

**Regulació de la producció de gelatinases
(MMP2 i MMP9) pels limfòcits.
Implicació en malalties inflamatòries i
síndromes limfoproliferatives**

Tesi presentada per

Marta Segarra Blasco

per a optar al grau de Doctora en Bioquímica

per la Universitat de Barcelona

Tesi dirigida per la Dra. Ma. Cinta Cid Xutglà

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona, IDIBAPS

Barcelona, Març 2006

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Com moltes de les senyals biològiques que hem estudiat, aquest treball ha estat per mi un camí dual, una suma d'entrebancs i alegries, que m'ha fet aprendre molt més del que m'havia imaginat. Afortunadament he pogut comptar amb una companyia meravellosa que són els amics i la meva família. Entre tots m'heu encomanat abundants dosis de bon humor, energia i comprensió. A tots els que m'heu ofert la vostra amistat i m'heu ajudat a realitzar aquesta tesi, tant en l'entorn laboral com a fora del laboratori, voldria donar-vos sincerament les gràcies:

A Mariona, perquè a més d'idear i dirigir aquesta tesi, ha estat la meva mare científica, i sempre serà un referent al llarg de la meva trajectòria. Li agraeixo que em donés l'oportunitat d'aprendre al seu costat. Laboralment admiro moltes de les seves aptituds, com la intel·ligència brillant, l'esperit de lluita o l'honestedat. Però sobretot m'agrada la seva proximitat, l'idealisme i el seu punt d'ingenuïtat que la fan tant especial. Sento que s'ha creat un vincle *promising* entre nosaltres que perdurarà per molt, molt temps.

A la Carme, per la seva càlida acollida, per obrir-me el camí en aquesta recerca i per la seva gran aportació a aquest treball. Però a més de la seva feina, voldria destacar la seva sensibilitat i el cor enorme que la fan una persona encantadora.

El Pepe és com el meu germà gran, sempre disposat a cuidar-me i fer que no "patixque". Per compartir llargues converses de "lo terrenal y lo divino", pels seus valuosos consells i per fer-me riure tant. Us desitjo molta sort en l'aventura americana.

A les vasculi-girls. A la Ester, pel seu companyerisme, per escoltar-me, preocupar-se tant per mi i per poder comptar sempre amb ella. A l'Ana, per transmetre aquesta confiança i serenitat, i per la seva ajuda infal·lible. I a la Montse, per la gran capacitat de treball sense deixar de somriure.

A totes les xiquetes del laboratori (Ester L, Sònia, Glòria, Anita, Merche, M^a Pau, Ester T, Moni, Eva i Dori). Totes sou fabuloses i úniques, he après molt de vatros i heu fet que la meva estada al laboratori hagi estat tant alegre i enriquidora. Especialment, la Ester L que ens aporta el seny amb un toc del seu humor, la Ma Pau que sembla tenir una bondat que no té límits, la Glòria perquè és simplement fantàstica i perquè amb la seva gran empatia et fa sentir acompanyada, la Merche per omplir-nos de color el laboratori, per compartir tantes bones estones i regalar-me la seva amistat, la Eva per les converses tant gratificants i el seu inestimable ajut, i la Sònia per la seva honestedat, per preocupar-se del benestar de totes i perquè des de què ens vam conèixer, juntament amb la Eva, tot va ser tant fàcil i vam iniciar una etapa juntes que ens ha omplert de bons records. Totes heu estat com una segona família (numerosa), i en els bons i mals moments sempre heu estat presents disposades a fer abraçades i a compartir somriures i somnis. Sense cap dubte, la vostra AMISTAT és lo millor d'aquests anys.

A la Maria Larrousse, per la seva alegria contagiosa i la seva generositat, i sobretot per fer-me participar en les seves inquietuds i donar-me tant d'afecte.

A les veïnetes d'Immunoal·lèrgia Respiratòria i als companys del departament d'Immunologia i del departament d'Anatomia Patològica, per ser uns grans aliats. I també a la Maite Cibeira i al Dr. Bladé per la seva col·laboració.

A Miquel Sánchez, pel seu altruisme i per prestar-se a dissenyar la portada de la tesi fent l'esforç d'imaginar-se les metal·loproteïnases.

Als meus companys de pis. Podria fer una llarga llista de persones fantàstiques, divertides o curioses. De gairebé totes tinc bons records, però voldria destacar a Àngela per mostrar-me un trosset del seu món i molt especialment a Lourdes, per la seva gran humanitat que tant admiro. Com diria Mitt: és "la más mejor".

A Malicita, per la seva càlida companyia mentre redactava aquest treball.

