isotípics amb anticossos irrellevants.

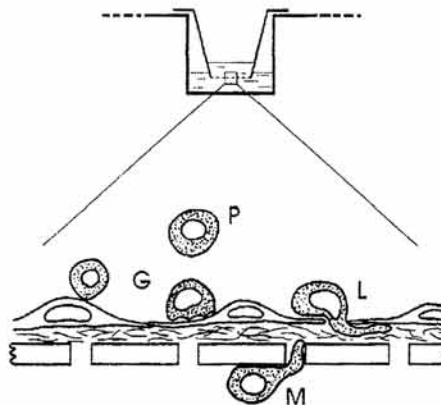
Es varen calcular els ratios de les mitjanes d'intensitat de fluorescència entre cada anticòs i el seu control.

Anticossos

Els anticossos contra les diferents proteïnes humanes utilitzats varen ser: anticossos policlonals anti-MMP-2, -MMP-3, -MMP-9, -TIMP-1, -TIMP-2 (Chemicon) així com anticossos monoclonals anti-integrina β_1 , IgG1, clon B3B11 (Chemicon); anti-integrina β_2 , IgG2a, clon IB4; anti-integrina β_3 , IgG2a, clon 25E11; anti-integrina β_5 ; anti-integrina α_v (Chemicon).

Migració transendotelial

Filtres de policarbonat de 12 mm de diàmetre amb porus de 12 μm varen ser tractats amb 200 μl d'una solució de matrigel (Collaborative Biomedical Products) a 0.4 mg/ml durant tota la nit a la campana de flux. Sobre aquesta superfície es varen fer créixer les cèl·lules endotelials fins a obtenir una monocapa de cèl·lules en postconfluència de 3 dies. Es va comprovar la continuïtat de la monocapa afegint-hi una solució formada per complexes d'albumina i blau tripan i descartant els filtres a través dels quals es va detectar pas de blau després de 5 min d'agitació. Els pous seleccionats varen ser incubats amb 10 u/ml IL-1 β durant 4 h a 37°C i a continuació es va substituir el medi per un que no contenia IL-1 β i s'hi van afegir les cèl·lules HAL-8Luc continuant la incubació a 37°C. Als assajos de quantificació les cèl·lules HAL-8Luc varen ser marcades prèviament amb 200 μCi de cromat sòdic (^{51}Cr) i als temps d'incubació predeterminats (10 min, 40 min, 1 h, 4 h, i 20 h) es van recollir i quantificar diferents fraccions. L'esquema següent il·lustra les diferents fraccions:



La fracció P inclou les cèl·lules tumorals presents al filtre no adherides a les cèl·lules endotelials després d'un rentat amb PBS. La fracció G correspon a cèl·lules tumorals unides a les cèl·lules endotelials mitjançant forces iòniques desenganxades a pH àcid mitjançant la incubació durant un minut del filtre amb 200 mM glicina a pH 3.0. La fracció M correspon a les cèl·lules que han completat la migració transendotelial i que es trobaven al compartiment inferior; es va obtenir recuperant el medi del pou i rasant el filtre per la seva cara basal amb una bola de cotó fluix que també va ser afegida al tub de recompte. La fracció L va correspondre a cèl·lules en procés de migració i es va obtenir separant la membrana del filtre de la resta de l'estructura de plàstic i introduint-la en un tub de recompte. A cadascun dels tubs es va afegir un tampó de lisi (0.01% SDS, 0.025 M NaOH) i es va quantificar la radioactivitat de cada fracció en un comptador gamma.

En un altre grup d'experiments, els assajos es van dur a terme en presència de l'inhibidor de proteases captopril, afegit al medi de les cèl·lules tumorals o bé copolimeritzat amb el matrigel a una concentració final de 14 mM.

RESULTATS

Regulació per PMA de l'expressió d'MMPs i TIMPs secretats per les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc

El tractament amb PMA va induir un increment de l'activitat gelatinolítica de les cèl·lules tumorals HAL-8Luc i HAL-24Luc. La figura 1A mostra l'activitat gelatinolítica dels medis condicionats de cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc a les 24 h de ser estimulades amb l'èster de forbol. El control correspon als medis condicionats de les mateixes cèl·lules no estimulades. A la figura 1B s'observa l'activitat gelatinolítica de medis condicionats de HAL-8Luc i HAL-24Luc a diferents temps d'estimulació amb PMA (temps 0, 2, 6 i 24 h). L'anàlisi dels pesos moleculars de les principals bandes d'activitat gelatinolítica va permetre identificar formes actives de l'MMP-2 (72 kDa) i l'MMP-9 (92 kDa). L'estimulació amb PMA va induir fonamentalment l'activitat gelatinolítica associada a l'enzim de 92 kDa (MMP-9) i aquesta activitat va ser major als medis d'HAL-24Luc que als d'HAL-8Luc. L'organomercurial APMA va afavorir la conversió dels enzims a formes actives de pes molecular inferior com s'observa a la mateixa figura 1A. 10 mM EDTA va inhibir completament l'activitat de totes les metal·loproteases (figura 2A). De la mateixa manera es va comprovar l'efectivitat de la fenantrolina i del captopril com a inhibidors de les gelatinases (figures 2B i C).

L'increment en l'activitat gelatinolítica degut al PMA es relaciona amb un increment en l'expressió proteica i gènica tant d'MMP-2 com d'MMP-9. Les figures 3 i 4 corresponen als Western blots i Northern blots en què es va estudiar l'expressió d'MMP-2, MMP-3, MMP-9 i dels inhibidors TIMP-1 i TIMP-2 en les condicions d'estimulació amb

PMA.

L'expressió proteica d'MMP-2 es va veure incrementada en els medis condicionats d'HAL-8Luc i HAL-24Luc estimulats amb PMA. El nivell d'expressió gènica per aquesta proteïna es va situar, però, per sota dels nivells de detecció per Northern blot en las condicions utilitzades.

Només es va detectar expressió proteica d'MMP-9 per Western blot en el medi condicionat de les cèl·lules HAL-24Luc estimulades amb PMA. A nivell d'expressió gènica es va detectar un increment d'expressió d'MMP-9 en els medis condicionats estimulats amb PMA, essent aquest increment molt més evident en el cas de les cèl·lules HAL-24Luc.

