

**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

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

El microentorn cel·lular és una entitat complexa i dinàmica que regula el comportament cel·lular. Al mateix temps, les pròpies cèl·lules integrants d'aquest microambient poden modificar la seva composició i estructura. Les **metal·loproteïnases de matriu** són enzims capaços de degradar múltiples substrats pericel·lulars i per tant de modular el comportament i la migració de les cèl·lules. La regulació de la producció d'aquests enzims és important en processos condicionats per les interaccions amb el microentorn, ja siguin situacions fisiològiques o bé processos patològics com la infiltració limfocitària en malalties inflamatòries o la invasió cel·lular i metàstasi en la progressió de tumors.

1. Metal·loproteïnases de matriu

1.1. Estructura i classificació

Les **metal·loproteïnases de matriu (MMPs; *matrix metalloproteinases*)** són una família multigènica d'endopeptidases que depenen catalíticament d'ions zinc i tenen la potent habilitat de degradar les proteïnes de la matriu extracel·lular. El primer indici de la seva existència va ser la constatació de l'activitat proteolítica responsable de la dissolució de la cua del cap-gros (Gross and Nagai, 1965). Des d'aquella troballa fins l'actualitat se n'han descrit 24 variants humanes.

Les MMPs pertanyen a la superfamília de les metzincines. Les metzincin es caracteritzen per una seqüència consens altament conservada que conté 3 histidines que formen el lloc d'unió de l'ió zinc a la regió catalítica i un gir de metionines que sustenta el lloc actiu (Stocker and Bode, 1995).

Clàssicament les MMPs es van dividir segons l'especificitat de substrat en col·lagenases, gelatinases, estromelisines i matrilisines. Però degut a la superposició de funcions i a la creixent descripció de nous substrats, s'ha adoptat una nova classificació en funció de les característiques estructurals (Figura 1).

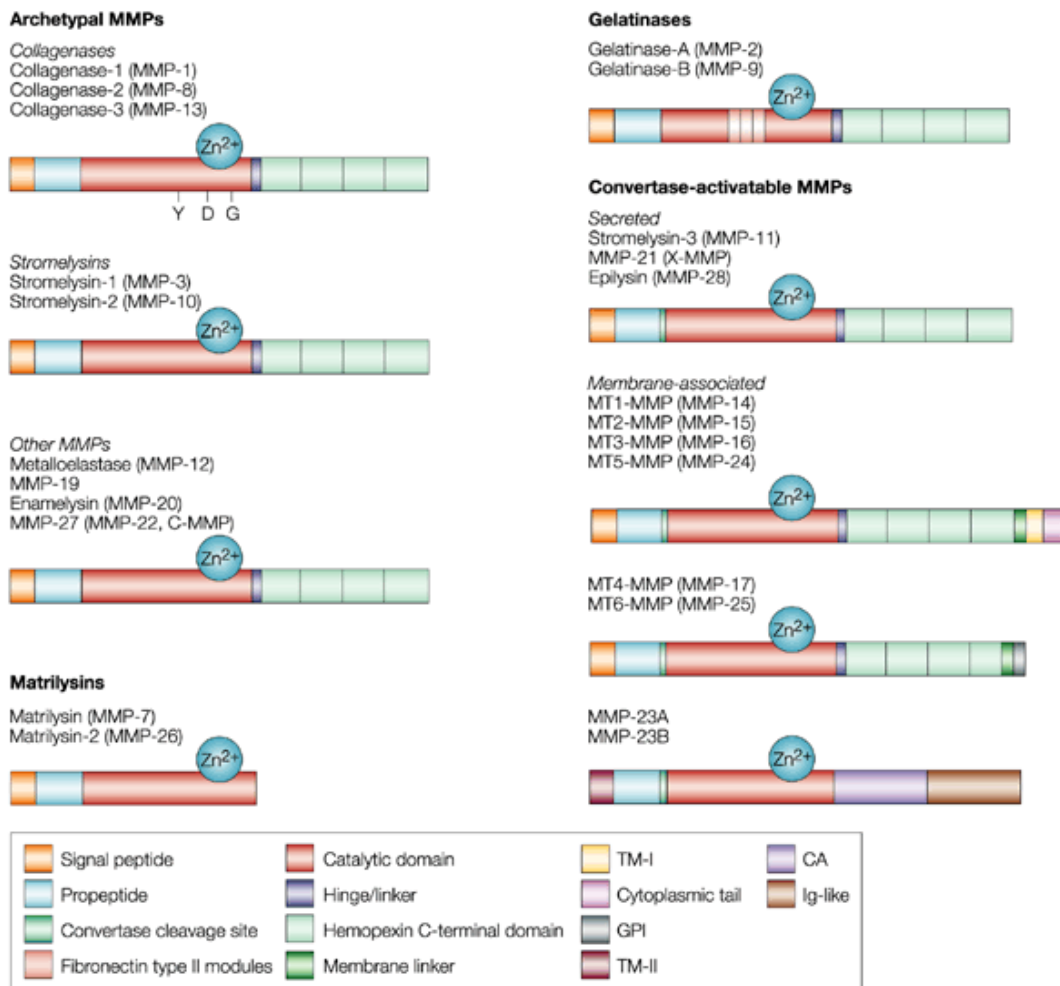


Figura 1. Classificació i estructura de les MMPs. Els dominis estructurals arquetípics de les MMPs són un pèptid senyal, un domini propeptídic, un domini catalític (inclou el lloc d'unió a l'ió zinc) i un domini hemopexina. Les matrilisines no disposen del domini hemopexina. Les gelatinases contenen mòduls tipus fibronectina II que li confereixen especificitat pels substrats. El grup de MMPs activables per convertases tenen un lloc de tall per furina a la regió propeptídica, i es poden trobar solubles o unides a la membrana. (Overall and Lopez-Otin, 2002).

Totes les MMPs es sintetitzen com zimògens i tenen una seqüència senyal (necessària per a la secreció) en el fragment N-terminal i un domini propeptídic que cal eliminar per esdevenir actives. Seguidament hi ha el domini catalític que conté el motiu consens d'unió de l'ió zinc. MMP7 i MMP26 (matrilisines) tenen aquesta estructura mínima. La resta de les MMPs (excepte MMP23) tenen un domini tipus hemopexina a la regió C-terminal que es connecta al lloc catalític a través d'una seqüència que actua com a frontissa (*hinge*) de longitud variable. El domini hemopexina influencia la unió dels TIMPs (inhibidors específics de les MMPs) i l'especificitat de substrat. Aquesta seria l'estructura arquetípica de la majoria de MMPs, però hi ha variacions particulars que caracteritzen la resta d'aquests enzims. Les **gelatinases (MMP2 i MMP9)** es distingeixen per la inserció de 3 dominis repetitius tipus fibronectina II rics en cisteïnes dins del domini catalític que permeten la unió i degradació del col·lagen desnaturalitzat (gelatina). Vàries de les MMPs tenen un domini dins la regió propeptídica que pot ser tallat per enzims convertases tipus furina. Entre elles estan les MMP associades a la membrana (MT-MMP), les quals s'ancoren a la superfície cel·lular a través d'un fragment transmembrana (TM) o bé d'un motiu glicosilfosfatidilinositol (GPI).

1.2. Nivells de regulació

L'acció de les MMPs ha d'estar finament controlada per a què estigui circumscrita amb precisió al lloc requerit. Bàsicament les MMPs estan sotmeses a 3 tipus de regulació: transcripcional, activació proenzimàtica i inhibició de l'activació. A més, s'han descrit diversos mecanismes addicionals que no estan estudiats tant profundament.

1.2.1. Control de la transcripció

En l'organisme adult la majoria de MMPs no s'expressen en condicions quiescents, però varies senyals poden induir la seva expressió: citocines, factors de

creixement, EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) (Lim et al., 1998), canvis en la matriu extracel·lular i en la forma cel·lular, etc... La regulació transcripcional de les diferents MMP es coordina de forma independent, encara que hi ha treballs que indiquen que l'expressió basal de MMP2, MMP14 i TIMP2 (Lohi et al., 2000) està co-regulada. L'expressió de MMPs és complexa, específica de l'estímul i del tipus cel·lular o del teixit, i varia temporalment.

Les senyals de transducció i els factors de transcripció involucrats són també molt diversos i depenen del tipus cel·lular. Una de les vies que més s'ha relacionat amb l'estimulació o repressió de les MMPs és la de les MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), la qual vehiculitza senyals procedents de múltiples estímuls. Moltes d'aquestes vies convergeixen en l'activació del factor de transcripció AP-1, format per heterodímers de les proteïnes c-Fos i c-Jun. El complex de les dues subunitats que formen AP-1 pot unir-se a una seqüència consens present en la majoria dels promotors dels gens de les MMPs. A més existeixen altres elements reguladors que actuen en *cis* depenent de la seva proximitat relativa en la regió promotora. Alguns d'aquests agents implicats en el control de l'expressió de MMPs són: el factor de transcripció PEA3 que s'activa per l'oncoproteïna Ets i també té un lloc d'unió en el promotor de molts gens de les MMPs, NF- κ B que entre d'altres activa MMP9 i MMP14, p53 que té un lloc d'unió al promotor de MMP1, MMP2, MMP13 o bé el regulador negatiu TIE (*TGF β inhibitory element*) que s'ha identificat dins el promotor d'alguns gens. (Overall and Lopez-Otin, 2002; Sternlicht and Werb, 2001).

1.2.2. Activació proenzimàtica

Les MMPs es sintetitzen com a proenzims inactius o zimògens i per ser actius requereixen el tall proteolític del fragment propeptídic.

En els zimògens MMP el grup sulfidril-cisteïna dins el propèptid es troba unit al lloc actiu de l'ió zinc de manera que el domini propeptídic protegeix el domini catalític

(Figura 2). La hidròlisi d'aquesta interacció cisteïna-zinc, ja sigui per agents químics o físics o bé per l'acció de proteïnases, fa que es desplegui aquesta estructura i llavors es produeix l'activació completa amb un tall proteolític dins del propèptid que elimina irreversiblement el residu cisteïna.

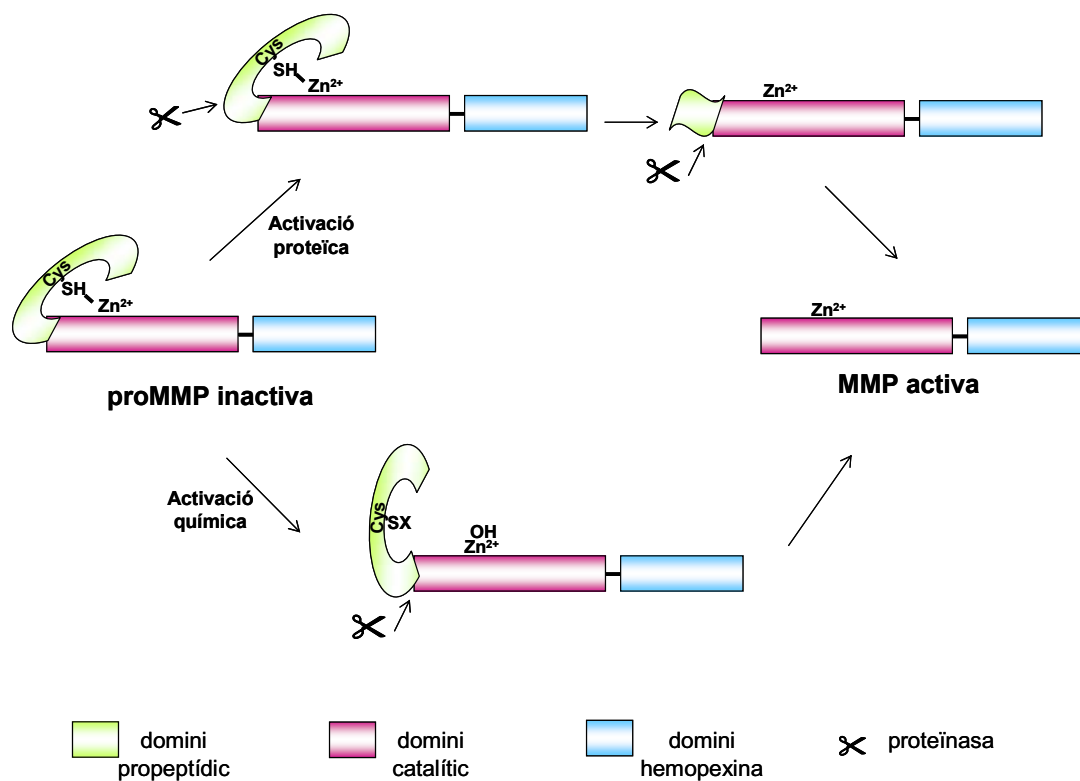


Figura 2. Representació esquemàtica dels passos d'activació dels zimògens MMPs.

Les MMPs poden ser activades per altres proteïnases que tallen el domini propeptídic (pas superior), o bé per agents no proteolítics que impedeixen l'enllaç Zn-cisteïna (Cys=cisteïna) i permeten la completa activació de les MMPs. (Adaptat de (Visse and Nagase, 2003)).

La majoria de MMPs es secreten com a zimògens latents i s'activen a fora de la cèl·lula un cop alliberades, a excepció de les MMPs activables per les proteïna-convertases (MMP11, MMP27 i MT-MMPs). Les proteïna-convertases són serina-proteïnases que hidrolitzen els proenzims durant el procés de transport intracel·lular i

secreció. Les MT-MMPs contenen un lloc de reconeixement per a enzims de tipus furina i poden ser activades per serina-proteïnases a nivell de trans-Golgi o bé per plasmina en la superfície cel·lular (Okumura et al., 1997).

L'activació de la majoria de MMPs la realitzen altres MMPs ja actives o bé varies serina-proteïnases, trencant els enllaços peptídics dintre del domini proMMP. No obstant, MMP2 no és susceptible a les serina-proteïnases i s'activa en la superfície cel·lular a través d'un mecanisme particular que implica a MMP14 (també anomenada MMP de membrana 1; MT1-MMP) i a TIMP2 (inhibidor tissular de MMP 2) (Strongin et al., 1995). TIMP2 inhibeix una MMP14 activada situada en la superfície cel·lular, llavors el domini hemopexina de proMMP2 s'uneix al fragment C-terminal de TIMP2 formant un trímer. Seguidament, una altra MMP14 lliure activa a la proMMP2 eliminant la major part del domini propeptídic. La porció residual de proMMP2 es elimina per una altra MMP2 activa localitzada en la superfície cel·lular donant lloc a una MMP2 madura plenament activa (Deryugina et al., 2001) (Figura 3).

