

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA

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

Mireia Martín Satué

Barcelona 2000

**DISCUSSION
GENERAL**

Les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc presenten diferent capacitat metastàtica quan s'injecten intravenosament o intramuscularment a ratolins immunodeprimits. Dels dos tipus cel·lulars d'adenocarcinoma de pulmó humà estudiats, només les cèl·lules HAL-8 i les seves derivades HAL-8Luc desenvolupen colònies pulmonars en ser injectades intravenosament (Inufusa *et al.*, 1991) o intramuscularment (Capítol I) a ratolins atímics. Totes dues línies cel·lulars indueixen una resposta inflamatòria al lloc de la inoculació intramuscular, però mentre HAL-8Luc donen lloc a un patró d'inflamació crònica amb alta activitat angiogènica, HAL-24Luc progressen cap a la regressió i necrosi cel·lulars, contribuint, així, al fenotip no invasiu característic d'aquestes cèl·lules. L'angiogènesi, procés de formació de nous vasos sanguinis a partir de la vasculatura preexistent, és necessària tant pel creixement dels tumors com per la disseminació hematògena de les cèl·lules tumorals (Sekido *et al.*, 1998). Aquesta neovascularització és un procés complex que depèn del balanç local entre factors reguladors positius i negatius. Factors angiogènics com el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) i el FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) actuen directament sobre les cèl·lules endotelials i d'altres com el TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) i el PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) poden atraure cèl·lules inflamatòries o del teixit connectiu que seran les que controlin l'angiogènesi (Battegay, 1995). L'estudi de factors antiangiogènics naturals com l'angiostatina (Gately *et al.*, 1997), l'endostatina (Boehm *et al.*, 1997) i esteroids angiostàtics o sintètics com el paclitaxel (Dhanikula & Panchagnula, 1999) constitueix un dels principals objectius científics actuals donada la seva implicació tant en el creixement tumoral com en el desenvolupament de metastàsis (Rundell, 1998). La manca de vascularització és, doncs, una de les causes més probables de la minsa tumorogènica de les cèl·lules HAL-24Luc i, conseqüentment de la nul·la capacitat metastàtica mostrada per aquestes cèl·lules.

D'altra banda en els experiments de metastasi experimental en els quals les cèl·lules són injectades intravenosament les dues línies cel·lulars també exhibeixen un comportament diferent. Així, mentre les cèl·lules HAL-8Luc envaeixen el parènquima pulmonar, desenvolupant-hi colònies, les cèl·lules HAL-24Luc no ho fan. Això pot indicar la manca de molècules d'adhesió necessàries per adherir-se a l'endoteli vascular i travessar-lo o la incapacitat de progressar dins el parènquima del pulmó una vegada hi han accedit.

Estudis previs demostraven que les cèl·lules HAL-8 sobreexpressen l'antigen de membrana sialil-Le^x dimèric quan es comparen amb les cèl·lules HAL-24 (Inufusa *et al.*, 1991). Aquest antigen va ser identificat inicialment a adenocarcinoma de còlon humà (Fukushi *et al.*, 1984). S'ha establert una relació entre l'expressió d'aquest difucogangliòsid (Matsushita *et al.*, 1991) o d'altres antigens relacionats com el sialil-Le^x (Fukushima *et al.*, 1984; Saitoh *et al.*, 1992; Shimodaira *et al.*, 1997) i el sialil-Le^a (Itzkowitz *et al.*, 1988; Magnani *et al.*, 1982), i el fenotip metastàtic de les cèl·lules tumorals, en relació directa amb la capacitat adhesiva d'aquestes cèl·lules a l'endoteli vascular. Els nostres resultats de

l'anàlisi de citometria utilitzant anticossos monoclonals pels oligosacàrids Le^x, sialil-Le^x, sialil-Le^x dimèric, Le^a i sialil-Le^a mostren que l'expressió diferencial a aquestes cèl·lules no es limita al sialil-Le^x dimèric i que existeixen diferències inclús més grans en els casos del Le^x i del sialil-Le^x. Així, *les cèl·lules metastàtiques HAL-8Luc sobreexpressen tots els oligosacàrids estudiats quan es comparen amb les cèl·lules no metastàtiques HAL-24Luc, que només expressen sialil-Le^x dimèric i sialil-Le^a, tots dos a un nivell inferior que en el cas de les cèl·lules HAL-8Luc* (Capítol I).