L'expressió gènica de TIMP-1 no es va veure modificada pel PMA tot i que sí es va detectar un lleuger increment de la proteïna. Tampoc es van detectar variacions en l'expressió gènica de TIMP-2. A nivell proteic no es va poder confirmar l'expressió d'aquest inhibidor.

No es va detectar expressió gènica ni proteica d'MMP-3.

Regulació de l'expressió i activitat de metal·loproteases per diferents components de la matriu extracel·lular: fibronectina, laminina, vitronectina y gelatina

La incubació de les cèl·lules tumorals HAL-8Luc i HAL-24Luc amb fibronectina va induir un fort increment d'activitat MMP-2 i MMP-9 tant si la fibronectina actuava com a substrate en el flascó de cultiu com si ho feia en solució en el medi. Per contra, la laminina, no va modificar l'activitat gelatinolítica i aquesta va ser comparable als medis control incubats sense proteïna o a aquells incubats amb gelatina (figura 5). L'anàlisi de la proteïna mitjançant Western blot (figura 6) va demostrar una relació entre aquest increment en l'activitat i una major expressió proteica d'MMP-2 i MMP-9. L'expressió de l'inhibidor TIMP-1 no es va veure modificada i no es va detectar expressió d'MMP-3 ni de TIMP-2.

Aquest increment en l'expressió i activitats proteiques no es va relacionar amb una variació en l'expressió gènica de cap dels gens analitzats: MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 (figures 7 i 8).

D'altra banda, la incubació de les cèl·lules en un medi de cultiu suplementat amb vitronectina va induir un fort increment en l'activitat de l'MMP-9 (figura 5).

Regulació de l'activitat gelatinolítica per integrines

Es va estudiar l'expressió a les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc de les següents cadenes alfa o beta d'integrines: beta 1, beta 2, beta 3, beta 5 i alfa v, mitjançant Western blot (figura 9) i citometria de flux (figura 10), i es va determinar que ambdós tipus cel·lulars expressen beta 1, beta 3, beta 5 i alfa v, i no expressen beta 2. L'expressió de les diferents integrines va resultar ser, a més, quantitativament equivalent a tots dos tipus de cèl·lules. La detecció per Western blot de bandes amb pesos moleculars lleugerament diferents entre

sí correspon a diferents formes de glicosilació per a cadascuna de les integrines.

Per determinar el rol de les diferents integrines en l'activitat gelatinolítica de les cèl·lules tumorals HAL-8Luc i HAL-24Luc, es van incubar aquestes cèl·lules amb medi lliure de sèrum suplementat amb els diferents anticossos. Els medis condicionats de cèl·lules incubades amb anti-beta 5, mostraren un increment en l'activitat gelatinolítica total quan es van comparar amb els medis de cèl·lules incubades amb la resta d'anticossos o amb el control. La zimografia en gelatina (figura 11) va posar de manifest un increment en les activitats MMP-2 i MMP-9 associades a les bandes de 72 i 92 kDa respectivament i l'aparició d'una banda de degradació de pes molecular intermig (75kDa) probablement corresponent a una forma activa d'MMP-9.

Migració transendotelial

L'adhesió de les cèl·lules HAL-8Luc al conjunt monocapa endotelial/matrigel i la migració a través seu, exhibeixen característiques d'especificitat, afinitat, inducció i saturació (figura 12).

A temps inferiors a 60 minuts, l'adhesió depèn bàsicament de la inducció per IL-1 β , essent l'adhesió a l'endoteli induït 20 vegades més eficient que l'adhesió a l'endoteli no estimulat. Així, en el gràfic P, la fracció de cèl·lules HAL-8Luc no unida a les cèl·lules endotelials estimulades amb IL-1 β és d'un 60%, front el 98% corresponent a la fracció de cèl·lules HAL-8Luc no unides a l'endoteli no induït. Per tant, l'eficiència en l'adhesió (complementari de P) és, en aquestes condicions, del 40% i el 2% respectivament.

En el cas de l'endoteli estimulat, a partir dels 60 minuts, al mecanisme d'adhesió depenent d'IL-1 β se li afegeix un altre depenent d'activitat proteolítica ja que és inhibit per la presència de captopril en el matrigel. Aquest resultat que no s'observa a l'endoteli no estimulat, és indicador de la seqüencialitat de l'adhesió i la migració, essent la primera una condició necessària per a la segona.

En el cas de l'endoteli no estimulat, s'observa un augment a l'eficiència de l'adhesió atribuïble a la formació d'agregats de cèl·lules HAL-8Luc sobre les prèviament adherides i que dificulten en grau variable la migració (observacions microscòpiques no mostrades).

Del total de cèl·lules adherides, una fracció significativa és depenent d'interaccions sensibles a pH baix (3.0), probablement del tipus iònic (gràfic G). La proporció d'aquest tipus d'interaccions dins l'adhesió total va del 15% en el cas de l'endoteli estimulat fins el 50% quan no s'estimula. Aquesta diferència pot respondre a la hipòtesi que les interaccions sensibles a baix pH representen la fracció en trànsit cap a la migració, capacitat molt disminuïda quan no s'estimula l'endoteli.

Quan l'endoteli és activat amb IL-1 β , la fracció majoritària de les cèl·lules adherides es localitza en el compartiment cèl·lules endotelials/matrigel (gràfic L). Aquesta associació és molt ràpida i s'incrementa a partir dels 60 minuts degut a la contribució de l'activitat

proteolítica a nivell del matrigel.

