

Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Biologia Cel·lular

Programa de Doctorado de Biología Celular
Bienio 1996-1998

La interacción de los glicosaminoglicanos con las isoformas de
PDGF-A y -B.
Su importancia funcional en la proliferación y migración de las
células musculares lisas.

Memoria presentada por Raquel García Olivas para optar al título de Doctor en
Bioquímica.

Dirigida y revisada por el director:

Dr. Senén Vilaró i Coma

Barcelona, Diciembre 2003

Un fragmento de "Le Petit Prince":

Et il revint vers le renard :

-Adieu, dit-il...

-Adieu, dit le renard. Voici mon secret. Il est très simple : on ne voit bien qu'avec le coeur. L'essentiel est invisible pour les yeux.

-L'essentiel est invisible pour les yeux, répéta le petit prince, afin de se souvenir.

-C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante.

-C'est le temps que j'ai perdu pour ma rose... fit le petit prince, afin de se souvenir.

-Les hommes ont oublié cette vérité, dit le renard. Mais tu ne dois pas l'oublier. Tu deviens responsable de ce que tu as apprivoisé. Tu es responsable de ta rose...

-Je suis responsable de ma rose... répéta le petit prince, afin de se souvenir.

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el fruto de muchos años de trabajo en el grupo de Biología Celular, lo cual me ha permitido conocer a mucha gente a la que quiero agradecer su apoyo, tanto a nivel científico como personal, ya que gracias a todos ellos este trabajo ha podido finalmente llegar a su fin.

En primer lugar, quiero agradecer a Senén Vilaró, que me dió la oportunidad de entrar en el grupo y lanzarme en el mundo de la investigación. Gracias por darme la ocasión de participar en diferentes proyectos lo que me ayudado muchísimo a tener una visión “global” de los diferentes aspectos de la Biología Celular.

A Manuel, a Ritchie, a la Roser, a Myriam, Conxita, Joan,... Sin vuestro apoyo y consejos en innumerables ocasiones, hubiera sido imposible desarrollar gran parte del trabajo experimental de esta tesis.

A la Susanna que me abrió las puertas de la Microscopía Confocal. Infinitas gracias por iniciarme, enseñarme y guiarme. Este trabajo ha podido salir adelante gracias a tus consejos y ayuda constante a lo largo de todos estos años.

A mis compañeros de CellTec y de Advancell, todos los que están y los que ya no están que me han brindado su cariño y han contribuido a que este trabajo vea su fin.

A mis compañeros del “Confocal Team”: a Jaume, Nieves y Montse. Mil gracias por crear un ambiente tan agradable en el trabajo, por ayudarme y animarme en esta etapa final.

A la gente de la Unitat de Citometria de Flux: Gracias Jaume, Ricard y Chari por vuestra colaboración en una parte importante de este trabajo.

A la gente del proyecto de BioMed-2: Gracias Johan, Florentyna y Gunnar. Gracias a la gente del Wallenberg Lab: Gunnel, Alexandra, Sophie,... y muchos más que hicieron que mis estancias en Suecia fueran cálidas a pesar del frío e instructivas.

A Víctor M. Gracias por tu comprensión y apoyo en todo momento. Gracias por estar a mi lado y quererme.

Mi eterna gratitud a mis padres, por confiar en mí y a quienes dedico esta tesis.

Índice

Abreviaturas	9
1. INTRODUCCION	15
1.1. EI PDGF	15
1.1.1. Biosíntesis del PDGF.....	16
1.2. RECEPTORES DEL PDGF (I): Receptores del PDGF tirosina quinasa α- y β-	17
1.2.1. Mecanismos de señalización.....	19
1.2.2. Vías de señalización implicadas en la mitogénesis y quimiotaxis inducida por el PDGF.....	21
1.2.3. Función del PDGF <i>in vivo</i>	22
1.2.4. PDGF en la enfermedad.....	22
1.3. RECEPTORES DEL PDGF (II): Proteoglicanos	23
1.3.1. Heparán sulfatos.....	24
1.3.2. Condroitín sulfatos y dermatán sulfatos.....	24
1.3.3. Keratán sulfatos.....	25
1.3.4. Clasificación de los Proteoglicanos.....	25
1.3.5. Funciones de los Proteoglicanos.....	27
1.3.5.1. Función de las proteínas núcleo de los PGs.....	27
1.3.5.2. Organización de la matriz extracelular.....	27
1.3.5.3. Interacciones a nivel de la superficie celular.....	27
1.3.5.3.1. Adhesión célula-célula.....	28
1.3.5.3.2. Adhesión célula-matriz extracelular.....	28
1.3.5.3.3. Patogénesis e invasión microbiana.....	28
1.3.5.3.4. Co-receptores de factores de crecimiento y citocinas...	29
1.3.5.3.5. Receptores de ligandos solubles.....	30
1.3.5.3.6. Metabolismo de lipoproteínas.....	31
1.3.5.4. Actividad anticoagulante.....	31
1.4. La aterosclerosis	32
1.4.1. La restenosis.....	34
1.4.2. Papel de las células musculares lisas.....	34
1.4.3. Proteoglicanos de los vasos sanguíneos.....	36
1.4.3.1. Biosíntesis.....	38
1.4.4. Proteoglicanos en la enfermedad arterial.....	39
1.4.5. PDGF en la aterosclerosis.....	41
1.4.6. Antagonistas del PDGF.....	42
1.4.6.1. Antagonistas del PDGF en el tratamiento de la aterosclerosis...	43
2. OBJETIVOS	47