A la colònia barcelonina de les Terres de l'Ebre i als que continuen a Tortosa. Ells defineixen la "meua faena" com que cuido càncers... me feu riure molt. Perquè hem crescut junts i amb el temps la nostra complicitat també s'ha fet més gran. Disfruto molt de la vostra amistat inconfessa.

A les meves amigues: Cinta, Mire, Tere, M^a Carmen, Merche, Maite, Lucía, Núria, Tati, Dolors i Gemma, perquè sé que sempre puc comptar amb vatos i sobretot pels petits grans moments compartits, i els que vindran!

Als meus iaïos, la parella més entranyable que coneixo. Un exemple de tolerància, l'Antonio, i de generositat, la Lidu. Qui us coneix us estima. Quantes coses he après de vatos...

Al meu menut, Toni, en qui confio molt, i a qui conto les meves inquietuds i m'obsequia amb la complicitat incondicional.

Als meus pares, Emília i Antonio, per la vostra entrega, pel desig inesgotable de donar-me el millor, per respectar-me i per oferir-me un refugi de pau. Però sobretot pel vostre afecte, milers de gràcies.

A Pere. Ens vam trobar per una coincidència espai temps, i amb poc espai i molt de temps i sense més secrets que el fet de no tenir-los, t'has convertit en l'amic més màgic, el que em fa més feliç. I sense tu, el teu suport, consells i abraçades aquest treball no seria el mateix.

ÍNDEX

ÍNDEX

ABREVIATURES	i
INTRODUCCIÓ	1
1. Metal·loproteïnes de matriu	3
1.1. Estructura i classificació	3
1.2. Nivells de regulació	5
1.2.1. Control de la transcripció	5
1.2.2. Activació proenzimàtica	6
1.2.3. Inhibició de l'activació	9
1.2.4. Altres mecanismes	10
1.3. Localització pericel·lular	12
1.4. Funcions de les MMPs	13
1.4.1. Remodelació de la matriu extracel·lular	13
1.4.2. Regulació del comportament cel·lular	14
1.5. Inductors de les MMPs en els limfòcits	15
1.5.1. Factors solubles: citocines, quimiocines i factors de creixement	15
1.5.2. Proteïnes de la matriu extracel·lular	17
2. Integrines limfocitàries	18
2.1. Expressió i activació	19
2.2. Senyalització integrina	22
2.2.1. Proteïnes relacionades amb la transducció de senyals a través d'integrines	23
2.2.1.1. FAK (<i>Focal adhesion kinase</i>)	23
2.2.1.1.1. FRNK (<i>Fak-related non-kinase</i>)	27

2.2.1.1.2. PYK2 (<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i>)	28
2.2.1.2. Src	29
2.2.1.3. Substrats de FAK/Src	31
2.2.2. MAPK	33
2.2.3. PI3K/Akt	35
2.3. Paper de les integrines en la migració cel·lular	38
3. Implicacions de la producció de MMPs pels limfòcits en processos fisiològics i patològics	41
3.1. Transmigració limfocitària	41
3.2. MMPs en la inflamació	43
3.2.1. Arteritis de cèl·lules gegants	45
3.3. MMPs en les síndromes limfoproliferatives	48
HIPÒTESI	53
OBJECTIUS	57
RESULTATS	61
- PRIMER ESTUDI: Mecanismes de regulació de la producció de gelatinases mitjançant integrines en limfòcits T	63
- SEGON ESTUDI: Expressió i activitat de gelatinases en les lesions inflamatòries de l'arteritis de cèl·lules gegants	101
- TERCER ESTUDI: Efecte de la talidomida en la producció de gelatinases induïda per integrines en línies cel·lulars de limfòcits B	139
DISCUSSIÓ	163
CONCLUSIONS	181
BIBLIOGRAFIA	185
ANNEX	211

ABREVIATURES

ABREVIATURES

- **aa**: Aminoàcids
- **AMPc**: Adenosina 5'-monofosfat cíclic (*Adenosin 5'-monophosphate cyclic*)
- **AP-1**: Proteïna activadora 1 (*Activating protein-1*)
- **ATP**: Adenosina trifosfat (*Adenosin triphosphate*)
- **C-**: Grup carboxil
- **CAS**: Substrat associat a Crk (*Crk-associated substrate*)
- **CD**: Grups de diferenciació (*Cluster of differentiation*)
- **CRK**: *Cas related kinase*
- **ECM**: Matriu extracel·lular (*Extracellular matrix*)
- **EGF**: Factor de creixement epidermal (*Epidermal growth factor*)
- **EGFR**: Receptor del factor de creixement epidermal (*Epidermal growth factor receptor*)
- **ERK**: Cinasa relacionada amb senyals extracel·lulars (*Extracellular-signal related kinase*)
- **FAK**: Cinasa de les adhesions focals (*Focal adhesion kinase*)
- **FAT**: *Focal adhesion targeting*
- **FIZ**: Zimografia in situ en pel·lícula (*Film in situ zymography*)
- **FGF**: Factor de creixement dels fibroblasts (*Fibroblast growth factor*)
- **FGFRI**: Receptor I del factor de creixement dels fibroblasts (*Fibroblast growth factor receptor I*)
- **FN**: Fibronectina
- **FRNK**: *FAK-related non-kinase*
- **GAP**: Proteïna activadora de GTPasa (*GTPase activating protein*)
- **GCA**: Arteritis de cèl·lules gegants (*Giant-cell arteritis*)

