



Al meu avi Frederic

Tesi Doctoral: Caracterització dels receptors de l'activador
tissular del plasminogen (tPA) en càncer de pàncrees.

Autor: Oriol Roda Noguera

Directors de la tesi: David Andreu Martínez i Pilar Navarro Medrano

Maquetació i Disseny: Jana Martínez Gallego

Publicada a Barcelona l'any 2006

Universitat Pompeu Fabra, UPF

Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM
DL: B. 22379-2007 / ISBN: 978-84-690-7824-2

PREFACI

És curiós com certes decisions marquen el nostre camí a la vida.

Quan feia 8è d'EGB vaig estudiar els àcids i les bases i em va agradar tant que vaig decidir ser químic, però, això sí, per dedicar-me a la "genètica"! I no és que tingués gaire idea del què volia dir "genètica", però havia llegit masses còmics de súper-herois on sempre es feien fabulosos experiments "genètics".

Aquesta decisió, presa amb 13 anys, va marcar el meu camí en els següents anys: vaig fer el BUP, després el COU científic i vaig començar química amb la intenció de passar-me, en algun moment, a la biologia molecular o la bioquímica. I mira per on que amb 23 anys vaig aconseguir realitzar el meu propòsit: un doctorat a cavall entre un grup de biòlegs a l'IMIM un de químics de la UB.

Ja ho diuen ja: "no vols caldo? Dues tasses!".

Vaig començar el doctorat sense saber massa on em posava i amb algun dubte sobre si això era, realment, el que volia fer a la vida. Just venia d'un viatge per la Índia que m'havia obert molt la ment i tancar-me en un laboratori se'm feia estrany. No negaré que des d'aleshores he tingut moments molt durs on em plantejava seriosament que estava fent en un laboratori quan podria estar voltant per les muntanyes o organitzant una comunitat hippy en alguna illa tropical. Però vaig seguir endavant tot i els dubtes i ara, que just acabo i puc fer un balanç de la tesi, veig que vaig triar un bon camí.

En aquest temps he entès una mica més què és la ciència i què implica ser científic. Hi ha moltes coses que no m'agraden i no hi estic d'acord, però al final he arribat a la conclusió que és una bona manera d'invertir-hi el meu temps i la meva energia. Per mi fer ciència és intentar entendre el nostre món i ampliar el coneixement que tenim dels fenòmens que hi succeeixen. D'alguna manera és un acte d'amor. Entendre implica estimar. El meu avi em va ensenyar que la millor manera de solucionar els problemes és via el diàleg i fer ciència, per mi, és un diàleg amb el món. Un diàleg que té com a finalitat comprendre millor que hi succeeix. És doncs un camí (que no l'únic) cap a una major harmonia amb el nostre entorn.

Crec que la gent que ens dediquem a aquesta feina no ho fem pels diners. Tampoc ho fem pel poder que acumulem i difícilment ens farem famosos. Crec que la major part de nosaltres ho fem per satisfer una curiositat que prové de l'admiració que sentim cap a la vida.

En aquests cinc anys i nou mesos m'han succeït moltes coses. Puc dir sense cap dubte que ha estat el període més intens de la meva vida. He realitzat molts projectes que m'han enriquit i m'han forjat com a persona. Els primers dos anys de tesi van coincidir amb una activitat política molt intensa. Va ser un temps d'ideals i de lluita. Molta gent sortia al carrer revelant-se contra el sistema que vivíem. El Banc Mundial a Barcelona; Niça; la cimera dels caps d'estat europeus a Barcelona; Torreblanca; els sopars populars a Sant Cugat; les eleccions municipals, l'okupació de la casa al carrer Girona, "Sant Cugat no m'estima" i entre mig reunions a Madrid, a Milà i assemblees a tort i a dret. En tot aquest temps he descobert que existeixen altes maneres de funcionar i de

prendre decisions. Ha estat un període de grans il·lusions i de molta energia. També he patit grans decepcions, però he après molt i m'ha permès crear-me una ideologia política i encara avui continuo pensant que cal treballar activament per transformar el món en un lloc una mica millor cada dia. Crec que fer ciència ben feta i amb consciència és també una manera de canviar el món.

La meua tesi també ha vist grans viatges. Vaig començar just arribat de 5 mesos per la Índia, tot sol, en un viatge iniciàtic. També m'he passat un mes i mig a Perú fent muntanya i viatjant pel país. He recorregut Cuba en bicicleta i New York en metro. He estat en llocs tant remots com el llac Baikal just al bell mig de la Sibèria o més propers com Londres, París, Sevilla, Madrid, etc. No està gens malament per un sou de becari! En tots aquests viatges he conegut molta gent que m'ha ajudat, de nou, a veure que existeixen moltes maneres d'entendre la vida i que moltes d'elles són un bon camí cap a la felicitat i la realització personal.

La tesi també ha coincidit amb una època de realitzacions a nivell esportiu: ascensions a varis sis-mils, vies d'escalada a mansalva, 150 tresmils als Pirineus, dues maratons, curses de resistència de fins a 92 Km, un raïd i més encara! De nou crec que no està gens malament per un becari precari!

I no puc oblidar totes les festes que he fet, des de les barraques, alguna rave, concerts i tants sopars a la terrasseta de casa meua amb els amics per després acabar al "Mundo Caníval". Fins i tot en congressos a Córdoba i València, que demostren que els científics també podem ser divertits un cop deixem de parlar de "DNA polimerases", "d'expressió de proteïnes endògenes" o de "microarrays".

La tesi també ha coincidit amb l'inici de la meua vida independent. Amb el primer sou vaig sortir del niu matern per independitzar-me a Sant Cugat, el meu poble. I es que, malgrat m'agrada tant viatjar, també m'agrada saber que hi ha un lloc on tinc les meves arrels.

Ep i que encara que no ho sembli també he treballat! En aquests anys al laboratori he après un mica la feina del científic: llegir articles, dissenyar experiments, realitzar-los, deprimir-me perquè no han sortit, tornar-los a repetir, tornar-me a deprimir i així tantes vegades com calgui fins trobar les condicions idònies i treure uns resultats, que després permetran concloure que la hipòtesi de partida era incorrecte...

I de tant en tant una joia.

Un experiment que t'indica el camí a seguir, una dada que t'omple de felicitat i et fa sentir que els astres estan en conjunció i que Déu existeix! Mica en mica, entre suor i moltes frustracions he anat fent el meu camí, aportant algun bri de palla al que és el paller del coneixement humà, que per cert té moltes agulles dures i punxegudes! Lo més curiós del cas és que amb el temps cada cop he fruit més de la meua feina. Cada vegada hi he dedicat més energia i esforços i cada vegada n'he tret més fruits. I així fins al final, a dia d'avui, que tot i patir una mica l'estrès del final d'una tesi, també sento una gran pau d'esperit de saber que faig allò que m'agrada i que crec que és correcte.

En tot aquest viatge he compartit el temps amb moltes persones. Se que és impossible mencionar-les a totes aquí, però voldria, si més no, esmentar aquelles que hi han jugat un paper clau:

Primer de tot la meua família: l'Ignasi, la Ivette, el Marc, el Nil, la Sílvia, el Sergi i els avis d'Agramunt. Amb ells comparteixo els gens i molt d'amor. Penso em mi mateix com la suma del que he après i ells són els que més m'han ensenyat. També vull tenir un record pel meu avi Frederic, a qui dedico aquesta tesi, i que sé que li hauria agradat

molt estar-hi present i de nou pel meu pare, Ignasi, que ha tingut la santa paciència de corregir-me la tesi.

Vull agrair als meus "jefes", David Andreu i Pilar Navarro, que m'han ajudat tots aquests anys. Sé que no sempre ha estat fàcil tenir-me per becari i això encara fa més valuós el suport que m'han donat. El David que m'ha fet costat tot i que de vegades no tenia massa clar a que em dedicava, demostrant una confiança que ha anat creixent amb els anys i de la que espero haver estat mereixedor. La Pilar que sempre ha estat assequible i tolerant amb els meus projectes esbojarrats. Hi ha un moment en especial que recordo i que li vull agrair: una conversa que vam tenir just després d'un seminari en la meva època de màxima desmotivació on va ser capaç de tornar-me les ganades de treballar. També vull mencionar al Paco Real, que tot i no aparèixer com a director d'aquesta tesi si que ha actuat moltes vegades com a tal i que és l'artífex de moltes de les idees que hi surten. És segurament la persona més donada a la ciència que conec i per això l'admiro.

El meu entorn laboral també ha estat important al llarg d'aquests anys. Tant la UBCM, el grup de Proteòmica i, en el seu moment, el grup 10 de pèptids de la UB. Tota la gent que hi he conegut és, en part, també responsable d'aquesta tesi: amb vivències compartides, converses de sobretaula, o simplement amb la seva presència que enriqueix l'ambient del laboratori (sobretot a l'estiu quan les noies venien amb tirantets!). He tingut la sort de viure a cavall entre el laboratori de proteòmica, on hi tenia el meu racó "de pau" i on sempre m'he sentit còmode i la UBCM, ple de becaris precaris com jo, on es respirava un ambient més alegre i intens. Aquests dos laboratoris han estat casa meva aquests anys. Vull agrair als seus "habitants", doncs, el temps compartit. D'entre tots ells en vull destacar uns quants, amb qui hi he tingut una relació més especial. De proteòmica el Miquel, company de tesi i de penúries amb qui tenia llargues converses político-filosòfiques i que és una bellíssima persona tot i ser de dretes, tot i que encara tinc fè en que un dia vegi la llum i es passi al bandol dels bons! La Judit, companya de tesi sènior, confident d'ultramar dels meus llios amorosos i a qui també admiro moltíssim i la Beatriz, que s'ha fet un fart de resoldre'm dubtes existencials sobre tipus de lletra i mida de les figures i que sempre té alguna paraula bonica per mi, els tres són bons amics i companys a qui estimo. De la UBCM també n'he tret una colla d'amics, el primer va ser el Maurici, amb qui he compartit tota la tesi i alguna cursa assassina de resistència. Ell ha estat la meva ànima bessona aquests anys i d'ell n'he après la tenacitat que cal tenir per dedicar-se a la ciència i a córrer maratons. El Ramon és un altre bon amic que he fet al laboratori, que te la sana afició d'investir-me amb la seva bicicleta i destrossar la meva! Ja he perdut l'esperança que em pagui la reparació... La Laia també forma part del meu "nucli dur" i ha estat una font d'alegria i entreteniment amb les seves trifulgues amoroses, visca els culebrons! La Cristina amb qui he compartit l'afició a la capoeira i que te una fantàstic gat "asalta-camas". L'Elena ha estat una troballa més recent però no per això menys important. En aquest temps s'ha forjat una bonica amistat entre nosaltres i crec que ha estat la clau per fer que marxi d'aquest laboratori amb tan bon feeling... i amb uns quants "mezcladillos" fantàstics en exclusiva!

També vull mencionar la gent que ha estat implicada més directament en la meva feina: La M. Luz, la Cristina i la Gemma de proteòmica, que em van donar un cop de mà amb els masses i la E2D. El Ricardo, que malgrat no pertànyer a cap dels meus laboratoris m'ha ajudat moltíssim amb la SPR. De la UBCM: la Peirols, l'Ester, la Coral i l'Elena (de nou), que, a apart del "buen rollete", també s'han currat uns quants experiments ben majos.

Els meus amics també han estat una font important d'amor aquests anys: el Ramon, amb qui estic encantat d'haver conviscut i fet concursos de llançament de bombardes des de la terrassa; el Xesco, el meu actual company de pis i que em suporta cada dia; el Fra-super-pressi que em té ben enredat al club; l'Elena amb qui comparteixo l'afició a les filosofades cosmo-místiques; la Maiushka companyera de transiverià; el Hare amb qui he canviat tantes vegades el món fent una birra; el Ferran que, no se com, és capaç de dilatar les bicicletes; la Janòfila, que tant estimo i admiro i que m'ha fet el disseny de la tesi (ella si que es mona!); el Nestor, tant motivat com jo a destrossar-se físicament; el Joel, un altre psicòpata que m'enreda a fer bestières; i per últim la Lau, una noia molt especial que em va regalar quatre meravellosos mesos i una bonica amistat. Aquesta tesis va veure el seu naixement a casa seva i per això n'hi pertany un tros.

Tota aquesta gent ha format part de la meva vida durant aquests anys, però me n'he oblidat molta d'altra. Faig extensiu, el meu agraïment a tots aquells que en un moment o altre s'han creuat a la meva vida i han col·laborat a fer-la més bonica i interessant.

Per últim lloc he deixat la persona més important: l'Anna. Ella ha estat la darrera troballa d'aquesta tesi. Ja fa dos anys que la conec, i durant tot aquest temps no he deixat d'admirar-la més i més i de meravellar-me de cada cosa nova que en descobria. Finalment la nostra amistat ha esdevingut quelcom més i he descobert com n'és de fantàstica la vida al seu cantó.

I un cop acabat el prefaci ja només queda llegir la tesi.

Disfruteu-la!!

Apa, bona sort i bon nadal!

Oriol Roda Noguera
Barcelona 8 de Maig del 2006

Tesi Doctoral

Caracterització dels receptors de l'activador tissular del plasminogen (tPA) en càncer de pàncrees

Oriol Roda Noguera

Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular
Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Unitat de Proteòmica i Química de Proteïnes
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra



IMAS
Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM



Barcelona Abril 2006

Caracterització dels receptors de l'activador tissular del plasminogen (tPA) en càncer de pàncrees

Memòria presentada per Oriol Roda Noguera
per optar al grau de Doctor
pel Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu Fabra

Tesi realitzada sota la direcció dels doctors:

Pilar Navarro Medrano
Institut Municipal d'Investigació Mèdica

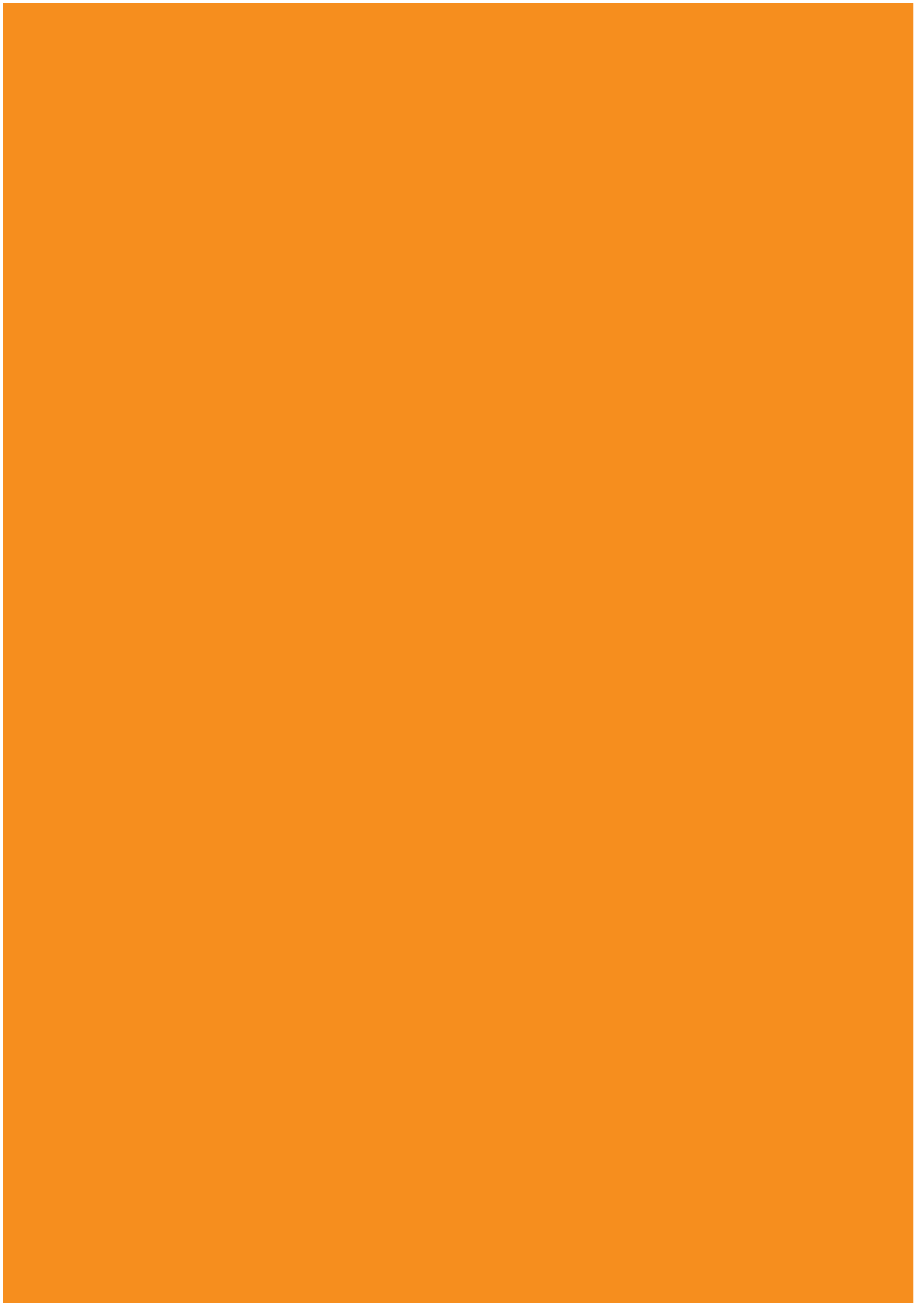
David Andreu Martínez
Universitat Pompeu Fabra

Programa de Doctorat en
Ciències de la Salut i la Vida del
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Universitat Pompeu Fabra (Bienni 2001-2003)

Pilar Navarro Medrano
Directora de tesi

David Andreu Martínez
Director de tesi

Oriol Roda Noguera
Doctorand



TAULA DE CONTINGUTS

ABREVIATURES

TAULA D'AMINOÀCIDS

SÍNTESI

TAULA DE CONTINGUTS	I
ABREVIATURES	III
TAULA D'AMINOÀCIDS	V
SÍNTESI	VII
INTRODUCCIÓ	
1) El càncer de pàncrees	1
1.1) El pàncrees	1
1.2) Model de progressió tumoral	2
1.3) Característiques del càncer de pàncrees	3
2) El sistema del plasminogen	7
2.1) Components	7
2.2) Funcions	10
2.3) El sistema del plasminogen en càncer	11
3) L'activador tissular del plasminogen (tPA)	13
3.1) Característiques	13
3.2) Receptors i lligands del tPA	14
3.3) Funcions	15
3.4) tPA i càncer	16
4) L'Annexina A2 (AnxA2)	18
4.1) Característiques	18
4.2) Funcions	19
4.3) L'AnxA2 i el sistema del plasminogen	20
4.4) AnxA2 i càncer	21
5) La galectina 1	23
5.1) Característiques	23
5.2) Funcions	25
5.3) Gal 1 i càncer	28
OBJECTIUS	31
RESULTATS	
1) New insights into tPA/Annexin A2 interaction	33
1.1) Resum	33
1.2) Article	35
1.3) Resultats addicionals	43
2) A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells	45
2.1) Resum	45
2.2) Article	47
3) Identification of a new tissue-plasminogen activator receptor: galectin-1 mediates tPA functions in pancreatic cancer	53
3.1) Resum	53
3.2) Article	55

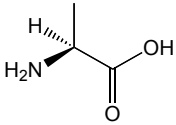
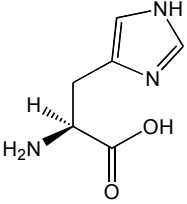
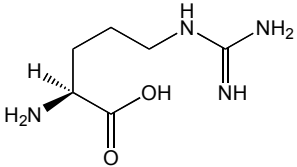
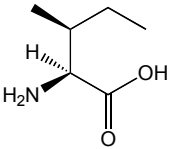
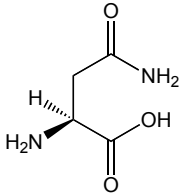
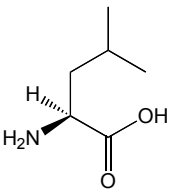
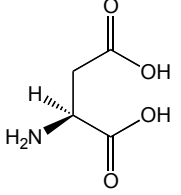
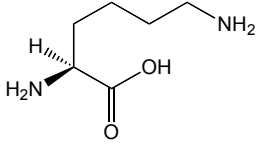
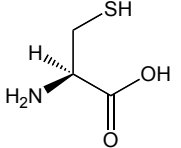
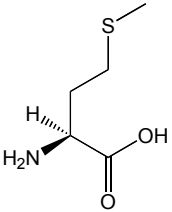
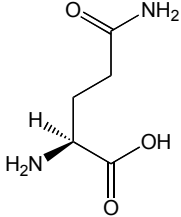
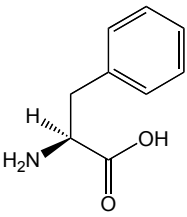
DISCUSSIÓ	77
CONCLUSIONS	85
MATERIALS I MÈTODES	
1) Materials	87
1.1) Aparells utilitzats	87
1.2) Reactius	88
1.3) Anticossos	89
1.4) Tampons	90
1.5) Cultius cel·lulars	91
2) Mètodes	92
2.1) Preparació de l'AnxA2 recombinant	92
2.2) Biotinilació del tPA	92
2.3) Síntesi de pèptids	92
2.4) Assaig ELISA competitiu	94
2.5) Espectrometria de masses per determinar l'interacció del pèptid LCKLSL i els seus derivats amb l'AnxA2	94
2.6) Acoblament del tPA a la sepharose CNBr	95
2.7) Pull down	95
2.8) Preparació de fraccions de membrana riques en colesterol (rafts)	95
2.9) Separació de les proteïnes mitjançant E2D	96
2.10) Digestió i identificació de les mostres mitjançant espectrometria de masses	96
2.11) Experiments de migració mitjançant la curació d'una ferida.	97
2.12) Immunofluorescència i microscòpia confocal	98
2.13) WB (WB)	98
2.14) Ressonància de plasmó superficial	99
2.15) Inhibició de l'expressió de la gal 1 mitjançant interferència de RNA (siRNA)	100
2.16) Assaig d'activació de la MAP quinasa Erk1/2	100
2.17) Assaig de proliferació cel·lular	101
3) Protocols	102
3.1) ELISA competitiu	102
3.2) ELISA competitiu sobre HUVEC	103
3.3) Preparació de resina Sefarosa-CNBr acoblada al tPA	104
3.4) Pull down	105
3.5) Purificació de rafts	106
3.6) Tinció de gels amb nitrat de plata	107
3.7) Digestió enzimàtica de bandes de gels acrilamida	108
3.8) Immunofluorescència i migració per curació de ferida	109
3.9) WB	110
3.10) Inhibició de l'expressió de la gal 1 mitjançant siRNA	111
3.11) Assaig d'activació de la MAP quinasa Erk1/2	112
3.12) Assaig de proliferació cel·lular mitjançant incorporació de timidina tritiada	113
BIBLIOGRAFIA	115

ABREVIATURES

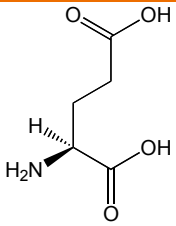
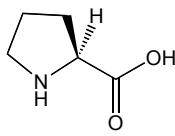
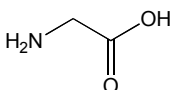
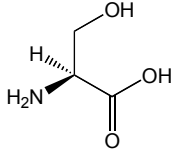
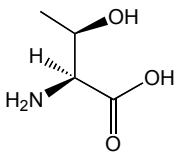
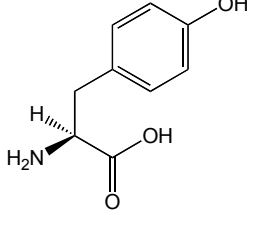
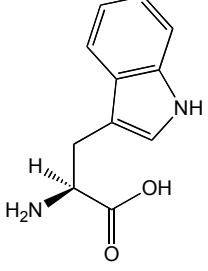
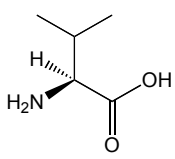
aa	Aminoàcid
AnxA2	Annexina A2
AnxA2d	Annexina A2 dimèrica
AnxA2m	Annexina A2 monomèrica
AnxA2t	Annexina A2 tetramèrica
BSA	Albúmina sèrica bovina
DMEM	Medi modificat Dulbecco
E2D	Electroforesi bidimensional
ECL	Enhanced ChemiLuminiscence
ECM	Matriu extracel·lular
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
EGF	Factor de creixement epitelial
ELISA	Assaig immunoenzimàtic d'adsorció
FBS	Sèrum fetal boví
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
FGF	Factor de creixement fibroblàstic
gal 1	Galectina 1
gal 3	Galectina 3
HBS-P	Tampó HEPES salí amb surfactant P20
Hcy	Homocisteïna
HGF	Factor de creixement dels hepatòcits
HPLC	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
HRP	Peroxidasa de rave
HUVEC	Cèl·lules endotelials de cordó umbilical
IEF	Isoelectroenfoc
KSFM	Medi de queranòcits lliure de sèrum
MBS	Tampó salí d'àcid 4-morfolinoetansulfònic
MEFs	Fibroblasts d'embrió de ratolí
MMPs	Metal·loproteïnases
PAI	Inhibidor de l'activador del plasminogen

PAs	Activadors del plasminogen
PanINs	Lesions neoplàssiques intraductals pancreàtiques
PBS	Tampó salí fosfat
PBSt	Tampó salí fosfat 0,02% Triton X 100
PLG	Plasminogen
RNA	Àcid ribonucleic
SDS	Sulfat de dodecil
siRNA	<i>Small interferent</i> RNA
TA	Tampó d'acoblament
TBS	Tampó Tris/HCl salí
TBSt	Tampó Tris/HCl salí 0,02% Triton X 100
TGF- β	Factor de creixement transformant beta
TGS	Tris-glicina-SDS
TIE	Tampó d'incubació d'ELISA
tPA	Activador tisular del plasminogen
TRITC	Isotiocianat de tetrametilrodamina
uPA	Activador del plasminogen tipus uroquinasa
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli venós
WB	Western blot

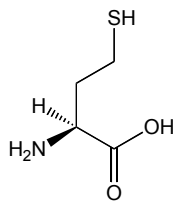
TAULA D'AMINOÀCIDS

Nom		Estructura	Nom		Estructura
Ala	A Alanina		His	H Histidina	
Arg	R Arginina		Ile	I Isoleucina	
Asn	N Asparagina		Leu	L Leucina	
Asp	D Àcid aspàrtic		Lys	K Lisina	
Cys	C Cisteïna		Met	M Metionina	
Gln	Q Glutamina		Phe	F Fenilalanina	

Taula d' Aminoàcids

Glu E Àcid glutàmic		Pro P Prolina	
Gly G Glicina		Ser S Serina	
Thr T Treonina		Tyr Y Tirosina	
Trp W Triptòfan		Val V Valina	

Aminoàcids no naturals

Nom	Estructura
Hcy Homocisteïna	

Les abreviatures dels aminoàcids segueixen les normes de la comissió de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB com s'especifica a *Eur. J. Biochem.* **138**; 9-37 (1984) i *Eur. J. Biochem.* **213**: 2 (1993)

SÍNTESI

L'activador tissular del plasminogen (tPA) és una serin proteasa que forma part del sistema d'activació del plasminogen a plasmina, una proteasa d'ampli espectre. El paper principal d'aquest sistema és l'eliminació dels coàguls de fibrina a la sang. També s'ha descrit la seva participació en els processos de migració i remodelació tissular, on actua degradant la matriu extracel·lular. El sistema del plasminogen també participa en els processos tumorals, sobretot en invasió i metàstasi.

Estudis anteriors havien descrit la sobre-expressió del tPA en el càncer de pàncrees i com aquesta sobre-expressió donava lloc a un fenotip més agressiu. El tPA és una proteïna essencialment soluble, present en el plasma i en el medi extracel·lular, però que també pot unir-se a la membrana cel·lular mitjançant la interacció amb certs receptors. Aquests són capaços d'augmentar la capacitat catalítica del tPA i la consegüent producció de plasmina, però també poden facilitar altres funcions independents d'aquesta.

L'objectiu d'aquesta tesi és identificar i caracteritzar els receptors del tPA que possibiliten la seva acció en la progressió tumoral de les cèl·lules tumorals pancreàtiques.

La tesi es divideix en els següents capítols:

New insights into tPA/Annexin A2 interaction (Roda et al. JBC vol 278 pp. 5702–5709, 2003)

L'annexina A2 (AnxA2) ha estat descrita com a receptor del tPA en cèl·lules endotelials, a més les cèl·lules pancreàtiques tumorals en presenten una sobre-expressió, suggerint la seva possible implicació com a receptor del tPA en aquest sistema. Diferents articles havien descrit els residus 7 a 12 (LCKLSL) de l'AnxA2, com a regió d'unió al tPA, a partir de l'estudi dels efectes inhibitoris d'un pèptid d'aquesta seqüència sobre la interacció tPA/AnxA2.

Basant-nos en aquestes dades vam dissenyar una biblioteca de pèptids amb diferents modificacions sobre la seqüència consens LCKLSL, per tal d'analitzar i caracteritzar millor la interacció tPA/AnxA2 i el paper que hi juguen els diferents residus. En cas d'identificar un pèptid amb una bona capacitat inhibidora, utilitzar-los com un cap de sèrie per a un posterior estudi farmacològic.