3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1. Slot-blot	51
3.1.1. Enhanced chemiluminescence (ECL).....	51
3.2. Unión de las isoformas de PDGF a los glicosaminoglicanos de las células CHO	52
3.2.1. Cultivo celular de las células CHO.....	52
3.2.2. Experimentos de “ <i>binding</i> ” o unión en la superficie celular de CHO.....	52
3.2.2.1. Concentración óptima de unión de bLPL /isoformas de PDGF en la superficie celular de CHO K1.....	52
3.2.2.2. Tratamiento con glicosidasas: Heparitinasa I y Condroitinasa ABC.....	53
3.2.2.3. Tratamiento con clorato sódico.....	53
3.2.2.4. Incubación de bLPL /isoformas de PDGF en presencia de heparina de bajo peso molecular (LMWH), heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS).....	53
3.2.3. Protocolo de inmunocitoquímica.....	54
3.2.3.1. Bloqueo.....	54
3.2.3.2. Incubación con anticuerpos primarios.....	54
3.2.3.3. Incubación con anticuerpos secundarios.....	54
3.2.3.4. Montaje.....	54
3.2.4. Microscopía Confocal (CSLM).....	54
3.2.5. Cuantificación de la fluorescencia.....	55
3.3. Colocalización del PDGF con Heparán sulfato y Condroitín sulfato en las hASMC	56
3.3.1. Cultivo celular de las hASMC.....	56
3.3.2. Experimento de “ <i>binding</i> ” del PDGF en las hASMC.....	57
3.3.3. Doble inmunodetección de heparán sulfato/condroitín sulfato y las isoformas de PDGF.....	57
3.3.3.1. Bloqueo.....	57
3.3.3.2. Permeabilización con saponina.....	57
3.3.3.3. Incubación con anticuerpos primarios.....	57
3.3.3.4. Incubación con anticuerpos secundarios.....	58
3.3.3.5. Montaje.....	58
3.3.4. Marcaje directo de los anticuerpos monoclonales anti-heparán sulfato y anti-condroitín sulfato.....	58
3.3.5. Triple inmunodetección de las isoformas de PDGF, heparán sulfato y condroitín sulfato.....	58
3.3.5.1. Bloqueo.....	58
3.3.5.2. Incubación con anticuerpos primarios anti-PDGF.....	58
3.3.5.3. Incubación con anticuerpos conjugados con fluorocromos.....	58
3.3.5.4. Montaje.....	59
3.3.6. Microscopía Confocal (CSLM).....	59
3.3.7. Análisis de la Colocalización.....	60

3.4. Mitogénesis de las hASMC con timidina-³H	61
3.4.1. Ensayo de mitogénesis con timidina- ³ H.....	61
3.4.1.1. Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen mitogénesis en las hASMC.....	61
3.4.1.2. Efecto de la Heparina en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	61
3.4.1.3. Efecto del clorato sódico en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	62
3.4.1.4. Efecto del β-xilósido en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	62
3.4.1.5. Ensayo de citotoxicidad del clorato sódico y del β-xilósido en las hASMC.....	62
3.5. Quimiotaxis de las hASMC	63
3.5.1. Ensayo de trans migración.....	63
3.5.1.1. Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen quimiotaxis en las hASMC.....	64
3.5.1.2. Efecto de la Heparina en la migración de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	64
3.5.2. <i>Laser Scanning Cytometer</i> (LSC).....	64
3.6. Quimiocinesis de las hASMC	65
3.6.1. Sembrado de las hASMC.....	65
3.6.2. <i>Time-lapse CSLM (Confocal Scanning Laser Microscopy)</i>	65
3.6.3. Análisis de la migración o “ <i>tracking</i> ”.....	66
4. RESULTADOS	71
4.1. Especificidad de unión de los anticuerpos anti-PDGF AA y anti-PDGF-BB	71
4.2. Unión de las isoformas de PDGF a los glicosaminoglicanos de las células CHO	71
4.2.1. Concentración óptima de unión de bLPL /isoformas de PDGF en la superficie celular de CHO K1.....	72
4.2.2. Unión a Heparán sulfatos.....	74
4.2.2.1. Unión de bLPL /isoformas de PDGF en los clones CHO.....	74
4.2.2.2. Unión de bLPL/ isoformas de PDGF en CHO K1 tratadas con Heparitinasa I y clorato sódico.....	75
4.2.3. Unión a Condroitín sulfatos.....	77
4.2.3.1. Unión de las isoformas de PDGF en CHO 677 tratadas con Condroitinasa ABC y clorato sódico.....	77
4.2.4. Unión de la bLPL/ isoformas de PDGF en presencia de heparina de bajo peso molecular (LMWH), heparán-sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS).....	79
4.3. Unión de las isoformas de PDGF en las hASMC	81