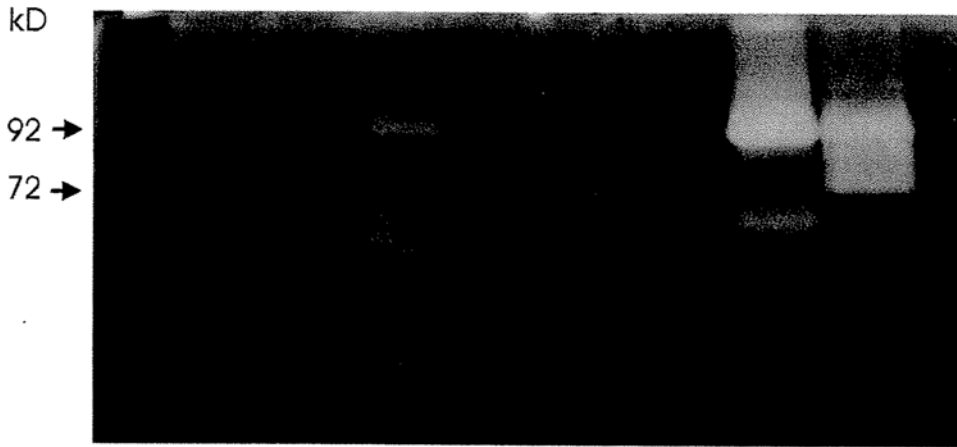
Finalment, la migració (gràfic M) a més de ser depenent de l'estimulació endotelial i de l'activitat metal·loproteàsica, presenta característiques exponencials respecte el temps.

FIGURES

FIGURA 1. Zimografia en gelatina de medis condicionats de les cèl·lules HAL-8Luc (8) i HAL-24Luc (24). (A) Els medis condicionats de cèl·lules incubades durant 24 hores amb (+) o sense (-) PMA, varen ser tractats (+) o no (-) amb APMA abans de ser carregats al gel. (B) Medis condicionats de cèl·lules incubades durant 0, 2, 6 i 24 hores amb PMA.

A

| | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PMA | - | - | + | + | - | - | + | + |
| APMA | - | + | - | + | - | + | - | + |



B

| | | | | | | | | |
|-------|---|----|---|----|---|----|----|----|
| t (h) | 0 | 0 | 2 | 2 | 6 | 6 | 24 | 24 |
| | 8 | 24 | 8 | 24 | 8 | 24 | 8 | 24 |

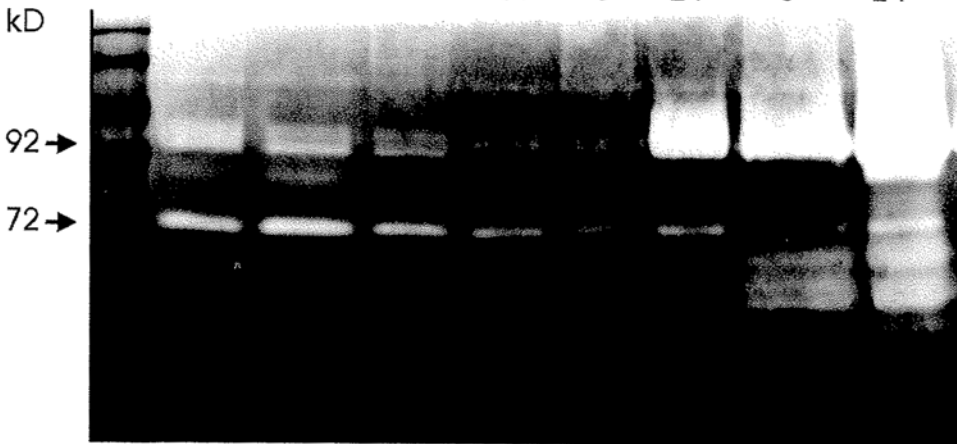
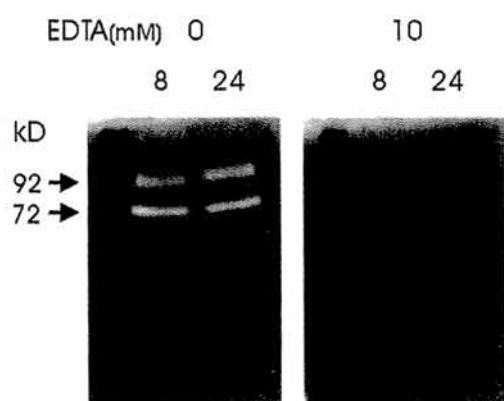
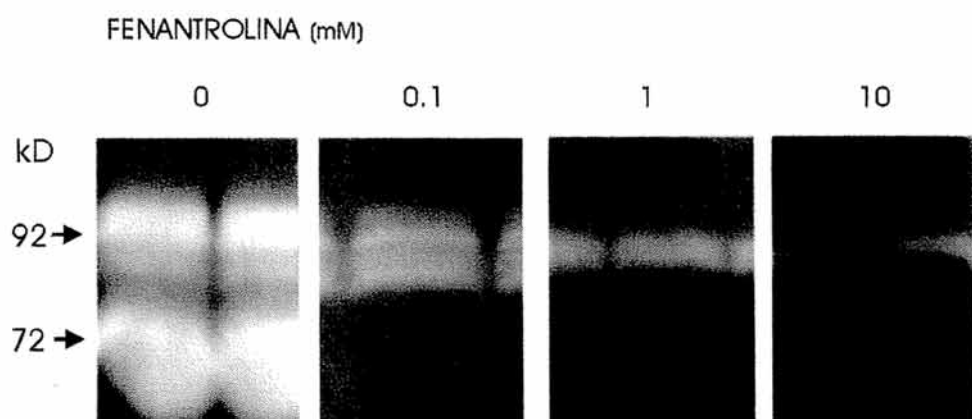


FIGURA 2. Zimografia en gelatina de medis condicionats de les cèl·lules HAL-8Luc (8) i HAL-24Luc (24). (A) Els gels amb medis condicionats de cèl·lules incubades durant 24 hores amb PMA varen ser incubats amb tampó d'activació (veure *Materials i Mètodes*) suplementat amb EDTA (0 ó 10 mM). Alternativament, per a comprovar l'efecte de diferents inhibidors de proteases, es van córrer gels amb medi de cultiu de cèl·lules HAL-8Luc (quantitats equivalents per pou) i, una vegada feta l'electroforesi, els gels es van tallar en quatre fragments (longitudinalment als carrils). Aquest fragments varen ser incubats amb (B) 0, 0.1, 1 ó 10 mM Fenantrolina ó (C) 0, 10, 12 ó 14 mM Captopril.