Mitjançant un assaig ELISA vam testar l'efecte inhibitori dels diferents pèptids sobre la interacció tPA/AnxA2. Sorprenentment els resultats indicaven que únicament la presència d'una Cys o Hcy a la seqüència del pèptid era suficient perquè aquest fos capaç d'inhibir la interacció entre les dues proteïnes. Aquests resultats es van confirmar sobre les cèl·lules HUVEC, que presenten una alta expressió de l'AnxA2, on la addició de pèptids amb una Cys o Hcy inhibia l'adhesió del tPA a les cèl·lules.

Per tal de caracteritzar millor el mecanisme d'inhibició dels pèptids vam realitzar un estudi mitjançant espectrometria de masses. Els resultats ens van indicar que la

presència d'un grup tiol en la seqüència del pèptid comportava la seva unió a la Cys⁸ de l'AnxA2, mitjançant la formació d'un pont disulfur, bloquejant d'aquesta manera el lloc d'interacció amb el tPA.

Malgrat que aquest resultat confirmava la importància de la regió N-terminal de l'AnxA2, i sobre tot de la Cys⁸, en la interacció amb el tPA, posava en entredit que LCKLSL fos el motiu d'unió al tPA i plantejava la necessitat d'una caracterització més exhaustiva del domini d'interacció tPA/AnxA2.

A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells (Roda et al. *Proteomics* vol 6 pp. S36–S41, 2006)

Uns experiments realitzats en el nostre laboratori, així com diferents articles publicats, suggerien que l'AnxA2 no era l'únic receptor del tPA en el pàncrees. A més a més s'havia descrit un paper mitogènic del tPA independent del plasminogen, que només s'explicava en part per la interacció amb l'AnxA2. La interacció tPA/AnxA2 també s'havia descrit en altres tipus cel·lulars. Així doncs, era interessant la recerca de nous receptors del tPA en el pàncrees, a fi de localitzar altres possibles dianes terapèutiques, a poder ser més específiques del pàncrees, i identificar el mecanisme pel qual el tPA activava una senyalització intracel·lular.

Vam posar a punt una metodologia de captura per afinitat i caracterització de les proteïnes capaces d'unir-se al tPA basada en un assaig *pull down* (amb una columna de Sepharose on havíem unit covalentment el tPA) i el posterior anàlisi proteòmic mitjançant una electroforesi bidimensional i espectrometria de masses.

Les mostres analitzades van ser, per una banda, uns lisats totals de la línia tumoral pancreàtica PANC-1 i, per l'altra, la fracció purificada dels dominis de membrana rics en colesterol (*rafts*) on ja s'havia descrit la presència de l'AnxA2. Els resultats es van comparar amb uns altres obtinguts de les cèl·lules HUVEC per tal de discriminar aquelles proteïnes que es presentaven només en les cèl·lules pancreàtiques.

Finalment es van identificar un total de 31 proteïnes candidates a ser receptors del tPA en el pàncrees. Un estudi bibliogràfic va servir per a destriar aquelles proteïnes que presentaven més possibilitats de ser un nou receptor del tPA. Els resultats es van validar per Western Blot (WB) per aquelles proteïnes que, o bé ja estaven descrites com a receptors del tPA en altres tipus cel·lulars (la α -enolasa, l'AnxA2 i les citoqueratines 8 i 18) o que presentaven característiques per a ser nous receptors (la cortactina i la galectina 1).

Identification of a new tissue-plasminogen activator receptor: galectin-1 mediates tPA functions in pancreatic cancer (Manuscrit en preparació)

Una de les proteïnes identificades en l'anterior estudi proteòmic va ser la galectina 1 (gal 1). La seva localització en membrana i algunes altres característiques d'aquesta lectina, suggerien que podia ser un bon candidat a receptor del tPA. Tot i així la seva expressió en el càncer de pàncrees ha estat sempre relacionada a l'estroma circumdant a la massa tumoral i no pas al tumor en si. En el darrer apartat de la tesi s'ha dut a terme la caracterització bioquímica de la interacció tPA/gal 1, així com la determinació de l'expressió i localització de la gal 1 en les cèl·lules pancreàtiques tumorals.

Finalment s'han realitzat alguns experiments per determinar la rellevància biològica d'aquesta interacció.

Primerament hem analitzat l'expressió de la gal 1 en una bateria de línies cel·lulars originàries de tumors pancreàtics i en una línia de fibroblasts originaris d'un càncer de pulmó mitjançant WB. D'aquesta manera hem pogut demostrar que la gal 1 s'expressa en la majoria d'aquestes línies. A més a més hem confirmat la interacció tPA/gal 1 en algunes d'elles mitjançant un assaig *pull down*.

En segon lloc hem realitzat un estudi *in vitro* d'aquesta interacció mitjançant una ressonància de plasmó superficial i un *pull down* amb la proteïna recombinant. Els resultats s'han comparat amb els obtinguts per l'AnxA2 i la galectina 3 (una altra lectina que s'ha descrit sobre-expressada en el càncer de pàncrees). Hem pogut concloure, doncs, que la gal 1 interacciona directament amb el tPA, i que per a aquesta proteïna té una afinitat molt semblant a la de l'AnxA2 i molt per sobre de la de la gal 3.

També s'han realitzat estudis d'immunofluorescència en experiments de curació d'una ferida en cultius cel·lulars per tal de determinar la localització de la gal 1 i si coincideix amb la del tPA. Els resultats demostren que la gal 1 s'expressa essencialment en el front de tancament d'una ferida suggerint un possible paper en els processos d'invasió i la progressió tumoral. A més a més colocalitza amb el tPA, afegint una nova dada que corrobora el possible paper de la gal 1 com a receptor del tPA.

Finalment s'ha estudiat l'activació de la MAP quinasa Erk1/2 induïda pel tPA sobre unes cèl·lules tractades amb un siRNA contra la gal 1 i sobre una línia de fibroblasts embrionaris d'un ratolí deficient de la gal 1. Els resultats han demostrat que la inducció de la fosforilació de l'Erk1/2 pel tPA es veu inhibida en les cèl·lules deficientes per la gal 1, fet que indica, doncs, la implicació de la gal 1 en la senyalització mitogènica del tPA.

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

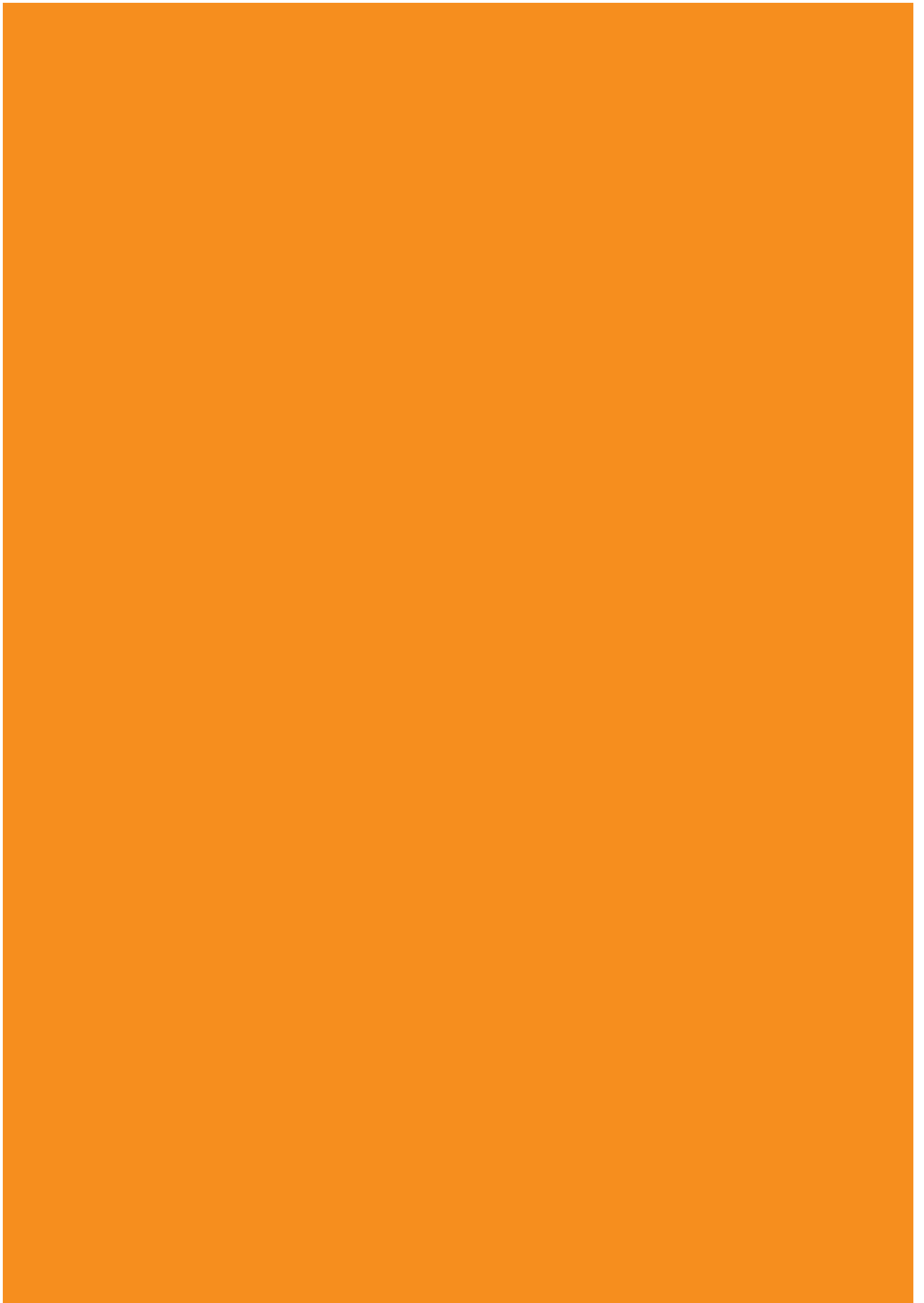
RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

MATERIALS I MÈTODES

BIBLIOGRAFIA



1) El càncer de pàncrees

1.1) El pàncrees

El pàncrees es un òrgan glandular lobulat. Té un color marró rosat i està situat al quadrant superior de la cavitat retroperitoneal de l'abdomen. Acostuma a fer uns 16 cm de llarg, 6 d'ample i 2,5 de gruix en una persona adulta. A nivell morfològic es divideix en quatre regions: el cap, el coll, el cos i la cua (fig. 1a). També podem dividir el pàncrees en relació a la seva funció fisiològica. Així doncs, existeix el **pàncrees exocrí**, que secreta enzims al tub digestiu, i el **pàncrees endocrí**, que s'encarrega de la secreció d'hormones al flux sanguini.

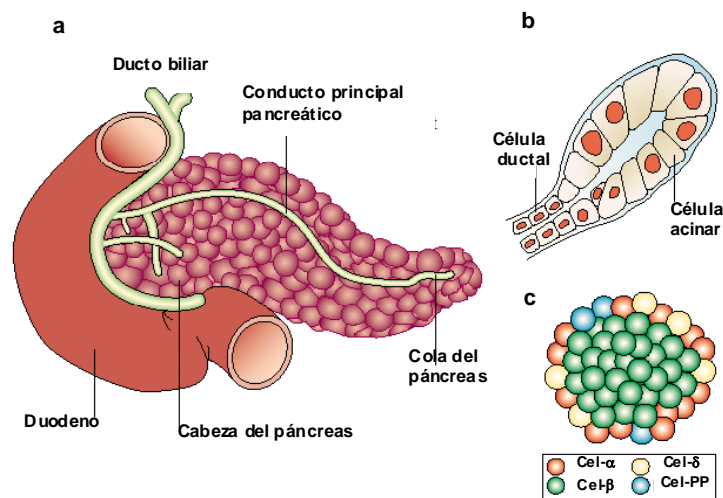


Figura 1. El pàncrees: un òrgan mixt endocrí i exocrí: (a) Parts diferenciades de l'òrgan madur. (b) Tipus cel·lulars del pàncrees exocrí, les cèl·lules acinars secreten enzims digestius que són transportats a l'intestí a través del sistema ductal. (c) El pàncrees endocrí, format per 4 poblacions cel·lulars (cèl·lules β , verd; cèl·lules α , vermell; cèl·lules δ , groc, i cèl·lules PP, blau). Figura adaptada d'Edlund [1].

A) Pàncrees exocrí

Aquest teixit representa la major part del pàncrees (85% de les cèl·lules). Està constituït per una gran quantitat de cèl·lules acinars que es caracteritzen per ser riques en reticle endoplasmàtic rugós i grànuls secretors dels zimògens dels enzims digestius. Una altra població, més minoritària però igualment important, és la constituïda per les cèl·lules ductals, d'origen epitelial. Aquestes cèl·lules formen els ductes que permeten arribar els enzims secretats als acinis fins el tub digestiu (fig 1b)

B) Pàncrees endocrí

Representa només el 1% de les cèl·lules de l'òrgan. Està format per els anomenats illots de Langerhans, dispersos entre el teixit exocrí. Els illots estan constituïts alhora per agrupacions de quatre poblacions cel·lulars: cèl·lules α , cèl·lules β , cèl·lules δ i cèl·lules PP; que s'encarreguen de la secreció de la insulina, el glucagó, la somatostatina i el polipèptid pancreàtic respectivament [2] (fig 1c).

1.2) Model de progressió tumoral

El model més amplament acceptat és el de l'origen clonal, que proposa que un tumor té origen en la mutació d'un o més gens en una sola cèl·lula d'un teixit que li confereixen un avantatge en el creixement respecte les altres cèl·lules. Aquestes mutacions es van acumulant al llarg de successives divisions de tal manera que les descendents d'aquesta "cèl·lula mare tumoral" van ocupant l'espai del teixit i en última instància desenvolupen un fenotip invasiu i metastàtic (fig 2) [3].

Malgrat que aquesta teoria és la prevalent avui en dia, certs autors postulen la possibilitat de l'origen policlonal d'alguns càncers. Això implicaria que un tumor estaria format per un conjunt de poblacions originades a partir de diferents "cèl·lules mare tumorals" i que justament la interacció entre aquestes poblacions amb característiques diferents és la que generaria certs trets tumorals [4].

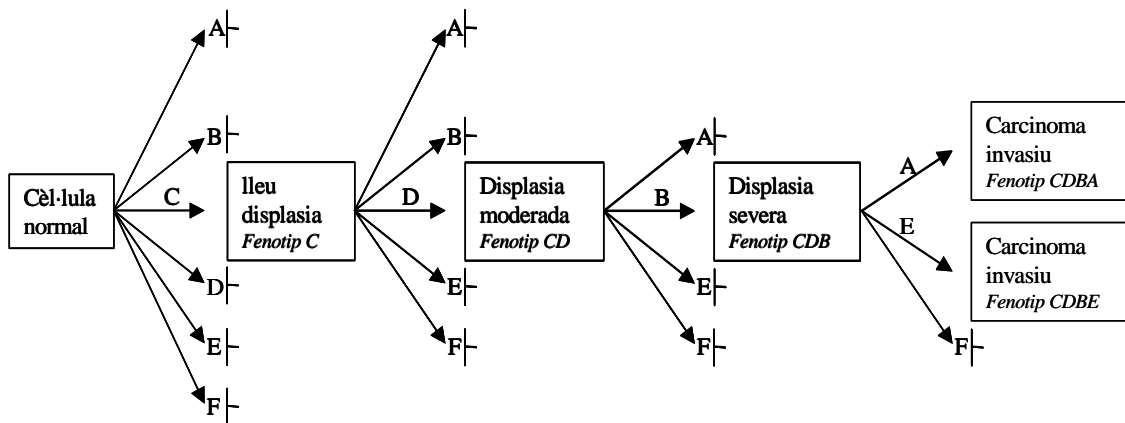


Figura 2. Procés d'aparició d'un càncer segons el model monoclonal: començant en una sola cèl·lula i progressant en una seqüència de passos des de la displàsia fins al carcinoma invasiu. Basat en el model de Vogelstein sobre el càncer de colòn, aquest diagrama és representatiu de la progressió neoplàsica en teixit epitelial. El diagrama representa diferents rutes en el desenvolupament d'un tumor on A,B,C,D, i F són possibles mutacions de gens, que, en ser seleccionades, donen avantatges en la supervivència de les cèl·lules. ┘ indica una mutació no seleccionada. Figura adaptada de Ilyas & Tomlinson [5].

En la literatura hi ha descrits més d'un centenar de càncers diferents. Aquesta gran diversitat fa difícil fer una anàlisi integral dels caràcters definitoris. És possible, però, classificar l'origen de tots els tumors en 6 alteracions fisiològiques essencials [6]:

Autosuficiència davant dels senyals de creixement: Les cèl·lules normals estan subjectes a un control de la seva proliferació per part dels senyals mitogènics externs. Molts càncers són capaços d'autogenerar les molècules que requereixen per a proliferar reduint la seva dependència dels agents externs. Molts dels oncogens que presenten mutacions en els càncers actuen en aquest nivell.

Insensibilitat a senyals d'inhibició del creixement: De la mateixa manera que en el punt anterior, hi ha moltes molècules, tant solubles com ancorades en la matriu extracel·lular (ECM), encarregades d'inhibir la proliferació quan aquesta no es necessita. Molts càncers presenten mutacions en els gens que els permeten escapar d'aquest control.

Evasió de l'apoptosi: La mort cel·lular programada és un mecanisme bàsic en els processos fisiològics per tal d'eliminar aquelles cèl·lules que, o bé han complert la seva funció, o han deixat de ser viables a causa d'un dany genètic o cel·lular irreparable. Els tumors desenvolupen estratègies que els permeten escapar d'aquest control sobrevivint malgrat l'acumulació del dany genètic.

Potencial de replicació il·limitat: La major part de cèl·lules de mamífers tenen una capacitat limitada de dividir-se. Aquesta limitació és conseqüència de l'escurçament dels telòmers dels cromosomes en cada replicació. Aquesta reducció origina diferents aberracions cariotípiques que desemboquen en una crisi de senescència i posterior mort cel·lular. Pràcticament tots els tumors (85-90%) són capaços de preservar la integritat dels telòmers mitjançant l'expressió de l'enzim telomerasa, evitant així la mort per aquest mecanisme.

Angiogènesi: La creació de nous vasos sanguinis és absolutament clau per al manteniment d'un tumor quan aquest adquireix certa mida. Els nous capil·lars suposen tant una via per a obtenir els nutrients i l'oxigen com una porta d'accés al rec sanguini per a les cèl·lules metastàtiques. Els mecanismes pels quals un càncer és capaç d'activar l'angiogènesi van des de l'activació dels gens promotors específics (p.e., el factor de creixement de l'endoteli vascular o els factors de creixement de fibroblasts) fins a la reducció dels factors inhibidors endògens (p.e. la trombospondina-1 o el interferó- β).

Invasió tissular i metàstasi: La capacitat d'un tumor d'envair altres teixits és el resultat d'un conjunt d'alteracions en les seves cèl·lules. Primerament cal que aquestes desenvolupin la capacitat de desenganxar-se de les cèl·lules veïnes i de l'ECM i sobreviure. Això es produeix quan apareixen mutacions o canvis en el nivell d'expressió dels gens encarregats d'aquestes tasques (p.e., la E-cadherina, les integrines, etc). També cal que aquestes cèl·lules s'obrin camí a través de l'ECM. En aquest punt entren en joc les proteases com ara les metal·loproteïnases (MMPs) o la plasmina i tot el seu sistema, encarregades de degradar l'ECM. Les cèl·lules tumorals poden actuar tant augmentant-ne l'expressió i la secreció com reduint l'expressió dels seus inhibidors. En el procés de degradació de l'ECM també s'alliberen molts factors de creixement ancorats que col·laboren al creixement tumoral.

L'acció proteolítica moltes vegades es concentra en la regió pericel·lular i més específicament en el front de migració. Aquesta localització és conseqüència de la presència de receptors específics de les proteases o dels seus activadors en la membrana cel·lular. En un càncer també pot aparèixer sobre-expressió d'aquests receptors específics.

La cèl·lula invasora ha de ser capaç de migrar cap a nous teixits o cap al torrent sanguini, un procés en el qual tenen un paper bàsic els filaments d'actina del citoesquelet i les adhesions focals de la membrana cel·lular. Finalment, en el rec sanguini la cèl·lula metastàtica ha d'esquivar el sistema immunològic de l'organisme i ha de ser capaç d'ancorar-se de nou en un altre teixit i iniciar així un nou tumor.

1.3) Característiques del càncer de pàncrees

1.3.1) Model de progressió tumoral pancreàtica

El 90% dels casos de càncer de pàncrees provenen de l'epiteli ductal i es defineixen com adenocarcinomes ductals del pàncrees (PDA) [7,8]. El model més acceptat postula que el tumor maligne invasiu s'origina en les lesions neoplàsiques intraductals pancreàtiques (PanINs) [9,10]. Podem dividir les PanINs en funció del seu grau de diferenciació (fig. 3):

PanIN-1: Neoplàsia amb l'epiteli mucinós pla sense displàsia (PanIN-1A). En un grau més avançat hi apareixen les papil·les (PanIN-1B). En molts casos presenta mutacions en els gens K-ras i Her-2.

PanIN-2: Apareix una displàsia lleu o moderada. Es pot observar una certa irregularitat nuclear, hiper cromàsia i la pèrdua de la polaritat cel·lular. A més a més de les mutacions anteriors també és freqüent detectar la inactivació del gen p16/INK4a.

PanIN-3 o Carcinoma *in situ*: Epiteli mucinós pla o papil·lar amb una greu displàsia, moltes vegades associat a estructures cribiformes. Apareixen mutacions en la p53, BRCA2 i, en aproximadament un 50% dels casos, en DPC4/SMAD4.

Aquestes lesions no sempre desemboquen en un tumor invasiu i no es coneix exactament quin mecanisme provoca aquesta evolució. S'ha postulat que hi ha un esdeveniment "catastròfic" que se situaria o bé dins PanIN-2 o dins PanIN-3 que desencadenaria irremissiblement el pas cap al càncer invasiu. L'origen d'aquesta catàstrofe possiblement no es pot atribuir a una sola mutació, sinó a l'acumulació de canvis genètics i epigenètics o a l'activació coordinada d'un seguit de programes de transcripció implicats en la capacitat del tumor d'envair a través de la membrana basal [10].

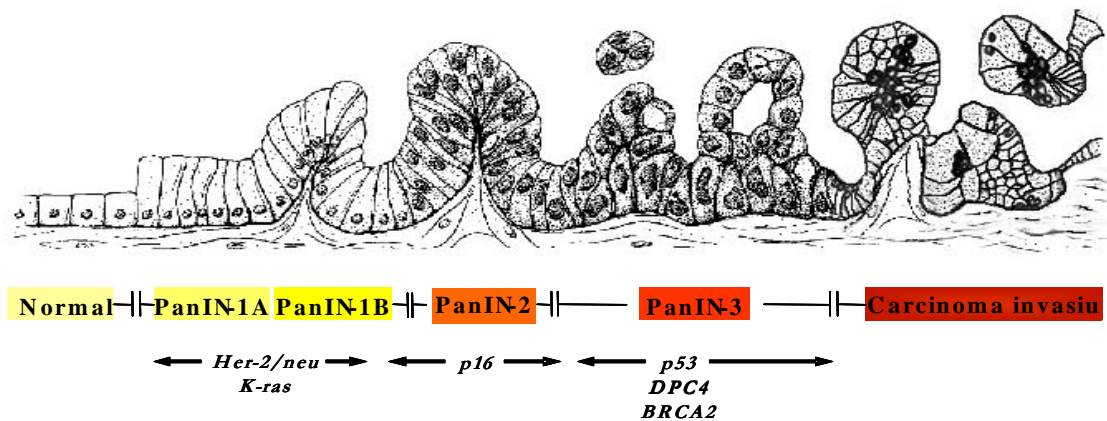


Figura 3. Model de progressió de l'adenocarcinoma ductal pancreàtic: L'epiteli ductal normal progressa a carcinoma invasiu (d'esquerra a dreta) passant per una sèrie de precursors histològicament definits (PanINs). La sobre-expressió del *HER-2/neu* i mutacions puntuals en el gen *K-ras* tenen lloc a l'inici de la progressió (PanIN-1), la inactivació del gen *p16* en fases intermitges (PanIN-2) i finalment la inactivació dels gens *p53*, *DPC4* i *BRCA2* que es dona relativament tard, en lesions PanIN-3 o carcinoma *in situ*.

1.3.2) Característiques moleculars

Les característiques moleculars en la majoria de càncers de pàncrees són bastant homogènies. A la següent taula s'enumeren els oncogens i gens supressors de tumors més importants que hi estan alterats.

Altres gens que estan alterats en els adenocarcinomes ductals de pàncrees són els que codifiquen per factors de creixement i els seus receptors. Podem destacar-ne quatre:

Factor de creixement dels hepatòcits (HGF): També està implicat en la tumorogènesi pancreàtica. Apareix sobre-expressat en les cèl·lules de l'estroma al voltant del tumor. Indueix la dissociació cel·lular i motilitat [11]. El seu receptor també està sobre-expressat [12].

Factor de creixement fibroblàstic (FGF): Dos membres d'aquesta família, el FGF-1 i el FGF-2, estan sobre-expressats en un 60% i 50% dels casos de càncer de pàncrees. Ambdós participen en la reparació tissular, l'atracció quimiotàctica dels fibroblasts i la promoció de l'angiogènesi [13]. Els seus receptors FGFR1, FGFR3 i FGFR4 també presenten una expressió més elevada comparada amb el teixit normal [14].

Factor de creixement transformant beta (TGF-β): Aquesta superfamília de polipèptids té una activitat inhibidora del creixement en molts tipus cel·lulars. En les cèl·lules mesenquimals, però, presenta activitat mitogènica. A més a més són immunosupressors i afavoreixen la formació de l'ECM [15]. Les tres isoformes TGF-β1, TGF-β2 i TGF-β3 són presents en el pàncrees i tenen els nivells d'expressió augmentats

en els tumors. D'aquestes, només TGF- β 2 s'ha correlacionat amb les fases avançades del tumor [16].

Factor de creixement de l'endoteli (VEGF): Aquesta molècula és un potent mitogen de les cèl·lules endotelials. També estimula l'angiogènesi fisiològica i patològica [17]. En el teixit pancreàtic normal aquest factor s'expressa en els illots de Langerhans. En els teixits tumorals s'ha pogut observar un augment dels nivells de RNA missatger i en assaigs immunohistoquímics s'ha observat una alta reactivitat en el 64% dels casos. Aquesta expressió està associada a una major formació dels vasos sanguinis [18].

Finalment cal mencionar el paper de les proteases associades als tumors. D'aquestes en ressaltarem dues famílies: per una banda el sistema del plasminogen (del qual parlarem en el següent capítol) i per altra les metal·loproteïnases. Aquestes últimes constitueixen una família d'enzims proteolítics dependents del zinc. Són capaces de degradar diversos components de l'ECM i de la membrana basal. Es divideixen en grups en funció del substrat de degradació (les colagenases, les gelatinases, les estromelisinines i les matrilisines) [19].

En estudis per northern blot i immunohistoquímica s'ha demostrat la sobre-expressió en el càncer de pàncrees de la colagenasa MMP-2, l'estromelislina MMP-11, la matrilislina MMP-7 i l'inhibidor de les metal·loproteïnases TIMP-1. L'alta expressió de MMP-2 s'ha relacionat amb un fenotip més agressiu d'aquest càncer [20].

Oncogens	Freq (%)	Alteració	Funció	Ref.
K- <i>ras</i>	>95	Mutació puntual, codó 12	Activitat hidrolítica sobre guanosina trifosfat (GTP). Un cop mutat dona una senyalització constitutiva de proliferació cel·lular	[21,22]
AKT2	10-20	Amplificació gènica	Codifica per una proteïna serina/treonina quinasa homologa a la proteïna quinasa-c	[23]
HER2/neu	90 (inicial) i 20 (final)	Sobre-expressió inicial i disminució durant la progressió tumoral	Receptor del factor de creixement epidèrmic (EGF) i del factor de creixement transformant alfa (TGF α), implicada en processos de creixement i diferenciació cel·lular	[24,25]

Gens supressors				
p16/INK4a	95	Mutació puntual, deleció homozigòtica, metilació del promotor	Inhibidor del complex quinasa entre ciclina D i Cdk4/6. Actua com a regulador de la progressió de la fase G1 del cicle cel·lular	[26,27]
p53	50-75	Mutació puntual	Codifica per una fosfoproteïna que s'activa quan hi ha dany cel·lular, permet l'aturada del cicle o l'entrada en apoptosi d'aquesta cèl·lula	[28,29]
SMAD4/ DPC4	55	Deleció homozigòtica, mutació puntual	Participa en la transmissió de senyals del factor de creixement transformant beta (TGF β)	[30]
BRCA2	7-10	Mutació puntual, deleció	Un dels gens principals implicats en el càncer de mama. Contribueix a la reparació del DNA i a la regulació transcripcional en resposta al dany sobre el DNA	[31]

Taula 1. Alteracions en oncogenes i gens supressors de tumors en l'adenocarcinoma pancreàtic humà: Estimada en base a la freqüència de deleció homozigòtica de p16/INK4a. Taula adaptada de Bardeesy N. *et. al.* [32].