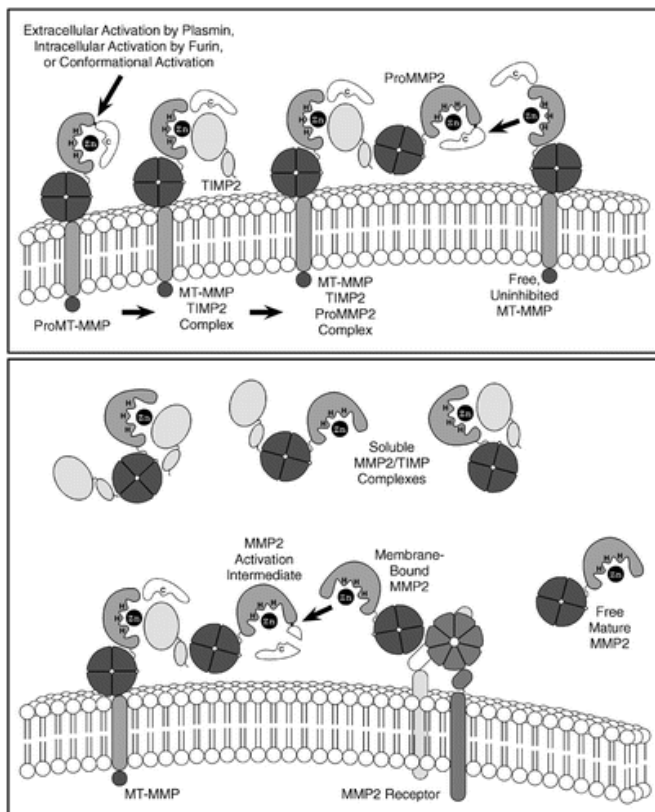


Figura 3. Model d'activació de proMMP2 per MMP14 (MT-MMP) i TIMP2. Una MMP14 activa situada en la superfície cel·lular es inhibida per la unió de TIMP2, el qual a la vegada recluta proMMP2, formant així un complex ternari MMP14/ TIMP2/ proMMP2. Una altra MMP14 activa parcialment a proMMP2. L'activació completa de MMP2 té lloc a través d'una altra MMP2 localitzada en la superfície cel·lular. (Sternlicht and Werb, 2001).

Un fet interessant és que s'ha observat la co-localització de MMP14, MMP2 i TIMP2 en les estructures cel·lulars especialitzades en la migració i invasió, de manera que l'activació de MMP2 es podria coordinar amb la degradació de la matriu cel·lular durant el procés invasiu (Chen and Wang, 1999).

1.2.3. Inhibició de l'activació

L'acció de les MMPs pot ser bloquejada per inhibidors generals com α -macroglobulina (present en el plasma i en diferents fluids tissulars) i per inhibidors específics anomenats **Inhidors tissulars de MMPs (TIMPs; Tissue inhibitors of metalloproteinases)** (Baker et al., 2002). S'han descrit 4 variants de TIMPs en vertebrats (21-29 kDa) que es troben ancorats a la membrana o en forma soluble. S'uneixen a les MMPs de forma no covalent en relació estequiomètrica 1:1 (Figura 4). El domini N-terminal dels TIMPs es replega sobre si mateix i pot inhibir el lloc catalític de les MMPs unint-se com ho faria el substrat. El domini C-terminal és el que coordina l'afinitat per les diferents MMPs. Així el C-terminal de TIMP1 té preferència pel domini hemopexina de MMP9 i en canvi TIMP2 per MMP2 (Murphy and Willenbrock, 1995). En general, els TIMPs poden inhibir totes les MMPs excepte que TIMP1 no pot unir-se a MMP14 (Will et al., 1996).

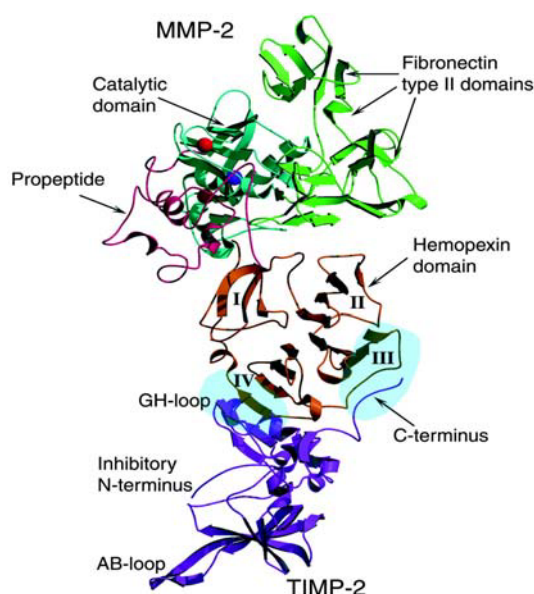


Figura 4. Estructura del complex proMMP2/TIMP2. Les dues zones en blau clar representen les àrees d'interacció entre MMP2 i TIMP2. (Morgunova et al., 2002).

Els TIMPs realitzen una inhibició local i reversible, en canvi α -macroglobulina realitza una inhibició àmplia i irreversible ja que el complex format per la unió α -macroglobulina/MMP s'elimina per endocitosi.

Recentment s'han descobert altres proteïnes que actuen com a inhibidors de les MMPs les quals tenen homologia amb regions inhibidores dels TIMPs. Aquest és el cas de RECK, una proteïna situada en la superfície cel·lular que regula negativament les MMPs (MMP9, MMP2 i MMP14) i la seva acció s'ha relacionat amb la inhibició de la invasió tumoral i l'angiogènesi (Oh et al., 2001).

També s'han sintetitzat o purificat diferents inhibidors de les MMPs amb finalitats terapèutiques. Els peptidomimètics, per exemple batimastat i marimastat, són petites molècules basades en l'àcid hidroxàmic que inhibeixen les MMPs per mimetisme amb el lloc de reconeixement del substrat col·làgen i perquè a més són quelants del zinc. Els no-peptidomimètics, com tanomastat i prinomastat, es basen en la conformació del lloc actiu de les MMPs. Les tetraciclins i derivats no-antibiòtics redueixen tant la síntesi com l'activitat de les MMPs, com per exemple periostat. Altres inhibidors sintètics o naturals són els bifosfonats, neovastat (extracte del cartílag del tauró), catequines del té verd o l'aspirina.

1.2.4. Altres mecanismes

En tot el procés de producció de les MMPs estan involucrats molts altres mecanismes cel·lulars, representats a la figura 5, que intervenen en el control precís de la producció de MMPs com són: l'eficiència de traducció i l'estabilitat del mRNA, la compartimentalització enzimàtica i la secreció, i els processos d'internalització i autolisi.

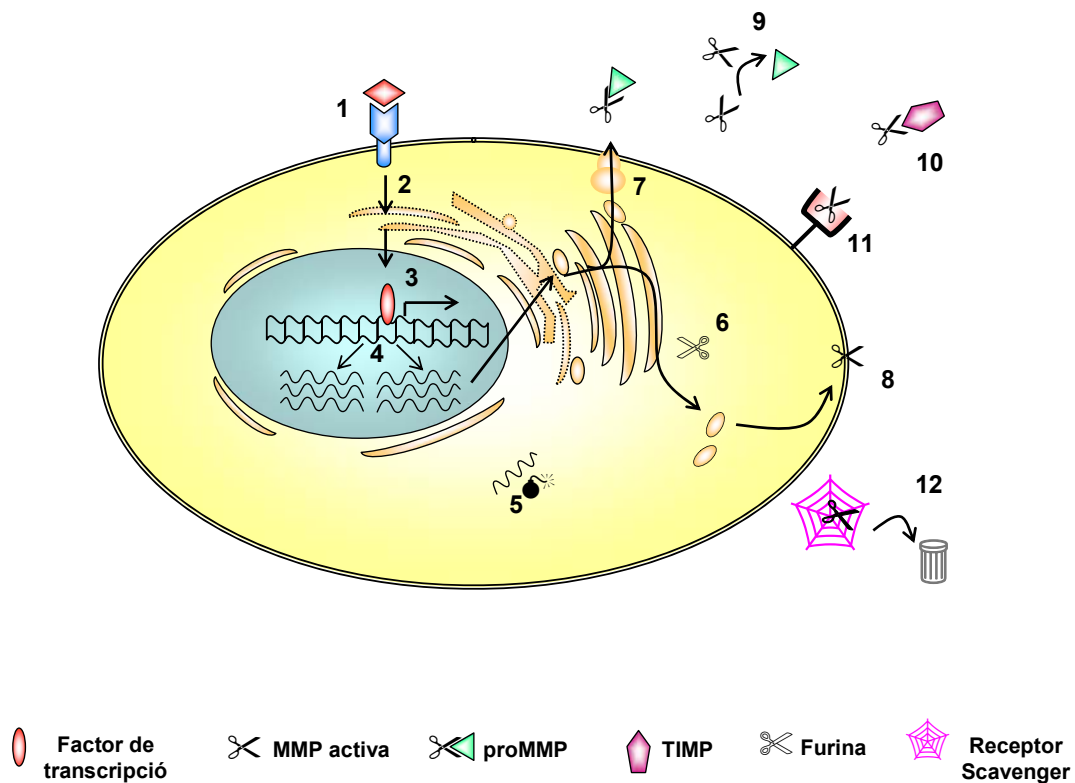


Figura 5. Representació dels diferents mecanismes de regulació de MMPs. 1) Inducció extracel·lular; 2) Transducció intracel·lular; 3) Regulació transcripcional; 4) Processament post-transcripcional de mRNA; 5) Degradació de mRNA; 6) Activació intracel·lular de MMPs per convertases; 7) Secreció de MMPs solubles; 8) Expressió de MMPs lligades a la membrana; 9) Activació proteolítica; 10) Inhibició de l'activació; 11) Localització pericel·lular; 12) Degradació i eliminació. (Adaptat de (Sternlicht and Werb, 2001)).

Tot i que actualment encara manca un coneixement més acurat d'aquests processos, es sap que els mecanismes post-transcripcionals poden influir en l'expressió de MMPs. Per exemple, alguns transcrits de RNA missatger (mRNA) són estabilitzats per esters de forbol i per certs factors de creixement (Vincenti and Brinckerhoff, 2001).

També el transport intracel·lular i l'exocitosi de MMPs és un procés clau en la regulació d'aquests enzims. Recentment s'ha demostrat que cèl·lules de melanoma

humà emmagatzemen i transporten MMP2 i MMP9 en petites vesícules citoplasmàtiques associades als microtúbuls citoesquelètics (Schnaeker et al., 2004), de manera que la secreció de MMPs podria estar coordinada amb mecanismes que regulen la morfologia i la motilitat cel·lular.

Les macroglobulines inhibeixen irreversiblement l'activitat de les MMPs perquè el complex MMP/macroglobulina s'elimina per endocitosi a través de receptors tipus *scavenger*. De forma similar la unió de trombospondina-2 a MMP2 facilita l'endocitosi del complex a través del mateix mecanisme.

1.3. Localització pericel·lular

Un aspecte important en la correcta funcionalitat de les MMPs és la seva localització en la superfície cel·lular (Werb, 1997). S'ha vist que MMP14 (MMP associada a la membrana) es situa als invadopodia, estructures especialitzades de la membrana cel·lular que dirigeixen els processos invasius, proporcionant un mecanisme estratègic per focalitzar la proteolisi de la matriu pericel·lular (Nakahara et al., 1997). A més, recentment s'ha demostrat que certes MMPs solubles s'associen, al menys transitòriament, a receptors d'adhesió o a proteoglicans de la superfície cel·lular: MMP2, a més de formar el complex d'activació amb MMP14/TIMP2, interacciona amb la integrina $\alpha v \beta 3$ a través del domini hemopexina (Brooks et al., 1996) i MMP9 s'uneix a diferents receptors de superfície cel·lular com ara al receptor hialurònic CD44 (Bourguignon et al., 1998; Yu and Stamenkovic, 1999) i a ICAM-1 (Fiore et al., 2002). També s'ha suggerit que proMMP9 s'associa a col·lagen IV (Olson et al., 1998).

Aquest mecanisme d'unió a la superfície cel·lular optimitza l'activitat proteolítica en les regions de contacte físic entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular i permet a la vegada que les cèl·lules dirigeixin el seu pas progressiu a través de la matriu extracel·lular en parcial remodelació. En concordança, s'ha observat la co-localització

de MMPs i integrines en els invadopodia (Mueller et al., 1999; Nakahara et al., 1998). També s'ha vist que MMP2 i els seus lligands de superfície, MMP14 i $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, es distribueixen en els mateixos microdominis de la membrana de les cèl·lules endotelials (Puyraimond et al., 2001). En aquest sentit també s'ha descrit la regulació específica de la compartimentalització de MMP14 pels receptors integrina fet que coordinaria la migració de cèl·lules endotelials i afavoriria l'angiogènesi (Galvez et al., 2002).

1.4. Funcions de les MMPs

L'activitat fonamental de les MMPs és la proteolisi dels components de la matriu extracel·lular. Aquesta facultat principal de les MMPs té una gran importància biològica en processos de reestructuració tissular o de pèrdua de confinament cel·lular. Però actualment se'ls estan atribuint noves funcions a mesura que s'ha posat de manifest que l'acció de les MMPs no està dirigida exclusivament contra proteïnes estructurals, sinó que s'amplia a una diversitat de substrats que modulen el comportament cel·lular (Sternlicht and Werb, 2001).

1.4.1. Remodelació de la matriu extracel·lular

La **matriu extracel·lular (ECM; *extracellular matrix*)** està formada per una mescla de molècules insolubles que les cèl·lules secreten i depositen al seu voltant. Està constituïda principalment per col·làgens, glicoproteïnes i proteoglicans. A més de suportar l'adhesió cel·lular i transmetre senyals a través dels receptors d'adhesió de la superfície cel·lular, la ECM actua com un reservori de citocines i factors de creixement que estan inserits dins la seva estructura, i per tant acumula un gran contingut d'informació críptica. La membrana basal és una estructura especialitzada de la matriu extracel·lular formada bàsicament per una xarxa de col·lagen IV que s'entrecreu amb nidogen, laminina i perlecans i que separa les cèl·lules de l'estroma.

Les MMPs poden processar pràcticament tots els components de la ECM i la membrana basal (Taula 1) i per tant modificar la funció físico-biològica d'aquesta estructura complexa. A més, les MMPs també poden activar a altres zimògens de MMPs de manera que es potencia l'acció proteolítica.

MMPs	Substrats de ECM	Altres substrats
MMP1	Col·lagen I, II, III, VII, VIII, X, XI, gelatina, fibronectina, laminina, nidogen, perlecan, tenascina, vitronectina	proMMP1, proMMP2, proTNF α , IGFBP, CXCL 12
MMP2	Col·lagen I, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, nidogen, decorina, tenascina, vitronectina	proMMP1, proMMP2, proMMP13, proTNF α , proTGF β , proIL1 β , IGFBP, FGFR1, CCL7
MMP3	Col·lagen III, IV, V, VII, IX, X, XI, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, nidogen, perlecan, decorina, tenascina, vitronectina	proMMP1, proMMP3, proMMP7, proMMP9, proMMP13, proTNF α , proIL1 β , IGFBP, CXCL 12, e-cadherina, plasminogen
MMP7	Col·lagen I, IV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, nidogen, decorina, syndecan-1, tenascina, vitronectina	proMMP7, proTNF α , FasL, e-cadherina, integrina β 4, plasminogen
MMP8	Col·lagen I, II, III	proMMP8
MMP9	Col·lagen IV, V, gelatina, elastina, laminina, vitronectina	proTNF α , proTGF β , proIL1 β , IL-2R α , CXCL1, CXCL7, CXCL8, CXCL12, ICAM-1, plasminogen
MMP10	Col·lagen III, IV, V, gelatina, elastina, fibronectina	proMMP1, proMMP10
MMP11		IGFBP
MMP12	Col·lagen I, IV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, nidogen, vitronectina	Plasminogen
MMP13	Col·lagen I, II, III, VI, VII, IX, X, XIV, gelatina, fibronectina	proMMP9, proMMP13, CXCL 12
MMP14	Col·lagen I, II, III, gelatina, fibronectina, laminina, nidogen, vitronectina	proMMP2, CD44, integrina α v, CXCL 12, transglutaminasa

Taula 1. Substrats de les MMPs. Les MMPs poden degradar un ampli ventall de proteïnes de la matriu extracel·lular (ECM) - col·làgens, glicoproteïnes i proteoglicans - i també altres substrats no pertanyents a la ECM. Les MMPs tenen una acció i repercussió biològica multifuncional.