A



B



C

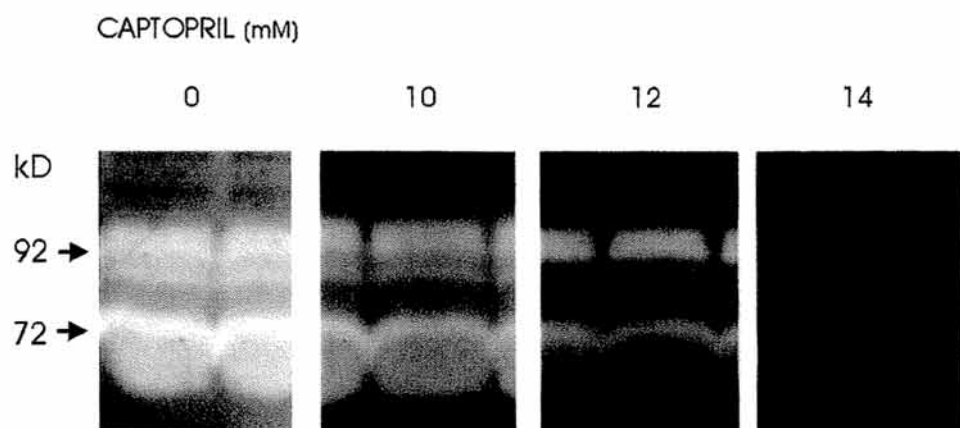


FIGURA 3. Western blot amb anticossos contra MMP-2, MMP-9 i TIMP-1, de medis condicionats de cèl·lules HAL-8Luc (8) i HAL-24Luc (24) incubades (+) o no (-) en presència de 16 nM PMA.

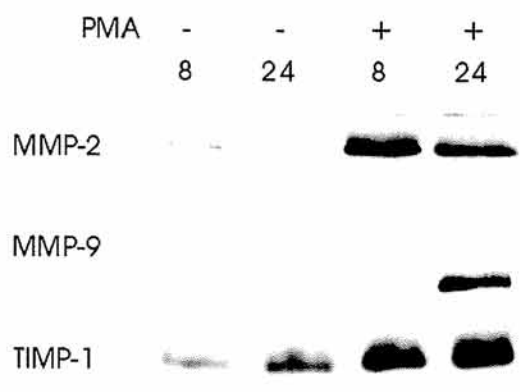


FIGURA 4. Northern blot d'RNA total de cèl·lules HAL-8Luc (8) i HAL-24Luc (24) incubades (+) o no (-) en presència de 16 nM PMA. Les membranes varen ser hibridades amb les sondes de cDNA d'MMP-3, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 marcades amb ^{32}P . Després de ser autorradiografiades, les membranes varen ser deshibridades i rehibridades amb la sonda de la β -actina (*β -act*) com a control de la càrrega i de la integritat de l'RNA.

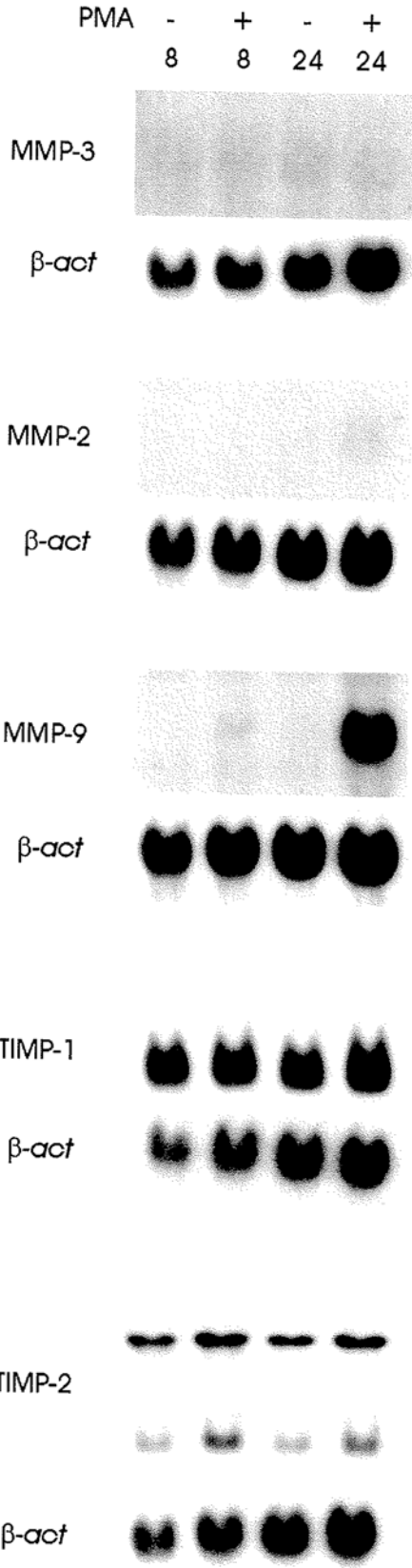
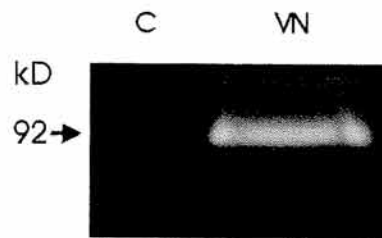
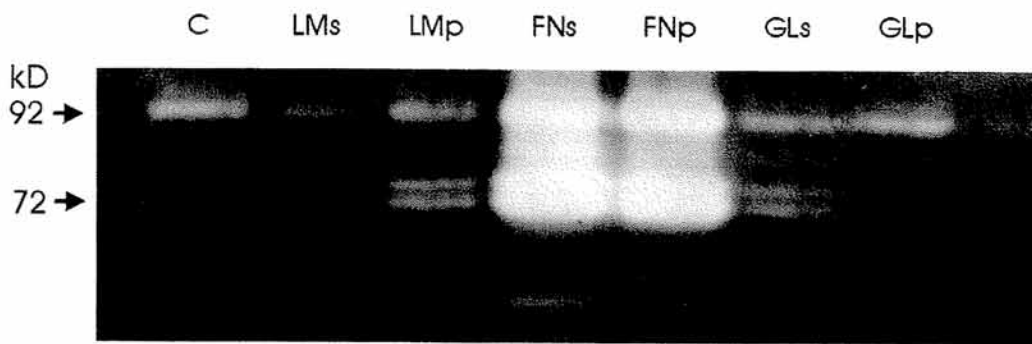


FIGURA 5. Zimografia en gelatina de medis condicionats de cèl·lules HAL-8Luc (A) o HAL-24Luc (B) incubades durant 24 hores en presència de laminina (LM), fibronectina (FN), gelatina (GL) o vitronectina (VN) en solució (s), o com a recobrint de les plaques de cultiu (p). Com a control es van carregar medis no suplementats (C).