2) El sistema del plasminogen

2.1) Components

2.1.1) El plasminogen/plasmina

El plasminogen (PLG) humà és una glicoproteïna de 791 aminoàcids (aa.) sintetitzada principalment en el fetge [33]. És el zimogen de la plasmina, una serin-proteasa d'ampli espectre. El PLG es troba en dues formes: la nativa Glu-PLG i la forma Lys-PLG, que apareix quan la pròpia plasmina proteolitza els enllaços Arg⁶⁸-Met⁶⁹, Lys⁷⁷-Lys⁷⁸ o Lys⁷⁸-Val⁷⁹ i que presenta una major susceptibilitat a ser activada a la plasmina. Aquesta activació la realitzen els activadors del PLG (PAs) mitjançant una proteòlisi parcial en la posició Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² [34]. Les dues cadenes resultants romanen unides mitjançant un pont disulfur.

El centre catalític actiu de la plasmina és constituït pels tres residus: His⁶⁰², Asp⁶⁴⁵ i Ser⁷⁴⁰. S'han descrit, també, cinc dominis homòlegs anomenats *kringle* d'uns 80 aa que formen un triple bucle i que permeten la unió a les lisines [35]. Modificacions post-traduccionals porten a dues variants glicosilades (formes 1 i 2) que regulen, en part la seva interacció amb els receptors cel·lulars [36,37].

La plasmina és una proteasa d'ampli espectre. La seva funció fisiològica més coneguda és la degradació de coàguls de la fibrina en la sang. A més a més també està implicada en la degradació dels components de l'ECM, així com en l'activació de les metalloproteïnes, els factors de creixement latents i la proteòlisi de les glicoproteïnes de la membrana [38-43]. Aquestes darreres activitats són especialment rellevants durant el desenvolupament i en situacions patològiques com ara: la invasió, la proliferació tumoral i la metàstasi.

2.1.2) Els activadors del plasminogen

Es coneixen dues molècules capaces d'activar el PLG: l'activador del plasminogen de tipus uroquinasa (uPA) i l'activador tissular del plasminogen (tPA), ambdues serin-proteases. El tPA serà descrit amplament en el següent capítol.

Activador del plasminogen de tipus uroquinasa (uPA): glicoproteïna de 54 kDa, formada per 411 aa, és sintetitzat com una cadena simple que pot ser proteolitzada per la plasmina i, menys eficientment, per la kaliceïna en la posició Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ donant una forma de doble cadena unida per ponts disulfur [38]. La forma totalment activa sorgeix d'una altra proteòlisi en la posició Lys¹³⁵-Lys¹³⁶, que resulta en l'eliminació de 135 residus.

uPA conté un domini homòleg al del factor de creixement epitelial, un únic domini *kringle* semblant al del PLG i el centre actiu proteolític format pels aa His²⁰⁴, Asp²⁵⁵ i Ser³⁵⁶ [44]. És capaç d'activar el PLG, el HGF i la proteïna estimuladora dels macròfags [45]. A més a més té la capacitat de degradar tant el seu inhibidor PAI-1 com la fibrina de forma independent del PLG [46,47]

Tant el tPA com el uPA catalitzen l'activació del PLG a la plasmina, però tenen diferents funcions *in vivo*. En absència de fibrina, uPA proteolitza el PLG a plasmina més eficientment, mentre que el tPA sols n'és un feble activador. En canvi, la unió d'alta afinitat del tPA amb la fibrina augmenta dramàticament l'efecte del tPA. Aquest mecanisme és el principal responsable de la degradació dels coàguls plasmàtics. Així doncs i en termes generals es considera que el tPA és una proteïna essencialment fibrinolítica mentre que la funció d'uPA estaria més lligada a modular l'activitat de la plasmina en els esdeveniments relacionats amb la degradació de l'ECM com per exemple els fenòmens neoplàsics [48,49].

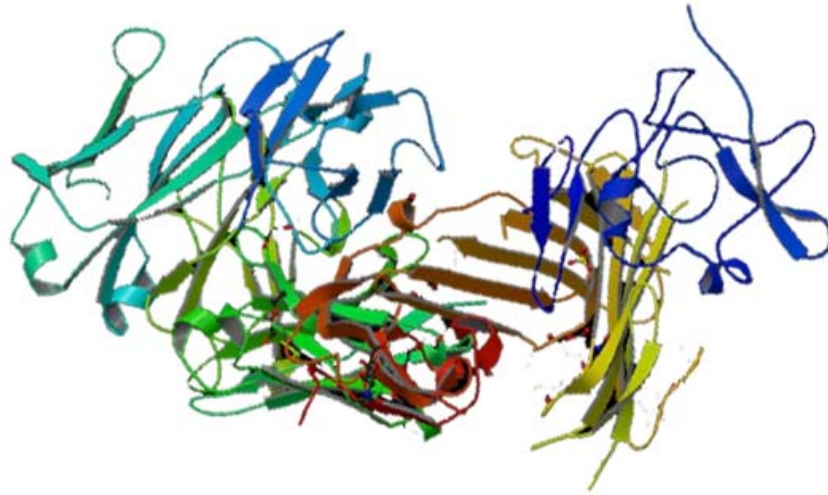


Figura 4: Estructura tridimensional de uPA en complex amb el seu receptor uPAR i l'anticòs α -uPAR. Imatge per difracció de raigs X. Obtinguda i adaptada del *protein data bank* (2FD6) [50].

2.1.3) Els inhibidors del sistema del plasminogen

La inhibició de l'activitat del PLG es pot fer tant a nivell dels PAs com sobre la pròpia plasmina. La majoria dels inhibidors pertanyen a la superfamília de les serpine (*serine protease inhibitors*), que s'encarreguen de la regulació de les cascades d'activació de la coagulació i la fibrinòlisi. Aquestes molècules s'uneixen amb alta afinitat als seus receptors i tenen un centre actiu amb un enllaç peptídic P1-P1 que mimetitzava els substrats de les proteases, però no és susceptible a la degradació i que, per tant, bloqueja l'activitat proteolítica [51].

Inhibidors del PLG/plasmina

α_2 -antiplasmina: Glicoproteïna de 452 aa i 70 kDa (expressada essencialment en el fetge) és el principal inhibidor de la plasmina. Té una cadena de lisines a l'extrem C-terminal que s'uneix als dominis *kringle* de la plasmina i un domini que interacciona amb el centre proteolític de la plasmina tot bloquejant-lo [52].

α_2 -macroglobulina: homotetràmer de 750 kDa sintetitzat per l'endoteli i els macròfags. És l'únic inhibidor que no pertany a la família de les serpine. Actua formant complexos amb la plasmina així com amb altres serin-proteases. Té una activitat deu vegades inferior que la de la α_2 -antiplasmina [53].

Hi ha altres inhibidors amb una activitat menor que cobren rellevància fisiològica quan la α_2 -antiplasmina no és suficient per a bloquejar tota la plasmina present. Destacarem els que actuen sobre la plasmina, tot i que aquesta no sigui el seu principal substrat. Per exemple la α_2 -antitripsina [54], la nexina [36] o la C_1 -esterasa [55].

Inhibidors dels activadors del plasminogen (PAIs)

PAI-1: Glicoproteïna de 45-50 kDa produïda per les cèl·lules endotelials, els monòcits, els macròfags, els adipòcits, els hepatòcits i les plaquetes [56,57]. Un cop sintetitzada canvia de conformació a un estat latent. La forma activa és l'inhibidor més important i ràpid, tant del tPA com del uPA [49].

El PAI-1 es complexa amb la vitronectina i l'heparina tot guanyant estabilitat i ampliant la seva activitat inhibidora a una altra serin proteasa: la trombina [58]. És capaç d'unir-se al complex entre el uPA i el seu receptor (uPAR) inhibint, així, l'activitat proteolítica de la plasmina sobre l'ECM induïda pel uPA unit a la superfície cel·lular [59].

PAI-2: Glicoproteïna de 393 aa i 70 kDa. Existeix també en forma desglucosilada (47 kDa). Membre àcid de la família de les serpine sintetitzada per els leucòcits i les

cèl·lules del fibrosarcoma. Inhibeix el tPA i el uPA, quan estan en forma de doble cadena, però té poca activitat sobre el tPA i cap activitat sobre el uPA quan aquests són en la forma de cadena senzilla [36]. Comparada amb el PAI 1, la seva activitat inhibidora sobre el uPA i el tPA és 10 i 100 vegades inferior, respectivament [60].

PAI-3: També anomenat inhibidor de la proteïna C. És un inhibidor no específic que actua sobre moltes serin proteases, com ara la proteïna C activada, el uPA i l'acrosina [61]. La seva rellevància fisiològica és baixa en esser 1.000 vegades menys eficient que el PAI-1 en inhibir el uPA [62].

Altres inhibidors coneguts són la neuroserpina que en part regula l'activitat del tPA en el sistema nerviós [63], i la procarboxipeptidasa B que té un paper en la fibrinòlisi i actua eliminant lisines terminals (llocs d'unió tant per el tPA com per la plasmina) [64].

2.1.4) Els receptors del sistema del plasminogen

C) Els receptors del plasminogen

Com ja hem comentat, el PLG s'uneix amb baixa afinitat a les cadenes de lisines, preferentment si es situen en l'extrem C-terminal. Així doncs, tota aquella proteïna que en contingui, serà potencialment un receptor.

El principal paper del PLG és la degradació dels coàguls de fibrina en els vasos sanguinis. El receptor principal del PLG en aquest sistema és la pròpia fibrina que, al mateix temps, és el seu substrat.

La unió de la plasmina a la superfície cel·lular està facilitada, sobretot, per les proteïnes que exposen residus de Lys al medi extracel·lular. Aquests receptors es caracteritzen per la seva alta densitat, distribució ubiqua i ser de baixa afinitat [65].

Malgrat la heterogeneïtat dels receptors, podem destacar-ne:

α -enolasa: Proteïna de 45 kDa, identificada inicialment en el sistema nerviós [66], tot i que posteriorment també s'ha relacionat amb la unió del PLG als monòcits i els neutròfils [67].

Annexina A2 (AnxA2): Proteïna de 36 kDa, receptor principal del PLG i el tPA en l'endoteli. És una de les proteïnes estudiades en aquesta tesi i en parlarem més extensament en un capítol posterior.

Glutaraldehyd 3-fosfat deshidrogenasa: Amb una massa de 41 kDa. Aquesta proteïna s'ha identificat com a receptor del PLG en les bactèries [66].

Amfoterina o HMG1: Proteïna de 30 kDa, descrita en el sistema nerviós. També s'uneix al tPA [68].

D'entre els diferents receptors que s'uneixen al PLG per un mecanisme que no implica residus Lys, en destacarem tres:

GPIIb-IIa: Amb 69 kDa. S'ha identificat en les plaquetes [69].

LRP like protein: De 216 kDa. Identificada en els fibroblasts. Sembla que té un paper significatiu en l'activitat patogènica de la plasmina en l'artritis [70].

Gangliòsids: Components de la membrana cel·lular. Van ser identificats com a receptors de la plasmina en les cèl·lules U397, l'endoteli i els fibroblasts [71].

La major part d'aquests receptors també s'uneixen a algun dels PAs. La seva funció primordial és augmentar l'activació del PLG a la plasmina i localitzar l'activitat d'aquesta en la superfície cel·lular.

D) El uPAR, receptor de uPA

L'uPAR és el receptor del uPA en la membrana cel·lular. Aquesta glicoproteïna de 41 kDa i 313 aa s'ancora mitjançant un pèptid senyal de 21 aa. També conté un lloc d'unió al uPA i dos dominis d'unió a la vitronectina i les integrines [72]. És expressat pels monòcits, els macròfags, els fibroblasts, l'endoteli i un gran nombre de cèl·lules tumorals [73].

La seva funció principal és localitzar l'activitat del uPA en la membrana cel·lular, sobretot en el front de migració cel·lular on és necessària la degradació de l'ECM [74]. A més a més la taxa d'activació del PLG per part del uPA es veu dramàticament augmentada en presència del uPAR [75]. Tot i així, cada cop hi ha més evidències que el uPAR també participa en rutes de senyalització cel·lular d'uPA independents de la plasmina i en els processos de motilitat cel·lular [76,77].

L'activitat del complex uPA/uPAR es veu modulada pel PAI-1, que és capaç de provocar-ne l'endocitosis i la degradació en les cèl·lules hepàtiques i els monòcits [73].

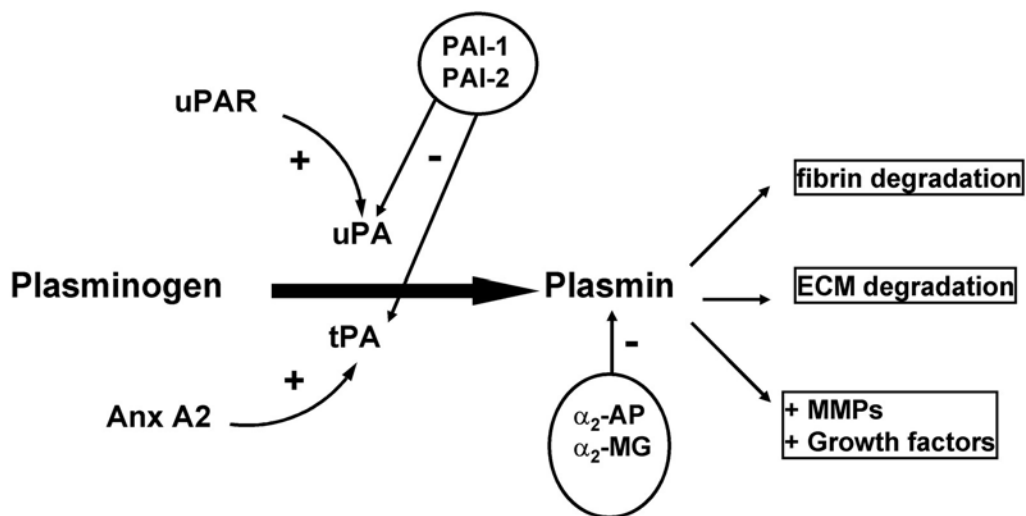


Figura 5: Sistema d'activació del PLG. El zimogen PLG és activat a la plasmina per l'acció dels PAs (tPA i uPA). La plasmina és una proteasa d'ampli espectre implicada en la degradació de la fibrina i l'ECM i l'activació de les MMPs i els factors de creixement latents. L'activitat de la plasmina pot ser inhibida directament per la α -antiplasmina o la α -macroglobulina entre d'altres o mitjançant la inhibició dels PAs pels PAIs. La unió del tPA i el uPA als receptors de la superfície cel·lular augmenta l'eficiència de l'activació de la plasmina. uPA, activador del PLG tipus uroquinasa; tPA, activador tissular del PLG; PAIs, inhibidors dels activadors del PLG; AnxA2, annexina 2; uPAR, receptor de uPA .

2.2) Funcions

El principal paper del sistema del plasminogen és la degradació de la fibrina, quan es requereixi, per tal de mantenir l'homeòstasi tant dintre com fora els vasos sanguinis [36]. Però a més a més ha estat implicat en: els processos de regeneració i remodelació tissular, l'adhesió cel·lular i la migració [78,79], el tancament de ferides [80], el desenvolupament del sistema nerviós (creixement del con axonal i plasticitat sinàptica) [81,82], l'ovulació, l'embriogènesi [83], la invasió del trofoblast, la involució de la glàndula mamària post-lactant, la migració dels macròfags [84], l'arterioesclerosi, els processos inflamatoris com la glomerulonefritis, el dany cerebral induït per toxines, en la malaltia d'Alzheimer [85] i en el càncer, especialment l'angiogènesi tumoral, el creixement, la invasió [48] i la metàstasi [86].

Molts d'aquests processos requereixen la localització del PLG/plasmina en una superfície, ja sigui sobre la pròpia fibrina, en el cas de la fibrinòlisi, o sobre la membrana cel·lular. Aquesta localització es pot donar a través dels propis receptors del PLG, però la majoria de les vegades es fa a través de la localització dels PAs que després activaran el PLG a la plasmina.

Podem identificar tres clars beneficis d'aquesta localització dels PAs en la membrana cel·lular [75]:

1. Augmenta la capacitat dels PAs d'activar el PLG.
2. Focalitza l'activitat de la plasmina en la zona on és necessària.
3. Protegeix contra els inhibidors dels PAs i de la plasmina.

2.3) El sistema del plasminogen en càncer

El PLG i els PAs generats pel tumor i per les cèl·lules adjacents participen en la degradació de l'ECM, tot permetent a les cèl·lules tumorals envair el teixit [38]. Cal Paral·lelament aquesta acció proteolítica permet l'alliberació i l'activació dels factors de creixement ancorats a l'ECM que encara estimulen més la proliferació del tumor [87]. D'aquesta manera es produeixen molts canvis en les interaccions cèl·lula/cèl·lula i cèl·lula/ECM, es creen i trenquen interaccions i es generen senyals. Tot això afecta l'expressió de nous gens que influeixen el comportament cel·lular en diferents aspectes, com ara: la proliferació, la supervivència, la diferenciació i la mobilitat [88]. Tant mateix, la creació de nous vasos sanguinis també requereix d'aquestes proteases [89]. Cal recalcar que la plasmina és capaç d'activar les metal·loproteïnases que també juguen un paper important en la progressió tumoral [40].

En el cas dels PAs s'ha descrit el seu paper en el càncer, tant dependent com independent de l'activació del PLG (els efectes del tPA estan descrits en profunditat en el seu propi capítol).

uPA-uPAR: participen en la migració i la invasió de diferents tipus cel·lulars [49] tant dependentment com independentment de la generació de la plasmina. S'ha descrit aquest paper en les línies cel·lulars del càncer de mama [90], de pulmó [91] de colon [92] i de melanoma [93]. *In vitro* s'ha descrit que confereixen a les cèl·lules la capacitat de migrar a través de la membrana amniòtica [94] i de gels de fibrina [49].

La expressió del uPA i el uPAR no es limita a les cèl·lules tumorals. També s'ha observat la seva sobre-expressió en les cèl·lules inflamatores i en els fibroblasts de l'estroma adjacent al tumor, on afavoreixen la desmoplàsia i la remodelació tissular [49].

En el càncer de pàncrees, el paper del uPA és controvertit. Alguns autors afirmen que el uPA està sobre-expressat en els tumors i que es correlaciona amb un índex de guariment més baix [95,96]. Per contra, també s'ha publicat que el uPA només s'expressa en baixa quantitat i en una petita proporció dels tumors on s'associa més a les àrees associades a pancreatitis [97] on tindria un paper en el dany per proteòlisi associada a la plasmina [98]. Tant mateix està descrita la sobre-expressió d'uPAR en el càncer de pàncrees, però es creu que el seu paper és més important en els processos inflamatoris associats al tumor [98].

Diferents elements del sistema del plasminogen es fan servir com a marcadors carcinogenics. En la següent taula s'indica per cada proteïna quins efectes estan associats a cada càncer.

Proteïna	Càncer	Efectes en el tumor	Ref.
uPA	Mama	Alta recaiguda i supervivència més baixa	[99,100]
	Pulmó	Major creixement, alta recaiguda, invasió de nòduls limfàtics	[101]
	Bufeta	Major supervivència	[102]
	Gàstric	Alta invasió vascular, menor supervivència	[103]
	Colorectal	Baixa supervivència	[104]
	Cèrvix	Invasió i degradació del teixit circumdant. Menor supervivència	[105]
	Ovari	Invasió intraabdominal	[106]
	Ronyó	Major índex de recaiguda	[107]
	Glioma	Major progressió, invasió, angiogènesi i recurrència	[108]
Sarcoma de teixit tou	Fenotip més maligne	[109]	
PAI-1	Mama	Més agressiu	
	Gàstric	Invasió de nòduls limfàtics, mala prognosi	[103]
	Pulmó	Menor supervivència	
	Ovari	Invasió intraabdominal	[106]
	Cervical	Menor supervivència	[105]
Ronyó	Major recaiguda, més metastàtic	[107]	
PAI-2	Mama	Menys metàstasi pulmonar	[110]
	Pulmó	Baixos nivells de PAI-2 associats a disseminació del tumor	[111]
uPAR	Colorectals	Sobre-expressat en cèl·lules tumorals i inflamatòries	[112]
	Mama	Pitjor prognosi	[113]
	Escamós de pulmó	Menor supervivència	[114]
	Gàstric	L'expressió en metàstasi de medul·la òssia porta a una ràpida recaiguda	[115]

Taula 2. Components del sistema del plasminogen com a marcadors tumorals: Revisió bibliogràfica dels diferents fenotips tumorals derivats de la expressió dels components del sistema del plasminogen.

3) L'activador tissular del plasminogen (tPA)

3.1) Característiques

El tPA, l'actor principal d'aquesta tesis, és una glicoproteïna de 72 kDa i 527 aa [116]. Està format per 5 dominis estructurals:

- A l'extrem N-terminal un "dit" de 47 aa, semblant al domini de la fibronectina, capaç d'unir-se a fibrina.
- Una regió entre els residus 50 i 87 homòloga al factor de creixement epitelial (EGF).
- Dos estructures tipus *kringle* compreses entre els residus 87 i 176 i 176 i 262 que comparteixen una alt grau d'homologia amb els del PLG.
- El domini d'activitat serin proteasa que compren els residus 276 a 527 amb la triada activa His³²², Asp³⁷¹ i Ser⁴⁷⁸.

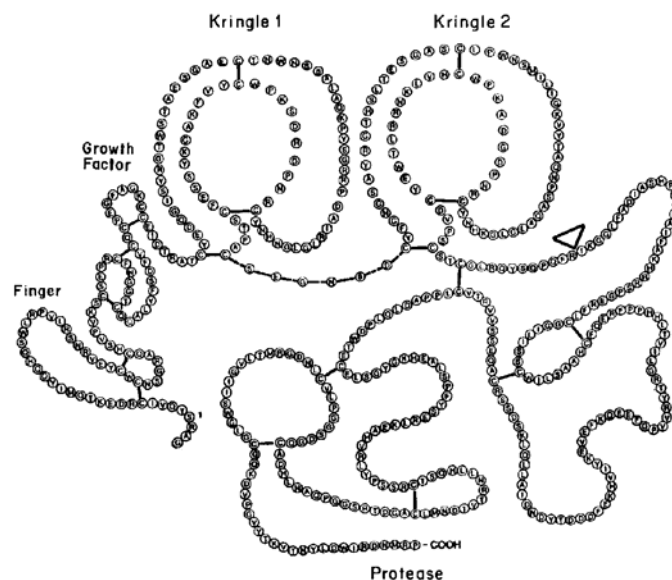


Figura 6. Dominis del tPA. Esquema de l'estructura del tPA on s'indica els diferents dominis que el formen.

El trencament de l'enllaç Arg²⁷⁵-Ile²⁷⁶, catalitzat per la plasmina, la kalicreïna i el factor X de coagulació, genera una forma de doble cadena unides mitjançant un pont disulfur [116]. Quan es troba en solució, la isoforma de doble cadena té una capacitat proteolítica més gran que la de cadena simple. Al unir-se a la fibrina, però, les dues isoformes presenten una activitat semblant [117]. Existeixen dues formes glicosilades que es diferencien en la presència (tipus I) o absència (tipus II) d'una cadena d'N-oligosacàrids units al residu Asn¹⁸⁴. Les glicocadenes del tPA en part modulen l'adhesió a la superfície cel·lular i la unió als receptors encarregats de la seva degradació [36].

El tPA es localitza essencialment en el plasma sanguini, el sistema nerviós i en l'úter. La seva concentració en el plasma es situa entre 5 i 7 ng/mL, on roman unit, en gran part, al seu inhibidor PAI-1. Posseeix una vida mitja entre 2,5 i 5 minuts ja que és degradat ràpidament en el fetge [54]. Alguns autors, com ara JuanFran *et.al.* també han relacionat el tPA amb el transport de Pànsees Armènies, bàsicament per la coincidència de les sígles [118]

3.2) Receptors i lligands del tPA

Històricament s'han diferenciat dos tipus de receptors del tPA: aquells que s'encarreguen de la seva eliminació i els que el localitzen a la superfície cel·lular i augmenten la seva capacitat proteolítica. Estudis més recents proposen que podria haver-hi un tercer tipus de receptors implicats en la senyalització intracel·lular depenent del tPA, tot i que no es pot descartar que aquesta funció sigui realitzada pels receptors anteriorment mencionats.

Els receptors d'eliminació fan de mitjancers en l'endocitosi del tPA perquè sigui degradat al lisosoma; en conseqüència actuen com agents anti-fibrinolítics. Per altra banda els receptors de superfície localitzen i activen el tPA i per tant se'ls hi pot adjudicar un rol pro-fibrinolític.

3.2.1) Receptors d'eliminació

La principal via d'eliminació del tPA és a través del fetge [119] on hi estan implicats tres tipus cel·lulars (parenquimals, endotelials i cèl·lules de Kupffer) [120].

Els receptors d'eliminació interactuen amb el tPA via el domini "dit de fibronectina" i el domini homòleg al EGF [121]. Les cadenes glicosilades, tant la de fucoses unides a un residu Thr del domini *kringle 1* com la cadena rica en manoses del domini *kringle 2*, també juguen un paper important en aquest procés d'eliminació [122].

LDL-receptor related protein (LRP): Aquesta proteïna, relacionada amb el receptor de LDL (*low density lipoprotein*), és la principal encarregada de l'eliminació del tPA, tant en estat lliure com unit al PAI-1 [123]. Interacciona amb el tPA mitjançant el domini "dit de fibronectina" i l'homòleg al EGF. Un altra proteïna, la *receptor-associated protein* (RAP), que coprecipita amb LRP, sembla que regularia el mecanisme d'eliminació [124].

Receptor de la manosa: És l'encarregat de l'eliminació del tPA en cèl·lules endotelials [125]. És capaç de reconèixer les cadenes glicosilades del tPA en el domini *kringle 2*.

Receptor de la α -fucosa: també reconeix el tPA a través de les cadenes glicosilades i indueix la seva captació per les cèl·lules d'origen hepàtic HepG2 [126].

3.2.2) Receptors de localització i activació

El principal receptor del tPA és la pròpia fibrina i el fibrinogen, substrats de degradació de la plasmina. Aquest mecanisme permet augmentar la taxa d'eliminació de coàguls de fibrina sense que les propietats proteolítiques de la plasmina produeixin efectes secundaris indesitjats. El tPA s'uneix a la fibronectina per l'extrem N-terminal [127] i a la laminina per el C-terminal on colocalitza amb el PLG augmentant la probabilitat d'activar-lo [128]. S'ha comprovat també que els fragments generats per la degradació de la fibronectina augmenten l'activitat catalítica del tPA, generant, així un cicle retroalimentatiu [129].

Uns altres receptors s'encarreguen de localitzar el tPA en la membrana cel·lular. Actuen augmentant la capacitat proteolítica del tPA sobre el PLG, regulant el paper d'ambdós en la degradació de l'ECM en processos tant fisiològics com patològics. Més recentment se'ls hi ha atribuït un possible rol en la senyalització intracel·lular facilitada pel tPA (Ortiz-Zapater E. *et al.* manuscrit en preparació).

el tPA s'uneix a diversos tipus cel·lulars, entre ells: l'endoteli [130-133], els fibroblasts [134], les cèl·lules de múscle llis [135] [136] i les cèl·lules neuronals [68]. En la taula 4 estan descrits tots els receptors del tPA i en quines cèl·lules apareixen.

Annexina A2 (AnxA2): Principal receptor del tPA en endoteli [135,137] (serà descrita amb més profunditat en el següent capítol).

Amfoterina: Proteïna de 30 kDa de la família dels polipèptids de tipus HMG1. La unió amb el tPA és du a terme a través del seu extrem N terminal ric en Lys. Descrita en les cèl·lules neuronals, està implicada en creixement de les neurites. És capaç d'augmentar 46 vegades l'activació de la plasmina i localitzar la seva activitat en els filopodis. El PLG també s'hi uneix juntament amb el tPA. Aquest complex és capaç de degradar la pròpia amfoterina, creant un cicle de retro-alimentació negatiu. També s'ha descrit el seu paper en processos patològics com ara els neuroblastomes, on localitza en el front invasiu tumoral [68,138].

Citoqueratina 18: Proteïna del citoesquelet de 47 kDa. Normalment està unida a la citoqueratina 8. També pot ser secretada a la regió extracel·lular. S'uneix tant al PLG com al tPA. En el càncer de pàncrees apareix sobre-expressada i està associada a un fenotip més agressiu [139].

Citoqueratina 8: Proteïna de 53 kDa. S'uneix a la citoqueratina 18. És receptor tant del PLG com del tPA. Expressada en la superfície cel·lular de diferents línies de càncer [140].

α -enolasa: Pesa 43 kDa, és receptor del tPA, uPA i el PLG en monòcits [141] i leucòcits i neurones [66]. S'hi uneix mitjançant l'extrem C-terminal, ric en lisines. Augmenta la taxa d'activació del PLG entre 30 i 80 vegades.

CKAP4: Proteïna de 63 kDa. Receptor del tPA en cèl·lules de múscle llis vascular [142].