1.4.2. Regulació del comportament cel·lular

Recentment s'ha descobert que les MMPs participen en altres processos que regulen el comportament cel·lular, ja que també poden actuar sobre factors de creixement, citocines, quimiocines i molècules d'adhesió (Taula 1).

La hidròlisi de les grans proteïnes insolubles de la ECM exposa nous fragments críptics (Giannelli et al., 1997; Xu et al., 2001) i augmenta la biodisponibilitat de factors de creixement i citocines retinguts dins de la ECM. Les MMPs modifiquen la funcionalitat de factors de creixement i citocines activant els seus precursors (Yu and Stamenkovic, 2000) o bé alliberant els seus receptors de la superfície cel·lular (Levi et al., 1996). La modificació de les molècules bioactives evidencia noves funcions de les MMPs en la modulació del comportament cel·lular.

1.5. Inductors de les MMPs en els limfòcits

Els limfòcits fonamentalment produeixen petites quantitats de proenzims de MMPs principalment del tipus gelatinases (MMP2 i MMP9) (Goetzi et al., 1996). Aquests enzims els serveixen en el procés de transmigració ja que degraden eficientment el col·lagen IV, el principal component de la membrana basal. La disregulació d'aquest procés pot estar en la base del desenvolupament d'infiltrats inflamatoris o la disseminació de les síndromes limfoproliferatives.

1.5.1. Factors solubles: citocines, quimiocines i factors de creixement

Els limfòcits T poden expressar constitutivament mínimes quantitats de proMMP9, en canvi la producció de proMMP2 està molt més restringida (Leppert et al., 1995). Inicialment es va aconseguir incrementar la producció de MMP9 mitjançant l'estimulació amb la citocina IL2 (Montgomery et al., 1993; Weeks et al., 1993). Posteriorment, altres treballs han seguit demostrant la regulació per citocines de la producció de MMPs en limfòcits (Johnatty et al., 1997). En general, s'ha vist que

citocines proinflamatòries (com IL1, IL2, IL4 i $TNF\alpha$) estimulen la producció de MMP9 en limfòcits T (Johnatty et al., 1997; Xia et al., 1996), en canvi $IFN\beta$ reprimeix la seva expressió (Stuve et al., 1996). Els limfòcits B transformats amb el virus Epstein-Barr sintetitzen MMP9 i la seva expressió es modula per diverses citocines, factors de creixement i esters de forbol (Trocme et al., 1998). Les línies cel·lulars limfoblastoïdes T i B també expressen basalment MMP9 (Stetler-Stevenson et al., 1997) i l'estimulació amb certes citocines, especialment IL6, indueix l'expressió de MMP9 i MMP2 en aquestes línies cel·lulars (Kossakowska et al., 1999).

Altres factors implicats en la resposta immunològica com eicosanoids, leucotriens i factors de creixement també contribueixen a la regulació de MMPs i estimulen la migració dels limfòcits (Leppert et al., 1995; Owen et al., 2003). Les cèl·lules plasmàtiques de mieloma també incrementen la producció de MMP9 i la invasivitat en resposta al factor de creixement HGF (Vande Broek et al., 2004).

Vàries citocines i factors de creixement han estat descrits com a potents inductors de les MMPs en diversos tipus cel·lulars. Però inversament, les mateixes MMPs poden afectar directament o indirectament l'activitat de citocines i factors de creixement, entre ells $IFN\beta$, VEGF, EGF, FGF, $TGF\beta 1$, $IL1\beta$ i $TNF\alpha$ que juguen un paper important en la inflamació i reparació tissular.

Unes altres senyals cel·lulars implicades en la inducció de MMPs en limfòcits són les quimiocines. Les quimiocines són una família de petites glicoproteïnes (70-90 aa) que són potents activadores de leucòcits i també tenen poder quimiotàctic. Les quimiocines atreuen específicament poblacions de cèl·lules immuno-efectores als llocs del dany o infecció, de manera que modulen l'evolució i resolució de la resposta inflamatòria.

Les MMPs participen en l'activitat quimiotàctica ja que poden controlar directament l'acció de les quimiocines mitjançant el tall proteolític d'aquestes molècules (McQuibban et al., 2001; McQuibban et al., 2000; McQuibban et al., 2002;

Van den Steen et al., 2000; Van Den Steen et al., 2003), el qual pot resultar en un increment, inactivació o antagonisme de les seves funcions quimiotàctiques. D'altra banda també poden fer una acció indirecta digerint els substrats que uneixen, retenen o concentren les quimiocines en una localització determinada (Corry et al., 2002; Li et al., 2002; Pruijt et al., 1999).

Al mateix temps, diverses quimiocines han estat relacionades amb la inducció de MMPs, especialment en el context inflamatori i tumoral. CXCL12 (SDF1 α) augmenta l'expressió de MMPs i la migració cel·lular en diferents càncers (Brand et al., 2005; Zannettino et al., 2005; Zhang et al., 2005) i les quimiocines MCP-1, SDF1 α , IP10 i Mig indueixen la sobreexpressió de gelatinases i colagenases en sinoviocits de pacients amb artritis reumatoide (Garcia-Vicuna et al., 2004). La producció de MMP9 en limfòcits T es potencia per l'estimulació amb les quimiocines MIP i RANTES (Johnatty et al., 1997). També les quimiocines del tipus CXC, ITAC, Mig i IP10, augmenten l'activitat gelatinolítica de MMP2 i MMP9 i la quimiotaxi en línies cel·lulars i en cèl·lules plasmàtiques de pacients amb mieloma múltiple, les qual expressen el seu receptor CXCR3 (Pellegrino et al., 2004). L'expressió de MMPs en resposta a gradients de quimiocines és important per a la disseminació tumoral i la infiltració inflamatòria.

1.5.2. Proteïnes de la matriu extracel·lular

Les MMPs es caracteritzen per una capacitat proteolítica específica dels components de la ECM. El grup de Z. Werb va ser el primer en demostrar que senyals promogudes per l'activació d'integrines, receptors essencials en el reconeixement de les proteïnes de la ECM, induïa la producció de MMPs en fibroblasts (Werb et al., 1989). Es descobria així un nou mecanisme bàsic en la producció de MMPs, en el qual els substrats clàssics de les MMPs, les proteïnes de la ECM, resultaven ser també els seus inductors. Aquest concepte es va traslladar a la producció de MMPs per limfòcits i es va poder observar que els elements relacionats amb el reconeixement de la ECM i

la interacció intercel·lular (anomenats generalment com a molècules d'adhesió) i les pròpies proteïnes constituents de la ECM són uns inductors molt eficients de la producció de gelatinases en els limfòcits (Esparza et al., 1999; Romanic and Madri, 1994; Vacca et al., 2001; Xia et al., 1996; Yakubenko et al., 2000).

En un d'aquests treballs realitzat pel nostre grup (Esparza et al., 1999), es va demostrar que la fibronectina, una proteïna constituent de la ECM, era un inductor molt potent de la síntesi i activació de MMP2 i MMP9 en limfòcits T.

La **fibronectina (FN)** és una glicoproteïna dimèrica. Aquesta proteïna es pot trobar en forma glomerular soluble circulant en sang a altes concentracions (0.3 g/l) i també de manera insoluble dipositada en la matriu extracel·lular en forma fibril·lar. La FN està formada per 3 tipus de subunitats repetitives amb insercions de mòduls variables (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003). El 10è domini repetitiu de la subunitat tipus III conté la seqüència d'aminoàcids Arginina-Glicina-Aspàrtic (RGD) que es reconeguda principalment per les integrines $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha v\beta 3$ i és el pas inicial per a l'ensamblatge de la FN a la matriu. La integrina $\alpha 4\beta 1$ reconeix la regió IIIICS, un mòdul variable situat darrera dels dominis crítics per al plegament de la molècula per interaccions FN-FN. La unió de FN als receptors integrina afecta la morfologia, diferenciació i migració cel·lular (Geiger et al., 2001).

En l'esmentat treball anterior (Esparza et al., 1999), es va veure que els receptors integrina implicats en el reconeixement de la FN, i per tant en la conseqüent producció de gelatinases, eren fonamentalment $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha v\beta 3$.

2. Integrines limfocitàries

Les **integrines** són una gran família de receptors de superfície cel·lular que reconeixen la majoria dels components de la ECM. Algunes d'elles també participen en la interacció intercel·lular. Són glucoproteïnes heterodimèriques formades per dues subunitats transmembrana, α i β , la combinació de les quals determina l'especificitat

de la unió. S'han identificat 8 tipus de cadenes β i 18 cadenes α . Existeixen múltiples combinacions de cadenes α i β i es coneixen al menys 24 integrines funcionals diferents en mamífers (Hynes, 1992; Kinashi, 2005). Es classifiquen en funció de la cadena β .

Els limfòcits expressen principalment les integrines de la família $\beta 1$ i $\beta 2$ per unir-se a la ECM i a l'endoteli. Les integrines $\beta 1$ interaccionen amb les proteïnes de la ECM i a més la integrina $\alpha 4\beta 1$ (també anomenada VLA4, *Very late antigen 4*) pot unir-se al receptor de l'endoteli activat VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*). Les integrines $\beta 2$ participen fonamentalment en les interaccions intercel·lulars leucòcit-leucòcit i leucòcit-endoteli. $\alpha L\beta 2$ (LFA1, *Lymphocyte function-associated antigen 1*) s'expressa selectivament en leucòcits i mitjança importants fenòmens adhesius a través de la interacció amb ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3 (*Intercellular adhesion molecule*). També és important l'expressió de la integrina $\alpha v\beta 3$, anomenada també receptor de la vitronectina, que permet la unió a un gran nombre de proteïnes de la ECM.

2.1. Expressió i activació

Els limfòcits expressen constitutivament les integrines i la seva regulació es bàsicament funcional.

L'avidesa (fermesa global) de les interaccions adherents de les cèl·lules està en funció de l'afinitat pel lligand i de la valència (nombre d'enllaços formats). L'afinitat pels lligands es regula per la conformació assolida per l'heterodímer, en canvi la valència es regula per canvis en la distribució de les integrines en la superfície cel·lular.

Les integrines es troben en un equilibri d'estats d'alta i baixa afinitat en la membrana dels limfòcits i la seva activació influencia el balanç entre aquestes formes. S'ha descrit (Takagi and Springer, 2002) que l'estructura plegada del domini extracel·lular i la proximitat de les dues subunitats integrina (α i β) en la regió intermembrana equivalen a una conformació de baixa afinitat, mentre que la distensió de l'estructura i la separació de les cues intracel·lulars es correspon amb una conformació d'alta afinitat (Figura 6).

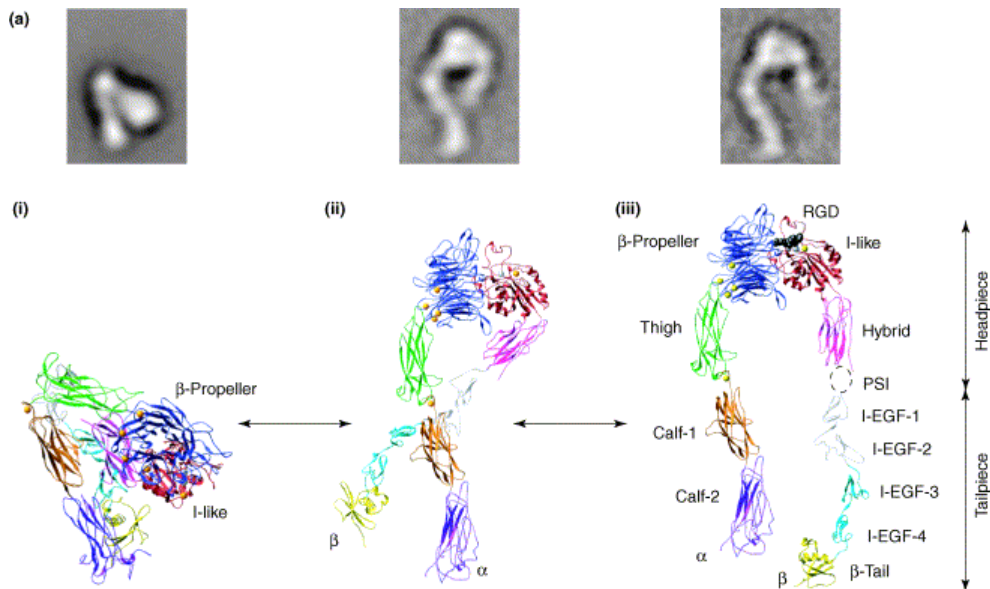


Figura 6. Els canvis de conformació de les integrines regulen els diferents estats d'afinitat. Les imatges de microscopia electrònica del complex $\alpha\beta$ integrina (part superior) i els corresponents models d'estructura atòmica amb diagrames de cintes (part inferior) representen la progressió dels estats d'afinitat: (i) Estructura plegada (baixa afinitat), (ii) conformació semiplejada (afinitat intermitja) i (iii) conformació desplegada amb exposició del domini extracel·lular (*headpiece*) (alta afinitat). (Carman and Springer, 2003).

La valència defineix la capacitat de les integrines de formar enllaços multivalents amb els seus lligands, és a dir d'establir múltiples interaccions, i es regula per la densitat local, difusivitat i distribució dels receptors integrina en la superfície cel·lular. Aquests canvis depenen de senyals intracel·lulars i/o de la unió al lligand. L'agrupació o *clustering* d'integrines és un concepte ampli relacionat amb la valència i es refereix a la redistribució d'integrines per agregar-se en la superfície cel·lular (Figura 7).