A HAL-8Luc



B HAL-24Luc

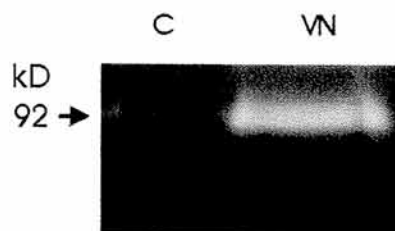
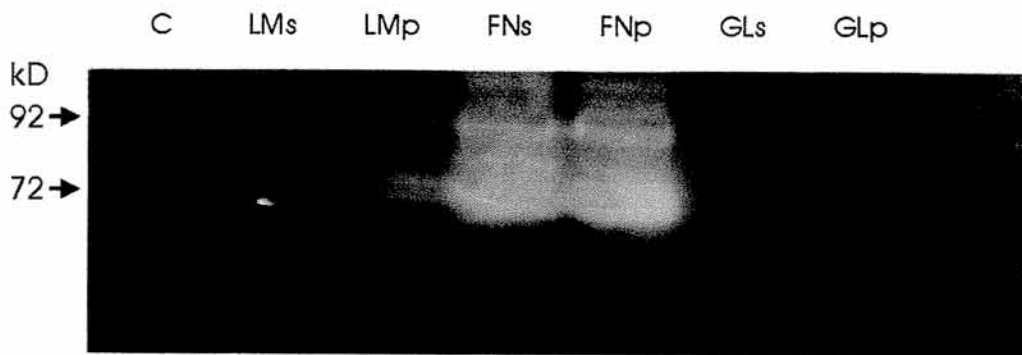
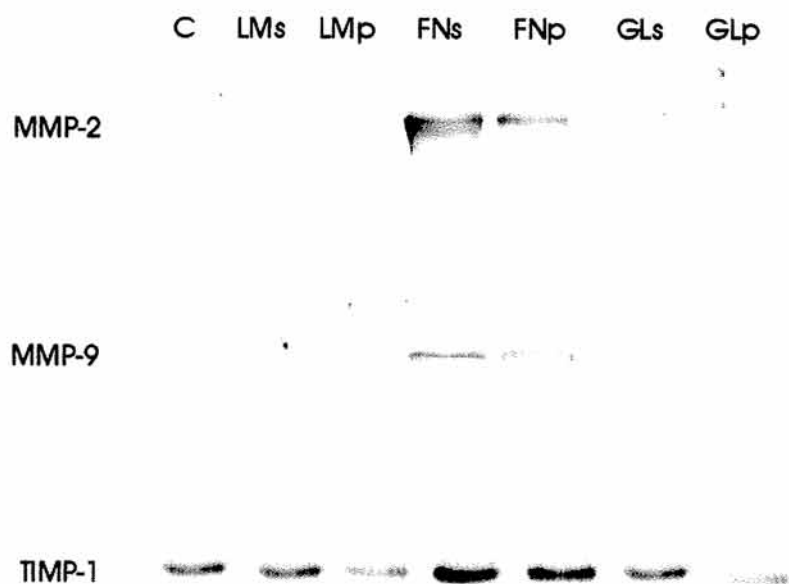


FIGURA 6. Western blot amb anticossos contra MMP-2, MMP-9 i TIMP-1, de medis condicionats de cèl·lules HAL-8Luc (*A*) i HAL-24Luc (*B*) incubades durant 24 hores en presència de laminina (LM), fibronectina (FN) o gelatina (GL) en solució (s), o com a recobriment de les plaques de cultiu (p). Com a control es van carregar medis no suplementats (C).

A

HAL-8Luc



B

HAL-24Luc

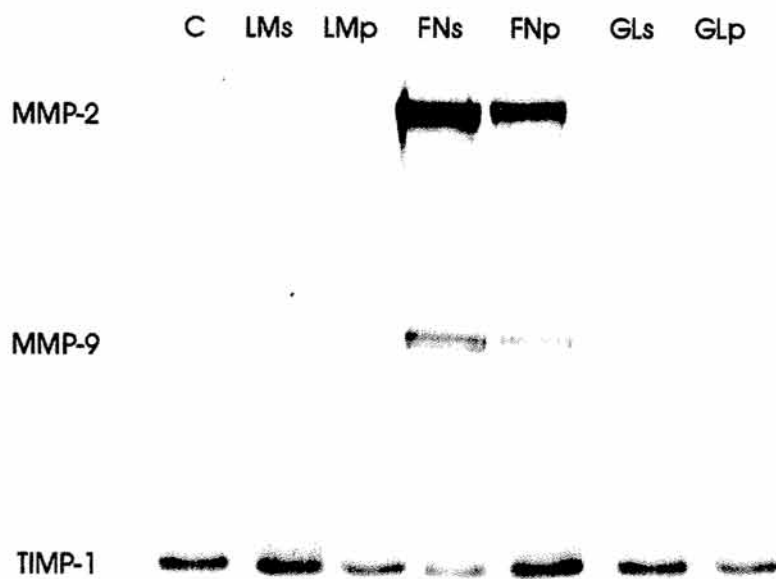


FIGURA 7. Northern blot d'RNA total de cèl·lules HAL-8Luc incubades durant 24 hores en presència de laminina (LM), fibronectina (FN) o gelatina (GL) en solució (s), o com a recobriment de les plaques de cultiu (p). Com a control es va utilitzar l'RNA de cèl·lules incubades amb medi no suplementat (C). Les membranes varen ser hibridades amb les sondes de cDNA d'MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 marcades amb ^{32}P . Després de ser autorradiografiades, les membranes varen ser deshibridades i rehibridades amb la sonda de la β -actina (β -act) com a control de la càrrega i de la integritat de l'RNA.