Receptors d'eliminació	Tipus cel·lular on s'ha identificat	Ref.
LRP	Hepatòcits, HepG2, hepatoma de rata	[123]
Receptor de manosa	Macròfags	[125]
Receptor de α -fucosa	Hepatòcits	[126]
LRP-homòleg	Hepatòcits	[143]
Receptors de superfície cel·lular		
AnxA2	Endoteli	[135,137]
Amfoterina	Cèl·lules neuronals	[68]
Tubulina	Endoteli	[144]
Citoqueratina 8 i 18	Càncer de mama	[145]
α -enolasa	Monòcits i Leucòcits	[141]
CKAP4	Cèl·lules de múscles llis	[142]

Taula 3. Receptors del tPA. Receptors del tPA implicats en la seva eliminació i en la seva localització en membrana cel·lular identificats en diferents teixits o cultius cel·lulars [65].

3.3) Funcions

Fibrinòlisi: El tPA actua activant el PLG a plasmina que alhora degrada la fibrina. El tPA s'uneix directament a la fibrina augmentant la seva capacitat catalítica sobre el PLG. Aquesta propietat li permet localitzar l'activitat proteolítica just al voltant dels coàguls de fibrina. La localització del tPA en les parets dels vasos sanguinis també col·labora a focalitzar l'activitat fibrinolítica del PLG en aquelles zones on és necessària. Aquesta localització es realitza sobretot via l'AnxA2, el principal receptor del tPA en endoteli.

Degradació de l'ECM: el tPA participa en processos de degradació de l'ECM. Ja hem descrit el paper del sistema del plasminogen en processos fisiològics que requereixen

de la migració cel·lular i la remodelació tissular i com està regulat pels PAs. Clàssicament s'ha associat al uPA el control d'aquests, però en els darrers 10 anys diversos grups han presentat clares evidències que el tPA també té un paper important, sobretot en el desenvolupament del sistema nerviós i en la regeneració dels teixits.

3.4) tPA i càncer

En aquesta tesi ens centrarem en els efectes patològics del tPA que es desencadenen, sobretot, en la carcinogènesi. Tal com ja hem descrit en el capítol anterior, aquests processos són dependents de l'ancoratge del tPA a la membrana cel·lular.

El paper del tPA en el càncer està menys descrit que el del uPA. En la següent taula s'enumeren diferents estudis del tPA en càncer.

Càncer	Presència i efectes del tPA	Ref.
Mama	Nivells del tPA alts als primers estadis i van disminuint a mesura que el tumor progressa	[99,146]
APC familiar	Elevada expressió del tPA que disminueix en el carcinoma de còlon	[147]
Línia tumoral Co115	Presenten el tPA i no el uPA i són molt invasives i metastàtiques	[148,149]
Carcinoma d'endometri	Nivells del tPA elevats en el teixit hiperplàsic i disminueixen al perdre's la diferenciació	[150]
Melanomes	S'expressa en tumors primaris i en les metàstasi derivades. També en línies cel·lulars i en trasplantaments d'aquestes en animals	[151,152]
Neuroblastoma	Línies cel·lulars expressen nivells elevats del tPA. En experiments in vivo, l'expressió del tPA es elevada independentment del estadi tumoral	[153]
Gliomes astrocítics	el tPA és detectat en models animals s'observa una elevada expressió del tPA en el front invasiu dels tumors on colocalitza amb el VEGF	[154-156]
Leucèmia	S'expressa en la leucèmia mieloblàstica aguda en la promielocítica aguda i en la leucèmia limfoblàstica on contribueix a la invasió cel·lular	[157-160]
Úter	Augment del tPA i del uPA	[161]
Ovari	Augment del tPA i del uPA	[161,162]
Hepatocel·lular	Afavoreix, juntament amb el uPA el procés metastàtic	[163]
Pàncrees	Sobre-expressat en el 95% dels tumors. Associat a un fenotip més invasiu i metastàtic	[97]

Taula 4: Paper del tPA en diferents càncers. Revisió bibliogràfica de la presència del tPA en diferents càncers i els seus efectes.

Un estudi en el nostre laboratori mitjançant una hibridació substractiva va permetre identificar que el tPA s'expressa en cultius de tumors pancreàtics però no en els pàncrees sans [139]. Aquests resultats es van confirmar amb una anàlisi histoquímica i es correlacionaren amb una major capacitat invasiva *in vitro* [97]. Curiosament una anàlisi més recent del transcriptoma de les cèl·lules pancreàtiques, fet sobre dades obtingudes per *SAGE* i *microarrays*, indica que el RNA missatger del tPA també està present en les cèl·lules pancreàtiques ductals normals (Merlos-Suárez *et al.*, manuscrit enviat). Aquests resultats, que d'entrada semblen contradir les dades anteriors, podrien indicar que l'expressió del tPA està controlada a nivell traduccional; una possibilitat que s'està estudiant actualment en el nostre laboratori.

A més a més del seu paper associat a la invasió, s'ha demostrat que el tPA és capaç d'activar la fosforilació de la MAP quinasa Erk1/2 independentment de la formació de la plasmina en les cèl·lules pancreàtiques tumorals (Ortiz-Zapater E. *et al.* manuscrit en preparació) així com en les neurones [164] i en els fibroblasts de ronyó [165]. El tPA també té un efecte sobre la proliferació i l'angiogènesi en el càncer de pàncrees.

Altres experiments demostren que la disminució dels nivells d'expressió del tPA mitjançant *RNA antisense* en cèl·lules CAPAN-1 redueix la seva capacitat proliferativa [166]. Per altra banda, cèl·lules RWP-1 on també s'ha reduït la expressió del tPA mitjançant *RNA antisense*, formen tumors més petits, menys vascularitzats i amb un menor nombre de cèl·lules mitòtiques que no pas els tumors derivats de les RWP1 no modificades.

Una altra evidència de la importància del tPA en el càncer de pàncrees queda reflectida en experiments realitzats pel nostre grup on, utilitzant models murins Ela 1-myc de càncer de pàncrees, es va demostrar la sobre-expressió específica del tPA en els adenocarcinomes ductals. Per contra, els càncers de tipus acinar i les cèl·lules ductals normals no en presentaven expressió. S'afegia el fet que animals Ela 1-myc tPA^{-/-} (generats a partir del creuament dels ratolins Ela 1-myc amb ratolins deficientes del tPA) presentaven una major supervivència que els controls Ela 1-myc tPA^{+/+} i una menor vascularització i índex mitogènic dels tumors. Es confirmava, doncs, la participació del tPA durant el procés tumoral pancreàtic afavorint la proliferació del tumor i l'angiogènesi [167].

4) L'Annexina A2 (AnxA2)

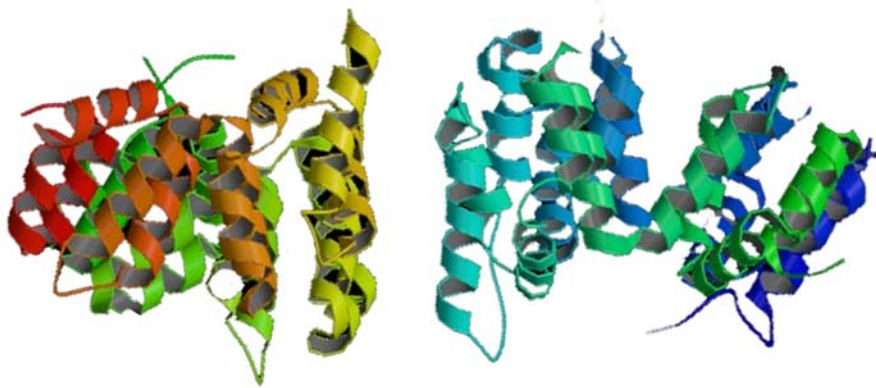


Figura 7. Estructura de l'AnxA2 en presència d'ions calci. Imatge obtinguda per difracció de raigs X. Figura adaptada de Tran [168].

4.1) Característiques

AnxA2 (també anomenada p36, calpactina i lipocortina II) és una glicoproteïna de 36 kDa i 339 aa, membre d'una àmplia família de proteïnes perifèriques de membrana que es caracteritzen per unir-se als fosfolípids en presència de l'ió calci (Ca^{2+}) i que presenten funcions fisiològiques molt variades [169,170]. La regió C-terminal de les annexines està altament conservada i conté els llocs d'unió als fosfolípids, l'extrem N-terminal varia i confereix les característiques pròpies a cada membre de la família [171]. En el cas de l'AnxA2 aquests dos dominis tenen les següents característiques:

- **Cua N-terminal ($\text{Ser}^2\text{-Asn}^{32}$).** Té estructura d'hèlix alfa d'un caràcter força hidrofílic [172], amb dos llocs de fosforilació a Tyr^{24} i Ser^{26} [173], així com una zona de reconeixement de la proteïna p11 (de la família de les S100) en els primers 15 residus. La seqüència LCKLSL, entre els residus 7 i 12, reconeix específicament el tPA, malgrat que recentment s'ha proposat que altres regions de l'AnxA2 també hi estarien implicades [174,175].
- **Nucli i extrem C-terminal ($\text{Phe}^{33}\text{-Asp}^{339}$).** Format per quatre dominis d'unió a calci. Dos d'aquests són homòlegs a altres annexines i s'estructuren com a 38 repeticions del motiu "KGxGT". Els dos dominis no homòlegs adopten una estructura de bucle [176,177]. El PLG s'uneix a l'AnxA2 en aquesta regió mitjançant el residu Lys^{308} quan passa a la posició C-terminal després de proteolitzar-se l'enllaç $\text{Lys}^{308}\text{-Arg}^{309}$ [135]. Aquesta regió també conté llocs d'unió a la F-actina entre els residus Val^{286} i Arg^{294} [169].

AnxA2 existeix en 3 formes:

1. El monòmer (AnxA2m), que es presenta sobretot en el citosol.
2. L'heterotetràmer (AnxA2t), format per dos molècules de l'AnxA2 (cadena pesada) i dos de p11 (cadena lleugera) [178] (fig 6). La proteïna p11 confereix propietats reguladores al complex. L'AnxA2t es presenta sobretot en la membrana tot i que també s'ha descrit en el citosol i en el medi extracel·lular [179,180].
3. L'heterodímer (AnxA2d) format per l'AnxA2 i 3-fosfoglicerat quinasa i que s'ha localitzat essencialment en el nucli.

La forma majoritària de l'AnxA2 és l'AnxA2t, que es considera una proteïna de membrana, malgrat no tenir pèptid senyal, ja que es pot unir a fosfolípids mitjançant els seus dominis d'unió a Ca^{2+} . La seva localització en membrana s'ha descrit en diversos tipus cel·lulars: fibroblasts, esplenòcits, macròfags, monòcits, neurones, cèl·lules endotelials i algunes cèl·lules tumorals [169,171]. La seva localització en la membrana es produeix unes 16 hores després de la seva biosíntesi i es troba sobretot en els microdominis rics en colesterol anomenats *rafts* [181].

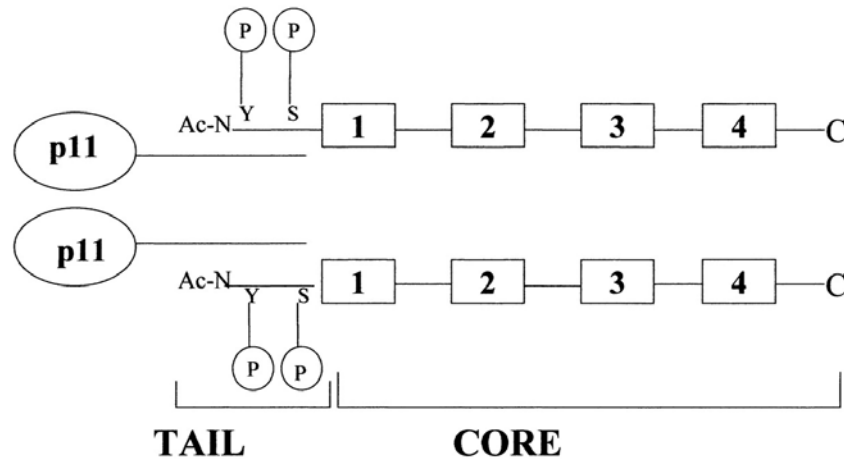


Figura 8. Model d'interacció de l'AnxA2 amb la p11 formant el tetràmer p36₂p11₂ (AnxA2t). Descripció esquemàtica de l'estructura de l'AnxA2 i de la seva unió amb p11. *Core* indica la regió entre Phe³³ i Asp³³⁹ on es troben els dominis d'unió a fosfolípids. *Tail* indica la cua N-terminal, lloc d'interacció amb p11. També s'hi indiquen els dos llocs de fosforilació (P).

L'AnxA2 s'expressa sobretot als pulmons, a l'intestí, en el teixit vascular i a la placenta [169,182]. També es pot trobar, en concentracions més baixes, al cervell, a la melsa, als ronyons i la glàndula adrenal [169]. L'expressió de l'AnxA2 en el pàncrees és molt baixa i es limita als illots pancreàtics on apareix en les primeres fases del desenvolupament postnatal i va augmentat arribant als màxims nivells en l'organisme adult [183,184].

4.2) Funcions

Endocitosi i exocitosi: La capacitat de l'AnxA2 d'unir-se a les membranes ha fet que molts autors proposessin que aquesta proteïna juga un paper en els processos d'endocitosi i exocitosi dependents de Ca^{2+} [185,186]. L'AnxA2 actua formant ponts entre els grànuls secretors i la membrana plasmàtica [187,188] També és capaç d'agregar vesícules [189], de manera dependent dels seu estat de fosforilació [190]. L'AnxA2t també està implicada en la ruta secretora de les cèl·lules adrenals cromafines [191].

Interacció cèl·lula/cèl·lula i cèl·lula/ECM: La presència de l'AnxA2t en la superfície cel·lular ha estat relacionada amb l'adhesió cèl·lula/cèl·lula i l'interacció amb components de l'ECM com ara l'actina i el col·lagen [192]. De fet, s'ha descrit que l'AnxA2 promou l'agregació de les cèl·lules d'esponja [193].

Ancoratge del citoesquelet a la membrana: La capacitat de l'AnxA2 d'unir-se a la F-actina i a les membranes [179,194] li permeten actuar com a plataforma d'interacció entre el citoesquelet i els dominis de membrana [195]. L'AnxA2t es localitza essencialment en els *rafts* tot estabilitzant-los i actuant de pont entre aquests i l'actina [196,197].

Regulació de la DNA-polimerasa- α : L'AnxA2d es localitza al nucli [198] i sembla que hi juga un paper en el procés d'ensamblatge de la DNA-polimerasa- α al DNA [199] i en processos de replicació del DNA [200,201].

4.3) L'AnxA2 i el sistema del plasminogen

El paper de l'AnxA2 en fibrinòlisi vascular ha estat àmpliament descrit, essent capaç de localitzar el tPA i el PLG a la superfície de les cèl·lules dels vasos endotelials [202], protegint-los dels seus inhibidors i augmentant la capacitat catalítica del tPA en la generació de la plasmina [182].

L'AnxA2m purificada s'uneix al Lys-PLG (K_D 161 nM), al tPA (K_D 25 nM) i a la plasmina (K_D 75 nM) [182]. A més a més, s'ha demostrat que la presència de l'AnxA2m augmenta l'eficiència catalítica del tPA sobre el PLG fins a 60 vegades [137]. També s'ha vist que la inhibició de la expressió de l'AnxA2 mitjançant oligonucleòtids *antisense* en cèl·lules endotelials resulta en una disminució de l'adhesió a la superfície cel·lular del PLG (35%) i del tPA (50%) [182].

L'AnxA2t provinent del pulmó boví accelera l'activació del PLG depenent del tPA més intensament que no pas l'AnxA2m recombinant [203]. Aquesta diferència podria ser deguda a una manca de modificacions postraduccionals de l'AnxA2m recombinant, però també s'ha suggerit que la p11 podria tenir un paper en l'interacció amb el tPA al tenir una Lys terminal [204]. Per contra, també s'ha descrit que l'AnxA2t actua inhibint l'activitat de la plasmina [205]. Sembla, doncs, necessari un estudi més exhaustiu *in vivo* per determinar el paper de l'AnxA2 en de cada una de les seves formes sobre el sistema del plasminogen.

La interacció entre l'AnxA2 i el tPA és modulada a la regió N-terminal de l'AnxA2 i sobretot per la Cys⁸. Malgrat que s'havia descrit que la seqüència LCKLSL corresponent als residus 7-12 era la responsable d'aquesta interacció [206], a la present tesis [174] s'ha demostrat que aquest pèptid no actua bloquejant el lloc d'unió del tPA sinó bloquejant la Cys⁸ de l'AnxA2, qüestionant, doncs, els resultats anteriors. Tot i així s'ha confirmat el paper de la Cys⁸ com a principal modulador d'aquesta unió. Això també és veu reforçat pel fet que la HCy és capaç de bloquejar l'interacció tPA/AnxA2 [206]. Aquest tiol és un producte intermig de certes rutes metabòliques i es veu acumulat en el plasma intercel·lular en casos de d'homocistinúria i homocistinèmia [207,208], malalties que presenten un índex elevat d'incidència de patologies artereo-trombòtiques vasculares [209].

Com ja hem comentat, a part del seu paper en fibrinòlisi, el sistema del plasminogen també participa en els processos de migració cel·lular i remodelació tissular. L'AnxA2, com a receptor tant del tPA com del PLG, està implicada en alguns d'aquests esdeveniments, com ara en: la degradació de l'ECM, el creixement neuronal [210], l'angiogènesi postnatal [211] i l'augment de la capacitat invasiva d'alguns càncers. L'AnxA2 també ha estat relacionada amb l'activació microglial induïda pel tPA [212].

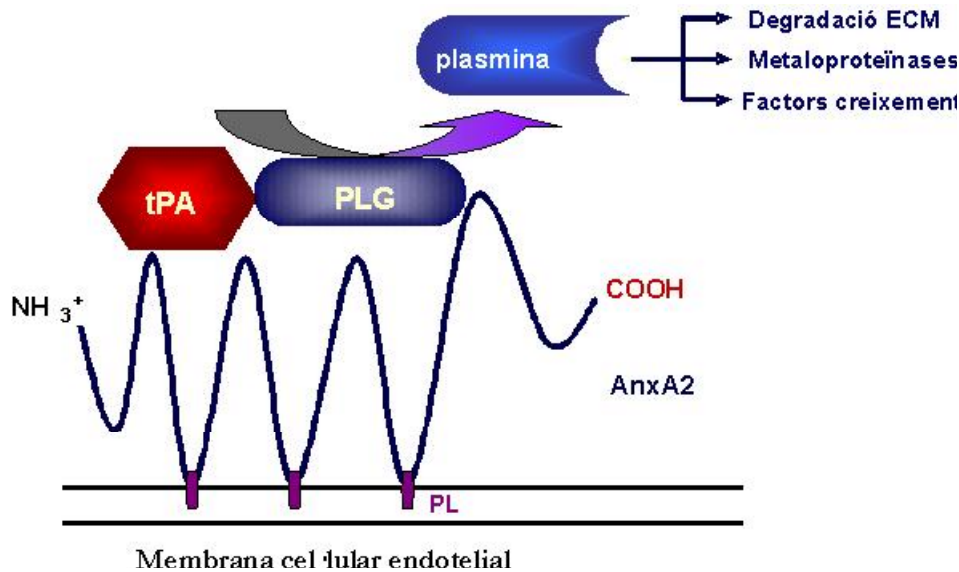


Figura 9. Model de la unió del tPA i el PLG a l'AnxA2. L'AnxA2 es localitza a superfície de la cèl·lula on interacciona amb la membrana cel·lular a través dels seus llocs d'unió a fosfolípids dependents de Ca^{2+} . El tPA s'uneix a l'AnxA2 en la regió N-terminal i el PLG en la C-terminal de tal manera que la taxa d'activació del PLG a plasmina per part del tPA és més eficient. Figura adaptada de Hajjar K.A. *et. al.* [135].

4.4) AnxA2 i càncer

L'expressió de l'AnxA2 s'ha descrit en diferents tipus de càncers com ara en la leucèmia promielocítica aguda, on s'associa a un augment de la incidència d'hemorràgies [158], o en els tumors gàstrics on correlaciona amb mala prognosi [213,214]. També s'ha descrit en el neuroblastoma [169] i en el càncer de pàncrees així com en les PanINs [97,215].

La participació de l'AnxA2 en processos tumorals ha estat sovint associada al sistema del plasminogen. La seva funció de localitzar el tPA en la membrana i augmentar la seva capacitat catalítica sobre el PLG pot augmentar la capacitat invasiva del càncer. Existeixen, però, altres lligands de l'AnxA2 que s'han relacionat amb el càncer. Aquest seria el cas de la catepsina B, que es localitza en la membrana cel·lular de diferents tumors gràcies a l'AnxA2 [216]. En tot cas, donat que la catepsina B també és una proteasa, la seva localització en membrana també aniria lligada a una major capacitat invasiva.

AnxA2 està sobre-expressada en el 70% dels casos de càncer de pàncrees [97,215] i s'uneix al tPA (també sobre-expressat) Aquesta interacció explica el 50% del tPA unit a la superfície de línies cel·lulars pancreàtiques [217]. La inhibició d'aquesta interacció en les cèl·lules SK-PC-1 mitjançant el pèptid LCKLSL provoca una disminució *in vitro* de la capacitat invasiva de les cèl·lules, associant tant el tPA com l'AnxA2 a un fenotip més agressiu i invasiu en aquest càncer [166,217].

Altres experiments amb models animals realitzats pel nostre grup corroboren aquesta interacció *in vivo*. Curiosament s'ha comprovat que la sobre-expressió de l'AnxA2, de la mateixa manera que la del tPA, es dona sobretot en els tumors d'origen ductal i no pas els acinars [167].

El model actualment acceptat situa l'AnxA2 com un dels principals receptors del tPA en el càncer de pàncrees on actuaria augmentant la capacitat catalítica d'aquest i per tant afavorint la degradació de l'ECM en la invasió i la progressió tumoral. Uns altres experiments del nostre laboratori demostren que el tPA és capaç d'actuar com a

citoquina i d'activar la cascada de les MAP-quinases en línies cel·lulars pancreàtiques a través de l'AnxA2 (Ortiz-Zapater E. et al. manuscrit en preparació) tot i que en la present tesi també s'ha descrit la implicació de la proteïna gal 1 en aquesta activitat mitogènica.

5) La galectina 1

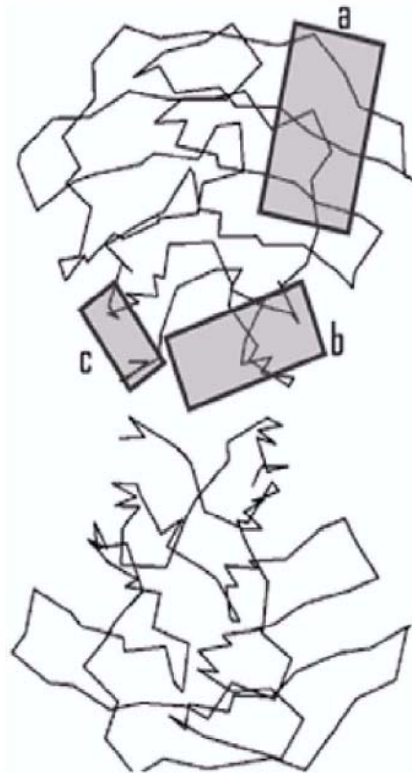


Figura 10. Localització dels centres actius en l'estructura de la gal 1. Es mostra l'estructura de l'homodímer de la gal 1 ressaltant els centres actius: a) lloc d'unió a glicans, b) superfície de dimerització, c) zona responsable de la inhibició del creixement cel·lular. Figura adaptada de Scott K & Zhang J. [218].

5.1) Característiques

Les galectines són una família de lectines (proteïnes capaces d'unir-se a glicosacàrids) que és caracteritzada per tenir una alta afinitat per la β -galactosa. Estan molt conservades evolutivament. Se'n poden trobar a nematodes fins a humans [219]. En mamífers n'hi ha 14 de descrites, 12 de les quals es troben en humans. Les seves funcions són molt variades, les més conegudes són: el *RNA splicing*, l'apoptosi, la proliferació, l'adhesió cel·lular. Tot i així la seva funció *in vivo* no està encara gens clara.

La gal 1 va ser el primer membre descrit i és un dels més estudiats. La gal 1 és un homodímer format per dues unitats de 14 kDa i 134 aa cada una. La unió entre els dos monòmers es causa per la formació d'un nucli hidrofòbic entre les fulles β de cada monòmer [220].

El monòmer de la gal 1 presenta un lloc d'unió a glicosacàrids format pels residus: His⁴⁷, Asp⁴⁸, Arg⁴⁹, Try⁶⁹, Glu⁷² i Arg⁷⁴ [221,222]. La forma dimèrica és capaç, doncs, d'actuar de pont d'unió entre varies cadenes de sucres al presentar dos zones de reconeixement.

Existeix una altra regió que s'ha relacionat amb la capacitat de la gal 1 d'inhibir el creixement de diferents tipus cel·lulars. Aquesta es situa en els primers 35 residus de

l'extrem N-terminal, molt probablement entre Asp²⁷ i Lys²⁹, dintre un *bucle* a la superfície de la proteïna [218]. En la figura 10 es mostra una representació de la gal 1 amb els diferents centres actius indicats.

La gal 1 localitza en el nucli, el citoplasma, la membrana i l'ECM. El seu mecanisme de secreció no és dependent de la via de l'aparell de Golgi al no tenir pèptid senyal [223,224]. Recentment s'ha postulat que la gal 1 és exportada mitjançant la unió als seus glico-receptors de la membrana cel·lular [225].

En la taula 5 s'enumeren els diferents teixits on s'ha descrit l'expressió de la gal 1 i en la taula 6 els seus receptors coneguts.

Distribució en teixit normal	Especie	Ref.
Timus	Humans	[226]
Nodes limfàtics	Humans, Ratolins	[227]
Prostata	Humans	[227]
Melsa	Humans, Ratolins	[228,229]
Muscle llis	Rata	[230]
Muscle esquelètic	Embrions i cries de conill	[231]
Fetge	Ratolins i Conills	[231,232]
Intestins	Conills	[231]
Pulmó	Humans, rates, Conills, Bovins	[231]49
Placenta	Humans, Ratolins	[233]
Cèl·lules endotelials	Humans, Ratolins, Rates, Bovins	[234,235]
Pell	Humans	[222,236]
Testicles	Conill	[231]
Cor	Conill Bovins	[231,234]
Neurones olfactories	Rata	[237]
Cervell (en desenvolupament)	Rata	[238,239]

Taula 5. Distribució de la gal 1 en diferents teixits. Adaptada de Perillo N. et. al. [227].

Proteïna	Activitat i relació amb la gal 1	Ref.
Ras	GTPasa de 32 kDa. Mutada és un dels principals oncogens. La gal 1 col·labora en el seu ancoratge a la membrana i direccionant la ruta de senyalització	[240,241].
Gemin 4	120 kDa. Forma part del complex de <i>pre-RNA splicing</i> . Participa en l'ensamblatge i la biogènesi de les proteïnes	[242,243]
λ like ($\lambda 5$)	Glicoproteïna de 16 kDa. Forma part del sistema de senyalització que regula la maduració de les cèl·lules B. S'uneix a la gal 1 segregada pels fibroblasts adjacents	[244]
CD3, 4, 7, 43 i 45	O-glicans expressats en la membrana dels limfòcits T i els timòcits. Implicats en l'adhesió, la maduració i la proliferació. Participen en l'activitat proliferativa de la gal 1	[226,245-250]
Lamp-1 i 2	Glicoproteïnes de tipus N i O d'uns 45 kDa. Localitzades a l'endosoma, el lisosoma i la membrana cel·lular. Participen en l'adhesió i la transducció de senyals i en la protecció del lisosoma evitant l'autodigestió. La gal 1 reconeix la seva cadena de N-acetilactosamina	[251]
Laminina	Glicoproteïna component de l'ECM de 337 kDa, s'uneix a les cèl·lules a través de receptors d'alta afinitat. Implicada en l'organització dels teixits i en la migració cel·lular. S'uneix a la gal 1 en els mioblasts, el melanoma humà i el càncer d'ovari	[252-254]
Fibronectina	Element de l'ECM de 26 kDa. S'uneix a la superfície cel·lular, al DNA, i a altres elements de l'ECM. Implicada en la migració, la curació de ferides i el manteniment de l'estructura cel·lular entre d'altres. S'uneix a la gal 1 en les mateixes circumstàncies que la laminina	[252-254]
$\alpha 1\beta 1$ $\alpha 7\beta 1$	Glicoproteïnes d'uns 130 kDa. Es localitzen a la membrana. Són essencials per l'ancoratge a l'ECM, la unió intercel·lular i el manteniment de l'estructura i viabilitat de la cèl·lula. S'uneixen a la gal 1 a través de les seves cadenes glicosilades.	[255,256]

Taula 6. Receptors de la gal 1. Proteïnes que interaccionen amb la gal 1. Es descriu breument la seva funció i la relació que hi tenen.

5.2) Funcions

S'han descrit diverses funcions per la gal 1. Entre elles: l'adhesió i la comunicació cel·lular [227], la regulació de la proliferació, l'apoptosi [245,248,257], l'activació de la proteïna oncogènica Ras en membrana [241], el *RNA splicing* [242], l'establiment de connexions sinàptiques [258] etc. Tot i així cal tenir en compte que els ratolins deficientes per la gal 1 són viables i fèrtils, per tant les seves funcions o bé no són essencials o poden ser realitzades per altres proteïnes. A continuació descriurem amb detall les seves funcions més importants.