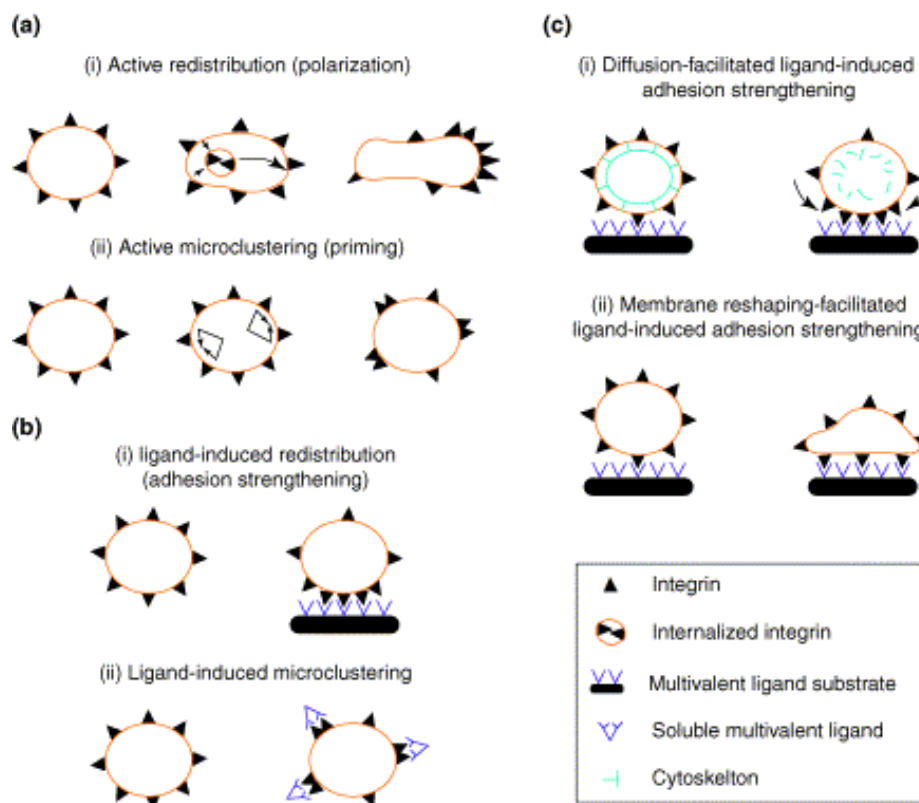


Figura 7. Models de reorganització d'integrines que modifiquen la valència. (a) Reorganització independent del lligand, com ocorre amb la polarització d'integrines al front conductor de cèl·lules en migració; (b) Reorganització dependent del lligand, com la unió a la matriu extracel·lular (i) o bé a substrats solubles (ii); (c) Mecanismes associats a l'adhesió per augmentar la valència d'interacció: canvis en la reorganització del citoesquelet per facilitar la redistribució d'integrines (i) i canvis en la forma cel·lular (*spreading*) (ii). S'anomena redistribució a l'agrupació d'integrines a gran escala i microcluster quan aquesta implica una proximitat de l'ordre de 100 Å (escala submicroscòpica). (Carman and Springer, 2003).

Les integrines permeten als limfòcits establir unions adhesives transitòries amb altres cèl·lules i amb la ECM que són cabdals per a la funcionalitat eficient del sistema immunitari. Els limfòcits en repòs estan en suspensió però ràpidament es tornen adherents en resposta a quimiocines o a antigens. Els canvis d'activació de les integrines han de ser ràpids i flexibles, i per tant és fonamental un mecanisme de senyalització àgil que faciliti un canvi controlat de l'afidesa de les integrines.

2.2. La senyalització integrina

Les integrines transmeten senyals a través de la membrana plasmàtica. La senyalització s'efectua en dues direccions: la senyalització *inside-out* (de dins cap a fora) comprèn senyals intracel·lulars rebudes a través d'altres receptors cel·lulars que modulen la cua citoplasmàtica de les integrines permetent l'afinitat pels lligands. D'altra banda la senyalització *outside-in* (de fora cap a dins) resulta de la unió del lligand a les integrines i transmet senyals intracel·lulars que desencadenen respostes de gran importància biològica (supervivència, proliferació i migració) (Hogg et al., 2003; Takagi et al., 2002).

La cua citoplasmàtica de les integrines és curta i no té activitat enzimàtica intrínseca. La unió lligand-integrina transdueix senyals al citoplasma a través de l'associació a proteïnes adaptadores que connecten la cua de les integrines a proteïnes cinasa, a proteïnes del citoesquelet i a receptors transmembrana de factors de creixement. El *clustering* d'integrines condueix a una sèrie de respostes intracel·lulars que porten a la reorganització del citoesquelet d'actina, un prerequisit per a la modificació de la forma i la migració cel·lular, i també determinen la modulació de l'expressió gènica amb l'activació, entre d'altres, de les proteïnes cinasa MAPK.

La unió integrina a la matriu extracel·lular genera la creació de zones on es concentren proteïnes citoesquelètiques i senyalitzadores que promouen la reorganització dels filaments d'actina. L'actina s'estructura en grans filaments que a la

vegada potencien l'agrupació de més d'integrines i es reforça la unió amb la matriu. Aquests agregats en la membrana plasmàtica formats per l'associació de proteïnes citoplasmàtiques amb la matriu extracel·lular a través de les integrines s'anomenen adhesions focals (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Liu et al., 2000). La composició i regulació de les adhesions focals ha estat àmpliament descrita en fibroblasts, en canvi hi ha un escàs coneixement de l'organització d'aquestes estructures en limfòcits. Atès que el limfòcits tenen una motilitat important es creu que aquestes plataformes adhesives són lleugerament diferents i s'estructuren en zones focals més dinàmiques i difuses (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999; Smith et al., 2005).

2.2.1. Proteïnes relacionades amb la transducció de senyals a través d'integrines

La unió integrina a proteïnes de la matriu extracel·lular genera el reclutament de proteïnes tirosina-cinasa que emeten senyals intracel·lulars a través de cascades de fosforilació (Geiger et al., 2001). La majoria d'estudis de senyalització a partir del *clustering* d'integrines han estat realitzats novament en fibroblasts i per tant existeix una informació més exhaustiva en aquest tipus cel·lular. En limfòcits s'ha vist que la unió a FN o a VCAM-1 mitjançant integrines activa a una sèrie de proteïnes (FAK, Lck, CasL, paxil·lina i Erk) que, en general, es corresponen a les mateixes identificades en altres tipus cel·lulars (Sato et al., 1995).

2.2.1.1. FAK (*Focal Adhesion Kinase*)

FAK (125 kDa) és una proteïna clau en la senyalització integrina. Es tracta d'una proteïna tirosina-cinasa citoplasmàtica que es localitza i s'activa a les adhesions focals després de la unió de les integrines a les proteïnes de la matriu extracel·lular. Es va identificar originàriament en fibroblasts d'embrions de pollastre transformats amb v-Src (Schaller et al., 1992) i subseqüentment es va observar en diversos tipus cel·lulars. Els limfòcits T i B presentaven una expressió basal de FAK, i aquesta era superior en les

línies tumorals limfocítiques T i B (Whitney et al., 1993). Posteriorment, es va descriure que la unió de les integrines $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ als seus respectius lligands induïa l'expressió i l'activació de FAK en limfòcits (Nojima et al., 1995). La interacció de cèl·lules tumorals limfoides amb proteïnes extracel·lulars a través de $\alpha v\beta 3$ també reclutava i activava FAK, a més d'altres elements senyalitzadors, en els complexos de les adhesions focals (Vacca et al., 2001).

FAK està implicada en la progressió del cicle cel·lular, en la regulació de mecanismes de supervivència i en la migració cel·lular (Schaller, 2001). FAK s'ha relacionat amb la migració i la dinàmica de les adhesions focals lligades a integrines, ja que els fibroblasts deficients en FAK (*fak*^{-/-}) presenten sobreacumulació d'adhesions focals i menors taxes de migració, les quals es recuperen amb la seva reexpressió (Ilic et al., 1995; Sieg et al., 1999). En canvi la sobreexpressió de FAK es relaciona amb un augment de la motilitat cel·lular (Cary et al., 1996). FAK està sobreexpressada i activa en molts tumors malignes humans (Owens et al., 1995). Aquest fet es correlaciona amb l'adquisició d'un fenotip invasiu i un augment de la metastasi (Cance et al., 2000; Kornberg, 1998).

FAK conté llargs dominis N- i C- terminals que flanquegen la regió catalítica (Figura 8). La regió N-terminal de FAK conté un domini altament conservat anomenat FERM (per la homologia amb ezrina, radixina i moesina) que és important per a la interacció amb proteïnes del citoesquelet, presenta afinitat d'unió per la cua de la subunitat β de les integrines i també per la regió citoplasmàtica dels receptors tirosina cinasa, com PDGFR i EGFR.

La regió més C-terminal, anomenada **FAT** (*Focal adhesion targeting*), està implicada en la localització de FAK a les adhesions focals. Aquesta regió conté llocs d'unió per a dues de les proteïnes del citoesquelet associades a les adhesions focals, paxil·lina i talina (Hayashi et al., 2002).

FAK també conté en el domini C-terminal dues regions riques en prolines que recluten proteïnes amb dominis SH3 com pCAS i GRAF, que participen, respectivament, en els mecanismes de senyalització mitjançats per FAK i en la regulació de la dinàmica de les adhesions focals.

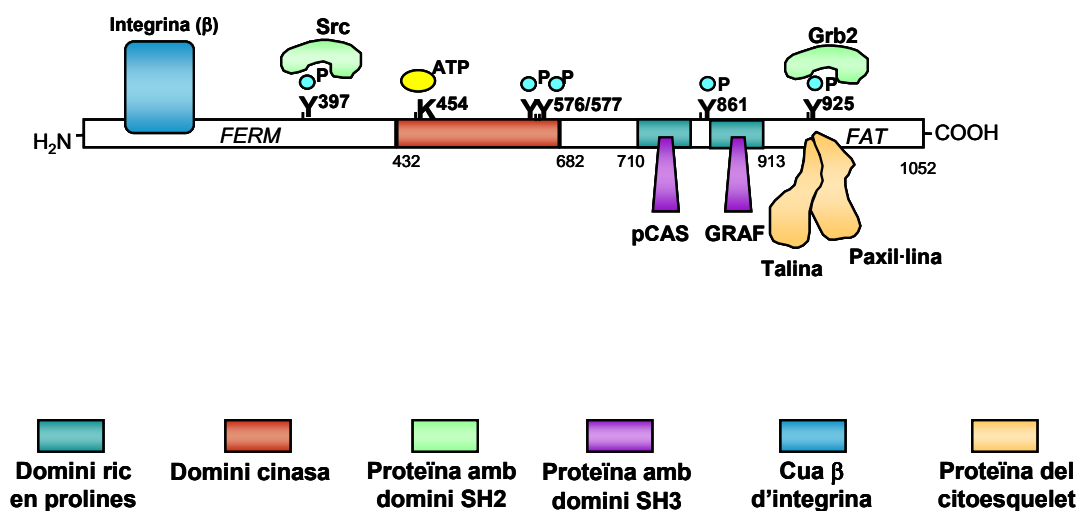


Figura 8: Representació esquemàtica dels principals dominis de FAK. FAK presenta en el domini N-terminal la regió FERM que mitjança la unió de FAK a la cua citoplasmàtica de receptors de membrana, entre ells la cua β de les integrines. El domini catalític central requereix la lisina (K) 454 per unir ATP. La regió C-terminal conté dues regions riques en prolines on es recluten proteïnes amb dominis SH3 (pCAS i GRAF) i l'extrem C-terminal, FAT, té gran afinitat per les proteïnes citoesquelètiques, paxil·lina i talina. FAK es fosforila (P) en diferents residus tirosina (Y). La fosforilació en Y397 i Y925 genera llocs d'unió a proteïnes amb dominis SH2 com Src i Grb2, respectivament.

FAK presenta diferents residus tirosina susceptibles de fosforilació. La tirosina 397 (Y397) és el principal lloc d'autofosforilació. Aquest residu fosforilat genera un lloc d'unió per a proteïnes de tipus SH2, amb gran afinitat per la família de tirosina-cinases Src. També s'ha descrit que es poden unir en aquesta posició la proteïna adaptadora Shc, fosfolipasa C γ (PLC γ) i la subunitat p85 de PI3K. L'activitat tirosina cinasa de FAK es reforça per la fosforilació en les tirosines 576 i 577 dins del domini catalític. La

fosforilació de la tirosina 861 (Y861) facilita la unió de pCAS i la fosforilació de la tirosina 925 (Y925) crea un lloc d'unió per a altres proteïnes de domini SH2 com Grb2, relacionada amb l'activació de la via Ras/MAPK.

FAK es reclutada a les adhesions focals incipients on ràpidament s'activa per autofosforilació en Y397. La fosforilació de Y397 genera un lloc d'unió per a la tirosina cinasa Src. La unió de Src a FAK permet l'activació de Src i es genera una cascada de fosforilació que activa a FAK en els residus tirosina Y576 i Y577 donant lloc a la màxima activitat catalítica de FAK. El complex FAK/Src activa també proteïnes adjacents a les adhesions focals com pCAS, Crk o paxil·lina, que a la vegada activen diferents vies de senyalització (PI3K, JNK i ERK MAPK) vinculades a processos de progressió i migració cel·lular. La proteïna GRAF, localitzada al segon domini ric en prolines, està lligada a la via de les Rho GTPases i participa en la reorganització del citoesquelet. Finalment, la fosforilació de FAK en Y925 crea un lloc d'unió per a la proteïna adaptadora Grb2 de manera que l'activació de FAK es vincula a la via les Ras/ERK2 MAPK. La fosforilació de ERK2 està relacionada amb la modulació de la dinàmica de les adhesions focals, ja que activa MLCK (*miosin light chain kinase*), implicada en la coordinació dels canvis citoesquelètics cel·lulars necessaris per a la migració. La motilitat cel·lular necessita coordinar passos dinàmics d'adhesió i pèrdua de l'adhesió per dissociació de les adhesions focals. Un mecanisme proposat per aconseguir aquest cicle és que subseqüent a l'activació de ERK2 impulsada per FAK/Src, ERK2 pot fosforilar a FAK en la serina 910 (Hunger-Glaser et al., 2004), inhibint així la unió de FAK a paxil·lina i per tant reduint la localització de FAK a les adhesions focals (Figura 9).

La capacitat de FAK de reclutar i/o activar múltiples proteïnes senyalitzadores, estructurals i adaptadores a les adhesions focals, converteixen a FAK en l'eix coordinador central de les vies de senyalització intracel·lulars que es deriven de la unió d'integrines amb proteïnes de la matriu extracel·lular.

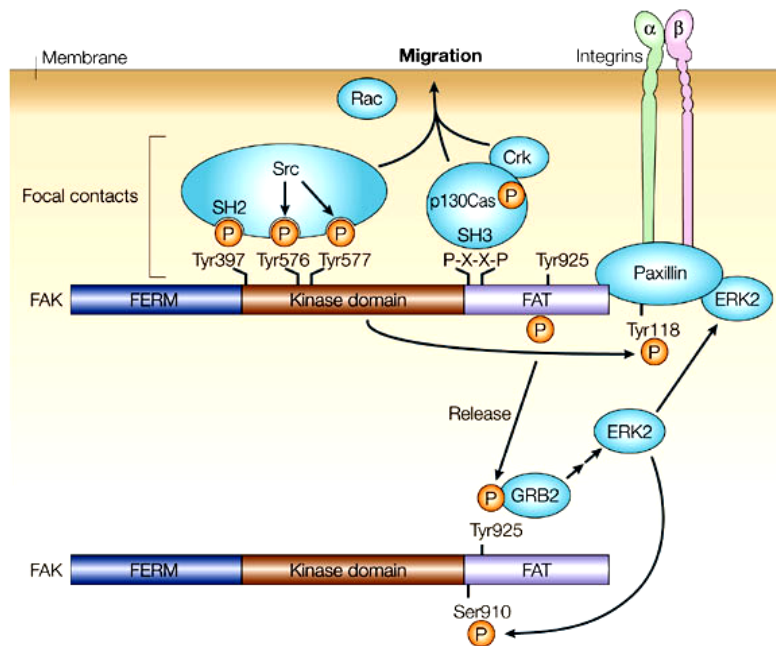


Figura 9. Mecanismes de senyalització promoguts per FAK. El *clustering* d'integrines genera l'activació de FAK per fosforilació en Y397 i la unió de Src. Src incrementa la capacitat cinasa de FAK fosforilant-la en Y576 i Y577. FAK/Src generen una cascada de fosforilacions de les proteïnes associades a FAK, pCAS i paxil·lina, les quals es relacionen amb la migració cel·lular. La fosforilació de FAK en Y925 uneix a Grb2, una proteïna adaptadora per a la via ERK2/MAPK. ERK2 també participa en la migració cel·lular promovent la dissociació de FAK de les adhesions focals per fosforilació en la serina 910. (Mitra et al., 2005).