La sobreexpressió de sialil-Le^x a les cèl·lules HAL-8Luc es correlaciona amb la major capacitat d'aquestes cèl·lules d'adherir-se a cèl·lules endotelials estimulades amb IL-1. Els estudis d'adhesió a cèl·lules endotelials realitzats ens indiquen que només les cèl·lules metastàtiques HAL-8Luc s'adhereixen de forma significativa a les monocapes endotelials estimulades amb IL-1 (Capítol I). Aquesta adhesió és dependent, d'una banda, de l'E-selectina expressada per les cèl·lules endotelials induïdes amb IL-1. Els estudis de bloqueig del sialil-Le^x expressat per les cèl·lules tumorals i reconegut lligand de l'E-selectina (Varki, 1994), fan palesa la implicació d'aquest oligosacàrid en els fenòmens adhesius estudiats, fet ja demostrat per altres tipus cel·lulars com els carcinomes de còlon (Sawada *et al.*, 1994). La importància del reconeixement entre el sialil-Le^x i l'E-selectina prové del mimetisme que s'estableix amb el procés inflamatori. Quan es produeix una lesió inflamatòria, els leucòcits, que expressen sialil-Le^x com a part de les seves glicoproteïnes o glicolípids (Foxall *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1999), són reclutats als llocs d'inflamació mitjançant interaccions entre aquests oligosacàrids i les selectines E i/o P expressades per les cèl·lules endotelials activades, com a pas previ a l'extravassació (Lowe, 1994; Rosen & Bertozzi, 1996).

Exceptuant Fuc-TIX, la resta de Fuc-Ts del tipus $\alpha(1,3)$ identificades actualment és capaç de sintetitzar l'oligosacàrid sialil-Le^x tot i que pel cas de Fuc-TIV només ha estat descrit en algun tipus cel·lular (Goelz *et al.*, 1994). Fuc-TVII, expressada a leucòcits, té la particularitat de sintetitzar de forma exclusiva sialil-Le^x (Natsuka *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994). Fuc-TIII té també activitat $\alpha(1,4)$, fet que li confereix l'exclusivitat en la síntesi de sialil-Le^a (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990). Estudis previs han demostrat l'expressió a pulmó normal dels gens de Fuc-TIII i Fuc-TVI (Cameron *et al.*, 1995) mentre que en aquest teixit només s'ha detectat expressió dels gens de Fuc-TIV i Fuc-TVII en relació amb el càncer i en correlació amb un mal pronòstic (Ogawa *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 1997). Els nostres resultats de l'anàlisi de l'expressió gènica de les Fuc-Ts demostren que els gens *Fuc-TIII*, *-IV*, *V*, *VI* i *VII* es troben sobreexpressats a les cèl·lules metastàtiques HAL-8Luc en comparació amb les no metastàtiques HAL-24Luc (Capítol I). El gen de Fuc-TIII és el que presenta major expressió a les cèl·lules HAL-24Luc, fet que coincideix amb l'expressió relativament elevada de sialil-Le^a i en part també de sialil-Le^x dimèric exhibida per aquestes cèl·lules. Destaca també l'elevada expressió gènica a les cèl·lules HAL-8Luc de *Fuc-TVII*,

que a les cèl·lules HAL-24Luc està al límit de detecció per Northern blot, i de *Fuc-TVV*, que està sis vegades sobreexpressat a les cèl·lules metastàtiques. L'increment a l'expressió gènica de Fuc-Ts ja ha estat relacionat amb el desenvolupament del càncer en comparació amb els nivells d'expressió presents al teixit normal (Majuri *et al.*, 1995; Togayachi *et al.*, 1999; Wittig *et al.*, 1996; Yago *et al.*, 1993).