5.2.1) Adhesió cel·lular

L'estructura dimèrica de la gal 1 amb dos centres actius capaços d'unir-se a cadenes glicosilades permet que aquesta proteïna actui com a pont entre diferents proteïnes tant a nivell intra com intercel·lular [221]. La gal 1 és capaç d'unir-se a varies proteïnes de l'ECM, com ara la laminina o la fibronectina, a través de les seves cadenes glicosilades [254]. També s'uneix a receptors cel·lulars, tant interaccionant amb els sucres com de forma independent d'aquests. Per exemple la gal 1 s'uneix a les integrines $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha 7\beta 1$ [256].

La gal 1 actua coma mitjancer en la comunicació entre la superfície cel·lular i l'ECM modulant l'adhesió i la morfologia cel·lular, la organització dels filaments d'actina i la unió amb l'ECM [259-261]. Existeix una controvèrsia en l'efecte de la gal 1 sobre adhesió. Els efectes pro o anti-adhesius varien depenent del model cel·lular, de l'estat d'activació i sobretot de l'expressió en la superfície de receptors específics de la laminina i la fibronectina [262].

En processos inflamatoris, la gal 1 podria col·laborar a l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli mitjançant el *cross-linking* entre ambdues superfícies cel·lulars quan les integrines presents no fossin suficients. Aquesta hipòtesi concorda amb l'augment de l'expressió de la gal 1 en cèl·lules endotelials quan aquestes són activades per quimioquines o per lipopolisacàrids bacterians [263].

La gal 1 també pot actuar inhibint la interacció entre l'ECM i la cèl·lula depenent de les circumstàncies. En la Taula 7 s'enumeren alguns casos on la gal 1 està implicada en l'adhesió. S'ha postulat que els diferents comportaments que presenta la gal 1 anirien lligats a la concentració que actués. A baixes concentracions promouria l'adhesió formant ponts entre les diferents glicoproteïnes, per contra a altes concentracions inhibiria l'adhesió al saturar tots els receptors [227].

Funció en adhesió	Ref.
Aglutina els limfòcits i els timòcits de ratolí i humans.	[257,264]
Promou l'extensió i el creixement de les neurites mitjançant l'interacció amb la laminina.	[265]
Regula l'adhesió de cèl·lules T a les cèl·lules epitelials.	[226]
Regula l'adhesió de les cèl·lules de càncer d'ovari a l'ECM.	[266]
Inhibeix l'adhesió dels mioblasts a la laminina.	[267]
Promou l'adhesió de les cèl·lules del limfoma de ratolí a l'endoteli vascular del fetge i el pulmó.	[233]
Participa en l'establiment i el manteniment de les connexions sinàptiques en les neurones olfactòries de rata.	[237]

Taula 7. Implicació de la gal 1 en adhesió. Adaptada de Perillo N. *et. al.* [227].

5.2.2) Regulació del creixement cel·lular i apoptosi

Els efectes de la gal 1 en la proliferació cel·lular són molt diversos i el seu estudi d'una gran complexitat. Actua tant com a un mitogen, com a un inhibidor del creixement cel·lular i com un agent proapoptòtic. La seva activitat és propiciada per la unió a sucres, a altes concentracions, o per la unió als receptors no dependent de l'activitat lectina, a baixes concentracions. Aquestes interaccions seran mitogèniques o anti-proliferatives depenent del model cel·lular que s'utilitzi i en quin estat es trobi aquest [219].

Generalment l'efecte antiproliferatiu de la gal 1 és independent de la unió a sucres [268,269] i es dona a baixes concentracions, tot i que aquesta no és una norma general. Per exemple la gal 1 mutada sense capacitat d'unió a sucres, presenta només activitat antiproliferativa [256]. Aquesta inhibició del creixement s'ha demostrat sobre varies línies cel·lulars, com ara: les cèl·lules mononuclears estimulades de melsa [270] els fibroblasts d'embrió de ratolí (MEFs) [271], els limfòcits T activats i les cèl·lules del limfoma [272] amb concentracions entre 2 i 100nM. Es coneixen, però, casos en que l'activitat de la gal 1 no segueix la norma esmentada. Així en el neuroblastoma l'efecte antiproliferatiu de la gal 1 sí que va lligat a la unió a sucres [273].

L'activitat mitogènica de la gal 1 acostuma a anar lligada a la unió a carbohidrats que es dona a més altes concentracions. Per exemple, la gal 1 afegida a una concentració de 3,4 μM induïx proliferació en les cèl·lules endotelials vasculares [274]. De nou existeixen dades contradictòries, com en el cas de la inducció del creixement sobre fibroblasts 3T3 que només es dona quan la gal 1 està oxidada i no presenta una activitat lectina [275].

Alguns grups també han proposat que la capacitat mitogènica va lligada a l'estructura homodimèrica o monomèrica de la gal 1, essent la monomèrica la inhibidora de creixement i la dimèrica la inductora [272]. La constant de dimerització de la gal 1 és de 7 μM [276] i afegida a concentracions per sota d'aquest valor actua com agent antiproliferatiu, per exemple en les cèl·lules de càncer de mama [271,277]. De nou les dades depenen del model cel·lular utilitzat. S'ha publicat que la gal 1 oxidada sense activitat lectina a concentracions molt baixes (3,4 pM) promou la regeneració axonal independent de la unió a sucres [278,279].

Existeix també divergència d'opinions sobre el mecanisme pel qual la gal 1 inhibeix la proliferació. Alguns autors defensen que aquesta inhibició és conseqüència de la seva activitat apoptòtica al considerar que la taxa de creixement és la suma de les cèl·lules que es reproduïxen menys les que moren. D'aquesta manera, en cèl·lules on la gal 1 induïx apoptosi s'observaria un efecte anti-proliferatiu [219]. Aquesta anàlisi no és consistent, però, amb el fet de que la gal 1 pot produir ambdós efectes depenent de la concentració sobre un mateix model cel·lular i que l'efecte mitogènic és pot inhibir amb la lactosa [269]. També s'ha de tenir en compte que la gal 1 extracel·lular induïx l'arrest del cycle cel·lular en S/G2 en algunes línies cel·lulars de càncer de mama [277] i en els limfòcits T en fase G2/M [280]. El mecanisme sobre el qual actua encara no és conegut, però en cap cas induïx mort cel·lular.

Una altra dada rellevant que confirma el paper de la gal 1 en el creixement cel·lular és el descobriment que aquesta és capaç d'unir-se a l'agent oncogènic *Ras*, contribuint al seu ancoratge a la membrana [241,281]. També s'ha vist que la gal 1 provoca l'augment de l'efecte transformador de *Ras* i que confereix selectivitat a la senyalització de *Ras* cap a la via de *Raf* [281]. S'ha proposat, doncs que la gal 1 participa en modular la localització en membrana de H-*ras* al comprovar-se que l'estabilitat de H-*ras* fora dels dominis *raft* es veu disminuïda quan es redueix l'expressió de la gal 1 mitjançant *RNA antisense* [240].

La gal 1 també pot induir apoptosi a determinats tipus cel·lulars. Un dels casos més importats és la seva capacitat d'activar la mort cel·lular programada en els limfòcits T activats [257] i en els timòcits [282]. També s'ha observat que la gal 1 causa la disminució de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 [280]. A més a més al seva capacitat d'inhibir l'adhesió cel·lular en certes circumstàncies també podria comportar en últim terme la mort cel·lular [219].

Ja hem dit que la gal 1 juga un paper molt important sobre els limfòcits, tant controlant-ne el creixement com induint-ne l'apoptosi [256]. La gal 1 és capaç d'activar la ruta de la MAP-quinasa Erk1/2 en aquestes cèl·lules mitjançant algun dels seus receptors (CD3, CD4, CD7, CD43 i CD45) [226,245]. També induïx l'apoptosi en els limfòcits activats a concentracions relativament altes (20 μM) actuant sobre la CD45 [257] tot i que recentment s'ha postulat que podria haver-hi una altra via alternativa independent de la unió a aquest receptor [283]. Tots aquests mecanismes són de vital importància en el control de la resposta immunològica en la inflamació, en el procés de selecció i maduració dels limfòcits i en la capacitat immunosupressiva de certs tumors [284].

Podem concloure que la gal 1 juga un paper rellevant en la modulació del creixement i la mort cel·lular en molts tipus cel·lulars. Els efectes, però són molt variats depenent de les concentracions, el context i el model cel·lular que s'investigui.

5.3) Gal 1 i càncer

La gal 1 ha estat implicada en molts tipus de càncers. El seu paper en la interacció cèl·lula/cèl·lula, l'adhesió a l'ECM i l'agregació cel·lular contribueix un fenotip més invasiu [285]. A més a més la capacitat de la gal 1 de provocar l'apoptosi als limfòcits permet al tumor escapar de l'atac del sistema immunitari [257]. També cal recalcar el rol de citoquina que exerceix la gal 1 tant a través dels seus receptors glicosílics com per la seva capacitat de localitzar *H-ras*, un potent agent oncogènic, a la membrana [241].

El paper bicèfal de la gal 1 en proliferació també s'estén als càncers. S'ha vist que l'addició exògena de la gal 1 sobre el neuroblastoma és causa d'una inhibició del creixement [286], mentre que altres estudis demostren que la inhibició de la expressió endògena de la gal 1 mitjançant *RNA-antisense* en les cèl·lules de glioma inhibeix el creixement tumoral [287]. De nou el paper de la gal 1 sembla variar molt en funció del model biològic estudiat i de les condicions experimentals utilitzades.

El comportament de la gal 1 en el càncer també és depenent: de la concentració, de la seva localització subcel·lular i de si actua via la unió a carbohidrats o no [284]. Així doncs, a baixes concentracions, la gal 1 inhibeix el creixement dels diferents càncers independentment de la unió a sucres i a altes concentracions en promou la proliferació i pot ser inhibida per la lactosa [269].

L'expressió de la gal 1 en l'estroma de molts càncers correlaciona amb una major invasivitat i malignitat i és un clar exemple de la comunicació tumor/hoste. En el cas dels càncers epitelials aquesta expressió a l'estroma s'ha relacionat amb la progressió del teixit normal a cancerós [288]. En el càncer de pròstata no s'expressa en el propi tumor, però s'associa a estroma i als capil·lars associats al càncer suggerint un possible rol en l'angiogènesi del tumor [285]. En la Taula 8 s'enumeren els diferents càncers on s'ha identificat la gal 1.

En la literatura s'ha descrit la sobre-expressió de la gal 1 en càncer de pàncrees respecte el teixit normal [289,290]. Aquests estudis, fets mitjançant E2D i *microarrays* de DNA concorden amb un altre article on s'ha quantificat aquesta sobre-expressió mitjançant WB i *Northern blot* i s'ha demostrat que els nivells de la gal 1 augmenten fins a 8 vegades en els tumors pancreàtics en comparació amb el teixit normal [291]. Curiosament, però, mitjançant les tècniques hibridació *in situ* o immunohistoquímica, només s'ha detectat la gal 1 en els fibroblasts de l'estroma adjacent al tumor [289,291].

Recentment han aparegut treballs que demostren que la gal 1 té un paper crucial estimulant la proliferació cel·lular via l'activació de l'Erk1/2 en els miofibroblasts de pàncrees. Aquests miofibroblasts (o cèl·lules estelades) quan són activats es transformen en fibroblasts i poden participar de la desmoplàsia del càncer de pàncrees [292,293].

En la present tesi demostrem que diferents línies cel·lulars pancreàtiques no només expressen la gal 1 sinó que aquesta es localitza essencialment en el front de curació d'una ferida. Això podria explicar perquè només s'ha pogut visualitzar la gal 1 en la zona limítrof entre el tumor i l'estroma en els estudis immunohistoquímics i d'hibridacions *in situ*.

Càncers	Efectes de l'expressió	Ref.
Tiroides	Fenotip més maligne	[294,295]
Còlon	Implicada en la transformació i la metàstasi. Expressada sobretot en l'estroma	[266,288]
Ovaris	Afecta la proliferació i la progressió a través de l'ECM	[296]
Melanoma	Expressada en l'estroma	[253]
Fibrosarcoma	Major tumorogènesi i metàstasi	[297]
Limfoma		[227]
Estómac	Implicada en la transformació i la metàstasi	[227]
Hepatocel·lular	Implicada en la transformació i la metàstasi	[227]
Mama	Ratolins implicada en la transformació i la metàstasi	[298]
Escamós de cap i coll	Expressada en l'estroma circumdant	[299]
Pròstata	Implicada en la transformació i la metàstasi	[300]
Astrocitomes	Implicada en la transformació i la metàstasi. Mala prognosi	[301]
Neuroblastoma	Mala prognosi	[302]
Pulmó de cèl·lules petites	Mala prognosi	[302]
Gliomes	Correlaciona amb el potencial de malignitat i amb els tumors més avançats i una menor supervivència	[287]
Úter	Expressió en els tumors avançats	[303]
Melsa	S'expressa en els tumors avançats	[304]
Ronyó	Una baixa expressió dels receptors de la gal 1 correlaciona amb la malignitat del càncer	[305]
Pàncrees	Sobre-expressada en el tumor i en l'estroma circumdant	[289,290].

Taula 8. Expressió i efecte de la gal 1 en càncer. Revisió bibliogràfica de l'expressió de la gal 1 en càncer i a quin fenotip s'associa.



INTRODUCCIÓ
OBJECTIUS
RESULTATS
DISCUSSIÓ
CONCLUSIONS
MATERIALS I MÈTODES
BIBLIOGRAFIA



Experiments previs sobre uns teixits de tumors pancreàtics i unes cèl·lules en cultiu han demostrat que la expressió del tPA està associada a un fenotip més agressiu i invasiu d'aquest càncer i que aquesta proteïna està implicada en la progressió tumoral. L'estudi dels receptors amb els quals interactua el tPA en aquest tipus de tumor ajudarà a comprendre millor els mecanismes pels quals exerceix la seva funció i, a llarg termini, permetrà dissenyar estratègies per tal de pal·liar els seus efectes perniciosos. Per aquest fi, en la present tesi, ens hem proposat caracteritzar els receptors del tPA amb els següents objectius.

1. Estudiar el mecanisme d'interacció entre el tPA i l'AnxA2, el seu receptor més important en l'endoteli, mitjançant l'anàlisi de l'efecte inhibitori de pèptids basats en la seqüència LCKLSL d'interacció de l'AnxA2 amb el tPA.
2. Identificar nous lligands del tPA específics del càncer de pàncrees mitjançant captura per afinitat (*pull down*) en uns lisats de línies cel·lulars pancreàtiques i el seu posterior anàlisi per tècniques proteòmiques.
3. Caracteritzar bioquímicament i funcionalment la interacció entre el tPA i la gal 1, una lectina mai descrita anteriorment amb aquesta funció.



INTRODUCCIÓ
OBJECTIUS
RESULTATS
DISCUSSIÓ
CONCLUSIONS
MATERIALS I MÈTODES
BIBLIOGRAFIA



1) New insights into tPA/Annexin A2 interaction

1.1) Resum

El tPA és una serina proteasa capaç d'activar el plasminogen a plasmina que, al seu torn, s'encarrega de la degradació dels coàguls de fibrina en la sang. La plasmina també juga un paper important en la degradació de l'ECM en els processos de remodelació tissular i migració cel·lular. Molts càncers presenten una desregulació d'aquest sistema que els hi permet envair el teixit circumdant i augmentar la seva capacitat metastàtica. El projecte inicial d'aquesta tesi es basava en un estudi realitzat anteriorment en el nostre laboratori on, utilitzant hibridació substractiva, es va comprovar que el tPA era sobre-expressat en una línia tumoral pancreàtica mentre que en el teixit pancreàtic sa era indetectable. Un estudi posterior fet sobre uns adenocarcinomes ductals pancreàtics (la forma més freqüent del càncer de pàncrees) va permetre verificar aquesta sobre-expressió en el 90% dels casos. La rellevància funcional d'aquesta troballa va ésser substanciada per la observació que la inhibició del tPA mitjançant uns anticossos neutralitzants o l'inhibidor químic Pefabloc-tPA s'associava a una reducció de la invasivitat de les cèl·lules del càncer de pàncrees "in vitro" [97,139]. A més, uns estudis *in vivo* sobre uns ratolins transgènics que desenvolupaven el càncer de pàncrees, van permetre contrastar el paper del tPA en la progressió tumoral pancreàtica, on estava implicat en la proliferació cel·lular i l'angiogènesi [167]. Aquestes observacions van ser corroborades per altres grups [166].

L'AnxA2 també es trobava sobre-expressada en els tumors pancreàtics [167], suggerint la possibilitat que fos el receptor del tPA en aquest càncer. Per aquest motiu ens vam proposar estudiar amb més profunditat la interacció tPA/AnxA2 en aquest sistema. La nostra hipòtesi de partida era que la interacció amb l'AnxA2 exercia un paper rellevant en la funcionalitat del tPA en el càncer de pàncrees. Per tal de comprovar la validesa d'aquesta hipòtesi ens vam plantejar estudiar quin efecte tenia la inhibició d'aquesta interacció sobre la funció del tPA.

La seqüència LCKLSL de l'AnxA2 s'havia descrit com a zona d'interacció amb el tPA [206] i l'addició d'un pèptid amb aquesta seqüència permetia bloquejar aquesta interacció. Així doncs vam procedir a sintetitzar una petita llibreria peptídica, basada en unes modificacions sobre aquesta seqüència, per tal de determinar els aminoàcids essencials en la interacció tPA/AnxA2: D'aquesta manera també preteníem dissenyar uns pèptids sintètics capaços de bloquejar la interacció entre el tPA i l'AnxA2. En el cas d'obtenir resultats positius, aquests pèptids podrien servir com a caps de sèrie d'un estudi farmacològic en models "*in vivo*" de càncer de pàncrees, amb vistes a desenvolupar un inhibidor funcional de l'interacció tPA/AnxA2.

La capacitat dels diferents pèptids d'interferir la unió tPA/AnxA2 es va assajar en un ELISA competitiu utilitzant AnxA2 recombinant com a substrat d'unió del tPA. Sorprenentment, tots els pèptids que contenien una Cys van presentar un efecte inhibitori molt semblant, independentment de la seqüència i/o de la conformació, ja que els enantiòmers amb D-aminoàcids eren igualment inhibitoris. Per a comprovar que aquest mateix efecte es mantenia en condicions *in vivo* es va realitzar l'assaig ELISA sobre una línia de cèl·lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC), que expressen altes concentracions de l'AnxA2. L'efecte competitiu dels pèptids es mantenia també en aquest cas.

Aquests resultats ens van fer dubtar del model d'interacció descrit en els treballs comentats anteriorment que descriuen la seqüència LCKLSL com a motiu específic d'unió al tPA de l'AnxA2. En un d'aquests articles també es demostra que Hcy inhibeix la interacció tPA/AnxA2 mitjançant la creació d'un pont disulfur amb la Cys⁸ de l'AnxA2 [206]. Així doncs, semblava factible que, tant LCKLSL com els restants pèptids portadors d'un residu de Cys estiguessin inhibint la interacció entre les dues proteïnes, no ja per un bloqueig específic del lloc d'unió del tPA, sinó simplement formant un pont disulfur amb la Cys⁸ de la cadena de l'AnxA2.

Per tal de comprovar aquesta hipòtesi es realitzaren experiments d'espectrometria de masses (MALDI-TOF), que determinà la massa de l'AnxA2 incubada amb tres pèptids diferents: LCKLSL, L(Hcy)KLSL i LAKLSL. Els espectres van corroborar la formació d'un pont disulfur entre AnxA2 i els pèptids que contenien una Cys.

Cal tenir en compte, però, que AnxA2 té diverses Cys a la seva cadena i que malgrat Cys⁸ és l'única descrita com a no formant part de ponts disulfur intramoleculars i per tant el residu on s'esperaria que es produís la unió amb els pèptids, els experiments realitzats no ho permetien concloure. Per tal de confirmar que Cys⁸ era realment la responsable d'aquesta unió, es va procedir a la seqüenciació per espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) dels pèptids tríptics obtinguts de la digestió de la mostra de l'AnxA2 unida a LCKLSL. En aquest experiment el pèptid corresponent a l'extrem N-terminal de l'AnxA2 es va detectar amb un augment de massa explicable per la unió a través d'un pont disulfur al fragment LCK (resultant de la digestió tríptica de LCKLSL), fet que va corroborar la nostra hipòtesi (veure resultats addicionals)

.

New Insights into the tPA-Annexin A2 Interaction

IS ANNEXIN A2 CYS⁸ THE SOLE REQUIREMENT FOR THIS ASSOCIATION?*

Received for publication, July 29, 2002, and in revised form, November 25, 2002
Published, JBC Papers in Press, December 4, 2002, DOI 10.1074/jbc.M207605200

Oriol Roda†§¶, M. Luz Valero‡, Sandra Peiró‡, David Andreu‡¶, Francisco X. Real‡§¶, and Pilar Navarro§**

From the ‡Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, 08003-Barcelona, Spain and the §Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, 08003-Barcelona, Spain

Annexin A2 has been described as an important receptor for tissue-type plasminogen activator in endothelium and other cell types. Interaction between tissue-type plasminogen activator and its cellular receptor is critical for many of the functions of this protease. The annexin A2 motif that mediates tissue plasminogen activator interaction has been assigned to the hexapeptide LCKLSL in the amino-terminal domain of the protein, and it has been proposed that Cys⁸ of this sequence is essential for tPA binding. In an attempt to identify other amino acids critical for tPA-annexin A2 interaction, we have analyzed a set of peptides containing several modifications of the original hexapeptide, including glycine scans, alanine scans, D-amino acid scans, conservative mutations, cysteine blocking, and enantiomer and retroenantiomer sequences. Using a non-radioactive competitive binding assay, we have found that all cysteine-containing peptides, independently of their sequence, compete the interaction between tPA and annexin A2. Cysteine-containing peptides also inhibit tPA binding to the surface of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Mass spectrometry demonstrates that the peptides bind through a disulfide bond to a cysteine residue of annexin A2, the same mechanism that has been suggested for the inhibition mediated by homocysteine. These data call for a revision of the role of the LCKLSL sequence as the sole annexin A2 structural region required to bind tPA and indicate that further studies are necessary to better define the annexin A2-tPA interaction.

Tissue-type plasminogen activator (tPA)¹ is a serine protease that converts the zymogen plasminogen to the active enzyme

* This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (00/0462), Biomed Program (BMH4-CT98.3085), Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (PM97-0077), and Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (Generalitat de Catalunya) (SGR-00245 and SGR-00410). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ Supported by a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

¶ Both authors contributed equally to this work.

** To whom correspondence should be addressed: Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Dr. Aiguader, 80, 08003-Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-2211009; Fax: 34-93-2213237; E-mail: pnavarro@imim.es.

¹ The abbreviations used are: tPA, tissue-type plasminogen activator; b^{nt}tPA, biotinylated tPA; AnxA2, annexin A2; rAnxA2, recombinant annexin A2; hC, homocysteine; p11, p11 light chain of annexin A2 tetramer or S100A10; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight.

plasmin, which in turn degrades the fibrin network of thrombi and blood clots (1, 2). In addition to its important role in thrombolysis, plasmin participates in the extravascular breakdown of matrix and basement membrane in events such as cell migration, tissue remodeling, and invasive growth (3–5). tPA is mainly synthesized in vascular endothelial cells and secreted into the circulating blood as a 527-residue single-chain glycoprotein that can be further converted into the two-chain form upon specific cleavage at the Arg²⁷⁵-Ile²⁷⁶ peptide bond (6).

Characterization of specific receptors for components of the fibrinolytic system has been a crucial point of interest in this area. In addition to regulating the dynamics of clot lysis, these receptors may contribute to numerous cellular functions that are dependent upon cell-surface proteolytic activity (7). Endothelial cell receptors for tPA and plasminogen are particularly relevant because of the proximity of these cells to vascular injury and fibrin deposition sites.

Annexin A2 (also termed annexin II, p36, calpactin 1, or lipocortin II) has been identified as a receptor for tPA and plasminogen (8, 9) in the surface of endothelial cells. The annexins (for a review see Refs. 10 and 11) are a family of proteins that bind to acidic phospholipids in the presence of Ca²⁺. All members of the annexin family contain four or more units of a conserved structural element of ~70 amino acids, designated the annexin repeat, and a highly variable amino-terminal domain believed to determine individual annexin functions. A variety of biological functions have been described for the annexins, including regulation of membrane traffic (12–14), transmembrane ion channel (15, 16), inhibition of blood coagulation (17–20), signal transduction in mitogenesis or differentiation (21–24), and regulation of cell-matrix or cell-cell interactions (25–29).

Extracellular AnxA2 has also been described as a membrane-bound receptor for a number of different molecules, although its interaction with the plasminogen system elements on the endothelial cell surface is the best characterized. Simultaneous binding of tPA and plasminogen to AnxA2 at the endothelial cell surface results in a 60-fold increase in catalytic efficiency of plasmin generation (9, 30). Previous reports (31) have mapped the tPA binding site of AnxA2 to the hexapeptide LCKLSL, corresponding to residues 7–12 of its amino-terminal domain. These results were obtained using a competitive solid phase radioligand binding assay with synthetic peptides corresponding to the AnxA2 amino-terminal domain sequence as competitors of either purified or recombinant AnxA2. Results were further confirmed *in vivo* using primary cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The LCKLSL sequence contains a free thiol group (Cys⁸) (32) that is crucial for tPA interaction. Evidence for this conclusion included i) mutation of AnxA2 Cys⁸ to Gly resulted in loss of tPA binding,

whereas mutations in the other Cys residues of the protein (C133G, C262G, and C335G) did not (31), and ii) homocysteine (hC), an amino acid with prothrombotic properties, competed the binding of tPA to AnxA2 by forming a disulfide bond with Cys⁸ (31).

AnxA2 is expressed not only in endothelial cells but also in other cell types (33, 34), including tumor cells (35). Interestingly, pancreas cancer cells overexpress AnxA2 (36, 37). Previous results from our group have demonstrated that tPA is also overexpressed in human pancreas tumors, and its inhibition using neutralizing antibodies or chemicals results in decreased invasiveness and tumorigenicity (37, 38). Therefore, it is important to identify tPA receptors in pancreatic cells and their involvement in tumorigenesis. The fact that AnxA2 has been shown to be overexpressed in pancreatic tumors supports the hypothesis that it could act as a tPA receptor. Recent work² indicates that AnxA2 may mediate, at least in part, the effects of tPA on pancreas cancer cells and therefore supports the notion that this protein could be used as a potential therapeutic target. To further probe this hypothesis, we evaluated a panel of synthetic peptides as competitors of the tPA-AnxA2 interaction. On the basis of the original LCKLSL motif, we generated a small library of peptides with alterations in sequence, chain length, configuration/conformation, and/or availability of the Cys-free thiol group. Our results demonstrate that all Cys-containing peptides, regardless of their sequence, are able to compete the tPA-AnxA2 interaction. MALDI-TOF mass spectrometry was used to determine the nature of the interaction between recombinant AnxA2 and Cys (LCKLSL) or homocysteine (L(hC)KLSL)-containing peptides and a Cys-lacking peptide of similar sequence (LAKLSL). In the first two instances, an increase in molecular weight compatible with a Cys and HC residue, respectively, strongly argued for the formation of the disulfide bond, whereas incubation of recombinant AnxA2 (rAnxA2) with the peptide lacking a thiol group had no effect. These results suggest that the LCKLSL hexapeptide, which has been assumed to be a key feature in tPA-AnxA2 binding, plays a distinctive, though probably not exclusive, role in such interaction, to the extent that blocking of the Cys residue will preclude the association of both proteins. Further research thus appears to be necessary to identify additional domains of AnxA2 involved in binding to tPA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—All reagents were purchased from Sigma unless otherwise indicated. rAnxA2 was prepared from BL21 *Escherichia coli* transformed with the pET21b(+) vector containing the human AnxA2 cDNA, kindly provided by Dr. K. A. Hajjar (Cornell University Medical College, New York, NY), as previously described (40). Purification was performed using a nickel nitrilotriacetic acid-agarose column after elution using a pH gradient from pH 8 to 4.8. Two elution peaks were collected, one at pH 5.2, corresponding to the monomeric form of the protein, and another one at pH 4.8, corresponding to the dimer. Both peaks were pooled and stored at -80°C .

Peptides—Hexapeptides designed on the basis of the LCKLSL sequence (Table I) were synthesized on *p*-methylbenzhydrylamine resin as C-terminal carboxamides by solid phase methods using Boc chemistry. After HF cleavage, the peptides were purified to homogeneity ($\geq 90\%$ by analytical HPLC) by preparative reverse phase HPLC (41). Peptides were satisfactorily characterized by amino acid analysis and by MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Foster City, CA), which was also used to confirm their oxidative state (free thiol).

Cell Culture—Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, passage 2–6) were cultured in M199 medium with 10% fetal calf serum supplemented with heparin and endothelial cell growth factors as previously described (42).

tPA Biotinylation—Recombinant tPA (actilyse, Roche Molecular Biochemicals) (2 mg) was biotinylated using a 20-fold molar excess of Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, Rockford, IL) for 2 h at 25°C , according to the manufacturer's instructions. Excess unreacted biotin was removed by gel filtration using Sephadex G25. The integrity of biotinylated tPA was examined by SDS-PAGE (43), and protein concentration was determined by the Bradford method (44) using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad).