2.2.1.1.1. FRNK (*Fak-related non-kinase*)

FRNK (43 kDa) és una isoforma de FAK que es troba expressada naturalment en cèl·lules embrionàries de pollastre i en cèl·lules musculars llises durant el desenvolupament murí (Nolan et al., 1999; Taylor et al., 2001). Es forma per *splicing* alternatiu a partir d'un promotor situat en la regió intrònica *downstream* de la regió catalítica. És una isoforma truncada que li manca la part N-terminal i el domini catalític de FAK (Figura 10), igualment es localitza a les adhesions focals però no té activitat catalítica intrínseca. FRNK funciona com un regulador negatiu de l'acció biològica de

FAK (Schaller, 2001; Walker et al., 2003). Degut a què la preservació del domini FAT de FRNK és necessària per a la inhibició de FAK, es considera que FRNK actua desplaçant a FAK de les adhesions focals i competeix per l'acoblament de proteïnes senyalitzadores (Richardson and Parsons, 1996).

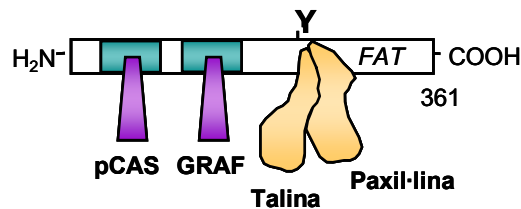


Figura 10. Representació dels dominis de la proteïna FRNK.



Curiosament, encara que en molts tipus cel·lulars l'expressió de FRNK sigui gairebé indetectable, s'ha vist que FAK pot sofrir un tall proteolític per calpaïna o caspases que generen una forma truncada de FAK similar a FRNK (Schaller, 2001).

2.2.1.1.2. PYK2 (*Proline-rich tyrosine kinase 2*)

PYK2 (110 kDa) és una proteïna tirosina-cinasa que té una gran homologia amb FAK (~45%), sobretot en el domini catalític i a les regions de fosforilació en tirosines (~60%). PYK2 comparteix dominis d'unió amb FAK: interacciona amb la família de les tirosina-cinases Src quan es fosforila en la tirosina Y402 (homòloga a Y397 de FAK) i amb Grb2 per la fosforilació de la tirosina 881 (homòloga a Y925 de FAK). També té dues regions riques en prolines i s'uneix amb la proteïna citoesquelètica paxil·lina pel domini C-terminal. Aquesta proteïna es troba expressada principalment per cèl·lules del sistema nerviós, per l'endoteli i per cèl·lules hematopoiètiques, mentre que FAK té una expressió menys restringida.

Malgrat l'homologia estructural, FAK i PYK2 divergeixen en els mecanismes de senyalització. PYK2 respon a canvis de calci citoplasmàtic i, a diferència de FAK, s'activa lleument en resposta a la unió a FN a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Avraham et al., 2000). Aquesta activació deficient de PYK2 per integrines pot ser deguda a que PYK2 té una distribució citoplasmàtica perinuclear, en canvi el domini FAT de FAK té una gran afinitat per localitzar-se a les adhesions focals. A més, la menor similitud de seqüència del domini FERM les diferencia en l'associació a certes proteïnes diana, i explica la manca de redundància funcional entre totes dues proteïnes.

2.2.1.2. Src

Src (~60 kDa) és una família de proteïnes tirosina cinasa que es va descobrir a partir de l'oncogen *v-src*, responsable de la formació de tumors en pollastres infectats pel virus del sarcoma de Rous (Hunter and Sefton, 1980). La família de les Src tirosina-cinases està formada per diferents proteïnes estructuralment homòlogues (Thomas and Brugge, 1997). El proto-oncogen *c-Src* té una distribució ubiqua al igual que la seva homòloga Yes. La família de les Src tirosina cinases és molt important en la transducció de senyals través de la membrana dels limfòcits. La proteïna homòloga Lck és específica de limfòcits T i està sobreexpressada en leucèmies limfocítiques agudes. Un altre membre de la família Src, Fyn, es distribueix ubiquament però a més té una isoforma anomenada Fyn T específica de limfòcits T. Les formes Fgr i Lyn són les representants de limfòcits B i cèl·lules mieloides i estan sobreexpressades en algunes leucèmies i limfomes.

Les Src cinases tenen un residu tirosina de regulació negativa (Y530) en el domini C-terminal i contenen 4 dominis SH. El domini SH1 cinasa conté un lloc d'autofosforilació (Y419). El domini SH2 interacciona amb el lloc de regulació negativa Y530 i el domini SH3 s'uneix al domini cinasa en la forma inactiva de la proteïna. El domini SH4 conté un lloc de miristilació que es necessari per a la localització en la

membrana. La regulació de l'activitat de Src inclou a receptors tirosina cinasa i fosfatases citoplasmàtiques. La fosforilació de Y530, típicament per la cinasa Csk, condueix a la inhibició de Src per la unió intramol·lecular amb el domini SH2 (Figura 11). D'altra banda, fosfatases com PTP α poden eliminar aquest fòsfor activant de nou a Src (Zheng et al., 1992). A més la unió de FAK (o pCAS) als dominis SH2 i SH3 dóna lloc a la conformació activa de Src (Burnham et al., 2000; Schaller et al., 1994).

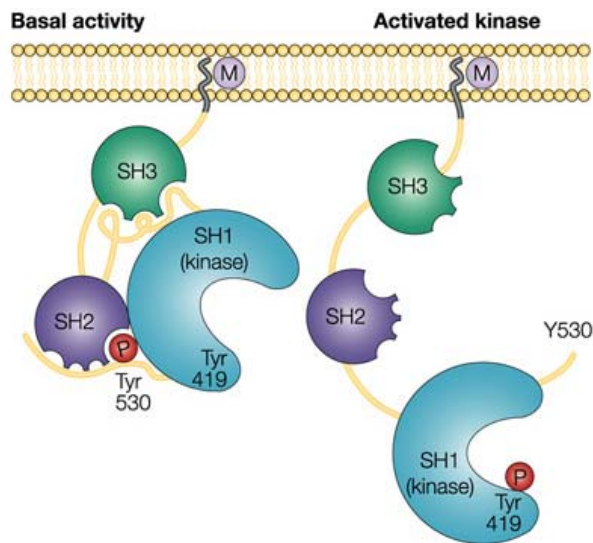


Figura 11. Dominis i mecanisme d'activació de Src. Src s'inactiva per la fosforilació en la tirosina 530 i el subseqüent replegament de la molècula per la unió d'aquest residu al domini SH2. D'aquesta manera s'impedeix l'accés dels substrats al domini cinasa, ja que en aquesta estructura interacciona el domini SH3 i el lloc catalític. L'activació s'aconsegueix amb la desfosforilació de Y530 i l'obertura de la conformació, completant-se l'activació amb la fosforilació de la tirosina 419. M: miristolil·li; P: fosforilació. (Yeatman, 2004).

La conformació inactiva de Src presenta localització pericel·lular, però la seva activació provoca la unió a actina a través del domini SH3. Src activa es transloca a la perifèria cel·lular on Src s'uneix a la membrana plasmàtica per miristolil·li i es reforça

la posició en les adhesions focals per interacció amb les proteïnes reclutades per les integrines.

Les Src cinases actives i localitzades a la cara interna de la membrana cel·lular poden fosforilar altres molècules amb dominis SH2 presents en les adhesions focals. S'han identificat una gran varietat de substrats de Src, entre ells proteïnes de les adhesions focals, proteïnes adaptadores i factors de transcripció.

Les Src controlen l'adhesió, migració i invasió i també la proliferació cel·lular. A l'igual que les cèl·lules *fak*^{-/-}, els mutants *src*^{-/-} presenten adhesions focals més llargues i menys organitzades i en conseqüència una motilitat deficient (Ilic et al., 1995). La disregulació de Src repercuteix en aquestes funcions i contribueix a la progressió tumoral i metàstasi. S'ha observat sobreexpressió i sobreactivació de Src en diversos càncers (Irby and Yeatman, 2000), i en moltes neoplàsies s'ha vist concordança entre la sobreexpressió de FAK i/o de Src, i l'increment d'invasió i metàstasi (Boyer et al., 2002; Owens et al., 1995; Summy and Gallick, 2003).

2.2.1.3. Substrats de FAK/Src

A més de FAK i Src, una sèrie d'altres molècules amb capacitat senyalitzadora i adaptadora són reclutades a les adhesions focals. FAK o el complex FAK/Src està implicat en la fosforilació de diversos substrats, de manera que la cascada de senyals s'amplifica de forma complexa i multivalent.

Entre els substrats de FAK/Src cal destacar **pCAS** (130 kDa). pCAS (*Crk-associated substrate*) és una proteïna adaptadora que s'uneix a la primera regió rica en prolines de FAK a través del domini SH3 (Harte et al., 1996). Després de la unió integrina a la matriu extracel·lular FAK i/o Src, o bé Crk, activen pCAS per fosforilació, de manera que fosfo-pCAS pot reclutar proteïnes amb domini SH2 (Crk, Nck o Grb2) activant així la via de les MAPK ERK i JNK.

pCAS està relacionada amb la migració ja que cèl·lules *knock-out* en pCAS presenten un ensamblatge deficient dels filaments d'actina i una migració reduïda (Honda et al., 1999). FAK estimula la migració cel·lular a través d'un mecanisme que depèn de la unió de Src i de la interacció pCAS/Crk. El complex pCAS/Crk es localitza al front migratori cel·lular i la inhibició de la seva formació impedeix la quimiotaxi i l'haptotaxi (Klemke et al., 1998). Crk, a través de SH2 o SH3, pot reclutar a DOCK180 en la membrana cel·lular i activar així a Rac i aquesta a JNK (Dolfi et al., 1998), les quals són vies importants en la regulació de l'expressió gènica. De la mateixa manera Crk també pot activar a ERK a través de Ras o bé a PI3K (Akagi et al., 2002), exercint un paper regulador en el control dels mecanismes d'ensamblatge de l'actina i miosina necessaris per a la migració.

Els limfòcits presenten una proteïna homòloga **CasL** (105 kDa). CasL s'activa per fosforilació després de la unió dels limfòcits a la matriu extracel·lular i la seva fosforilació està regulada per FAK (Minegishi et al., 1996).

Un altre substrat important de FAK/Src és **paxil·lina**. Paxil·lina (68 kDa) és una proteïna adaptadora que recluta un gran nombre de proteïnes senyalitzadores. Es localitza a les adhesions focals per interacció directa amb la cua citoplasmàtica de les integrines, principalment a través de $\alpha 4$, i amb les proteïnes del citoesquelet a través de l'associació amb les proteïnes estructurals tubulina i vinculina (Han et al., 2003). FAK s'uneix a paxil·lina a les adhesions focals pel domini C-terminal FAT (Tachibana et al., 1995). El complex FAK/Src, format després de l'activació de FAK en Y397, pot fosforilar a paxil·lina en 2 residus Y31 i Y118. La fosforilació d'aquests aminoàcids genera la creació de llocs d'unió tipus SH2, de manera que paxil·lina també es vincula a la regulació de cascades de senyalització intracel·lular. Paxil·lina pot unir Crk, i les fosfatases PTP-PEST (defosforila pCAS i la pròpia paxil·lina) i Csk (inhibeix l'activitat de Src) (Turner, 2000). L'activació de paxil·lina està relacionada amb el control de la dinàmica de les xarxes del citoesquelet d'actina que permeten els canvis en la forma i

la migració cel·lular. Mutacions en paxil·lina inhibeixen la dinàmica de les adhesions focals necessària per a la migració cel·lular (Webb et al., 2004).

2.2.2. MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)

Les **MAPK** són una família d'enzims que intervenen en la senyalització limfocitària transmetent senyals extracel·lulars que condueixen a l'activació de factors de transcripció (Yang et al., 2003). Moltes de les senyals iniciades per receptors integrina convergeixen en la via de les MAPK.

Les diferents vies d'activació comparteixen les mateixes característiques generals: s'inicien amb l'activació d'una proteïna G petita de la família de GTPases per un factor d'intercanvi de nucleòtids de guanina (GEF, *Guanine exchange factor*) i continua amb una triple activació seqüencial de diferents membres de les MAPK que es fosforilen en cascada uns als altres. La GTPasa activa el primer enzim de la cascada, una proteïna-cinasa anomenada MAPKKK. Aquesta activa una segona cinasa anomenada MAPKK que un cop fosforilada activa a la proteïna cinasa MAPK per doble fosforilació en els residus tirosina i treonina separats per un sol aminoàcid. Es distingeixen 4 subfamílies de MAPK, ERK/MAPK, JNK/SAPK, ERK5/BMK1 i p38/HOG, en funció de la seqüència d'aquest darrer domini d'activació (Chang and Karin, 2001; Cobb and Goldsmith, 2000). Aquesta MAPK doblement fosforilada pot activar els factors de transcripció, ja sigui directament o bé través d'altres proteïna cinases. Una part de les MAPK activades es transloca al nucli i promou l'activació de factors de transcripció, la resta roman al citoplasma i regula l'expressió gènica a través de facilitar l'import de factors de transcripció citoplasmàtics al nucli o a través de modular a co-reguladors transcripcionals.

El factor de transcripció millor estudiat en el qual convergeixen moltes de les senyals extracel·lulars conduïdes per la via de les MAPK és AP-1. AP-1 és un heterodímer format per dues subunitats, c-Fos i c-Jun, i les MAPKs regulen els nivells

d'expressió dels gens que codifiquen per aquests factors de transcripció. Com es deia en la secció 1.2.1, AP-1 té un domini d'unió present en el promotor de la majoria dels gens de les MMPs.

La regulació dels gens c-Jun i c-Fos és molt complexa i estan implicades múltiples cascades de senyalització. ERK, JNK i p38 poden fosforilar a Elk-1 i ERK i p38 poden activar a SAP-1. Tant SAP-1 com Elk-1 augmenten la transcripció del gen de c-Fos. c-Jun està majoritàriament regulat per JNK. c-Jun s'autoregula positivament unint-se al seu promotor dimeritzant amb ATF-2, el qual està activat per JNK, p38 i ERK (Figura 12).