HAL-8Luc

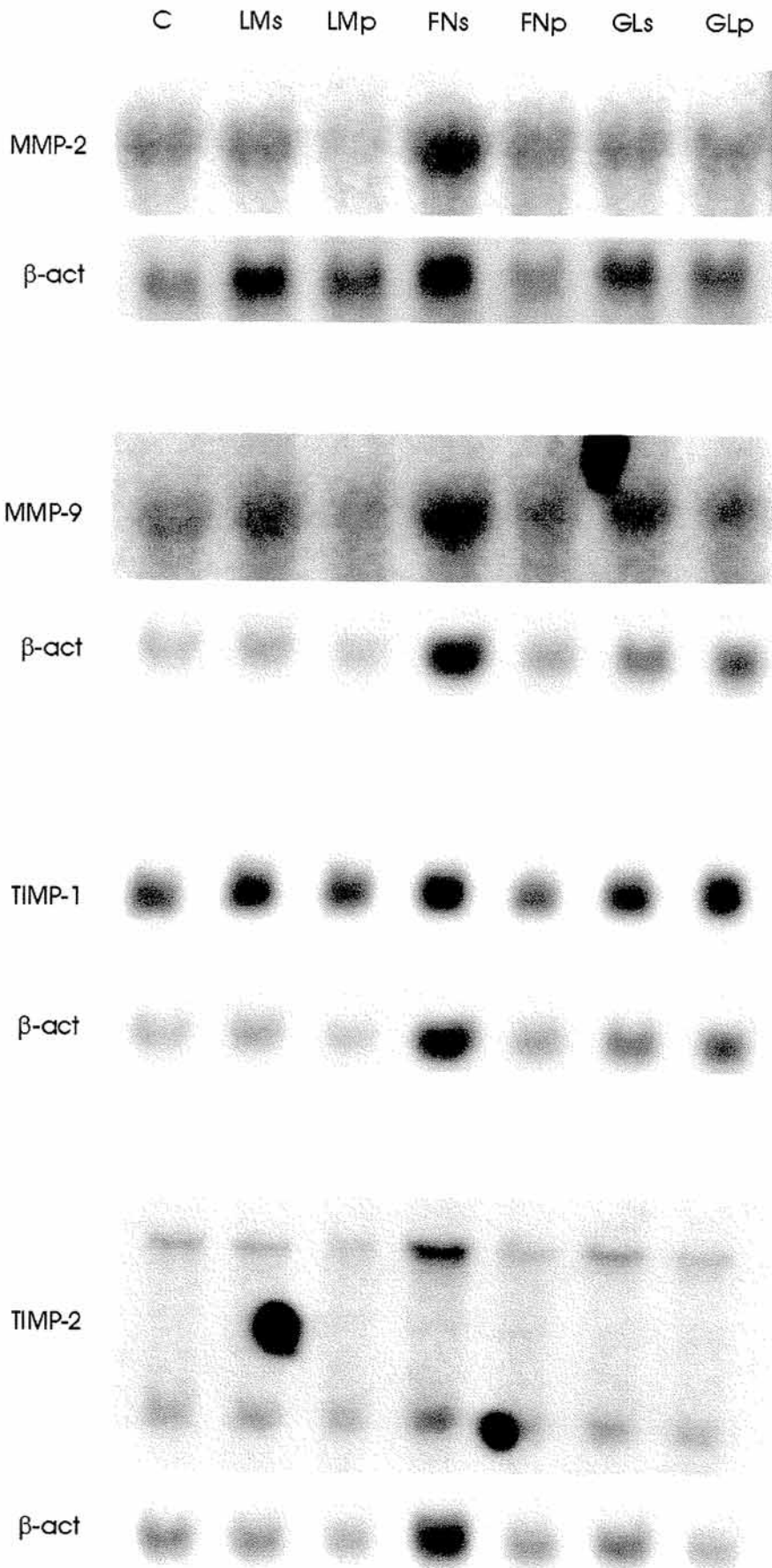


FIGURA 8. Northern blot d'RNA total de cèl·lules HAL-24Luc incubades durant 24 hores en presència de laminina (LM), fibronectina (FN) o gelatina (GL) en solució (s), o com a recobriment de les plaques de cultiu (p). Com a control es va utilitzar l'RNA de cèl·lules incubades amb medi no suplementat (C). Les membranes varen ser hibridades amb les sondes de cDNA d'MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 marcades amb ^{32}P . Després de ser autorradiografiades, les membranes varen ser deshibridades i rehibridades amb la sonda de la β -actina (*β -act*) com a control de la càrrega i de la integritat de l'RNA.