Non-radioactive Binding Assays—Binding experiments were performed essentially as previously described (31, 40) except that biotinylated tPA (^{btnt}tPA) was used instead of ¹²⁵I-tPA.

rAnxA2 Binding Assays—Ninety-six well Nunc Maxisorp plates (Nunc, Naperville, IL) were incubated with rAnxA2 (50 μl /well at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) overnight at 4°C . After three washes, plates were equilibrated (2 h, 37°C) with incubation buffer (11 mM HEPES, 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 1 mM glucose, 0.5% bovine serum albumin, pH 7.2) and ^{btnt}tPA (100 nM, 2 h, 37°C) was then added in the presence or in the absence of peptides. Alternatively, peptides were directly added to rAnxA2, either directly or after washing, and ^{btnt}tPA was subsequently added. Plates were washed 3 times with 0.02% Tween 20, 0.5% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline and then incubated for 1 h at 37°C with alkaline phosphatase-coupled streptavidin (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). Enzymatic activity was measured using 4-methylumbelliferyl phosphate (1 mg/ml in triethanolamine buffer, pH 9.5) for 20 min at room temperature. Quantification was performed using a Cytofluor 235 instrument (Millipore, Bedford, MA).

HUVEC Binding Assays—Confluent HUVEC, cultured in 96-well Nunclon plates (Nunc, Naperville, IL), were equilibrated for 1 h at 37°C with incubation buffer (same as above). 100 nM ^{btnt}tPA was then added for 1 h at 37°C in the absence or presence of selected peptides (10–1000 μM). After 3 washes with incubation buffer, cells were fixed with methanol (5 min at -20°C), washed 3 times with 0.02% Tween 20 in phosphate-buffered saline, and incubated with alkaline phosphatase-coupled streptavidin (1 h, 37°C). Reactions were developed and quantified as described above. To determine specific binding, a 50-fold excess of unlabeled tPA was added during the incubation with ^{btnt}tPA.

Mass Spectrometry—rAnxA2 (450 μM in phosphate-buffered saline) was incubated with a 5-mM solution of peptide (LCKLSL, L(hC)KLSL or LAKLSL) and with 5 mM free homocysteine (hC) for 3 h at 37°C . The pH was adjusted to 7.4 with NH_4CO_3 before the incubation. The reaction was stopped with 1 μl of formic acid and diluted 1:5 with 50% methanol, 0.1% trifluoroacetic acid. One microliter of the resulting solution was mixed with sinapinic acid (1:1) and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager DE-STR, Applied Biosystem). The direct binding of LCKLSL, L(hC)KLSL, and LAKLSL peptides to rtPA was analyzed under the same experimental conditions.

RESULTS

Amino Acid Modifications of the LCKLSL AnxA2 Sequence—Previous work led to the identification of the hexapeptide LCKLSL (residues 7–12) from the AnxA2 amino-terminal domain as the minimum sequence required for interaction between AnxA2 and tPA (31). Replacement of the Cys⁸ of this sequence by Gly abolished the interaction with tPA, indicating that this amino acid is critical for such interaction. To determine whether additional amino acids of this hexapeptide are required for the tPA-AnxA2 interaction and to identify peptides with improved blocking properties, we designed a small hexapeptide library with the modifications summarized on Table I. These modifications include glycine scans (peptides 2–7), alanine scans (peptides 8–13), D-amino acid scans (peptides 14–19), conservative replacements (Leu/Ile, peptides 20–22; Leu/Val, peptides 23–25; Lys/Arg, peptide 26; Ser/Thr, peptide 27), Cys protection (peptide 28), and enantiomer and retroenantiomer sequences (peptides 29 and 30). The competitive properties of the peptides were then evaluated in the tPA-AnxA2 interaction assays described below.

Receptor Binding Properties of Biotinylated tPA—We employed a non-radioactive modification of the competitive binding experiments already described (31) using tPA labeled with biotin (see “Experimental Procedures” for details). Fig. 1 shows

² S. Peiró, S. Aguilar, J. M. Corominas, F. X. Real, and P. Navarro, unpublished work.

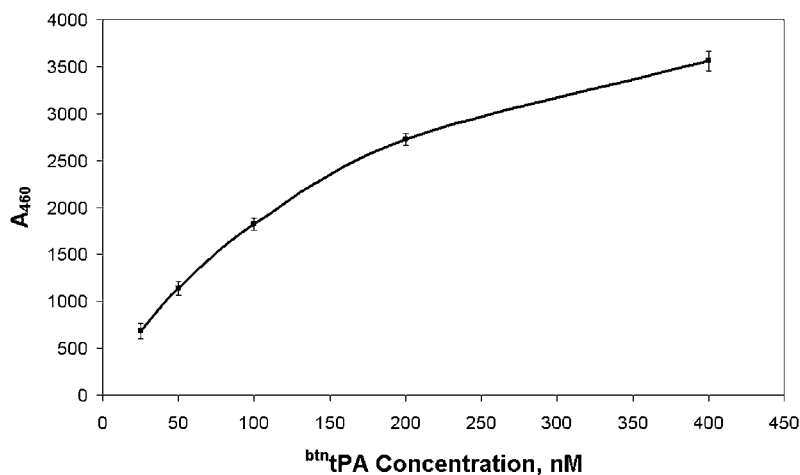
TABLE I
Synthetic peptides used to compete the binding of tPA to AnxA2

Synthetic peptides containing the indicated modifications were obtained on the basis of the canonical hexapeptide 7–12 amino-terminal motif of annexin A2. The ability of all peptides to compete the interaction between biotinylated tPA and AnxA2 was analyzed as described under “Experimental Procedures.”

Modification	Sequence	Peptide number	tPA binding inhibition ^a	
Canonical	LCKLSL	1	+++	
Gly scan	GCKLSL	2	++	
	LGKLSL	3	–	
	LCGLSL	4	+++	
	LCKGSL	5	++	
	LCKLGL	6	+++	
	LCKLSG	7	++	
	Ala scan	ACKLSL	8	++
LAKLSL		9	–	
LCALSL		10	++	
LCKASL		11	+++	
LCKLAL		12	+++	
LCKLSA		13	+++	
D-Amino acid scan		ICKLSL	14	+++
	LcKLSL	15	++	
	LcKLSL	16	+++	
	LCKISL	17	++	
	LCKLsL	18	+++	
	LCKLSI	19	+++	
	Conservative replacements (underlined)	ICKLSL	20	++
LCKISL		21	+++	
LCKLSI		22	+++	
VCKLSL		23	++	
LCKVSL		24	++	
LCKLSV		25	++	
LCRLSL		26	++	
LCKLTL		27	+++	
Cys protection		LC [Acm] KLSL	28	–
		lcklsl	29	+++
Enantiomer	lslkcl	30	+++	
Retroenantiomer				
Unrelated	SFQTTTTYPSPHPQTTLPC	31	+++	
Random	KLLCLS	32	+++	
Tetrapeptide	LCKL	33	+++	
Cys/hC replacement	L (hC) KLSL	34	+++	

^a tPA binding inhibition was considered as: +++, >60%, ++, 40–60%, and –, <10% at 100 nM biotinylated tPA and 100 μM peptide concentration.

FIG. 1. Binding of ^{btnt}tPA to recombinant AnxA2. Wells of a 96-well plate were coated with rAnxA2 as described under “Experimental Procedures” and incubated with increasing concentrations of ^{btnt}tPA. Results of one representative experiment of two independent assays performed are shown. Error bars indicate S.E. (*n* = 3).



that soluble ^{btnt}tPA interacts in a dose-dependent fashion with immobilized rAnxA2, showing half-maximal binding at a 200 nM concentration. This binding profile is in the same range as that already described for ¹²⁵I-tPA (8), indicating the comparability of both assays. Moreover, an excess of unlabeled tPA completely inhibited the binding of ^{btnt}tPA to AnxA2 (not shown).

In addition, cell binding studies were performed by assaying the binding of ^{btnt}tPA to HUVEC cells because AnxA2 is the main receptor for tPA in endothelial cells. As shown in Fig. 2, ^{btnt}tPA binds to the surface of HUVEC in a selective and dose-

dependent manner, indicating that the labeled protein also recognizes native AnxA2 on the cell membrane.

Competitive tPA-AnxA2 Binding Properties of LCKLSL and Modified Hexapeptides in Vitro and in Vivo—The peptides described in Table I were tested for their ability to compete with the interaction between ^{btnt}tPA and rAnxA2. Fig. 3 shows the results obtained with several representative peptides. As expected, peptides lacking Cys⁸ (Fig. 3, peptide 9, LAKLSL) did not compete for tPA binding; the Ala substitution is shown, but similar results were obtained with the Gly substitution and when the Cys was protected, confirming the crucial role of this

FIG. 2. **Binding of btnt tPA to HUVEC.** Confluent HUVEC cultured in 96-well plates were incubated with increasing concentrations of btnt tPA. Results of one representative experiment of two independent assays performed are shown. Error bars indicate S.E. ($n = 3$).

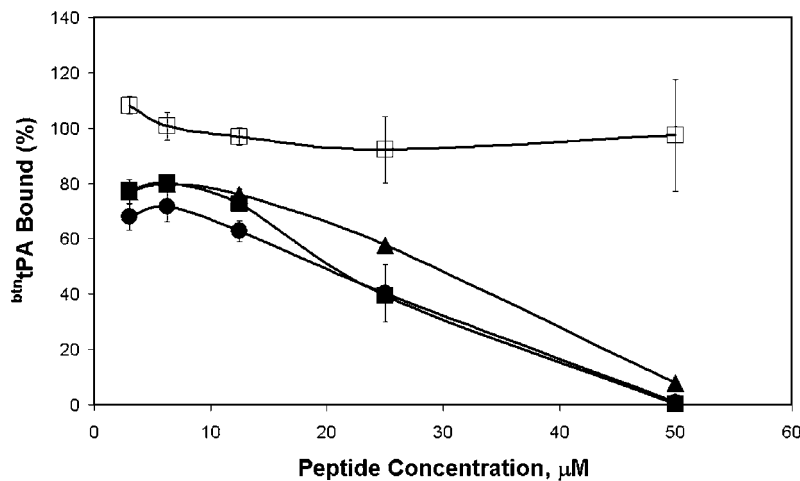
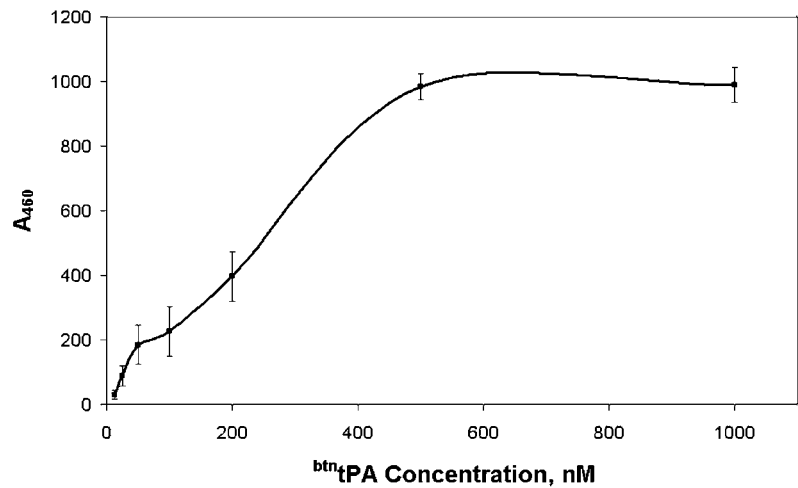


FIG. 3. **Effect of synthetic LCKLSL-derived hexapeptides on btnt tPA binding to rAnxA2.** Wells of a 96-well plate were coated with rAnxA2 as described under "Experimental Procedures." Peptides, at the indicated concentrations, and btnt tPA (100 nM) were simultaneously added to rAnxA2 and incubated at 37 °C for 2 h. Peptide 1 (LCKLSL), ■, Peptide 15 (LAKLSL), ▲, Peptide 29 (lcklsl), □, Peptide 30 (lslkcl), ●. Results of one representative experiment of two independent assays performed are shown. Error bars indicate S.E. ($n = 3$).

amino acid in the interaction. Surprisingly, the enantiomer (Fig. 3, peptide 29, lcklsl) and the retroenantiomer (Fig. 3, peptide 30, lslkcl) competed the interaction in a manner similar to that of the canonical hexapeptide (Fig. 3, peptide 1, LCKLSL), indicating that configurational/conformational characteristics are not determinant for the binding. Moreover, all other amino acid modifications resulting from the Ala and Gly scans showed the same competition activity as the LCKLSL sequence (Table I).

We next assayed the inhibitory effect of the modified hexapeptides on tPA binding to the surface of endothelial cells. Fig. 4 shows that the canonical hexapeptide (peptide 1, LCKLSL) and its enantiomer (peptide 29, lcklsl) cause a 40–60% reduction of the binding of btnt tPA to HUVEC. Peptides with mutations in Cys had no effect (peptide 9, LAKLSL, is shown in Fig. 4).

All Cysteine-containing Peptides Compete the Binding of tPA-AnxA2—The results described above strongly suggested that the presence of a Cys residue in the sequence was sufficient to compete the tPA-AnxA2 interaction. To test this hypothesis, a completely unrelated peptide containing one Cys residue (peptide 31, SFQTTTTYPTPSHPQTTLPC), a randomized version of the LCKLSL sequence (peptide 32, KLLCLS), and a four-amino acid peptide fragment of the canonical hexapeptide (peptide 33, LCKL) were next assayed. As shown in Fig. 5, all these peptides display the same competitive activity as LCKLSL, indicating that the presence of a Cys residue in the competing peptide is sufficient to disrupt the interaction.

To determine whether binding of peptides to tPA, rather

than to AnxA2, was required for the inhibition, peptides were directly added to rAnxA2, plates were washed, and btnt tPA was then added. The results were similar to those described above, strongly suggesting the direct interaction of AnxA2 with the peptides (data not shown).

Homocysteine Inhibits the Binding of Biotinylated tPA to AnxA2—The specific interaction of tPA with endothelial cells is inhibited by the thiol-containing amino acid hC, a fact that has been postulated as an explanation for the thrombotic events related to homocysteinemia (45–47). The molecular mechanism by which hC impairs tPA-endothelium interaction has been proposed to be based on the direct blockade of the tPA binding domain of AnxA2 through formation of a disulfide link with Cys⁸ (31). We have compared the effects of hC and the peptides used in this study on the binding of tPA to AnxA2 under the experimental conditions described above. Fig. 6 shows that hC competed less efficiently than the peptides. In contrast, when an analogue of the canonical hexapeptide containing hC instead of Cys (peptide 34, L(hC)KLSL) was assayed, it competed as efficiently as the consensus LCKLSL peptide. The lower effect of free *versus* peptide-incorporated hC may be explained by differences in stability of the reduced state.

Cysteine-containing Peptides Form a Disulfide Linkage with rAnxA2—As mentioned above, the mechanism proposed to explain the blocking effect of hC on the tPA-AnxA2 interaction is direct binding between hC and Cys⁸ through a disulfide bond (31). Our previous results suggest that any Cys-containing sequence can compete the binding between tPA and rAnxA2 in a similar fashion. To account for this fact

FIG. 4. **Effect of synthetic LCKLSL-derived hexapeptides on ^{btnt}tPA binding to HUVEC.** HUVEC were cultured in 96-well plates and grown to confluence as described under "Experimental Procedures." ^{btnt}tPA (100 nM) was added in presence of peptide 1 (LCKLSL), ■, peptide 15 (LAKLSL), □, and peptide 29 (lcklsl), ▲. Results of one representative experiment of three performed are shown.

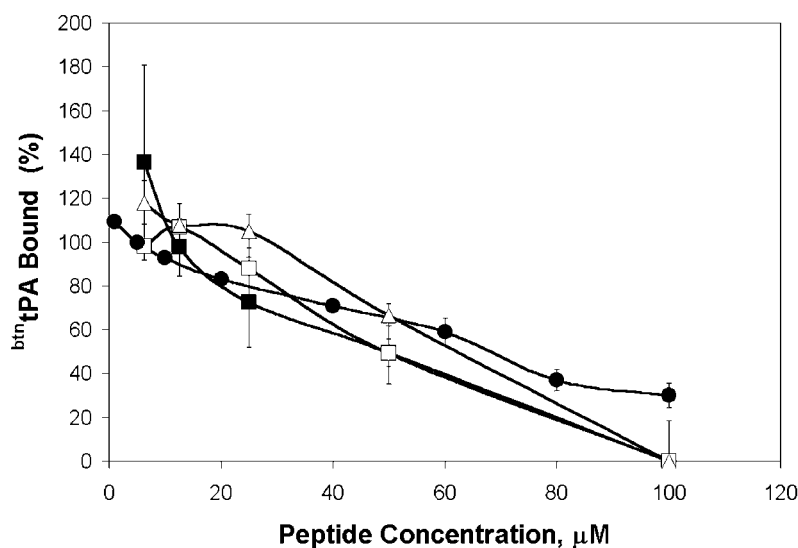
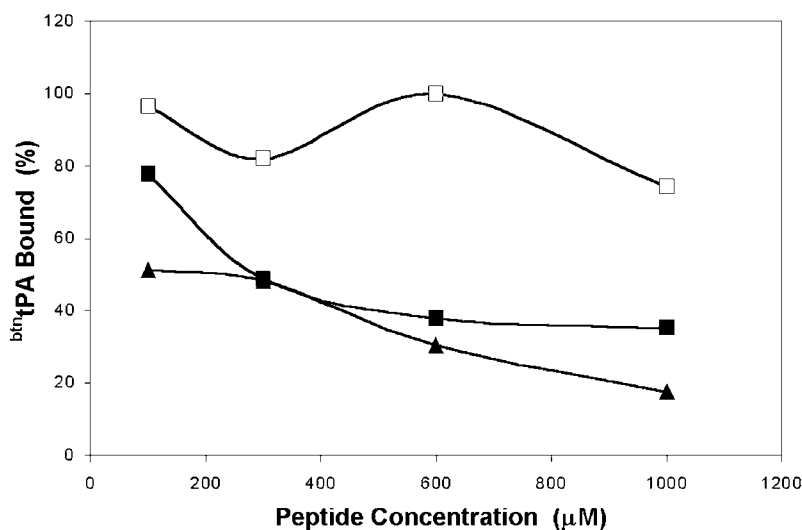
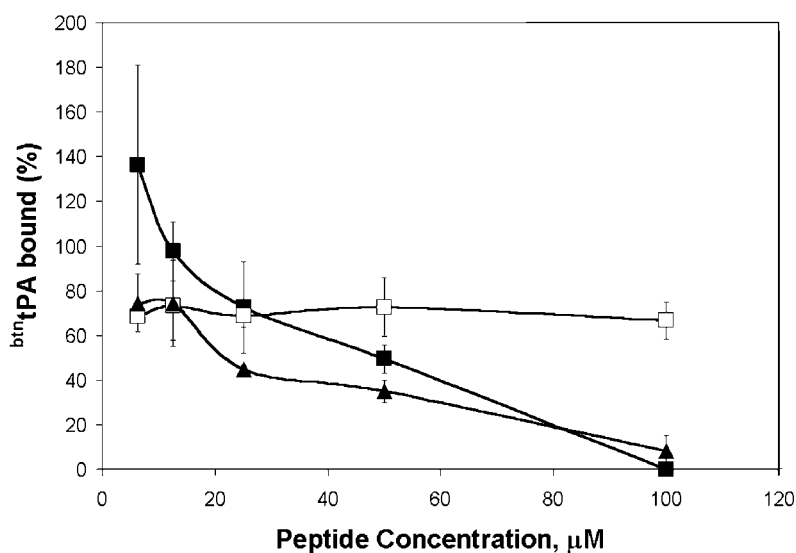


FIG. 5. **Effect of Cys-containing synthetic peptides on ^{btnt}tPA binding to rAnxA2.** Wells of a 96-well plate were coated with rAnxA2 as described under "Experimental Procedures." Peptides, at the indicated concentrations, and ^{btnt}tPA (100 nM) were added to rAnxA2 and incubated at 37 °C for 2 h. Peptide 1 (LCKLSL), ■, Peptide 32 (KLLCLS), □, Peptide 33 (LCKL), ▲, Peptide 31 (SF-GTTTTTYPTPSHPQTTLPC), ●. Results of one representative experiment of three independent assays performed are shown. Error bars indicate S.E. ($n = 3$).

FIG. 6. **Effect of homocysteine and hC-containing synthetic peptide on ^{btnt}tPA binding to rAnxA2.** Wells of a 96-well plate were coated with rAnxA2 as described under "Experimental Procedures." Peptides, at the indicated concentrations, and ^{btnt}tPA (100 nM) were added to rAnxA2 and incubated at 37 °C for 2 h. Peptide 1 (LCKLSL), ■, Homocysteine, □, Peptide 34 [L(hC)KLSL], ▲. Results of one representative experiment of two performed are shown. Error bars indicate S.E. ($n = 3$).



we have considered two possible explanations: i) a low affinity interaction (disrupted by high concentrations of thiol-containing peptides) exists between tPA and AnxA2, which implicates Cys⁸ of AnxA2, or ii) by forming a disulfide bond

with Cys⁸ of AnxA2 (as does homocysteine), Cys-containing peptides render this amino acid unavailable for further interaction, such as tPA binding. To test these hypotheses, we have studied the binding of Cys-containing peptides to

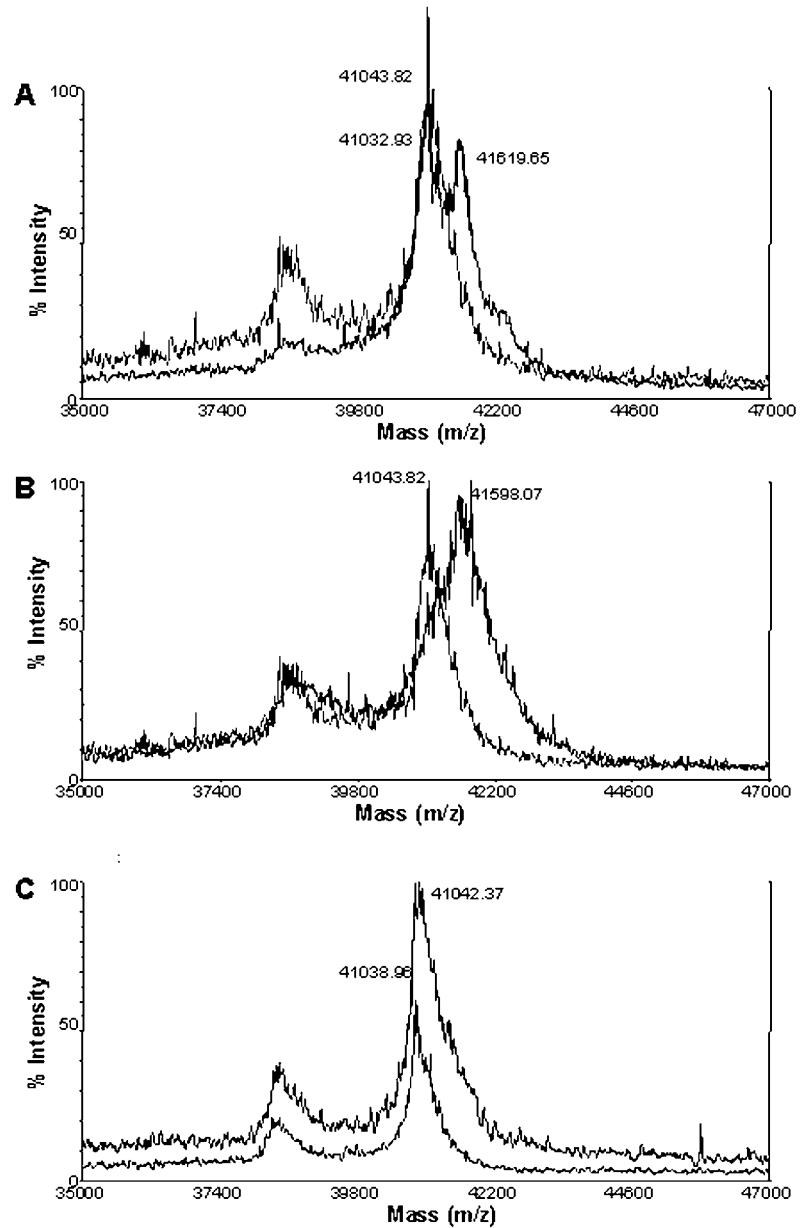


FIG. 7. Mass spectrometry analysis of untreated and peptide-treated rAnxA2. rAnxA2 was dissolved in phosphate-buffered saline, incubated with different peptides for 3 h at 37 °C, and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry as described under "Experimental Procedures." Analyses of untreated rAnxA2 (panels A, B, and C, left graph) as well as rAnxA2 treated with peptide 1 (LCKLSL) (panel A, right graph), peptide 34 (L(hC)KLSL) (panel B, right graph), or peptide 15 (LAKLSL) (panel C, right graph).

rAnxA2 by mass spectrometry. Fig. 7 shows the MALDI-TOF spectra of AnxA2 incubated, or not, with the hexapeptides LCKLSL (panel A) and L(hC)KLSL (panel B). Both peptides bound to rAnxA2, as reflected by the increase of molecular mass from 41,043 Da (free rAnxA2) to 41,619 Da (rAnxA2 incubated with LCKLSL) or 41,598 Da (rAnxA2 incubated with L(hC)KLSL). These increments in 576 and 555 Da, respectively, fit well with the molecular mass of the hexapeptides and suggest the formation of a complex with a 1:1 stoichiometry. In contrast, incubation of rAnxA2 with the Cys-lacking hexapeptide LAKLSL had no effect on the mass spectrum (Fig. 7, panel C). These results indicate that peptide competition is mediated by direct disulfide bond formation with rAnxA2. This interaction is likely to be mediated by Cys⁸, although the participation of other Cys residues cannot be completely ruled out.

To exclude the possibility that the peptides bound promiscuously to any Cys-containing protein, and more specifically to tPA, LCKLSL, L(hC)KLSL, and LAKLSL peptides were incubated with tPA, and the reaction products were analyzed by MALDI-TOF. The spectra of tPA were not significantly

changed upon incubation with any of the peptides analyzed (data not shown).

DISCUSSION

The dramatic increase in tPA catalytic activity resulting from its binding to cellular membranes provides an interesting target for the modulation of its biological functions related to the proteolytic degradation of fibrin as well as other substrates. We have recently shown that tPA is overexpressed in pancreas cancer cells and the blockade of tPA is associated with reduced *in vitro* invasiveness and tumorigenicity (37, 38). Therefore, the tPA system constitutes an attractive target for the development of novel therapies. Because cell surface receptors allow focalization of the proteolytic activity at the cell membrane and may also participate in signal transduction, their identification is of major importance.

AnxA2 has been shown to be a major tPA receptor in endothelial cells, among others, and preliminary data indicate that this protein is also overexpressed in pancreas cancers (36, 37).² On the basis of these findings, it can be postulated that AnxA2 might play a role in stimulating tPA activity and plasmin

generation at the membrane of cancer cells, potentially leading to increased tumorigenic properties. Nevertheless, our data do not exclude the possibility that some of the effects of tPA and its receptor(s) take place independently of its proteolytic activity and/or that of plasmin, as is the case of some effects mediated by the receptors for urokinase-type plasminogen activator (48). The blockade of the interaction between tPA and AnxA2 might provide clues about the precise role of this molecule as a tPA cell surface receptor in cancer cells.

Hajjar *et al.* (31) have recently reported on the critical role of a Cys residue in the LCKLSL (residues 7–12) sequence at the N terminus of AnxA2 for tPA and hC binding and have proposed that the interaction between the latter and AnxA2 leads to a reduction of tPA binding, thus providing an explanation for the prothrombotic effects of hC (45–47). This conclusion was based on the fact that: 1) an AnxA2 33-kDa chymotryptic peptide lacking the N-terminal peptide did not compete tPA-AnxA2 binding, 2) the hexapeptide abolished the binding of ^{125}I -tPA to immobilized purified AnxA2 and to HUVEC cells, 3) synthetic peptides lacking Cys⁸ did not inhibit binding, and 4) a systematic mutation of all Cys residues of AnxA2 showed that only Cys⁸ was required for the interaction. Therefore, we initiated a search for variant peptides that were able to better compete AnxA2-tPA binding and had more suitable pharmacological properties. These peptides were tested using the experimental procedures previously described (31) except that tPA was labeled with biotin instead of ^{125}I . Our findings confirm the requirement of Cys in the LCKLSL sequence but also suggest that other regions of the molecule must be necessary in order to confer specificity to the interaction.

We found that all peptides containing a Cys residue, regardless of the rest of their sequence and of the position in which the Cys was located, were able to compete the interaction between tPA and AnxA2 because of their capacity to bind AnxA2. The fact that the consensus peptide, as well as its enantiomer and retroenantiomer versions, showed similar properties in these assays and the small size of the peptides used argue in favor of mechanisms independent of a strong secondary structure. Because hC has been shown to block AnxA2-tPA binding through the formation of a disulfide bond with the thiol group of Cys⁸, we considered the possibility that the effects of synthetic peptides used in the assays performed here and in the work of Hajjar *et al.* might act through similar mechanisms. Our results indicate that the peptides compete with AnxA2-tPA binding more efficiently than hC and that peptide LCKLSL and its enantiomer bind covalently to AnxA2 and induce an increase in molecular mass, as determined by mass spectrometry, whereas a peptide with a Cys-Ala substitution does not bind. Although we cannot exclude the covalent binding of the peptides to other Cys residues, all available evidence points to an interaction with Cys⁸, because it has been shown that it is the only residue to which hC binds (31). Similar analyses using mass spectrometry showed that the same peptides do not bind tPA.