4.4. Colocalización de las isoformas de PDGF con el heparán sulfato y el condroitín sulfato.....	83
4.5. Mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	90
4.5.1. Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen mitogénesis en las hASMC.....	90
4.5.2. Efecto de la heparina en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	91
4.5.3. Efecto del clorato sódico en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	91
4.5.4. Efecto del β -xilósido en la proliferación de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	94
4.6. Quimiotaxis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	95
4.6.1. Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen quimiotaxis en las hASMC.....	95
4.6.2. Efecto de la heparina en la quimiotaxis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	97
4.7. Quimiocinesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.....	99
4.7.1. Análisis de la quimiocinesis de las hASMC.....	99
5. DISCUSIÓN.....	105
5.1. Unión de las isoformas de PDGF a las diferentes especies de GAGs.....	105
5.2. Mitogénesis y migración mediada por las isoformas de PDGF.....	108
5.3. Interacciones entre el PDGF y los glicosaminoglicanos en la aterosclerosis.....	111
5.4. Efecto de la heparina en la mitogénesis y quimiotaxis.....	113
5.5. Otros inhibidores de la mitogénesis: el clorato sódico y el β-xilósido.....	114
5.6. Importancia de los glicosaminoglicanos en la actividad del PDGF.....	114
6. CONCLUSIONES.....	119
7. BIBLIOGRAFÍA.....	123

ABREVIATURAS

- aFGF (FGF-1): Factor de crecimiento de fibroblastos ácido
- bFGF (FGF-2): Factor de crecimiento de fibroblastos básico
- bLPL: Lipoproteína lipasa bovina
- BM: Medio basal de las hASMC
- BSA: Albúmina de suero bovino
- CCR-2: Receptor de MCP-1
- CMFDA: *5-chloromethylfluorescein diacetate*
- CS: Condroitín sulfatos
- CSLM: *Confocal Scanning Laser Microscopy*
- CSPG: Proteoglicanos de tipo condroitín sulfato
- CHO: *Chinese Hamster Ovary*
- DAG: Diacilglicerol
- DNA: Ácido desoxiribonucleico
- D-PBS: *Dulbecco's phosphate-buffered saline*
- dpm: desintegraciones por minuto
- DS: Dermátan sulfatos
- DSPG: Proteoglicanos de tipo dermatán sulfato
- ECL: *Enhanced chemiluminescence*
- ECM: *Extracellular matrix*
- EGF: Factor de crecimiento endotelial
- FCS (Foetal calf serum): Suero fetal bovino
- GAGs: Glicosaminoglicanos
- Gal: Galactosa
- GalN: D-galactosamina
- GalNAc: N-acetilgalactosamina
- GlcA: Ácido D-glucorónico
- GlcN: D-glucosamina
- GlcNAc: N-acetilglucosamina
- GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- GP: Glicoproteína
- GPI: *Glycosylphosphatidylinositol*
- hASMC (*human arterial smooth muscle cells*): Células musculares lisas procedentes de arterias humanas
- hAVEC (*human adult vein endothelial cells*): Células endoteliales de vena humana de adulto
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad

Hepes: *N*-[2-hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]
HGF: Factor de crecimiento de los hepatocitos
HRP: *Horse Radish Peroxidase*
HS: Heparán sulfatos
HSPG: Proteoglicanos de tipo heparán sulfato
ICAM-1: Molécula-1 de adhesión intercelular
IdoA: Ácido L-idurónico
IF: Intensidad de fluorescencia en escala de grises
Ig: Inmunoglobulina
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico-1
IL: Interleucina
IL-1: Interleucina-1
IFN- γ : Interferón gamma
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃: Inositol trifosfato
JNK: Quinasa Jun-N-Terminal
KS: Keratán sulfatos
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LDLmm: Lipoproteínas de baja densidad mínimamente modificadas
LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPL: Lipoproteína lipasa
LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*): proteína relacionada con el receptor de LDL
LSC: *Laser Scanning Cytometer*
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno
MAPKK: Quinasa activada por MAPK
MCP-1: Proteína-1 quimiotáctica de monocitos
M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos
MFI: *Mean Fluorescence Intensity*
MMPs: Metaloproteinasas de la matriz
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
N.A: *Numerical aperture*
NGF: Factor de crecimiento neuronal
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGs: Proteoglicanos
PI 3-quinasa: Fosfatidil inositol 3'-quinasa
PIP₂: Fosfatidil inositol bifosfato
PKC: Proteína quinasa C

PLC- γ : Fosfolipasa C gamma

ROI: Región de interés

S-BM: Medio completo de las hASMC

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*

SMC (*smooth muscle cells*): Células musculares lisas

TCA: Ácido tricloroacético

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TIMPs (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*): Inhibidores de MMPs

Tris: *Tris (hydroxymethyl) aminotethane*

Tween-20: *Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate*

TxA2: Tromboxano A2

VCAM-1: Molécula-1 de adhesión vascular

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

vWF: Factor von Willebrand

WST-1: *4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate*