

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-blots | 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: Dermátán 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*