AnxA2 has been described (49) to exist as at least three different forms, monomer, heterodimer (composed of one molecule of AnxA2 and one molecule of 3-phosphoglycerate kinase), and heterotetramer (two AnxA2 subunits and two 11-kDa regulatory subunits called p11 or S100A10). These different forms seem to be present in distinct subcellular compartments; AnxA2 monomer is mainly cytosolic (49–51), whereas the heterodimer has been described in the nucleus (52–54) and the heterotetramer is associated with the plasma membrane (55). The AnxA2 heterotetramer is the most abundant form of the protein, representing 90–95% of the total AnxA2 in endothelial, epithelial, and Madin-Darby canine kidney cells (34, 56). The p11 light chain regulates many of the

activities of AnxA2 and confers to the heterotetramer biochemical properties distinct from those of the monomer (49, 57, 58). In particular, the tetramer is an extremely potent activator of plasminogen, stimulating the rate of activation of (Glu) plasminogen about 341-fold, compared with an approximate 6-fold stimulation by the monomer, and inducing a 90-fold increase in the catalytic efficiency of tPA for (Glu) plasminogen (59). Binding of p11 to AnxA2 also decreases the K_d (Ca^{2+}) for the binding of AnxA2 to biological membranes. In addition, the monomer bundles F-actin to a much lesser extent than the tetramer, and actin binding is important for regulation of intracellular AnxA2-membrane-mediated functions. Overall, the data suggest that p11 acts as a modulator of properties displayed by the p36 core protein. Interestingly, the interaction domain for p11 has been located, using fluorescence spectroscopy, within the first 9 amino acids of the AnxA2 tail (STVHEILCK) (32). This sequence partially overlaps with the LCKLSL peptide, suggesting that both p11 and tPA could compete for binding to AnxA2. However, the fact that tPA can bind to the tetramer, thereby leading to enhanced plasmin generation activity, supports the notion that non-overlapping domains must also be involved in binding of AnxA2 to p11 and to tPA. Our studies do not modify the interpretation of the mechanism of interaction of AnxA2 with p11, because the latter has been shown with a fluorophore used in fluorescence spectroscopy studies to be dependent on the N-terminal acetyl group of Ser¹ (60, 61) and unaffected by substitution of Cys⁸ (32). Because the AnxA2 tetramer is overexpressed at the extracellular side of the membrane in tumor cells (35) and its expression has been associated with cellular transformation and metastasis (35, 28), elucidating the precise structure of the complex remains an important task.

Regarding the binding site in the tPA molecule, Beebe *et al.* (62) have proposed that residues 7–17 of its finger domain (RDEKTQMIYQQ) are involved in binding to AnxA2. This sequence mimics partially the sequence of p11 responsible for AnxA2 binding (CRDGK, residues 61–65), suggesting again the possibility of competition between both molecules for AnxA2 binding. However, the high concentrations (mM) of tPA-derived peptide required for HUVEC binding suggest that other regions of the molecule may also play a role. For instance, tPA deletion mutants lacking the finger domain or both the finger and growth factor domains are still able, although to a much lesser extent, to bind to endothelial cells (63) and stimulate plasminogen activation (39). However, in these assays the cellular receptors involved in the interaction with tPA or tPA-derived fragments were not molecularly characterized. Altogether, the available evidence indicates that a reassessment of the domains involved in the binding of AnxA2, tPA, and p11 is necessary and that it is important to take into account that different domains may be involved in different cellular processes, given the broad range of functions ascribed to the molecules involved in this complex.

The precise mechanisms through which the overexpression of tPA and AnxA2 may contribute to tumor progression in pancreas cancer, as well as in other tumor types, are not clear and may be severalfold. To tackle more effectively such processes and to develop therapeutic strategies, a better understanding of the molecular interactions between these two proteins is necessary.

Acknowledgments—We thank Drs. C. Castellernau and M. G. Lampugnani for kindly providing the HUVEC cells and Drs. A. García de Herreros and J. Domínguez for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Collen, D., and Lijnen, H. R. (1995) *Thromb. Haemostasis* **74**, 167–171
- Madison, E. L. (1994) *Fibrinolysis* **8**, 221–236
- Dano, K., Andreasen, P. A., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen,

- L. S., and Skriver, L. (1985) *Adv. Cancer Res.* **44**, 139–266
4. Liotta, L. A., Rao, C. N., and Barsky, S. H. (1983) *Lab. Invest.* **49**, 636–649
 5. DeClerck, Y. A., Imren, S., Montgomery, A. M., Mueller, B. M., Reisfeld, R. A., and Laug, W. E. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **425**, 89–97
 6. Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Fischer, S., Rudolph, R., Kohnert, U., and Bode, W. (1996) *J. Mol. Biol.* **258**, 117–135
 7. Redlitz, A., and Plow, E. F. (1995) *Bailliere's Clin. Haematol.* **8**, 313–327
 8. Hajjar, K. A., Jacovina, A. T., and Chacko, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21191–21197
 9. Cesarman, G. M., Guevara, C. A., and Hajjar, K. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21198–21203
 10. Gerke, V., and Moss, S. E. (2002) *Physiol. Rev.* **82**, 331–371
 11. Gerke, V., and Moss, S. E. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1357**, 129–154
 12. Emans, N., Gorvel, J. P., Walter, C., Gerke, V., Kellner, R., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 1357–1369
 13. Burgoyne, R. D., Morgan, A., and Roth, D. (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **710**, 333–346
 14. Morgan, A., Roth, D., Martin, H., Aitken, A., and Burgoyne, R. D. (1993) *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 401–405
 15. Rojas, E., Arispe, N., Haigler, H. T., Burns, A. L., and Pollard, H. B. (1992) *Bone Miner.* **17**, 214–218
 16. Pollard, H. B., Guy, H. R., Arispe, N., de la Fuente, M., Lee, G., Rojas, E. M., Pollard, J. R., Srivastava, M., Zhang-Keck, Z. Y., Merezhinskaya, N., Cahuy, H., Burns, A. L., and Rojas, E. (1992) *Biophys. J.* **62**, 15–18
 17. Sun, J., Bird, P., and Salem, H. H. (1993) *Thromb. Res.* **69**, 279–287
 18. Kondo, S., Noguchi, M., Funakoshi, T., Fujikawa, K., and Kisiel, W. (1987) *Thromb. Res.* **48**, 449–459
 19. Andree, H. A., Stuart, M. C., Hermens, W. T., Reutelingsperger, C. P., Hemker, H. C., Frederik, P. M., and Willems, G. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17907–17912
 20. Romisch, J., Schorlemmer, U., Fickenscher, K., Paques, E. P., and Heimburger, N. (1990) *Thromb. Res.* **60**, 355–366
 21. Keutzer, J. C., and Hirschhorn, R. R. (1990) *Exp. Cell Res.* **188**, 153–159
 22. Masiakowski, P., and Shooter, E. M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1277–1281
 23. Harder, T., Thiel, C., and Gerke, V. (1993) *J. Cell Sci.* **104**, Pt. 4, 1109–1117
 24. Leung, M. F., Lin, T. S., and Sartorelli, A. C. (1992) *Cancer Res.* **52**, 3063–3066
 25. Pfaffle, M., Ruggiero, F., Hofmann, H., Fernandez, M. P., Selmin, O., Yamada, Y., Garrone, R., and von der Mark, K. (1988) *EMBO J.* **7**, 2335–2342
 26. Kirsch, T., and Pfaffle, M. (1992) *FEBS Lett.* **310**, 143–147
 27. Wu, L. N., Genge, B. R., Lloyd, G. C., and Wuthier, R. E. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1195–1203
 28. Tressler, R. J., Updyke, T. V., Yeatman, T., and Nicolson, G. L. (1993) *J. Cell. Biochem.* **53**, 265–276
 29. Tressler, R. J., and Nicolson, G. L. (1992) *J. Cell. Biochem.* **48**, 162–171
 30. Hajjar, K. A., and Krishnan, S. (1999) *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 128–138
 31. Hajjar, K. A., Mauri, L., Jacovina, A. T., Zhong, F., Mirza, U. A., Padovan, J. C., and Chait, B. T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9987–9993
 32. Johnsson, N., Marriott, G., and Weber, K. (1988) *EMBO J.* **7**, 2435–2442
 33. Ma, A. S., Bell, D. J., Mittal, A. A., and Harrison, H. H. (1994) *J. Cell Sci.* **107**, 1973–1984
 34. Gerke, V., and Weber, K. (1984) *EMBO J.* **3**, 227–233
 35. Yeatman, T. J., Updyke, T. V., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., and Nicolson, G. L. (1993) *Clin. Exp. Metastasis* **11**, 37–44
 36. Vishwanatha, J. K., Chiang, Y., Kumble, K. D., Hollingsworth, M. A., and Pour, P. M. (1993) *Carcinogenesis* **14**, 2575–2579
 37. Paciucci, R., Tora, M., Diaz, V. M., and Real, F. X. (1998) *Oncogene* **16**, 625–633
 38. Paciucci, R., Berrozpe, G., Tora, M., Navarro, E., Garcia, D. H., and Real, F. X. (1996) *FEBS Lett.* **385**, 72–76
 39. Sinniger, V., Merton, R. E., Fabregas, P., Felez, J., Longstaff, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12414–12422
 40. Hajjar, K. A., Guevara, C. A., Lev, E., Dowling, K., and Chacko, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21652–21659
 41. Carreño, C., Roig, X., Cairó, J., Camarero, J., Mateu, M. G., Domingo, E., Giralt, E., and Andreu, D. (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* **39**, 41–47
 42. Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., and Dejana, E. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 1511–1522
 43. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
 44. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
 45. Hajjar, K. A. (2001) *J. Clin. Invest.* **107**, 663–664
 46. Graham, I. M., Daly, L. E., Refsum, H. M., Robinson, K., Brattstrom, L. E., Ueland, P. M., Palma-Reis, R. J., Boers, G. H., Sheahan, R. G., Israelsson, B., Uiterwaal, C. S., Meleady, R., McMaster, D., Verhoef, P., Witteman, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, J. C., de Valk, H. W., Sales Luis, A. C., Parrot-Rouland, F. M., Tan, K. S., Higgins, I., Garcon, D., Medrano, M. J., Candito, M., Evans, A. E., and Andria, G. (1997) *JAMA* **277**, 1775–1781
 47. D'Angelo, A., and Selhub, J. (1997) *Blood* **90**, 1–11
 48. Ossowski, L., and Aguirre-Ghisso, J. A. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 613–620
 49. Waisman, D. M. (1995) *Mol. Cell Biochem.* **149–150**, 301–322
 50. Osborn, M., Johnsson, N., Wehland, J., and Weber, K. (1988) *Exp. Cell Res.* **175**, 81–96
 51. Zokas, L., and Glenney, J. R., Jr. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 2111–2121
 52. Vishwanatha, J. K., Jindal, H. K., and Davis, R. G. (1992) *J. Cell Sci.* **101**, 25–34
 53. Jindal, H. K., Chaney, W. G., Anderson, C. W., Davis, R. G., and Vishwanatha, J. K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5169–5176
 54. Vishwanatha, J. K., and Kumble, S. (1993) *J. Cell Sci.* **105**, 533–540
 55. Thiel, C., Osborn, M., and Gerke, V. (1992) *J. Cell Sci.* **103**, 733–742
 56. Nilius, B., Gerke, V., Prenen, J., Szucs, G., Heinke, S., Weber, K., and Droogmans, G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30631–30636
 57. Drust, D. S., and Creutz, C. E. (1988) *Nature* **331**, 88–91
 58. Kang, H. M., Kassam, G., Jarvis, S. E., Fitzpatrick, S. L., and Waisman, D. M. (1997) *Biochemistry* **36**, 2041–2050
 59. Kassam, G., Choi, K. S., Ghuman, J., Kang, H. M., Fitzpatrick, S. L., Zackson, T., Zackson, S., Toba, M., Shinomiya, A., and Waisman, D. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 4790–4799
 60. Becker, T., Weber, K., and Johnsson, N. (1990) *EMBO J.* **9**, 4207–4213
 61. König, J., Prenen, J., Nilius, B., and Gerke, V. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19679–19684
 62. Beebe, D. P., Miles, L. A., and Plow, E. F. (1989) *Blood* **74**, 2034–2037
 63. Barnathan, E. S., Cines, D. B., Barone, K., Kuo, A., and Larsen, G. R. (1988) *Fibrinolysis* **2**, 58

2) A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells

2.1) Resum

Com ja s'ha comentat en el resum anterior, fins al moment l'únic receptor del tPA descrit en el càncer de pàncrees havia estat l'AnxA2. Tot i així, uns estudis realitzats més recentment mostraven. Per altra banda i tenint en compte que l'AnxA2 és el principal receptor del tPA en les cèl·lules endotelials i responsable d'una eficient activitat fibrinolítica, el desenvolupament d'estratègies inhibidores tPA/AnxA2 podria interferir en la homeòstasi del sistema de coagulació i la fibrinòlisi.

Per tots aquests motius ens vam proposar identificar nous receptors del tPA en unes línies cel·lulars derivades de càncer de pàncrees de cara a millorar la comprensió dels mecanismes pels quals actua el tPA, i identificar noves possibles dianes terapèutiques per inhibir els seus efectes perniciosos.

Els possibles receptors van ser separats per afinitat en un assaig de *pull down* amb el tPA unit covalentment a una resina sefarosa (Sefarosa-tPA). Com a model de treball s'utilitzà la línia cel·lular PANC-1 derivada d'un adenocarcinoma ductal de pàncrees. Es van obtenir dos tipus diferents d'extractes cel·lulars. Per una banda un lisat total que només exclouïa nuclis i per altra un fracció purificada dels rafts de membrana on s'ha descrit que s'hi concentra una gran quantitat de receptors importants per a la senyalització cel·lular.

La separació de les proteïnes obtingudes es va fer amb una E2D i la identificació mitjançant una espectrometria de masses tot comparant el patró de masses dels pèptids tríptics obtinguts (*mass fingerprint*) amb la base de dades *on line* del *NCBI* utilitzant el motor de cerca MASCOT. .

Per tal d'identificar aquells receptors específics del pàncrees es van comparar els resultats obtinguts amb cèl·lules PANC-1 amb un altre experiment realitzat sobre una línia de cèl·lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC).

Finalment s'obtingué un llistat de 31 proteïnes, de les quals 12 eren específiques del pàncrees. Algunes d'aquestes proteïnes ja havien estat descrites anteriorment com a receptors del tPA en altres models (l'enolasa, la citoqueratina 8 i 18 i la tubulina). Per la resta, aquesta era la primera evidència que podien interaccionar amb el tPA. D'entre elles, algunes presentaven més possibilitats de ser receptors funcionals del tPA degut a la seva localització cel·lular i a les seves funcions descrites, com ara la gal 1 o l'anomenada *valosin containing protein*.

Per tal de validar els resultats amb una altra tècnica vam procedir a la identificació d'algunes de les proteïnes trobades (la cortactina, l'AnxA2, la citoqueratina 18 i la gal 1 i l'enolasa) per WB a partir de *pull downs* amb el tPA sobre un lisat cel·lular de PANC-1. Totes elles van ser positivament detectades.

Finalment, vam fer extensiu l'estudi d'aquestes proteïnes (l'enolasa, l'AnxA2, la cortactina, la citoqueratina 18 i la gal 1) en altres línies cel·lulars derivades de càncer de pàncrees (SK-PC-1 i Hs766T) i una línia provinent de cèl·lules pancreàtiques no tumorals immortalitzades (HPDE). Els resultats, de nou, van confirmar la interacció d'aquestes proteïnes amb el tPA.

SHORT COMMUNICATION

A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells

Oriol Roda^{1,2}, Cristina Chiva¹, Gemma Espuña¹, Hans-J. Gabius³, Francisco X. Real^{1,2}, Pilar Navarro² and David Andreu¹

¹ Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain

² Cell and Molecular Biology Unit, Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain

³ Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians University, München, Germany

We have developed a strategy to identify putative tissue-type plasminogen activator (tPA) receptors present in pancreatic cancer cells by affinity capture with tPA-Sepharose followed by 2-DE and MALDI-MS PMF. Proteins pulled down from either total lysates or raft membrane fractions were characterized and compared with those from a total lysate of an endothelial cell line (HUVEC) to identify pancreas-restricted tPA receptors. A total of 31 proteins were found by this approach, including annexin A2, already described as a tPA receptor in pancreas and endothelial cells, other proteins acting as tPA receptors (*i.e.*, enolase, cytokeratins 8 and 18) in other tissues, and additional proteins not previously identified as candidate tPA receptors. Confirmation of the results was performed for some of these proteins using immunoblotting. These studies are the basis for further functional analyses on the role of these proteins in the biological effects of tPA.

Received: May 26, 2005
Revised: September 6, 2005
Accepted: September 19, 2005

Keywords:

Affinity capture / Electrophoresis / Pancreatic cancer / PMF / Raft membrane fraction

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease whose best documented role, together with urokinase-type plasminogen activator (uPA), is the activation of the zymogen plasminogen to the protease plasmin, which in turn is implicated in the degradation of fibrin clots in blood [1]. The plasminogen system is also involved in the degradation of extracellular matrix and activation of growth factors in processes of tissue remodeling, cell migration and, in the case of cancers, tumor invasiveness [2]. Of the two plasminogen activators, uPA, has been most extensively studied in cancer progression and has been shown to play a role both by

activating plasmin and by modulating cell migration through its receptor, uPAR. Its overexpression in tumors is associated with a more invasive behavior and worse prognosis [3]. However, there are some tumor types such as melanomas [4], neuroblastomas [5], acute promyelocytic leukemia [6] and exocrine pancreatic adenocarcinoma [7, 8], where a crucial role for tPA has been demonstrated. In the pancreas, tPA is overexpressed in 95% of ductal tumors, whereas it is undetectable in normal pancreatic ducts, and tPA expression is associated with a more invasive behavior *in vitro* [7, 8]. Furthermore, it has been proposed that tPA may affect tumor progression by increasing angiogenesis and tumor cell proliferation *in vivo* [9, 10]. By analogy with uPA, it has been proposed that tPA activity is linked to its binding to membrane-localized receptors that enhance its proteolytic activity and localize this protein at the cell membrane in the migration front. Annexin A2 (AnxA2) is a well-known receptor for tPA and plasminogen in endothelial cells [11, 12]. AnxA2 is present in several cellular compartments, including membrane rafts [13], and appears to trigger proin-

Correspondence: Professor David Andreu, Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain
E-mail: david.andreu@upf.edu

Abbreviations: AnxA2, Annexin A2; tPA, tissue-type plasminogen activator; uPA, urokinase-type plasminogen activator; WB, Western blot

vasive activity through tPA activation of plasmin in several tissues, including pancreatic cancer ([14] and Peiró *et al.*, submitted).

Recent work has shown that some effects of tPA—both in pancreatic and other cell types—do not require its proteolytic activity, including the activation of the MAP kinase ERK1/2 signaling pathway ([15] and Peiró *et al.*, submitted). Furthermore, it is likely that other molecules, in addition to AnxA2, participate in tPA binding in pancreatic tumors since AnxA2 can only account for the binding of 50% of tPA to pancreas cancer cells [14]. Therefore, we have set out to identify putative tPA receptors in cultured pancreatic cancer cells, and determine their role in a variety of biological processes.

We have used a proteomic approach relying on an affinity capture (pull-down) initial step using Sepharose-bound tPA, followed by 2-DE and PMF analysis. Several pancreas cancer cell lines were used for the experiments. PANC-1 cells were chosen because they do not produce endogenous tPA [16, 17], and are therefore the focus of this report. To ascertain whether the proteins identified as putative tPA receptors using pull-down were specific for pancreatic cells, the 2-DE profiles of bound proteins isolated from PANC-1 cells were compared with those from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). PANC-1 cells were cultured to confluence in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum, and HUVEC cells were cultured as previously described [18]. Total protein lysates were obtained by extraction with Tris-buffered saline (TBS) containing 1% Triton X-100, protease inhibitors (200 mM Pefabloc, 1 mM aprotinin, 20 mM leupeptin) and phosphatase inhibitors (1 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate). We also analyzed the raft fractions, prepared as previously described [19] using detergent-free lysis and ultracentrifugation in a discontinuous (5%–35%–45%) sucrose gradient. The raft fraction was collected between 35% and 5% sucrose, and further purified by resuspension in 25 mM MES buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.5, and centrifugation at 13 000 rpm for 1 h at 4°C. The pellet was next resuspended in TBS containing 1% Triton X-100, 20 mM octylglucoside and the above-mentioned protease and phosphatase inhibitors.

For the pull-down assay, an initial procedure optimization was required, as commercial recombinant tPA (Actilyse, Roche Molecular Biochemicals) contains a 300-fold molar excess of arginine as stabilizer which effectively competes with tPA for CNBr-Sepharose binding sites, and results in very low immobilization yields. Attempts to remove arginine by either dialysis or ultrafiltration on Centricon (Millipore) membranes resulted in the precipitation of tPA. However, overnight dialysis of the commercial tPA solution against 0.9 M guanidine hydrochloride avoided precipitation and the resulting arginine-free tPA solution could be used to obtain satisfactory tPA substitution levels (ca. 25 mg/mL dried CNBr-Sepharose). This resin was then used for affinity capture of tPA-binding proteins. tPA-Sepharose (50 μ L, dry volume) was incubated with ca. 5 mg total protein from the cell lysates. After 2 h at 4°C, the supernatant was discarded, the

resin washed three times with lysis buffer, and bound proteins were eluted with the IEF buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (Amersham Biosciences), 0.5% IPG buffer 3–10 non-linear (NL) (Amersham Biosciences) and 1% DTT]. BSA-coupled Sepharose was used as control to assay for nonspecific binding.

IEF was carried out on 24-cm, pH 3–10 NL IPG strips, and followed by 2-DE on 12.5% Bis/acrylamide precast gels (Amersham Biosciences). Protein spots were visualized first by CBB R-350 and, in some experiments, destained and restained with silver, and then excised, and digested with trypsin (Promega). Control 2-DE runs included BSA-Sepharose (see above) and, due to the spontaneous leaking of recombinant tPA from the matrix, tPA-coupled Sepharose resin incubated with buffer alone (Fig. 1D). Figure 1 shows the 2-D gels of PANC-1 cell lysates (Fig. 1A, C) compared with those of HUVEC (Fig. 1B). Spots selected for PMF analysis are indicated by arrows and the spots corresponding to proteins selected for further characterization as putative tPA receptors are specified.

Digest solution (10 μ L) was passed through an Empore column (Proxeon) and the tryptic peptides were eluted with 1 μ L 70% ACN in 0.1% TFA containing 20 mg/mL CHCA. A Voyager DE-STR MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) operating in the reflectron mode was used to generate PMFs, which were searched against the NCBI database using MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>) with a mass tolerance of 50 ppm. PANC-1 total cell lysates were analyzed in quadruplicate; HUVEC total cell lysates and PANC-1 raft fraction experiments were performed in duplicate.

The protein identification process yielded 31 tPA receptor candidates identified in gels of PANC-1 cell pull-downs, either from total lysates or from raft fractions (Table 1). Since several proteins previously shown to act as tPA receptors cannot strictly be classified as *bona fide* membrane proteins, we have chosen to report all reliably identified (*i.e.*, reproducibly observed by PMF with a significant sequence coverage) candidates, assuming they may include either authentic tPA receptors, or proteins associated with authentic tPA receptors, or even ligands with no apparent physiological relevance.

Some of the listed proteins have already been described as tPA receptors, such as AnxA2, enolase, cytokeratins 8 and 18, and tubulin [20–22], thereby validating the analytical methodology used. Among them, AnxA2 is the only protein previously identified as a tPA receptor in pancreas cancer cells ([15] and Peiró *et al.*, submitted).

Thioredoxin peroxidase has been recently identified as capable of binding AnxA2 [23], and thus might have been indirectly bound by tPA-Sepharose. Along similar lines, vimentin has been described as a mediator of PA inhibitor and its receptor in platelets [24].

Galectin-1, one of the proteins identified for which a membrane localization has been reported in a variety of cell types, has been proposed to play an important role in tumor

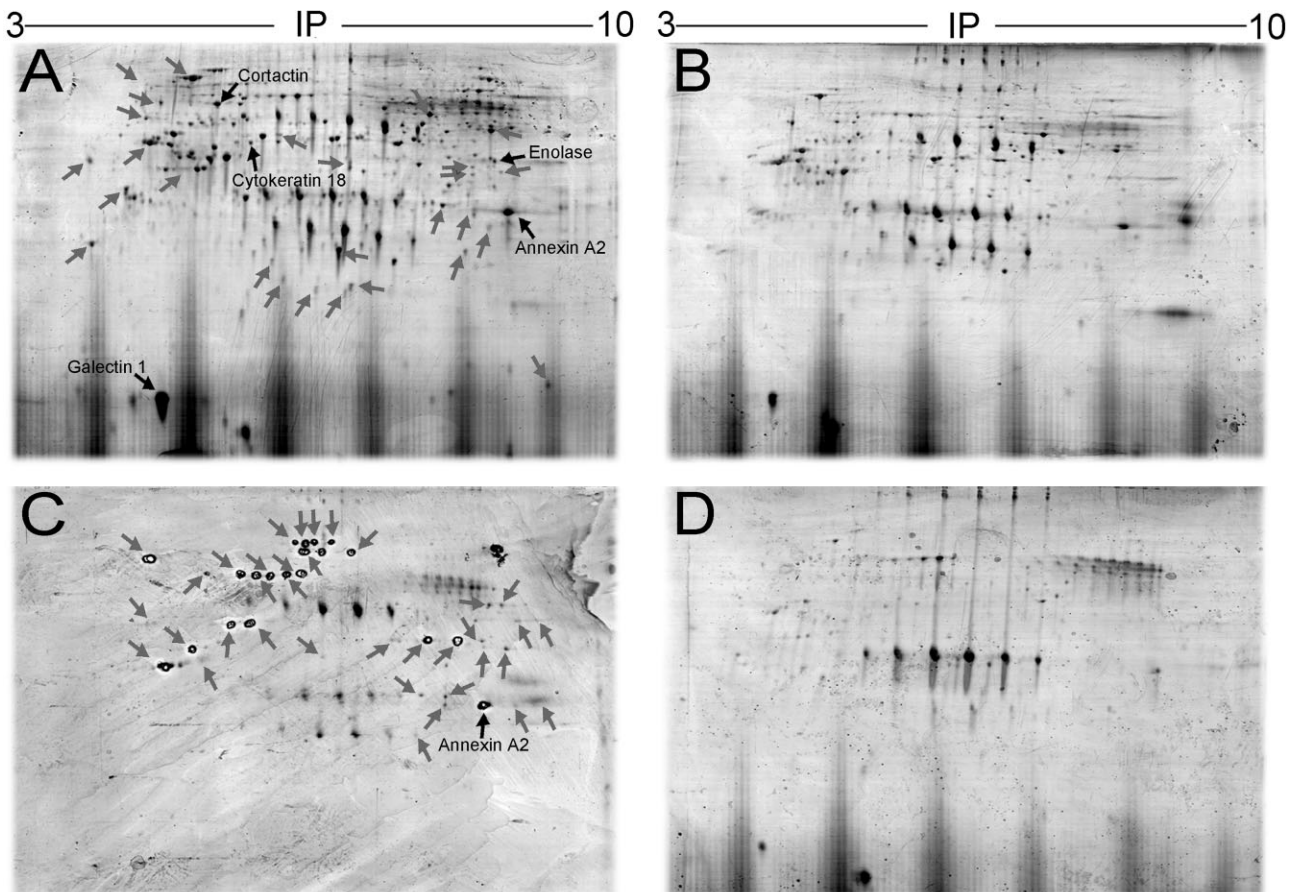


Figure 1. 2-DE of proteins bound to tPA-Sepharose in the pull-down assays. Pull-down experiments were done as described in the text using total cell lysates of PANC-1 (A) or HUVEC (B) and the raft fraction of PANC-1 cells (C). A control experiment with tPA-Sepharose incubated with lysis buffer was also carried out (D); all spots in this gel correspond to tPA. Protein spots are CBB stained and, in the case of raft fraction of PANC-1, destained and re-stained with silver for improved visualization. Spots excised from both PANC-1 gels (total lysate and raft fraction) are marked with arrows. Proteins most extensively studied (see text), *i.e.*, enolase, AnxA2, cortactin, cytoke-
 ratin 18 and galectin-1 (black arrows), are explicitly labeled.

progression, partly by modulation of immune cells [25], and also through its interaction with the product of the H-Ras proto-oncogene [26].

Nine of the proteins in Table 1 are cytoskeletal, suggesting their implication in the cell motility function of tPA. Immunocytochemical studies to determine their co-localization with tPA in the migration front of pancreatic cells are ongoing.

We have also identified the cytosolic protein ERK 1, in agreement with its role in tPA mitogenic signaling ([14] and Peiró *et al.*, submitted), also suggesting that the methodology used may allow the identification of proteins not directly bound to tPA but implicated in complexes with other tPA-interacting proteins.