Abreviatures

- **GEF**: Factor d'intercanvi de nucleòtids de guanina (*Guanine-nucleotide exchange factor*)
- **GRAF**: Regulador de GTPases associat a FAK (*GTPase regulator associated with FAK*)
- **Grb2**: *Growth factor receptor bound 2*
- **GTPases**: Guanosina trifosfatases (*Guanosin triphosphatases*)
- **HGF**: Factor de creixement dels hepatòcits (*Hepatocyte growth factor*)
- **ICAM**: Molècula d'adhesió intercel·lular (*Intercellular adhesion molecule*)
- **IFN**: Interferó
- **IGF**: Factor de creixement tipus insulina (*Insulin-like growth factor*)
- **IGFBP**: Proteïna d'unió al factor de creixement tipus insulina (*Insulin-like growth factor binding protein*)
- **IL**: Interleucina
- **IEL**: Làmina elàstica interna (*Internal elastic lamina*)
- **IP10**: *Interferon- γ induced protein 10*
- **ITAC**: *Interferon inducible T-cell alpha chemoattractant*
- **JNK**: Cinasa N-terminal Jun (*Jun N-terminal kinase*)
- **kDa**: KiloDalton
- **LFA**: Antigen associat a la funció limfocitària (*Lymphocyte function-associated antigen*)
- **MAPK**: Proteïna cinasa activada per mitògens (*Mitogen activated protein kinase*)
- **MCP-1**: Proteïna quimioattractant de monòcits 1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*)
- **MIP**: *Macrophage inflammatory protein*
- **MLCK**: Cinasa de la cadena lleugera de miosina (*Miosin light chain kinase*)
- **MM**: Mieloma múltiple
- **MMP**: Metal·loproteïnases de matriu (*Matrix metalloproteinases*)
- **mRNA**: RNA missatger (*messenger Ribonucleic acid*)

- **MT-MMP**: Metal·loproteïnases de matriu de membrana (*Membrane-type matrix metalloproteinases*)
- **N-**: Grup amino
- **NF-κB**: Factor nuclear kappa B (*Nuclear factor kappa B*)
- **pb**: Parell de bases
- **PDGFR**: Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (*Platelet derived growth factor receptor*)
- **PDK**: Cinasa dependent de fosfatidilinositol (*Phosphatidylinositol-dependent kinase*)
- **PEA3**: *Polyoma enhancer activator 3*
- **PI3K**: Fosfatidilinositol 3-cinasa (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)
- **PKA**: Proteïna cinasa A (*Protein kinase A*)
- **PKB**: Proteïna cinasa B, també anomenada Akt (*Protein kinase B*)
- **PTEN**: *Phosphatase and Tensin Homolog detected on Chromosome 10*
- **PYK2**: Tirosina cinasa rica en prolines 2 (*Proline-rich tyrosine kinase 2*)
- **RANTES**: *Regulated upon activation and normally T cell expressed and secreted*
- **RECK**: *Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*
- **RHO**: Homologia Ras (*Ras homology*)
- **SDF**: Factor derivat de cèl·lules de l'estroma (*Stromal-cell derived factor*)
- **SH**: Domini amb homologia Src (*Src homology*)
- **Th**: *T helper*
- **Thd**: Talidomida (*Thalidomide*)
- **TIMP**: Inhibidors tissulars de metal·loproteïnases de matriu (*Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*)
- **TNF**: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*)
- **TGF**: Factor transformant del creixement (*Transforming growth factor*)
- **mTOR**: *Mammalian target of rapamycin*

Abreviatures

- **VCAM-1**: Molècula d'adhesió a cèl·lules vasculars 1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*)
- **VLA**: Antigen d'activació molt tardana (*Very late antigen*)
- **VEGF**: Factor de creixement de l'endoteli vascular (*Vascular endothelial growth factor*)
- **Y**: Tirosina
- **wt**: Forma original (*wild-type*)