HAL-24Luc

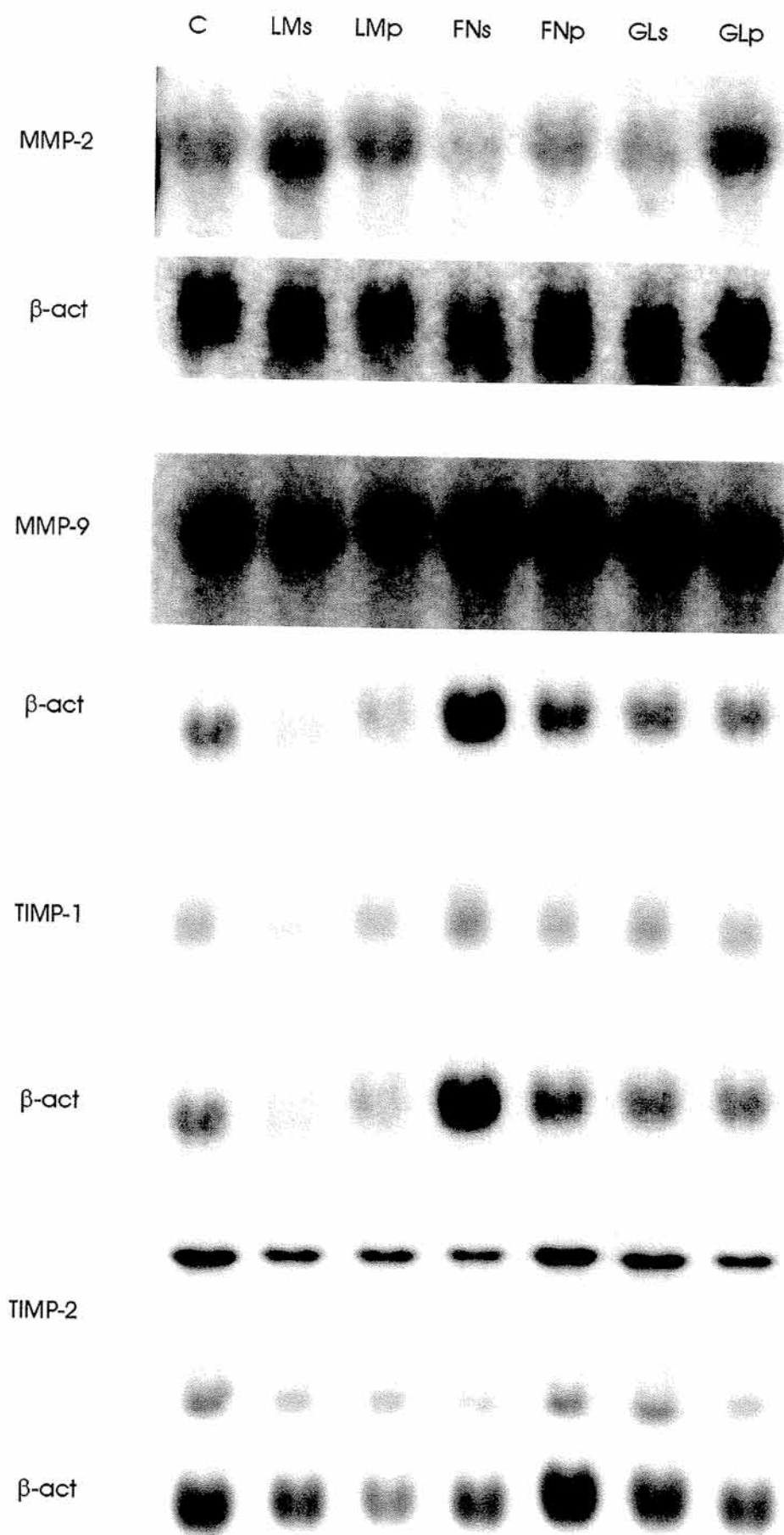


FIGURA 9. Western blot de llisats de cèl·lules HAL-8Luc (8) i HAL-24Luc (24) amb anticossos contra les cadenes d'integrina β_1 , β_2 , β_3 i β_5 .

8 24

beta 1



beta 2

beta 3

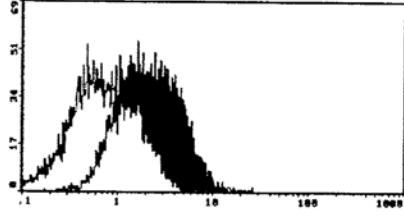


beta 5

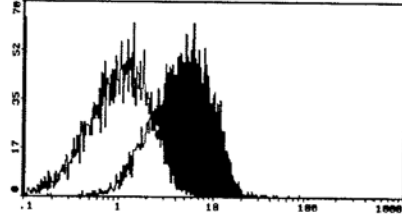


FIGURA 10. Histogrames d'intensitat de fluorescència de l'anàlisi per citometria de flux de les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc incubades amb anticossos contra les cadenes d'integrines β_1 , β_2 , β_5 i α_v . Els histogrames blancs corresponen als control negatiu amb anticossos irrelevantes. Els histogrames ombrejats corresponen als anticossos rellevants contra les diferents integrines.

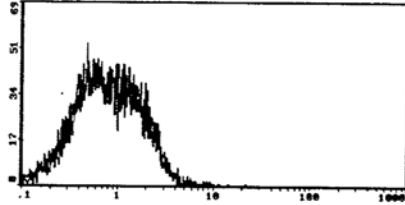
HAL-8 anti-BETA-1



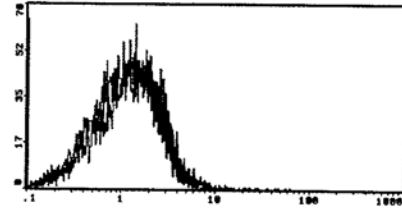
HAL-24 anti-BETA-1



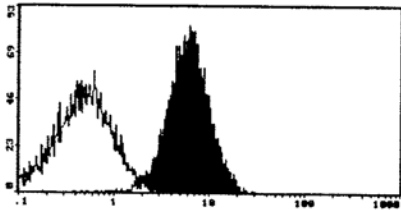
HAL-8 anti-BETA-2



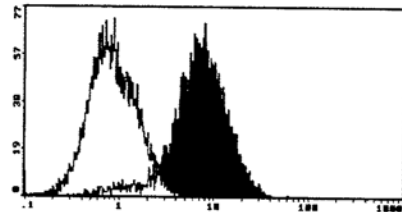
HAL-24 anti-BETA-2



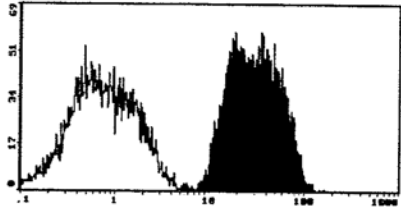
HAL-8 anti-BETA-5



HAL-24 anti-BETA-5



HAL-8 anti-ALPHA v



HAL-24 anti-ALPHA v

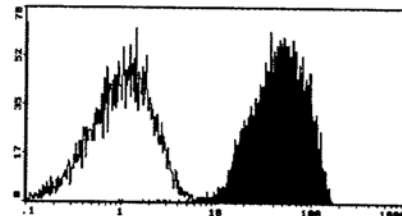
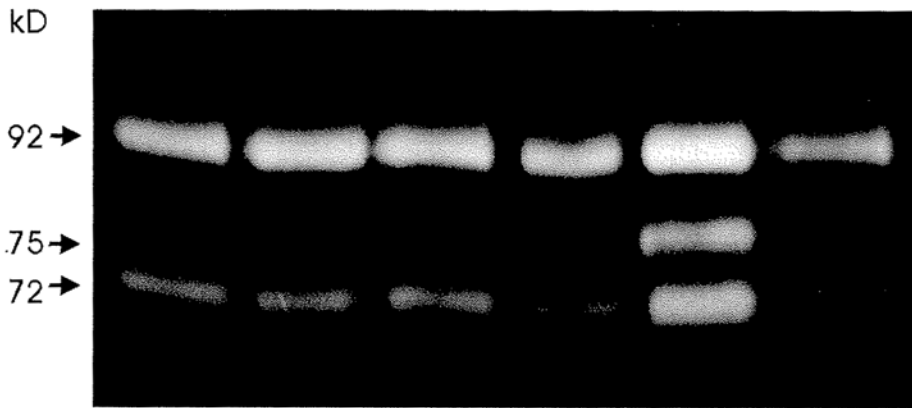


FIGURA 11. Zimografia en gelatina de medis condicionats de cèl·lules HAL-8Luc (*A*) o HAL-24Luc (*B*) incubades durant 24 hores en presència d'anticossos contra las cadenes d'integrines β_1 , β_2 , β_3 , β_5 i α_v . Com a control es van utilitzar medis suplementats amb anticossos irrelevantes.