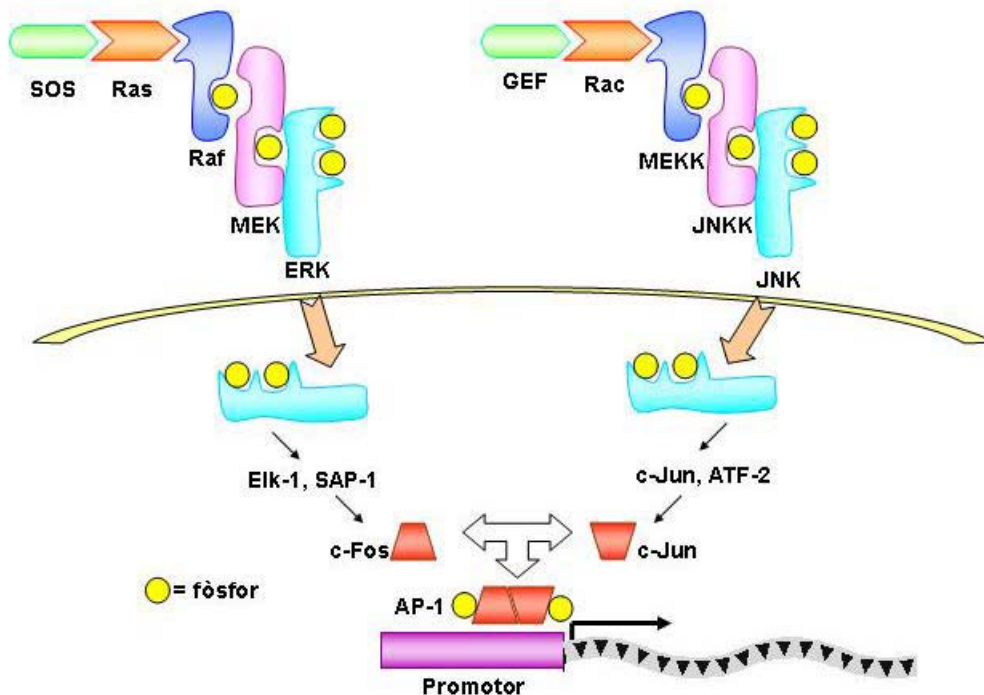


Figura 12. Cadena de fosforilació de les MAPK que duen a l'activació d'AP-1.

Molècules amb funció GEF activen a GTPases de la família Ras i Rho (Ras i Rac) en resposta a estímuls extracel·lulars. Les GTPases promouen una triple cascada d'activació seqüencial de MAPK: MAPKKK (Raf i MEKK) activa a MAPKK (MEK i JNKK) i aquesta a MAPK (ERK i JNK). MAPK doblemet fosforilada es trasloca al nucli on regula l'expressió gènica, activant, entre d'altres, a c-Jun i c-Fos que constitueixen el factor de transcripció AP-1.

JNK, ERK, p38 i ERK5 poden fosforilar a altres factors de transcripció com NFAT, SP1, c-Myc, p53, STAT, etc. (Edmunds and Mahadevan, 2004).

JNK i p38 s'activen en resposta a factors d'estrès i a citocines inflamatòries, mentre que ERK respon més eficientment a factors de creixement i a canvis en l'adhesió (Aplin et al., 2002). A més ERK2 està relacionat amb la reorganització del citoesquelet (Ridley et al., 2003).

2.2.3. PI3K/Akt

Les integrines també són importants en l'activació de la via de **PI3K** (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). Aquestes senyals controlen la supervivència, el metabolisme i la migració cel·lular a través de lípids que actuen de segon missatgers (Vanhaesebroeck et al., 2001).

La família de les PI3K es pot dividir en diferents classes. La classe I està relacionada amb la senyalització i estimulació dels limfòcits. Dintre de la classe I es distingeix la subclasse IA que respon a receptors associats a tirosina cinasa, i la subclasse IB que s'activa per receptors acoblats a proteïnes G. Les classes II i III s'ha vist que poden regular el transport de vesícules (Simonsen et al., 2001), i poden estar implicades en processos d'endocitosi, fagocitosi o transport de productes biosintètics, però les seves característiques no estan tan ben estudiades.

PI3K de classe IA és una cinasa lipídica heterodimèrica formada per una subunitat reguladora (p85 α , p85 β i p55 γ) i una subunitat catalítica (p110 α , p110 β i p110 δ). Les subunitats reguladora i catalítica de la classe IB són, respectivament, p101 i p110 γ . La subunitat catalítica pot ser activada per la GTPasa Ras (Rodríguez-Viciano et al., 1994). La funció de les cinases PI3K de classe I és convertir el fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfat (PIP2) en fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfat (PIP3) en la cara interna de la membrana plasmàtica (Figura 13). PIP3 té llocs d'unió per a molts enzims intracel·lulars que tenen el domini d'homologia Pleckstrin (PH). Una de les molècules

que s'uneix a PIP3 i és la proteïna serina/treonina cinasa Akt. Akt, també anomenada PKB, es trasloca a la membrana plasmàtica on s'uneix als PIP3 i s'activa per fosforilació en la serina 473 i en la treonina 308. Amb la fosforilació d'aquest darrer residu, Akt esdevé catalíticament activa. Akt/PKB regula diverses vies de senyalització que promouen la supervivència i la proliferació cel·lular, les quals estan alterades en diversos càncers (Altomare and Testa, 2005).

Per al correcte funcionament d'aquests segons missatgers es necessari mantenir un equilibri de PIP3 respecte a formes bisfosforilades. Les fosfatases lipíques SHIP i PTEN inactiven a PIP3 donant lloc a fosfatidilinositol-(3,4)-bisfosfat i fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfat respectivament. *PTEN* és un conegut gen supressor de tumors i *PTEN* és la principal fosfatasa inhibidora de la via PI3K/Akt (Sansal and Sellers, 2004).

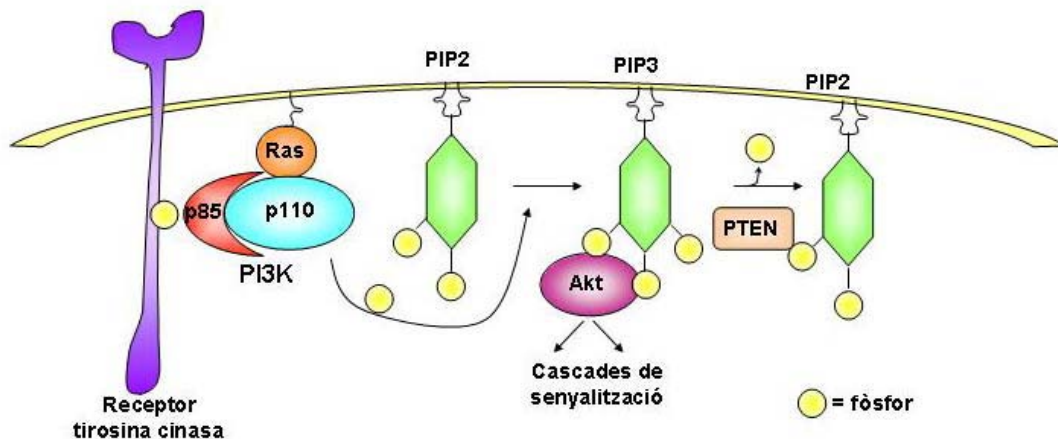


Figura 13. Mecanisme de senyalització de PI3K classe I. El domini regulador (p85) s'uneix al domini catalític (p110), creant una PI3K funcionalment activa. PI3K fosforila a fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfat (PIP2) unit a la membrana plasmàtica generant fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfat (PIP3). PIP3 uneix a diverses molècules efectores, com Akt, la qual participa en nombroses vies de senyalització. PIP3 es desfosforila per les fosfatases PTEN o SHIP, recuperant a una forma lipídica bisfosforilada. (Adaptat de (Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2003).

La subunitat reguladora de PI3K, p85, pot unir-se a FAK fosforilada en Y397 a través de dominis SH2, però p85 α i p85 β també tenen dominis rics en prolines, dominis SH3 i dominis Rho-GAP i per tant poden realitzar altres interaccions amb proteïnes intracel·lulars. Per exemple p85 es pot unir a Crk, i Crk s'uneix a FAK a través de pCAS fosforilada (Akagi et al., 2002), o bé pot unir-se a les Rho GTPases Cdc42 i Rac independentment de la subunitat catalítica (Jimenez et al., 2000). A més les Rho GTPases tenen una o més regions PH i poden unir-se a PIP3. Com veurem en el següent apartat aquestes Rho GTPases participen en la regulació del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.

2.3. Paper de les integrines en la migració cel·lular

La migració cel·lular és un element clau en processos fisiològics i patològics com la reparació tissular, la resposta immunitària, la infiltració inflamatòria o el càncer.

La migració és un procés integrat que requereix la formació continua i coordinada d'adhesions que es fan i desfan de forma cíclica. Aquest mecanisme és coneix com a *turnover* de les adhesions focals i implica la interacció regulada de múltiples molècules i l'activació de vies de senyalització específiques. La cèl·lula en migració es polaritza i forma protrusions al front conductor (*leading edge*) en resposta a estímuls quimiotàctics. Al *leading edge* es concentra l'activitat PIP3 ja que s'acumulen PI3K i Akt, mentre que PTEN es desplaça al front posterior (*rear edge*). Les integrines són receptors fonamentals en la migració perquè actuen com els peus de la cèl·lula en moviment: generen punts de suport per a la cèl·lula adherint-la a la ECM o a altres cèl·lules i els connecten als filaments d'actina de l'interior cel·lular. Així, la unió integrina amb la ECM estabilitza l'adhesió i inicia la formació de les adhesions focals on es recluten proteïnes senyalitzadores (FAK, Src, pCas, etc.) i citoesquelètiques (paxil·lina, talina, etc). Aquestes plataformes proteiques actuen com a punts de tracció que arrossegueu el cos cel·lular. Per permetre l'avanç i completar el

cicle migratori cal la dissociació de les adhesions al front posterior, també anomenat uròpod en limfòcits, on també participen molècules adjacents a les adhesions focals, entre elles el complex FAK/Src i PTEN. (Figura 13).

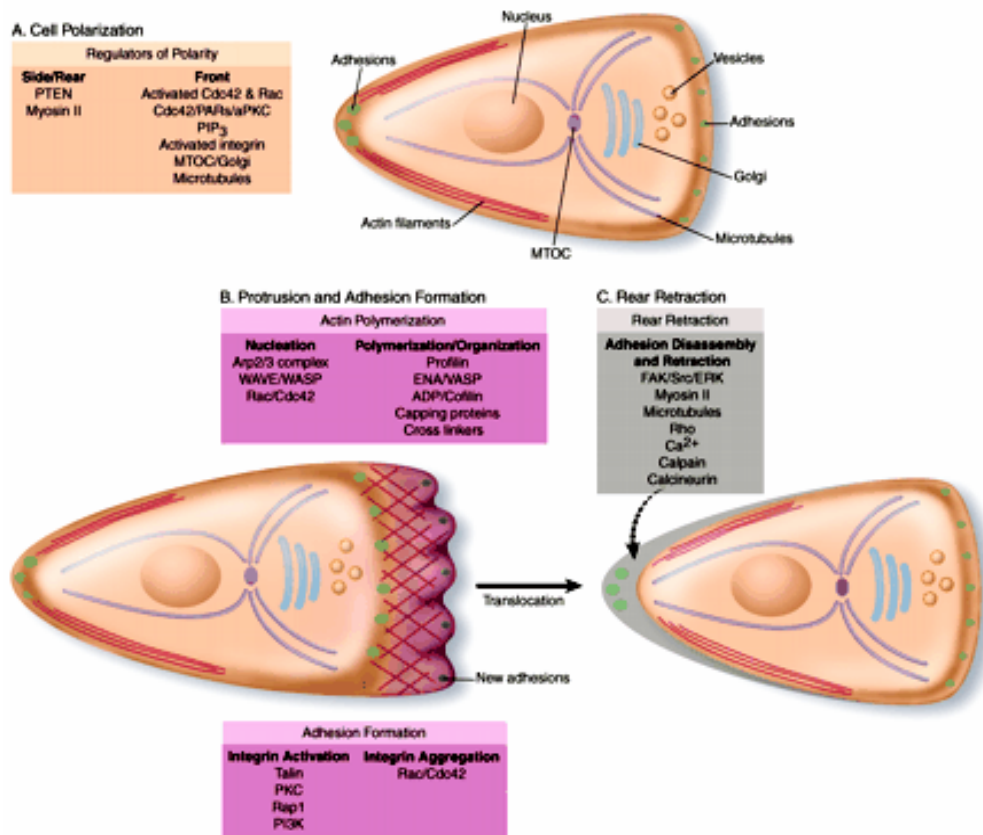


Figura 13. Etapes de la migració cel·lular. **A.** La polarització cel·lular és intrínseca a la migració i s'inicia amb un estímul quimiòtactic que genera canvis intracel·lulars. Cdc42 i Rac impulsen la formació de protrusions al front conductor (*leading edge*) i PTEN i miosina II regulen la despolarització al front posterior (*rear edge*). **B.** Al front conductor es polimeritza l'actina i les protrusions es converteixen en adhesions estables que serviran de punts de tracció. L'activació integrina dona lloc al reclutament dels components estructurals i senyalitzadors (Fak, Src, paxil·lina, talina) a les adhesions focals creixents. **C.** Simultàniament al front posterior es dissocien les adhesions per permetre la retracció del cos cel·lular, fenomen en el que possiblement participen FAK, Src, Rho, miosina II, etc. Moltes d'aquestes molècules també podrien reestructurar les adhesions al front cel·lular, darrera el front conductor. (Ridley et al., 2003)

La família de les GTPases petites Rho (Cdc42, Rac, Rho) controlen l'organització del citoesquelet d'actina-miosina i per tant l'estructura i la dinàmica migratòria. El seu paper està molt ben caracteritzat en fibroblasts (Hall, 1998; Ridley, 2001). Cdc42 i Rac organitzen les xarxes d'actina de les noves adhesions en el *leading edge* de les cèl·lules en moviment. Cdc42 forma els filopodia (petites protrusions llargues i fines de la perifèria cel·lular formades per fibres d'actina) i Rac activa la formació de lamellipodia (fines estructures planes compostes per xarxes de polímers d'actina que es projecten des de la superfície cel·lular). Rho participa en la formació de fibres d'estrès (feixos axials de fibres d'actina que sustenten el cos cel·lular) i en la maduració de les adhesions preformades a través de les cinases ROCK i MLCK que regulen l'activació del citoesquelet d'actina-miosina. Rho també regula el desacoblament de les adhesions al *rear edge* cel·lular i la retracció cel·lular a través de l'activació de MLC fosfatasa que desfosforila a miosina. Les Rho GTPases també existeixen en els limfòcits i la seva organització s'assimila a la dels fibroblasts (D'Souza-Schorey et al., 1998; Smith et al., 2003).

Les integrines, mitjançant el reclutament de FAK, poden modular els canvis en la polimerització de les fibres d'actina-miosina conduïts per Rho GTPases. D'una banda, FAK pot activar Rac a través de pCAS/Crk i DOCK180. En els limfòcits equivalen a CasL/CrkL i DOCK2 (Hogg et al., 2003). FAK pot augmentar la tensió de les fibres d'estrès a través de l'activació de p190RhoGEF, el qual indirectament activa MLCK. Però també en el segon domini ric en prolines de FAK uneix la GTPasa **GRAF** (*GTPase regulator associated with focal adhesion kinase*) que s'ha relacionat amb la hidròlisi de Rho (Hildebrand et al., 1996; Taylor et al., 1998) i la seva associació a FAK donaria lloc a la despolarització cel·lular per la reducció de l'activitat MLCK (Webb et al., 2004).

Les integrines, a través de FAK i la conseqüent unió de Src, esdevenen un nexe elemental en la transmissió de senyals procedents de la matriu extracel·lular cap a nombroses vies de senyalització intracel·lulars que regulen l'adhesió i la motilitat cel·lular. Per dirigir-se cap a estímuls externs la cèl·lula necessita la continua formació i dissociació de punts de tracció acompanyats de la reorganització en el citoesquelet. A més, la migració sovint necessita associar-se a la proteolisi de la matriu extracel·lular per trencar les barreres fisiològiques i continuar avançant. La migració cel·lular en conjunció amb la producció de MMPs confereix el marc conceptual necessari per a la invasió.

3. Implicacions de la producció de MMPs pels limfòcits en processos fisiològics i patològics.

3.1. Transmigració limfocitària.

Els limfòcits contínuament recirculen de la sang als teixits, passen pels limfàtics i tornen a la sang per acomplir el procés de vigilància immunològica. Els limfòcits constantment recorren tot l'organisme reseguint indicis de lesió i/o infecció, i en cas de detectar senyals moleculars indicadores d'agressió ràpidament s'acumulen en el teixit danyat. Tant la recirculació com l'extravasació limfocitària cap al focus inflamatori necessiten la transició d'un estat circulatori lliure a un estat migratori que propiciï el pas a través de l'endoteli vascular. Tots dos fenòmens segueixen un mecanisme estrictament regulat molt similar que es compon de 4 etapes coordinades seqüencialment (Springer, 1994). (Figura 14).

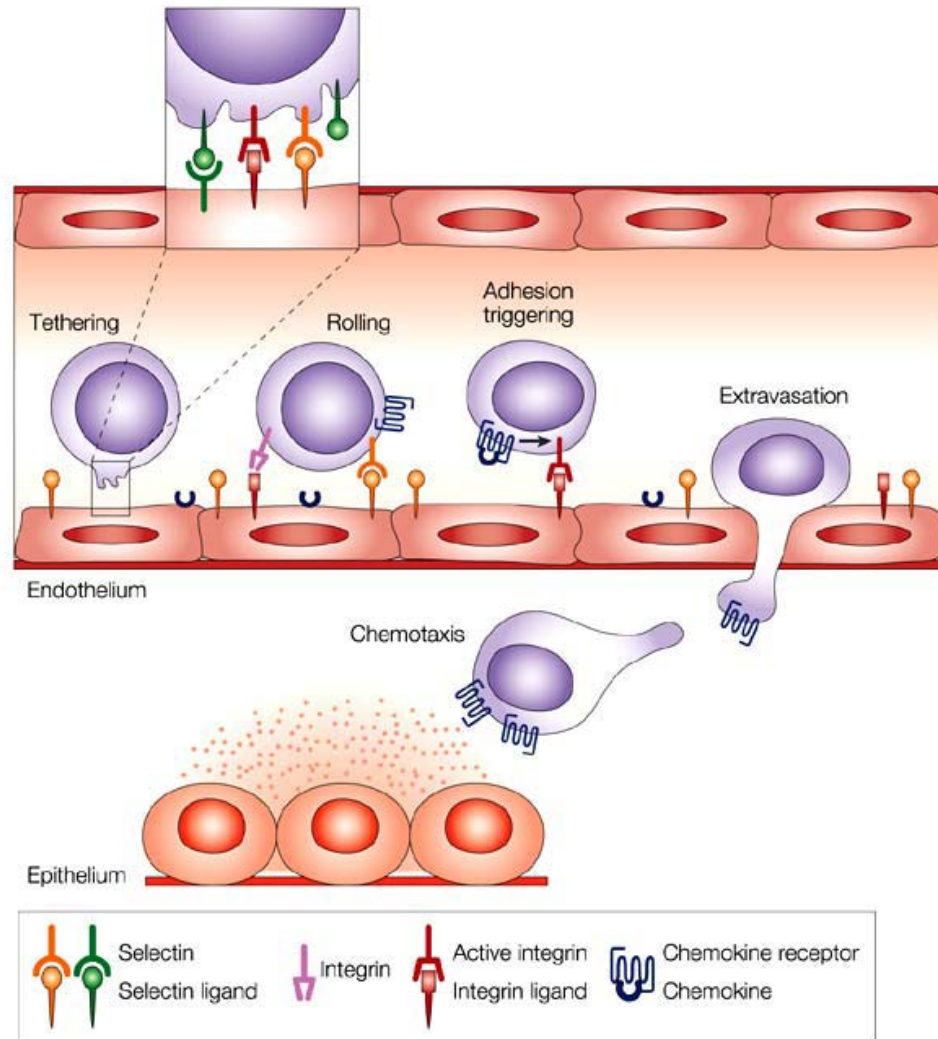


Figura 14. Etapes del procés de transmissió limfocitària. El mecanisme d'infiltració limfocitària està dirigit per factors quimiotàctics, principalment quimiocines, i per la interacció entre molècules d'adhesió. Es distingeixen 4 etapes: els limfòcits circulants es poden enganxar (**tethering**) i llavors rodolar (**rolling**) sobre l'endoteli vascular a través d'unions transitòries entre selectines i lligands carbohidrats. Amb el rodolament els limfòcits rastregen senyals quimiotàctiques que activaran les integrines i impulsaran una adhesió més ferma (**triggering adhesion**) del limfòcit sobre l'endoteli. Més senyals quimiotàctiques indueixen la polarització dels limfòcits i dirigeixen la migració del limfòcit a través de la capa endotelial cap a l'espai extravascular (**extravasation**). (Kunkel and Butcher, 2003).

La transmigració s'inicia per estímuls pro-inflamatoris que redueixen la velocitat del flux sanguini i indueixen canvis en la superfície de l'endoteli inflamat, principalment l'expressió de selectines, de manera que permeten una adhesió làbil (*tethering*) del limfòcit sobre el vas i provoquen l'alentiment i el rodolament (*rolling*) dels limfòcits damunt la superfície endotelial. Seguidament es reforça aquesta adhesió perquè agents quimiotàctics (quimiocines) activen les integrines limfocitàries. Posteriorment s'estabilitza plenament l'adhesió limfòcit-endoteli amb la interacció de les integrines amb els seus contrareceptors, els membres de la superfamília de les immunoglobulines. Després certes quimiocines indueixen la polarització dels limfòcits necessària per a la transmigració (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999): es produeixen canvis en el citoesquelet que redistribueixen les molècules d'adhesió per facilitar la incursió dels limfòcits a través de l'endoteli cap a un estímul quimiotàctic i reclutar nous limfòcits que amplificaran la cascada inflamatòria. Finalment, un cop els limfòcits han transmigrat a través de les unions intercel·lulars de l'endoteli, les integrines interaccionen amb les proteïnes de la ECM per permetre la migració dels limfòcits a través de la membrana basal i posteriorment a través de la matriu intersticial. Aquesta progressió cap als teixits requereix la degradació local de les proteïnes de matriu extracel·lular. Tal com hem vist, la interacció de les integrines amb la matriu extracel·lular indueix la producció de MMPs pels limfòcits, de manera que els mecanismes que utilitzen els limfòcits per reconèixer l'entorn i progressar a través de la ECM són els mateixos que impulsen la degradació focal de la matriu. Aquest fenomen és de gran importància biològica per al desenvolupament de lesions inflamatòries i per a la progressió de les síndromes limfoproliferatives.

3.2. MMPs en la inflamació

Els nivells de moltes MMPs estan augmentats o disregulats en les patologies de caràcter inflamatori. Així, les MMPs han estat relacionades amb diverses malalties

inflamatòries cròniques que comporten la destrucció tissular, entre elles l'artritis reumatoide, l'esclerosi múltiple o les vasculitis.

L'artritis reumatoide és una malaltia inflamatòria crònica que es caracteritza per la degradació proteolítica que culmina amb la destrucció del cartílag articular, provocant la pèrdua funcional de l'articulació. Les MMPs contribueixen a la destrucció progressiva de l'articulació causant la degradació del cartílag i de l'os. MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 i MMP13 han estat associades a aquesta acció. Les MMPs també són importants en el procés angiogènic que caracteritza aquesta malaltia (Cawston, 1998; Cawston and Billington, 1996; Walsh, 1999).

L'esclerosi múltiple és una malaltia neuroinflamatòria que danya el sistema nerviós central. Les MMPs poden degradar la mielina i també afectar la integritat de la barrera hematoencefàlica. S'han detectat diverses MMPs en el cervell de pacients amb esclerosi múltiple i també en el model d'encefalomielitis al·lèrgica experimental (MMP2, MMP7, MMP9 i MMP12) (Rosenberg, 2005). MMP9 es considera una de les molècules immune-efectores que més clarament s'associa a la patogènesi de l'esclerosi múltiple (Cuzner and Opdenakker, 1999; Gijbels et al., 1992), ja que té com a substrat varies proteïnes rellevants en aquesta patologia: mielina, molècules d'adhesió, citocines i quimiocines. D'altra banda, els pacients amb esclerosi múltiple presenten menors concentracions de TIMPs en el fluid cerebroespinal i en el plasma. L'interferó β , el qual s'utilitza com mesura terapèutica per aturar la progressió de la malaltia, redueix els nivells de MMP9 i activa la producció de TIMP1 (Karabudak et al., 2004; Yong et al., 1998; Yushchenko et al., 2003). A la vegada, MMP9 també pot degradar l'interferó β , per la qual cosa es planteja una possible teràpia combinada d'interferó β amb inhibidors de les MMPs (Opdenakker et al., 2003).

Donada la trajectòria del grup de recerca en el que s'inscriu aquest treball, ens centrarem en l'arteritis de cèl·lules gegants com a situació patològica per a explorar la intervenció de les MMPs en aquest context inflamatori.

3.2.1. Arteritis de cèl·lules gegants

L'**arteritis de cèl·lules gegants** o arteritis de Horton és una malaltia inflamatòria granulomatosa crònica que afecta les artèries de mida mitjana i gran (Salvarani et al., 2002; Seo and Stone, 2004). Les manifestacions clíniques clàssiques es deuen principalment a la inflamació de les branques supraòrtiques de l'àrea craneocervical que causen diferents símptomes locals (p. ex.: cefalea, claudicació mandibular i diversos dolors facials). Com a resultat de la important reacció inflamatòria, aquests pacients també presenten diversos símptomes sistèmics (febre, pèrdua de pes, anèmia i augment de les proteïnes de fase aguda). Aquesta malaltia és la vasculitis sistèmica més freqüent a Europa i Nord-Amèrica i incideix en persones majors de 50 anys, preferentment dones (Boesen and Sorensen, 1987; Gonzalez-Gay et al., 1992).

Segons es dedueix de diferents treballs sobre aquesta patologia, la reacció inflamatòria de l'arteritis de cèl·lules gegants sembla originar-se a partir d'una resposta immune tipus Th1 contra antígens encara no identificats presents en la paret vascular (Cid et al., 1998; Weyand and Goronzy, 2003). Segons la diferenciació funcional Th1, els limfòcits T CD4+ que infiltren la paret vascular produeixen IFN γ . El IFN γ és una citocina clau en l'activació dels macròfags i en la seva diferenciació granulomatosa amb la formació de cèl·lules gegants típiques d'aquesta malaltia. Els macròfags activats produeixen importants quantitats de radicals lliures i metal·loproteïnases (Rittner et al., 1999) i també generen citocines i factors de creixement que repercuteixen en la reacció sistèmica característica d'aquesta malaltia (Cid et al., 1998; Hernandez-Rodriguez et al., 2004). Tots aquests mecanismes contribueixen al trencament de la làmina elàstica interna i indueixen la hiperplàsia de la capa íntima,

causant la reducció i fins i tot l'oclusió de la llum vascular (Figura 15). L'obturació de la llum vascular causa complicacions isquèmiques que afecten a un 15-20% del pacients.

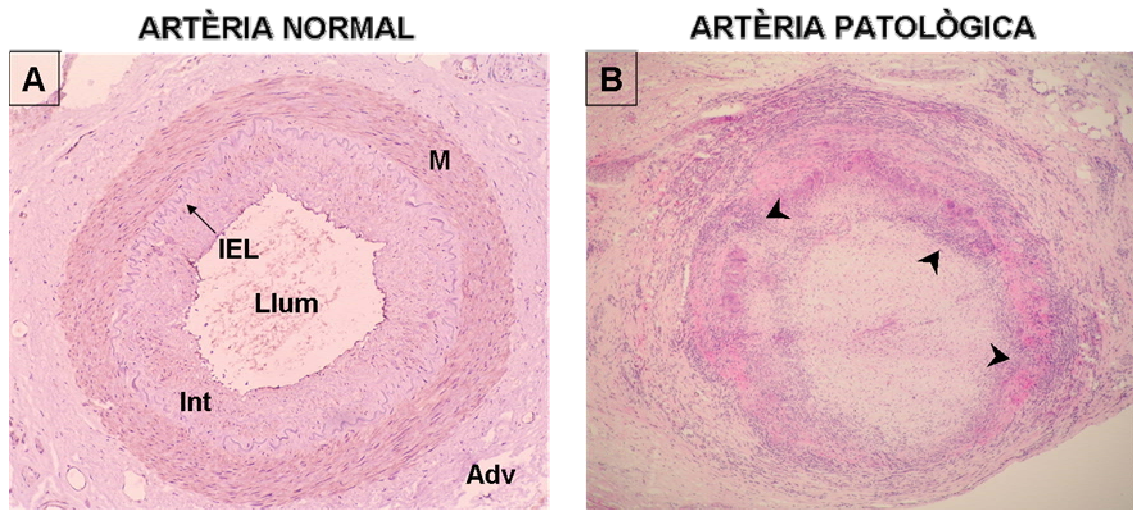


Figura 15. Estructura de l'artèria temporal. L'artèria de l'esquerra, A, és una biòpsia normal. En ella es poden observar les diferents capes: La capa adventícia (Adv) no té estructura laminar i està formada per fibroblasts inserits en fibres de col·lagen, principalment I i III. La capa mitja (M) està formada per múltiples capes de cèl·lules musculars llises orientades concèntricament. La capa íntima (Int) separa la capa mitja de l'endoteli luminal i està formada per cèl·lules miointimals i matriu extracel·lular. Entre la capa mitja i la íntima es situa la làmina elàstica interna (IEL) que s'observa com una estructura ondulada (fletxa). L'artèria de la dreta (B) és una biòpsia que correspon a un pacient amb diagnòstic d'arteritis de cèl·lules gegants. En la fotografia es pot veure com l'infiltrat inflamatori (caps de fletxa), procedent de la capa adventícia, s'acumula en la zona d'unió íntima-mitja. En l'artèria patològica també s'observa la hiperplàsia de la capa íntima que obstrueix la llum vascular.

Els diversos treballs del nostre grup han contribuït a caracteritzar millor la presentació i l'evolució d'aquesta malaltia en els diferents pacients. Hem vist que els pacients amb una resposta inflamatòria sistèmica elevada tenen majors nivells

circulants de les citocines pro-inflamatòries IL6 i $TNF\alpha$ i també les seves artèries expressen més IL6, $TNF\alpha$ i IL1 β (Hernandez-Rodriguez et al., 2004). Aquests pacients presenten menys fenòmens isquèmics i a la vegada cursen una malaltia més resistent. L'acció angiogènica de la citocina IL6 explicaria, al menys parcialment, el seu efecte protector enfront de fenòmens isquèmics (Hernandez-Rodriguez et al., 2003). En contrapartida, la formació de neovasos contribuiria a la perpetuació i ampliació de la inflamació.