La sobreexpressió de Fuc-TVII resulta suficient per l'adhesió a l'endoteli i l'adquisició del fenotip colonitzador de pulmó. Les cèl·lules no metastàtiques HAL-24Luc transfectades amb el cDNA per a la Fuc-TVII (24FT7) només sobreexpressen sialil-Le^x (Capítol II) coincidint amb estudis previs que demostren que aquest és l'únic antigen sintetitzat per l'esmentat enzim (Natsuka *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994). Aquesta sobreexpressió té com a conseqüència un increment en l'eficiència en l'adhesió a l'endoteli per part d'aquestes cèl·lules. Els nostres resultats d'adhesió endotelial demostren que aquesta adhesió depèn, com en el cas de les cèl·lules HAL-8Luc, de l'E-selectina expressada per les cèl·lules endotelials induïdes amb IL-1 β i del sialil-Le^x expressat per les cèl·lules tumorals. El paper clau de Fuc-TVII en l'adhesió a l'endoteli ja ha estat demostrat a leucòcits ja que variants deficientes per aquest enzim perden la capacitat d'unir-se a l'endoteli (Weston *et al.*, 1999). Quan les cèl·lules 24FT7 són injectades intravenosament a ratolins immunodeprimits en assajos de metàstasi experimental, aquestes cèl·lules són capaces de desenvolupar colònies pulmonars, posant de manifest l'adquisició de la capacitat colonitzadora de pulmó per part d'aquestes cèl·lules. Per tant, la sobreexpressió de Fuc-TVII a les cèl·lules HAL-24Luc és condició suficient per a que aquestes cèl·lules adquireixin el fenotip colonitzador de pulmó (Capítol II). Resultats similars han estat obtinguts amb la sobreexpressió de Fuc-TIII a cèl·lules de melanoma murí (Ohyama *et al.*, 1999).

Un cop les cèl·lules tumorals circulants s'han adherit a l'endoteli vascular han de travessar la làmina basal i progressar al parènquima de l'òrgan diana per tal de desenvolupar una metàstasi (Fidler, 1990). Els enzims proteolítics juguen un paper fonamental en aquesta etapa, destacant el rol de les metal·loproteases de matriu i en concret de l'MMP-2 (Gelatinasa A) i l'MMP-9 (Gelatinasa B) (Chambers & Matrisian, 1997). Els nostres resultats mostren que *les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc expressen les metal·loproteases de matriu MMP-2 i MMP-9 i els seus inhibidors respectius TIMP-1 i TIMP-2*. Aquestes activitats gelatinolítiques són qualitativament i quantitativament equivalents a tots dos tipus cel·lulars i manifesten un fort increment en presència de l'éster de forbol PMA (Capítol III). Aquesta major activitat està relacionada amb un increment de l'expressió gènica i proteica de les metal·loproteases de matriu MMP-2 i MMP-9. Per contra, l'expressió dels inhibidors TIMP-1 i TIMP-2, que tampoc exhibeix diferències entre ambdós tipus cel·lulars, no es veu modificada per la presència de PMA al medi, posant de manifest una regulació gènica probablement independent de les gelatinases i els seus inhibidors respectius.

Les integrines, expressades per les cèl·lules tumorals circulants, contribueixen a l'adhesió a l'endoteli i promouen interaccions més estables que les afavorides pels primers contactes amb l'E-selectina (Lafrenie *et al.*, 1994). Les integrines actuen també com a receptors de molècules de la matriu i aquest reconeixement desencadena una sèrie d'esdeveniments intracel·lulars de transducció de senyal que regula, al seu torn, l'expressió de diferents proteïnes, entre elles les metal·loproteases de matriu responsables de la degradació de la matriu extracel·lular (Crowe & Shuler, 1999). Així, hem demostrat que *la integrina β_5 regula l'activitat gelatinolítica associada a l'MMP-2 i l'MMP-9 a les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc.*