A

HAL-8Luc

control anti-
beta1 anti-
beta2 anti-
beta3 anti-
beta5 anti-
alfav



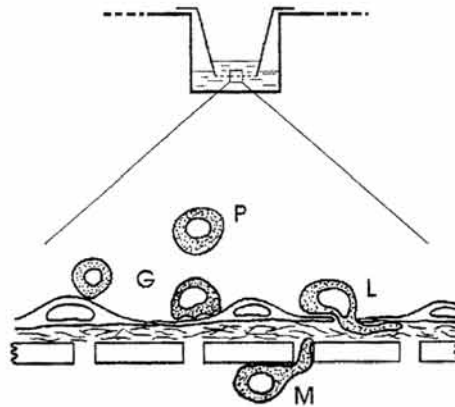
B

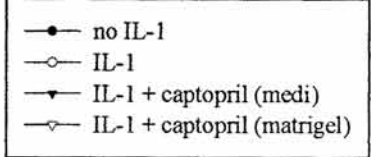
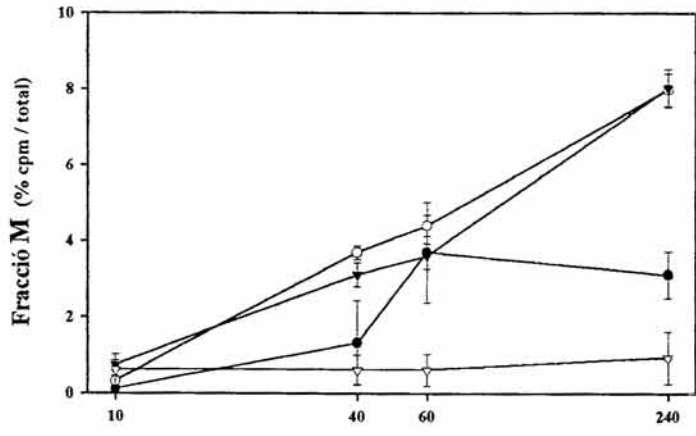
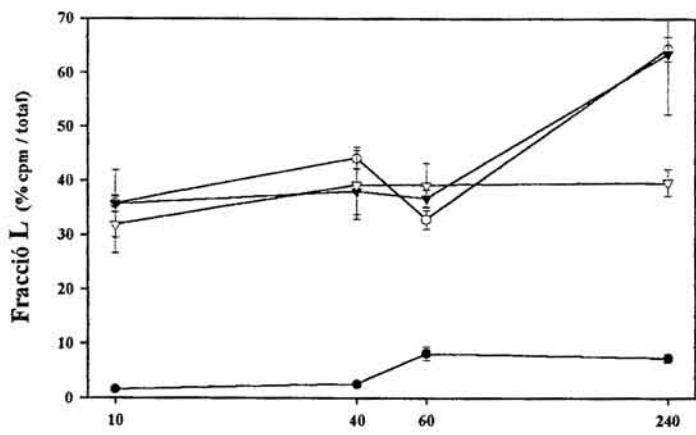
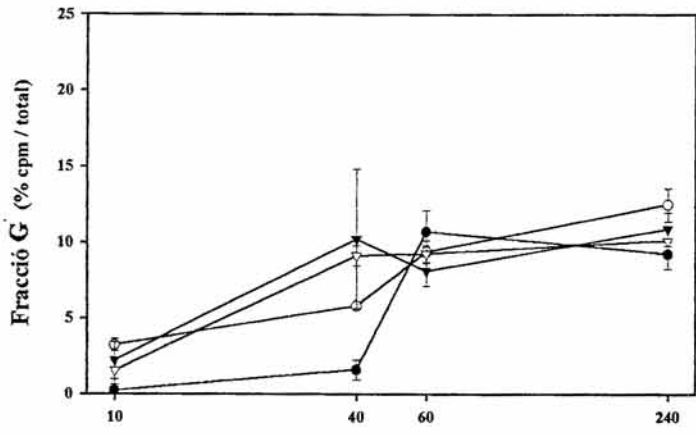
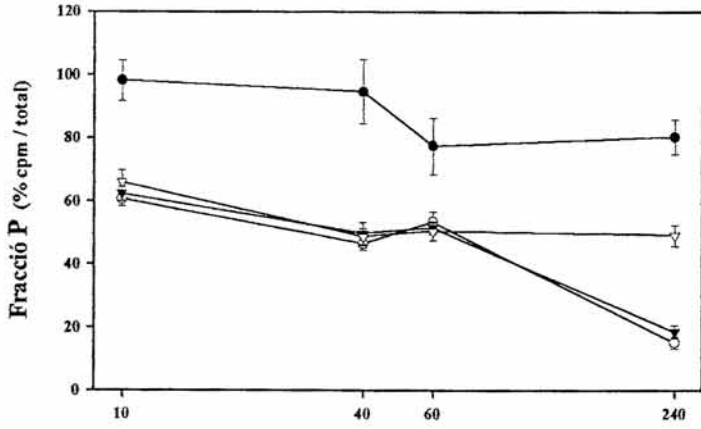
HAL-24Luc

control anti-
beta1 anti-
beta2 anti-
beta3 anti-
beta5 anti-
alfav



FIGURA 12. Migració transendotelial de les cèl·lules HAL-8Luc. En abscisses es representa el temps com a logaritme dels minuts transcorreguts desde l'addició de les cèl·lules. Les ordenades corresponen a les cpm associades a cada fracció (P, G, L i M) en relació al total de cpm afegides.





temps (log minuts)