L'estudi de l'evolució histopatològica dels infiltrats inflamatoris i els patrons d'activació endotelial en aquesta malaltia suggereixen que la invasió arterial dels limfòcits s'inicia en els *vasa vasorum* de l'adventícia. Els limfòcits i els macròfags activats produeixen citocines proinflamatores ($TNF\alpha$ i IL1) que indueixen l'expressió de molècules d'adhesió de l'endoteli vascular. Els factors de creixement indueixen l'angiogènesi i els vasos neofornats incrementen la superfície d'interacció amb les cèl·lules inflamatores. Posteriorment l'infiltrat inflamatori progressa cap a la capa mitja on es dona la diferenciació granulomatosa i continua cap a la capa íntima després del trencament de la làmina elàstica interna. Diversos estudis han descrit la presència de gelatinases en l'arteritis de cèl·lules gegants (Nikkari et al., 1996; Rodriguez-Pla et al., 2005; Sorbi et al., 1996; Tomita and Imakawa, 1998). Les gelatinases, MMP2 i MMP9, a més de l'especificitat pel col·lagen desnaturalitzat, tenen activitat elastinolítica (Senior et al., 1991) i s'ha postulat que l'activitat proteolítica d'aquests enzims (tant gelatinasa com elastasa) podria destruir la làmina elàstica i a més permetria l'evolució cap a lesions inflamatores plenament desenvolupades abastant tota l'extensió del territori arterial. El trencament de l'elàstica facilitaria la migració de les cèl·lules miointimals causant la hiperplàsia de la capa íntima.

Un altre aspecte on l'acció destructora de les MMPs pren importància en la patologia vascular són els **aneurismes**. L'afectació inflamatòria de l'artèria aorta es produeix en gairebé la totalitat dels pacients. Una complicació tardana de l'arteritis de

cèl·lules gegants és la formació d'aneurismes aòrtics i la ulterior ruptura de l'artèria és una causa de mort per aquesta malaltia (Nueninghoff et al., 2003).

Els aneurismes són dilatacions focals de l'aorta superiors al 150% del seu diàmetre arterial normal. Aquesta complicació es produeix a conseqüència de la inflamació de la capa mitja i de l'adventícia, el trencament proteolític de les elàstiques de la mitja, la pèrdua de cèl·lules musculars llises i la remodelació de la matriu extracel·lular. En aquestes circumstàncies, la paret arterial és incapaç de suportar la pressió arterial i es distensa donant lloc a l'aneurisma. No es coneix amb exactitud amb quina freqüència es produeix aquesta complicació perquè els pocs estudis existents són retrospectius.

En un estudi prospectiu realitzat pel nostre grup sobre 50 pacients hem pogut veure que aquesta complicació es produeix en un 20% dels pacients al cap d'una mitjana de seguiment de 5,5 (4-10) anys (Garcia-Martinez et al., 2005).

Diferents estudis han relacionat la presència de MMPs en els aneurismes aòrtics d'origen ateroscleròtic (Freestone et al., 1995; Thompson and Parks, 1996). MMP2 està produïda en grans quantitats per les cèl·lules de la capa mitja i els seu increment d'expressió ha estat correlacionat amb l'augment del diàmetre de l'aorta. D'altra banda MMP9 semblaria estar més lligada a la progressió de l'aneurisma i la posterior ruptura (Petersen et al., 2002). Una font molt important de MMP9 són els macròfags i limfòcits de l'infiltrat inflamatori. A més cal ressaltar que ratolins *knock-out* de MMP9 són resistents als aneurismes induïts per infusions d'elastasa (Pyo et al., 2000).

No existeixen pràcticament estudis en aneurismes relacionats amb arteritis de cèl·lules gegants. En una peça quirúrgica d'un aneurisma aòrtic d'un dels nostres pacients hem pogut observar la presència d'infiltrats inflamatoris en la capa muscular mitja que expressen les gelatinases MMP2 i MM9 (Figura 16; publicació pendent).

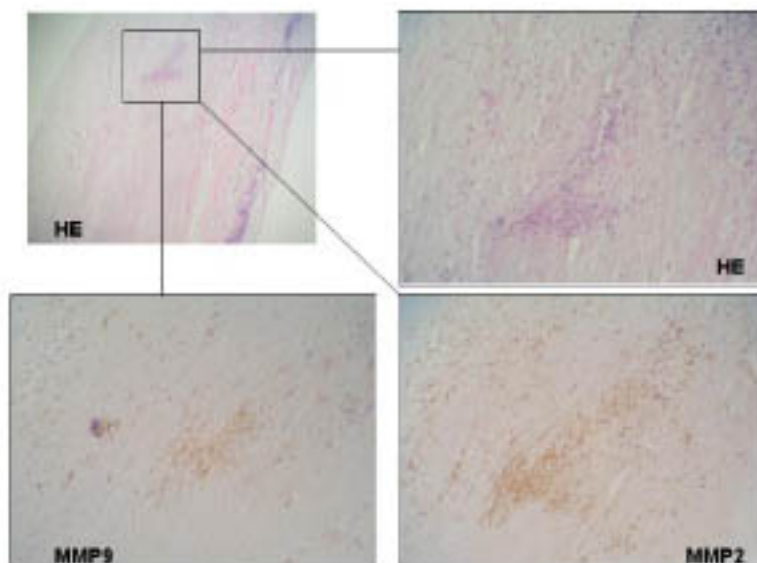


Figura 16. Expressió immunohistoquímica de MMP2 i MMP9 en una secció de teixit arterial procedent d'un aneurisma aòrtic. L'expressió de les gelatinases es correlaciona amb la localització de l'infiltrat inflamatori en la capa muscular mitja de l'artèria (HE: hematoxilina-eosina).

3.3. MMPs en les síndromes limfoproliferatives

Les MMPs juguen un paper important en la progressió tumoral ja que es detecten nivells elevats de MMPs en la majoria de tumors malignes que es correlacionen amb invasivitat i mal pronòstic (Johnsen et al., 1998). La invasió tumoral és un procés complex en el qual la migració cel·lular està associada amb la degradació focal, i per tant implica l'establiment d'interaccions dinàmiques entre les cèl·lules tumorals i la matriu extracel·lular. Durant el procés invasiu, les cèl·lules tumorals han d'alliberar-se del tumor primari, migrar i penetrar barreres estructurals com la membrana basal i la matriu estromal. La fase més avançada de la progressió tumoral, la metàstasi, s'aconsegueix amb la degradació de la membrana basal vascular i la penetració en el torrent sanguini (intravasació) i posteriorment la nova invasió del vas per abandonar el

torrent circulatori (extravasació) fins arribar a un teixit hoste on s'estableix una nova colònia del tumor (Figura 17). L'acció de les MMPs és crucial en aquestes etapes d'invasió i metàstasi.

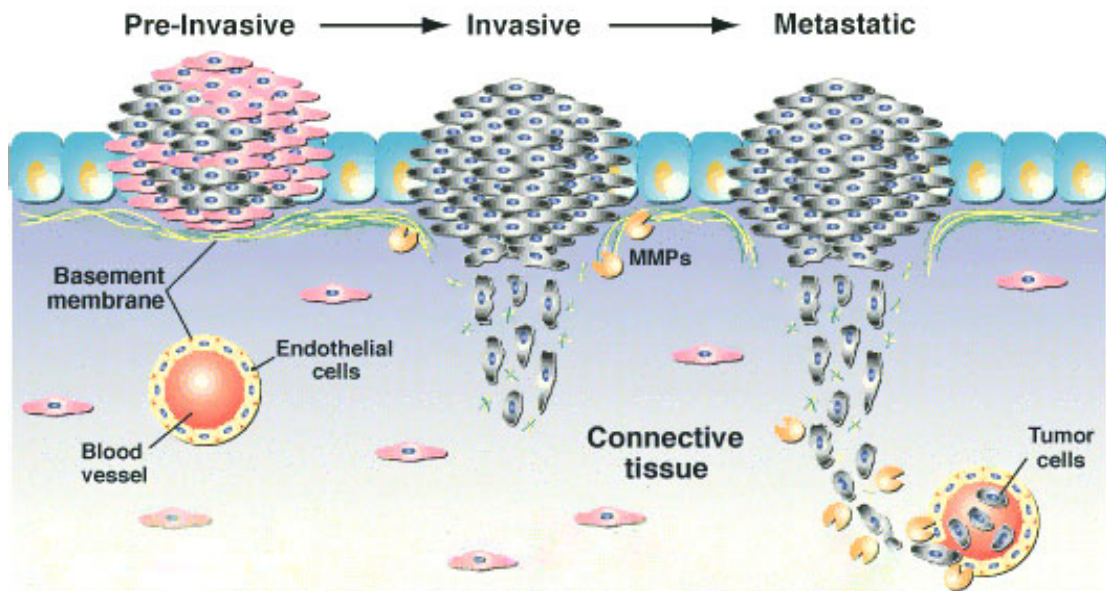


Figura 17. Etapes de la progressió tumoral. En estadis inicials, diversos canvis provoquen la proliferació de cèl·lules tumorals, després el tumor irromp en el teixit subjacent a la membrana basal i l'envaeix. La transició cap a la metàstasi implica l'accés de les cèl·lules tumorals als vasos sanguinis i la disseminació cap a la colonització d'altres teixits. (Adaptat de (Schlaepfer et al., 2004).

A més les MMPs no només s'associen amb invasió i metàstasi, sinó que també juguen un paper crític en les etapes inicials del desenvolupament del tumor perquè afecten a la supervivència i proliferació cel·lular. Les MMPs, com veiem en la secció 1.4, poden generar senyals que indueixen la proliferació de les cèl·lules tumorals per l'activació de precursors de factors de creixement, l'alliberament de factors de creixement, citocines i quimiocines retinguts en la ECM i la modificació de l'estructura de la ECM i l'expressió de seqüències críptiques de la ECM.

Les MMPs també tenen un paper actiu en l'angiogènesi tumoral. L'acció de les MMPs es necessita per a la ramificació de nous vasos a partir dels preexistents i per a la modificació de la ECM per permetre la invasió de les cèl·lules endotelials. També les MMPs augmenten la biodisponibilitat de factors angiogènics i la seva relació amb l'angiogènesi ha estat demostrada en models angiogènics *in vivo* i *in vitro* (Bergers et al., 2000; Galvez et al., 2001; Yu and Stamenkovic, 2000).

Els limfomes són neoplàsies d'estirp limfocitària. Existeixen nombrosos tipus de limfomes que es corresponen amb la transformació tumoral de les diferents classes i estadis madurats dels limfòcits. Al voltant d'un 95% dels limfomes provenen de cèl·lules B, i la resta són originats per cèl·lules T (Kuppers, 2005).

Les cèl·lules tumorals de síndromes limfoproliferatives expressen MMP2 i MMP9, les quals es relacionen amb fenòmens d'invasió i angiogènesi (Barille et al., 1997; Vacca et al., 1998). L'expressió de MMP9 en tumors hematològics es relaciona amb mal pronòstic en l'evolució del limfoma (Kossakowska et al., 2000; Kuittinen et al., 2003).

El **mieloma múltiple** és una malaltia limfoproliferativa de les cèl·lules B en la seva diferenciació terminal (cèl·lula plasmàtica) (Hideshima and Anderson, 2002). Es caracteritza per la proliferació clonal de cèl·lules malignes al moll de l'os que produeixen una immunoglobulina monoclonal. A més, la clona de mieloma sol causar l'activació dels osteoclasts que provoquen lesions osteolítiques a l'os i la secreció de citocines i factors de creixement que activen l'angiogènesi. També, en etapes avançades de la malaltia, la clona de mieloma pot esdevenir independent de l'estroma i pot estendre's cap a regions extramedul·lars.

Les cèl·lules plasmàtiques malignes del mieloma es caracteritzen per una primera localització selectiva (*homing*) al moll d'os, on s'adhereixen amb gran afinitat a les proteïnes de la matriu extracel·lular i a les cèl·lules estromals del moll d'os. Aquesta unió entre les cèl·lules tumorals i el microentorn del moll de l'os es produeix per mitjà

de molècules d'adhesió, entre elles les integrines $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ i el receptor de l'àcid hialurònic CD44 (Menu et al., 2004). Els estímuls que proporciona el microentorn del moll de l'os, com IL6, IGF-1 o $TNF\alpha$, són essencials per al creixement, supervivència i migració de les cèl·lules de mieloma. Les cèl·lules de l'estroma també expressen VEGF i bFGF que augmenten la vascularització tumoral. En etapes tardanes de l'evolució de la malaltia, les cèl·lules de mieloma poden esdevenir independents de l'estroma, escapar al torrent sanguini i desenvolupar metàstasis. La producció de MMPs per les cèl·lules de mieloma o per les cèl·lules de l'estroma podria intervenir en diferents fenòmens que acompanyen la patologia del mieloma múltiple com la regulació de les diverses molècules bioactives del microentorn del moll d'os, l'augment de l'angiogènesi, les lesions òssies i l'establiment de tumors extramedul·lars. Alguns treballs demostren que les cèl·lules de mieloma secreten MMP9 i MMP7, i regulen MMP1 i MMP2 produïdes per les cèl·lules de l'estroma (Barille et al., 1997; Barille et al., 1999).

Tot i que amb altes dosis de quimioteràpia juntament amb el trasplantament de cèl·lules mare hematopoiètiques es pot aconseguir la remissió completa de certs pacients amb mieloma múltiple, no existeix un tractament vertaderament efectiu per aquesta malaltia. Recentment, en la terapèutica del mieloma s'ha incorporat el tractament amb **talidomida** (i els seus anàlegs) aconseguint taxes de remissió del 60-70% en combinació amb corticoides (Bartlett et al., 2004). Actualment aquest fàrmac s'està experimentant en altres síndromes limfoproliferatives per a les quals no existeix un tractament efectiu, com la leucèmia limfàtica crònica i el limfoma de cèl·lules del mantell. L'efecte terapèutic de la talidomida s'ha atribuït als efectes immunomoduladors i anti-angiogènics però els mecanismes moleculars de la seva acció són pràcticament desconeguts. Els efectes anti-angiogènics fan pensar que la talidomida podria modular la producció de MMPs però aquest fet no ha estat explorat.

Des del seu descobriment inicial en la resorció de la cua del cap-gros fins l'actualitat, el nombre i propietats de les MMPs ha crescut enormement i les MMPs han esdevingut uns reguladors fonamentals de molts processos cel·lulars. La demostració de la sobreexpressió de MMPs en moltes patologies, entre elles els processos tumorals i inflamatoris, les ha convertit en una interessant diana terapèutica i ha impulsat la síntesi d'inhibidors de MMPs. No obstant, la diversitat i complexitat de funcions atribuïdes a les MMPs possiblement explica parcialment que els assaigs clínics amb aquests fàrmacs hagin obtingut resultats paradoxals (Coussens et al., 2002). Per tant, es requereix un coneixement més detallat dels seus mecanismes d'acció per tal de dissenyar inhibidors específics de l'acció patològica que a la vegada no interfereixin amb els processos biològics normals.