Els nostres resultats indiquen que tant les cèl·lules HAL-8Luc com les HAL-24Luc expressen les cadenes d'integrines β_1 , β_3 , β_5 i α_v i no expressen β_2 , sense existir diferències quantitatives entre ambdós tipus cel·lulars. Els medis condicionats de cèl·lules incubades en presència d'anticòs anti- β_5 presenten un increment de l'activitat gelatinolítica global associada a l'MMP-2 i, sobretot, a l'MMP-9, posant de manifest la implicació d'aquesta integrina, conegut receptor de la vitronectina (Felding-Habermann & Cheresch, 1993), en la regulació de la degradació de la matriu extracel·lular per part de les cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó (Capítol III). L'activitat metal·loproteàsica s'activa quan les cèl·lules interaccionen amb la matriu a través de les integrines que, en ser ocupades pels diferents lligands, inicien cascades de senyalització intracel·lulars (Crowe & Shuler, 1999). Anticossos contra integrines que simulen l'ocupació del receptor pel lligand desencadenen la resposta equivalent a l'originada per l'estímul matricial corresponent. Tal és el cas de cèl·lules de melanoma humà en ser incubades en presència de vitronectina o d'anticossos contra el seu receptor en aquestes cèl·lules, l' $\alpha_v\beta_3$ (Seftor *et al.*, 1992; Seftor *et al.*, 1993).

Els diferents components de la matriu extracel·lular regulen, a través d'interaccions amb les integrines, l'activitat de les metal·loproteases responsables de la seva degradació. Tal és el cas de la fibronectina que indueix l'expressió d'MMP-9 a cèl·lules de càncer d'ovari (Shibata *et al.*, 1997) o d'MMP-2 a cèl·lules de fibrosarcoma (Stanton *et al.*, 1998). Els nostres resultats indiquen que la fibronectina incrementa l'activitat tant d'MMP-2 com d'MMP-9 a les cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó HAL-8Luc i HAL-24Luc (Capítol III). Aquest increment es correspon amb una major concentració de proteïna MMP-2 i MMP-9 al medi però no es correlaciona amb un increment de l'expressió gènica, als temps estudiats en aquest treball. Aquest fet podria indicar, bé que la fibronectina indueix la secreció al medi d'MMP-2 i d'MMP-9, proteïnes que ja es trobaven emmagatzemades dins la cèl·lula, o, més probablement, que l'increment d'expressió gènica es produeix en els primers moments d'afegir la fibronectina al medi. L'increment d'activitat gelatinolítica també ha estat demostrada per cèl·lules incubades en presència de vitronectina (Bafetti *et al.*, 1998). Tanmateix, mostrem com a les cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó, la vitronectina indueix l'activitat gelatinolítica associada, en aquest cas, a MMP-9. Finalment,

la laminina no afecta les activitats ni les expressions gèniques ni proteiques d'MMP-2 i MMP-9 en les cèl·lules HAL-8Luc i HAL-24Luc en les condicions experimentals presentades en aquest treball, contràriament al que s'ha demostrat per alguns tipus cel·lulars que manifesten canvis a l'activitat metal·loproteàsica en presència d'aquesta proteïna (Reich *et al.*, 1995; Stack *et al.*, 1991). Els diferents components de la matriu extracel·lular tenen, doncs, efectes diversos sobre l'expressió de les diferents metal·loproteases de matriu i aquests efectes varien en funció del tipus cel·lular estudiat, en relació, probablement, al repertori d'integrines.

La migració transendotelial de les cèl·lules HAL-8Luc és dependent de l'activitat metal·loproteàsica. Els nostres resultats de migració transendotelial *in vitro* indiquen que l'activitat metal·loproteàsica és indispensable per a que aquesta migració es completi (Capítol III). En el model estudiat les cèl·lules metastàtiques s'adhereixen a l'endoteli i el travessen de manera independent de les metal·loproteases de matriu però precisen de la seva activitat per superar la matriu extracel·lular (matrigel) present a la cara basal de la monocapa endotelial. Així, la presència d'un inhibidor de proteases, el captopril, al medi no modifica el patró de migració cel·lular però si l'inhibidor es dissol en el matrigel la migració no es completa i, tot i que les cèl·lules metastàtiques han pogut superar la barrera endotelial, no són capaces de progressar en la migració. Aquests resultats reforcen els exposats als apartats anteriors que indiquen que l'activitat metal·loproteàsica és dependent de l'activació pels diferents components de la matriu extracel·lular. La rellevància de l'activitat MMP en la degradació de la làmina basal ha estat demostrada en estudis *in vitro* en què s'ha bloquejat la invasió cel·lular a través de matrigel o d'altres derivats mitjançant inhibidors sintètics d'MMPs (Taraboletti *et al.*, 1995) o els inhibidors tissulars TIMP-1 i TIMP-2 (Albini *et al.*, 1991; DeClerck *et al.*, 1992; Schultz *et al.*, 1988). Estudis *in vivo* també coincideixen en el bloqueig del procés metastàtic amb l'ús inhibidors d'MMPs, (Imren *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1995) essent aquest un dels objectius claus d'estudi per la farmacologia oncològica actual.

Finalment, *l'expressió diferencial de gens com el de la Semaforina E a les cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó HAL-8Luc i HAL-24Luc posa de manifest el caràcter multigènic del desenvolupament de les metastasis.* L'anàlisi de l'expressió gènica diferencial entre les línies cel·lulars HAL-8Luc i HAL-24Luc ens ha permès identificar diversos gens l'expressió dels quals varia entre les cèl·lules metastàtiques i les no metastàtiques i que estan, per tant, probablement relacionats amb aquests fenotips. Tot i existir uns patrons d'expressió molt similars entre totes dues línies cel·lulars, degut al seu origen cel·lular comú, hem pogut aïllar seqüències gèniques expressades diferencialment com són els gens de les Fuc-Ts (Capítol I) o d'altres que hem identificat mitjançant la tècnica del *differential display* o anàlisi d'expressió diferencial (Capítol IV). Alguns d'aquests gens presenten una expressió disminuïda a les cèl·lules metastàtiques com és el

cas de p54^{nrb} (*nuclear RNA binding protein*, 54 kDa) de seqüència homòloga al factor d'*splicing* PSF (Dong *et al.*, 1993) o d'un possible factor de proliferació (Sykes & Weiser, 1992). L'expressió de gens que regulin fenòmens tan diversos com l'*splicing* o la proliferació poden jugar un paper clau en el desenvolupament de la patologia tumoral (Dong *et al.*, 1997; Siebert & Huang, 1997) que en el nostre cas encara cal identificar. D'altres, com el gen de la Semaforina E, estan fortament sobreexpressades a les cèl·lules metastàtiques. La Semaforina E, o SEMA3C segons la nomenclatura recentment actualitzada (*Cell*, 97: 551-2, 1999), pertany a la família de les Semaforines, proteïnes implicades en la direccionalitat dels axons durant el desenvolupament neuronal (Bagnard *et al.*, 1998). El paper d'aquestes proteïnes a d'altres teixits és força desconegut però hi ha indicacions de la seva implicació en diversos mecanismes de supervivència cel·lular (Hall *et al.*, 1996; Yamada, T., *et al.*, 1997) i s'ha especulat sobre la seva funció com a supressors naturals del sistema immune (Luo *et al.*, 1993; Mangasser-Stephan *et al.*, 1997; Seki *et al.*, 1998). La Semaforina E podria, doncs, estar implicada en la regulació immunològica de la propagació dels tumors primaris, col·laborant en evitar la vigilància immunitària. L'absència de limfòcits als tumors generats per les cèl·lules HAL-8Luc inoculades intramuscularment a ratolins immunodeprimits comparada amb l'elevada infiltració limfocitària que presenten els tumors HAL-24Luc (Capítol I) reforça aquesta hipòtesi. A més, estudis previs (Yamada, T., *et al.*, 1997) descriuen la sobreexpressió de Semaforina E a carcinomes recurrents d'origen humà, inclosos els d'origen pulmonar. Destaquem, per tant, la detecció de l'expressió del gen de la Semaforina E com a possible factor pronòstic a l'adenocarcinoma de pulmó humà.

D'altra banda els nostres resultats fan palesa la conveniència d'aquest tipus d'anàlisi per a la identificació de gens d'expressió diferencial, com ja ha estat realitzat per cèl·lules metastàtiques d'altres orígens (Duncan *et al.*, 1998; Lee & Welch, 1997; Liu *et al.*, 1997).