For other proteins listed in Table 1, a discernible role as tPA receptors cannot be identified, and the biological relevance of their *in vitro* interaction with tPA has to be established. This is particularly the case for those proteins loca-

lized in cellular organelles where the presence of tPA has so far not been established (*i.e.*, the nucleus or mitochondria). Intriguingly, some of them have been described as over-expressed in pancreatic cancer [27, 28], and others might have a yet unknown function in this system. For example, valosin-containing protein, although not strictly described as membrane bound, has been implicated in membrane fusion events [29] and has been consistently observed in our experiments, therefore suggesting that the interaction is real and that it is a plausible tPA receptor candidate. Even though RNA-binding proteins and chaperones in Table 1 may at first sight be labeled as likely false positives, the recent finding of AnxA2 as an RNA binding protein [30] would recommend a more cautious course.

Twelve of these proteins (labeled ψ in Table 1) were over-represented in PANC-1 cells, a property that made them particularly attractive for further validation given the selectivity of their expression. Five of these proteins (AnxA2,

Table 1. Proteins identified by tPA-Sepharose pull-down assay and 2-DE of pancreatic cell fractions^{a)}

Protein name	Lysate	Raft	Reference	Best coverage	pI	Mass (kDa)	Localization	Function
Annexin A2	+	+	gi 16306978	48%	7.6	39	Membrane, cytoplasm, nucleus	Signal transduction; cell communication
Enolase ^ψ	+	+	gi 4503571	22%	7.0	47	Membrane, cytoplasm,	Metabolism
Galectin-1 ^ψ	+		gi 42542978	51%	5.3	15	Membrane, cytoplasm, nucleus	Receptor binding; immune response
Cortactin ^ψ	+		gi 182087	35%	5.2	61	Cytoskeleton	Structural component
Cytokeratin 8 ^ψ	+	+	gi 181573	33%	5.5	53	Cytoskeleton	Structural component
Cytokeratin 18	+	+	gi 30311	48%	5.3	47	Cytoskeleton	Structural component
Tubulin ^ψ	+	+	gi 2119276	29%	5.0	50	Cytoskeleton	Structural component
Vimentin	+	+	gi 2119204	54%	5.1	54	Cytoskeleton	Structural component
Actin	+	+	gi 3157976	38%	5.3	42	Cytoskeleton	Structural component
ARP3 ^ψ	+	+	gi 5031573	32%	5.6	47	Cytoskeleton	Structural component
Cytokeratin 19	+		gi 24234699	49%	5.0	44	Cytoskeleton	Structural component
Enigma proteins with LIM and PDZ domains ^ψ	+		gi 13994151	39%	6.6	36	Cytoskeleton	Receptor signaling complex scaffold
Cystathionine-beta-synthase	+		gi 4557415	43%	6.2	61	Cytoplasm	Metabolism
Pyruvate kinase 3		+	gi 31416989	18%	7.9	58	Cytoplasm	Metabolism
Placental thrombin inhibitor	+		gi 20141722	53%	5.1	43	Cytoplasm	Protease inhibitor
Translin associated protein X	+		gi 6136057	60%	6.1	33	Cytoplasm	Transporter
Eukaryotic translation initiation factor 3	+		gi 4503513	37%	5.4	37	Cytoplasm	Translation regulation
CTP synthetase	+		gi 20981706	24%	6.0	67	Cytoplasm	Ligase; nucleotide and nucleic acid metabolism
Chaperonin (acute related morphine dependence protein) ^ψ	+		gi 4502643	28%	6.2	58	Cytoplasm	Chaperone activity; metabolism
Thioredoxin peroxidase ^ψ	+		gi 9955007	45%	5.4	22	Cytoplasm, nucleus	Peroxidase activity; metabolism
ERK 1 ^ψ	+		gi 20986531	19%	6.5	42	Cytoplasm, nucleus	Kinase activity; signal transduction; cell communication
Valosin containing protein ^ψ	+		gi 6005942	47%	5.1	90	Cytoplasm, ER, nucleus	ATPase activity
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	+		gi 5031753	37%	5.9	49	Nucleus	Ribonucleoprotein
ER-associated DnaJ protein 3	+		gi 18203497	33%	5.8	41	ER	Chaperone
DnaJ (Hsp40) homolog	+		gi 5453980	29%	5.8	58	ER	Chaperone
Eukaryotic translation elongation factor	+		gi 39644794	27%	6.3	50	ER	Translation regulator activity
Eukaryotic initiation factor 4B	+		gi 18146614	79%	5.4	69	Ribosome	Translation regulator activity; metabolism
PWP1-interacting protein 4	+		gi 14579002	33%	5.8	41	Mitochondria	DNA binding protein
Elongation factor Tu, mitochondrial precursor ^ψ	+		gi 34147630	51%	7.3	46	Mitochondria	Translation regulator activity
H ⁺ -transporting two-sector ATPase		+	gi 16359160	17%	9.2	59	Mitochondria	Ion channel activity; transport
Ubiquinol-cytochrome-c reductase		+	gi 731047	20%	6.9	53	Mitochondria	Catalytic activity; metabolism

a) Proteins present in PANC-1, but not in HUVEC, total cell lysates are marked with a superscript ψ . Cell localization and function of each protein were obtained from Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org>)

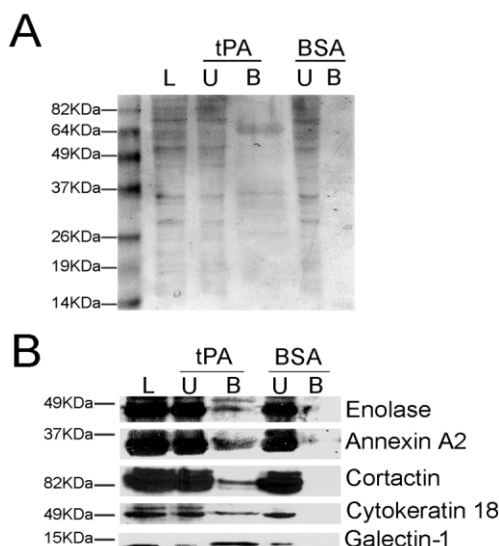


Figure 2. WB analysis to examine the presence of selected proteins identified by pull-down in cell lysates and in the tPA-Sepharose pull-down fractions. PANC-1 cell lysates were incubated with either tPA-Sepharose or BSA-Sepharose, as described in the text. One half of the bound fraction (B) and 5% of the unbound lysate (U) of both tPA and BSA pull-downs were loaded, along with the corresponding amount of unfractionated cell lysate (L). Proteins were separated by 1-DE (8% and 12% Bis/acrylamide gels) and transferred to NC membranes. (A) Ponceau staining. For WB analysis (B), filters were blocked with 5% skim milk, incubated with primary antibodies against enolase, AnxA2, cortactin, cytoke- ratin 18 and galectin-1, washed and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were detected by the enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences) according to manufacturer's instructions. The following antibodies were used: rat mAb against enolase (kind gift of Dr. G. Adamus, Oregon Health Science University, Beaverton, OR); rabbit polyclonal anti-AnxA2 produced in our laboratory [10]; rabbit polyclonal antibody against cortactin (kind gift of Dr. J. Cheng, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) [34]; mouse mAb LE61 recognizing cytoke- ratin 18 (kind gift of Dr. E. B. Lane, University of Dundee, UK) [35]; and rabbit polyclonal antibody detecting galectin-1 [36].

cytoke- ratin 18, enolase, cortactin, and galectin-1) were selected for confirmation of the 2-DE and PMF-based protein identifications by further analysis using tPA-Sepharose pull-down (as described above) followed by 1-DE and Western blot (WB). Anx2 and cytoke- ratin 18 were included as positive controls because their interaction with tPA has been pre- viously reported. An additional reason to include cytoke- ratin 18 was that it is a highly abundant cytoskeletal protein that has been reported to be accessible at the extracellular side of the membrane in cancer, but not normal, epithelial cells [31]. Figure 2 shows the detection of these proteins in total cell lysates, in the tPA-Sepharose pull-down fraction, and in the unbound material, using WB as a semi-quantita- tive approach.

The interaction of tPA with these proteins was also ana- lyzed in three additional pancreatic cell lines, selected on the basis of their different tumorigenic and differentiation prop- erties: SK-PC-1 cancer cells display a well-differentiated phe- notype [27, 32]; Hs766T are less differentiated; and HPDE are an immortalized non-tumorigenic cell line obtained by infection of human pancreatic ductal cells with a retrovirus containing the E6 and E7 genes of the human papilloma virus [33]. Hs766T and SK-PC-1 were grown using the same conditions as described above for PANC-1. HPDE cells were cultured in KSFM medium (Gibco) supplemented with epi- thelial growth factor (0.1–0.2 ng/mL) and bovine pituitary extract (25 µg/mL) [33]. Figure 3 shows that binding of AnxA2, cytoke- ratin 18, cortactin and galectin-1 to tPA could be verified by WB analysis in all pancreatic cells. In contrast, enolase was barely detectable despite its abundant expres- sion. Cytoke- ratin 7, an abundant cytoskeletal protein expres- sed by pancreatic cancers that did not appear among the proteins identified in the pull-downs, was included as a negative control. Surprisingly, although cytoke- ratin 7 binding to tPA was not detected in the three cancer cell lines examined, its binding to the non-tumorigenic HPDE cells suggests differential binding properties of tPA to either nor- mal or tumor cells.

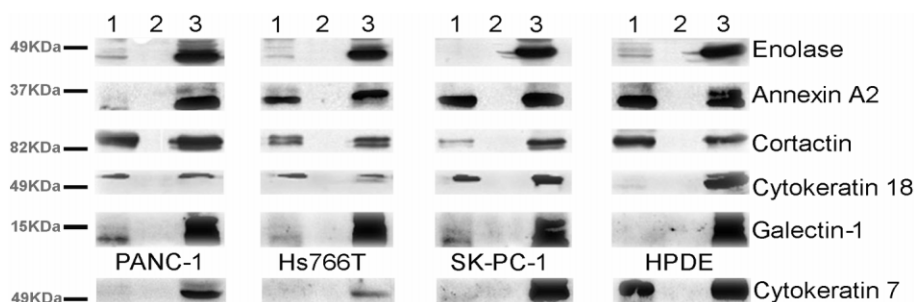


Figure 3. WB detection of six putative tPA receptors by pull-down assay using four pancreatic cell lines. Lysates from four different pancreatic cell lines (PANC-1, Hs766T, SK-PC-1, and HPDE) were incubated with tPA-Sepharose (1) or BSA-Sepharose (2) as described, followed by separation by 1-DE and WB as described in Fig. 2 with antibodies against enolase, AnxA2, cortactin, cytoke- ratin 18, galectin-1, and cytoke- ratin 7. Total cell lysates (3) were included in the analyses for refer- ence. Cytoke- ratin 7 was detected using mouse mAb RCK105 (kind gift of Dr. F. Ramaekers, Uni- versity of Maastricht, The Netherlands).

The work reported here represents the first step of a systematic attempt of the structural and functional characterization of putative tPA receptors. Biochemical validation of the interactions, demonstration of the colocalization of the proteins in cultured cells and tissues, and functional analysis using siRNA or antisense strategies should provide stronger evidence about the role of these proteins in the biological effects of tPA, both in pancreatic cancer and in other diseases. In addition, these studies should provide clues for the design of selective pharmacological strategies.

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III, Spain (00/0462 to P.N., C03/010 to F.X.R., PI040885 to D.A.), the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2002-00718 to P.N., BIO2002-04091-C03-01 to D.A.) and the European Community Biomed Programme (QLG1-CT-2002-01196 to F.X.R.). O.R. is supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science.

References

- [1] Collen, D., Lijnen, H. R., *Thromb. Haemost.* 1995, **74**, 167–171.
- [2] DeClerck, Y. A., Imren, S., Montgomery, A. M., Mueller, B. M. *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997, **425**, 89–97.
- [3] Bell, W. R., *Semin. Thromb. Hemost.* 1996, **22**, 459–478.
- [4] Stack, M. S., Gray, R. D., Pizzo, S. V., *Cancer Res.* 1993, **53**, 1998–2004.
- [5] Neuman, T., Stephens, R. W., Salonen, E. M., Timmusk, T., Vaheer, A., *J. Neurosci. Res.* 1989, **23**, 274–281.
- [6] Wilson, E. L., Jacobs, P., Dowdle, E. B., *Blood* 1983, **61**, 568–574.
- [7] Paciucci, R., Tora, M., Diaz, V. M., Real, F. X., *Oncogene* 1998, **16**, 625–633.
- [8] Navarro, P., in: Gress, T. M., Neoptolemos, J., Lemoine, N. R., Real, F. X. (Eds.), *Exocrine Pancreas Cancer*, Solvay, Bruxelles 2005, pp. 456–470.
- [9] Diaz, V. M., Planaguma, J., Thomson, T. M., Reventos, J., Paciucci, R., *Gastroenterology* 2002, **122**, 806–819.
- [10] Aguilar, S., Corominas, J. M., Malats, N., Dufresne, M. *et al.*, *Am. J. Pathol.* 2004, **165**, 1129–1139.
- [11] Hajjar, K. A., Krishnan, S., *Trends Cardiovasc. Med.* 1999, **9**, 128–138.
- [12] Hajjar, K. A., Jacovina, A. T., Chacko, J., *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 21191–21197.
- [13] Harder, T., Gerke, V., *Biochim. Biophys. Acta* 1994, **1223**, 375–382.
- [14] Diaz, V. M., Hurtado, M., Thomson, T. M., Reventos, J., Paciucci, R., *Gut* 2004, **53**, 993–1000.
- [15] Medina, M. G., Ledesma, M. D., Dominguez, J. E., Medina, M. *et al.*, *EMBO J.* 2005, **24**, 1706–1716.
- [16] Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., Todaro, G., *Int. J. Cancer* 1975, **15**, 741–747.
- [17] Sipos, B., Real, F. X., Moore, P., Kalthoff, H., *et al.*, in: Gress, T. M., Neoptolemos, J., Lemoine, N. R., Real, F. X. (Eds.), *Exocrine Pancreas Cancer*, Solvay, Bruxelles 2005, pp. 118–133.
- [18] Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R. *et al.*, *J. Cell Biol.* 1992, **118**, 1511–1522.
- [19] Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 9690–9697.
- [20] Hembrough, T. A., Li, L., Gonias, S. L., *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 25684–25691.
- [21] Nakajima, K., Hamanoue, M., Takemoto, N., Hattori, T. *et al.*, *J. Neurochem.* 1994, **63**, 2048–2057.
- [22] Beebe, D. P., Wood, L. L., Moos, M., *Thromb. Res.* 1990, **59**, 339–350.
- [23] Kwon, M., Yoon, C. S., Jeong, W., Rhee, S. G., Waisman, D. M., *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, 23584–23592.
- [24] Podor, T. J., Singh, D., Chindemi, P., Foulon, D. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 7529–7539.
- [25] Rabinovich, G. A., *Br. J. Cancer* 2005, **92**, 1188–1192.
- [26] Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E., Kloog, Y., *Oncogene* 2001, **20**, 7486–7493.
- [27] Paciucci, R., Berrozpe, G., Tora, M., Navarro, E. *et al.*, *FEBS Lett.* 1996, **385**, 72–76.
- [28] Crnogorac-Jurcevic, T., Efthimiou, E., Nielsen, T., Loader, J. *et al.*, *Oncogene* 2002, **21**, 4587–4594.
- [29] Dreveny, I., Pye, V. E., Beuron, F., Briggs, L. C. *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* 2004, **32**, 715–720.
- [30] Filipenko, N. R., MacLeod, T. J., Yoon, C. S., Waisman, D. M., *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 8723–8731.
- [31] Godfroid, E., Geuskens, M., Dupressoir, T., Parent, I., Szpirer, C., *J. Cell Sci.* 1991, **99**, 595–607.
- [32] Vila, M. R., Lloreta, J., Schussler, M. H., Berrozpe, G. *et al.*, *Lab. Invest.* 1995, **72**, 395–404.
- [33] Furukawa, T., Duguid, W. P., Rosenberg, L., Viallet, J. *et al.*, *Am. J. Pathol.* 1996, **148**, 1763–1770.
- [34] Cao, H., Orth, J. D., Chen, J., Weller, S. G. *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 2003, **23**, 2162–2170.
- [35] Lane, E. B., *J. Cell Biol.* 1982, **92**, 665–673.
- [36] Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., Gabius, H. J., *J. Biol. Chem.* 1998, **273**, 11205–11211.

3) Identification of a new tissue-plasminogen activator receptor: galectin-1 mediates tPA functions in pancreatic cancer

3.1) Resum

La cerca de nous lligands del tPA realitzada en l'apartat anterior ens va permetre identificar, entre d'altres, la gal 1. La localització en la membrana i algunes altres característiques d'aquesta lectina feien pensar que era una bona candidata per a un estudi més exhaustiu. Així doncs vam decidir abordar la caracterització bioquímica de la interacció tPA/gal 1, així com la determinació de l'expressió i la localització de la gal 1 en les cèl·lules pancreàtiques tumorals. Finalment vam realitzar alguns experiments per determinar la rellevància biològica d'aquesta interacció.

A la bibliografia, l'expressió de la gal 1 en el càncer de pàncrees s'ha relacionat amb l'estroma circumdant a la massa tumoral però no pas amb el propi tumor. Donat que això no coincidia amb les nostres observacions, vam començar analitzant l'expressió de la gal 1 en una bateria de línies cel·lulars originàries de tumors pancreàtics i en una línia de fibroblasts originaris d'un càncer de pulmó, podent demostrar que la gal 1 és present a la majoria d'aquestes cèl·lules. També vam confirmar la interacció tPA/gal 1 amb un assaig *pull down* sobre algunes de les línies analitzades.

Seguidament vam estudiar *in vitro* la interacció tPA/gal 1 mitjançant ressonància de plasmó superficial i *pull down* amb la gal 1 recombinant. Els resultats es van comparar amb els obtinguts per l'AnxA2 i la gal 3 (una altra lectina que s'ha descrit sobre-expressada en càncer de pàncrees) i van indicar que la gal 1 interacciona directament amb el tPA, amb una afinitat molt semblant a la de l'AnxA2 i molt superior a la de la gal 3.

Per tal d'aprofundir més en la caracterització de la gal 1 vam realitzar uns experiments de curació d'una ferida en cultiu cel·lular i, mitjançant tècniques d'immunofluorescència, en vam visualitzar la seva localització. En efecte, els resultats indicaven que la gal 1 es localitza essencialment en el front de migració cel·lular. A més a més, es podia observar una clara co-localització entre el tPA i la gal 1, novament consistent amb el possible paper de la gal 1 com a receptor del tPA. Aquestes dades permeten interpretar sota un altre prisma les afirmacions de la bibliografia en el sentit que la gal 1 només s'expressa a l'estroma. Al nostre parer, és probable que l'expressió de la gal 1 en cèl·lules tumorals, que els nostres resultats evidencien, no fos degudament detectada en estudis immunohistoquímics, en trobar-se restringida al front de migració cel·lular, on la forta expressió de la gal 1 en els fibroblasts circumdants podia fàcilment emascarar-ne la detecció.

Finalment, vam estudiar si la gal 1 estava implicada en l'efecte proliferatiu induït pel tPA. Per a esbrinar això vam utilitzar dues tècniques: d'una banda vam quantificar l'activació de la MAP quinasa Erk1/2 induïda pel tPA, i d'una altra vam mesurar l'augment en proliferació induït pel tPA, expressat com a incorporació de timidina tritiada. Aquests experiments es van realitzar tant sobre cèl·lules pancreàtiques i fibroblasts que expressaven constitutivament la gal 1 com sobre els mateixos tipus cel·lulars on l'expressió de la gal 1 s'havia inhibit mitjançant siRNA. Com a model alternatiu també es va utilitzar una línia de fibroblasts embrionaris d'un ratolí transgènic deficient de la gal 1. En tots els casos els resultats van demostrar que la supressió de la gal 1 inhibia l'activitat mitogènica del tPA.

Així doncs, en aquesta tercera fase hem caracteritzat a nivell bioquímic la interacció entre el tPA i la gal 1, una interacció fins ara no descrita ni investigada, i n'hem demostrat la clara rellevància funcional, la qual cosa ens ha permès proposar la gal 1 com a receptor del tPA.

Title: Identification of a new tissue-plasminogen activator receptor: galectin-1 mediates tPA functions in pancreatic cancer.

Oriol Roda^{1,2}, Elena Ortiz-Zapater², Miquel Vila-Perelló¹, Coral Ampurdanés², Hans-Joachim Gabius³, Francisco X. Real², David Andreu¹ and Pilar Navarro^{2*}.

¹ *Proteomics Unit, Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Dr Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain.*

² *Cell and Molecular Biology Unit, Municipal Institute of Medical Research, Dr Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain*

³ *Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, 80539-München, Germany.*

Running title: galectin1 is a new tPA functional receptor

Key words: galectin-1, tissue plasminogen activator (tPA), pancreatic cancer, cell proliferation, Erk1/2, siRNA.

Grant support

This work was supported by grants from Plan Nacional de I+D, Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-00704 to PN, BIO2005-07592-CO2-02 to DA, SAF2004-01137 to FXR)

Correspondence and reprint requests should be addressed to: Pilar Navarro, Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Dr. Aiguader, 80, 08003-Barcelona, Spain. Tel: 34-93-2211009; Fax: 34-93-2213237; E-mail: pnavarro@imim.es.

Abbreviations

¹The abbreviations used are: AnxA2, annexin A2; gal 1, galectin-1; gal 3, galectin-3; tPA, tissue plasminogen activator, MEF, mouse embryonic fibroblast; EGF; epidermal growth factor, BPE, Bovine pituitary extract; BSA, bovine serum albumin; WB, Western blot; SPR, Surface plasmon resonance.

ABSTRACT

Galectins, a family of lectins with high affinity for β -galactosidase, are overexpressed in different tumors where they have been suggested to play a role in tumor progression and metastasis. In pancreatic cancer, one of the most aggressive tumor and with the worst prognosis tumors, overexpression of galectin-1 (gal 1)¹ has been described. By immunohistochemical analysis, gal 1 expression appears to be restricted to the fibroblasts and extracellular matrix surrounding the tumor, and it has been suggested that it can play a role in the desmoplastic reaction of pancreatic cancer. Our group has previously described tissue plasminogen activator (tPA) overexpression in pancreatic tumors and characterized the role of this protease in tumor progression through induction of cellular proliferation, invasion and angiogenesis. In addition, using an affinity capture proteomic approach we have recently shown that gal 1 is associated to tPA. In the present work we have analyzed the tPA/gal 1 interaction in more detail, both at biochemical and functional level. Using a panel of pancreatic tumoral cell lines and Western blot (WB) analysis we observe that gal 1 is highly expressed in most cells analyzed. We also demonstrate, by pull down experiments with recombinant proteins, that tPA and gal 1 bind directly and with high affinity ($K_D = 9,1 \times 10^{-6}$, determined by surface plasmon resonance). *In vivo*, gal 1 and tPA co-localize in the migrating front of wound healing experiments. Finally, abolishment of gal 1 expression using siRNA or mouse embryonic fibroblasts from gal 1^{-/-} mice leads to a significant decrease of tPA-induced Erk1/2 activation and cellular proliferation. Taken together, results reported here are the first evidence for a role of gal 1 as a functional tPA receptor and highlight gal 1 participation in tPA activity during pancreatic cancer progression.

INTRODUCTION

Galectins are a family of structurally related proteins with α -galactosidase-binding ability. They can display a wide range of cellular functions and have been described as involved in cell growth, apoptosis, adhesion and malignant transformation [1,2]. In cancer, galectins have been proposed to promote cell metastasis, to stimulate cell growth and to protect tumoral cells against immune surveillance [3-5]. At least fourteen different mammalian galectins have been sequenced and characterized, with galectin 1 (gal 1) and galectin 3 (gal 3) being the two members of the family studied in greatest detail. Overexpression of these two proteins has been detected in several tumors [6-11], including pancreatic carcinoma, one of the most devastating tumors [12-16]. Gal 1 has been found overexpressed in pancreatic tumors relative to normal pancreas by both microarray [14] and proteomic techniques [13]. However, by immunohistochemical analysis gal 1 expression has been found mainly restricted to the stroma (fibroblast and extracellular matrix) surrounding the cancer mass [12,13], while gal 3 is abundant in most types of pancreatic cancer cells. Furthermore, metastatic pancreatic cancers show moderate to strong gal 3 expression but are negative for gal 1 [12]. These results suggest that gal 1 and gal 3 could play different functions in pancreatic cancer: whereas gal 1 appears to participate in the desmoplastic reaction around tumors, gal 3 seems to play a role in cell proliferation and metastasis formation. However, the molecular mechanisms governing galectin-mediated cellular functions in pancreatic cancer remain unknown.

Plasminogen is the zymogen form of plasmin, a serine protease implicated in the degradation of fibrin clots in blood vessels. Activation of plasminogen is carried out by the two plasminogen activators: tissue-type (tPA) and urokinase-type (uPA). tPA is secreted by endothelial cells and displays high affinity for fibrin, which increases plasminogen/plasmin catalytic conversion and efficient fibrinolysis. In addition to its established fibrinolytic role, tPA has also been involved in both normal and pathological events like cell migration and invasion during development and cancer [17-25]. Data from our laboratory and other groups have demonstrated that tPA plays a significant role in pancreatic cancer progression. tPA is overexpressed in pancreatic cancer in comparison to normal tissue and its expression is restricted to malignant ductal cells [26,27]. *In vitro* and *in vivo* data have demonstrated that tPA is involved in several tumor-related processes, inducing cell proliferation, invasion and angiogenesis [27,28]. Although such tPA functions could be exerted by its catalytic activity, mainly through plasmin generation, recent data suggest that tPA can also mediate cellular effects in a non-catalytic way [29,30]. These catalysis-independent functions require tPA binding to membrane cellular receptors and intracellular signal transduction. Several tPA receptors have been described in different cells, i.e. annexin A2 (AnxA2) in endothelial cells, HMG1 in neuronal cells, etc., although their participation in tPA catalysis-independent events has not been demonstrated. In neurons, there is evidence that the NMDA receptor is involved in tPA signalling [29,31]. In pancreas, several reports have indicated that AnxA2 is a functional receptor for tPA [32] (Ortiz-Zapater E. *et al.*, manuscript) although its inhibition does not completely abolish tPA effects, suggesting the involvement of other receptors in tPA functionality. In addition, AnxA2 is involved in the tPA fibrinolytic role in blood vessels, and thus inhibition of the tPA/AnxA2 interaction could have collateral effects in the homeostasis of the coagulation system. Therefore, identification of new tPA receptors can offer novel and specific therapeutic strategies to abolish tPA-induced malignant progression in pancreatic cancer.

In order to identify tPA receptors specific for pancreatic cancer, we have recently used a proteomic approach involving tPA-Sepharose affinity capture of cellular lysates from either endothelial or pancreatic cells [33]. In addition to AnxA2, several putative tPA receptors were found, including α -enolase and cytokeratin 18, already described to interact with tPA in other systems. In this analysis, gal 1 was also identified for the first time as interacting with tPA, thus suggesting a putative role as tPA receptor.

In the present work we have characterized in detail the interaction between tPA and gal 1 in our pancreatic cancer model. Using *in vitro* and *in vivo* experimental procedures we demonstrate that: 1) gal 1 is highly expressed by most of the cell lines analyzed; 2) Interaction between tPA and gal 1 is direct and with high affinity; 3) tPA and gal 1 co-localize in the migration front of a cell monolayer; 4) down-regulation of gal 1 expression by siRNA leads to a marked decrease in Erk1/2 activation and cell proliferation induced by tPA 5) using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from gal 1^{-/-} mice we demonstrate that gal 1 is also involved in the tPA-induced Erk1/2 activation in fibroblasts. Taken together these results indicate that gal 1 plays a pivotal role as a mediator of tPA functionality in pancreas tumor progression, and suggest it can be a new target in pancreatic cancer therapy.

MATERIALS AND METHODS

Materials. All reagents were obtained from Sigma unless specified. Rabbit α -gal 1 and α -gal 3 antibodies were produced in one of our laboratories (Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany) [34]. Mouse α -tPA 374-B and α -tPA 373 were from American Diagnostics (Stamford, CT). Rabbit α -ERK 1/2 and α -total ERK 1/2 antibodies were purchased from Cell Signalling (Boston, MA) and Upstate Laboratories (Charlottesville, VA), respectively. Chips, reagents and buffers for the BIAcore experiments were obtained from BIAcore (Uppsala, Sweden). SMARTpool[®] and siCONTROL non-targeting siRNA pool[®] were from Dharmacon (Lafayette, CO). Recombinant AnxA2 was prepared from BL21 *Escherichia coli* transformed with the pET21b(+) vector containing the human AnxA2 cDNA, kindly provided by Dr. K. A. Hajjar (Cornell University Medical College, New York, NY), as previously described [35]. Recombinant gal 1 and gal 3 were produced as described [36]. Recombinant tPA (Actilyse[®]) was from Boehringer (Ingelheim, Germany). Thymidine [³H] was purchased from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

Cell lines. HPDE were established by immortalization of human pancreatic ductal cells by infection with E6 and E7 genes from human papilloma virus [37]. PANC-1 [37], SK-PC-1, SK-PC-3 [38], and BxPC-3 [39] were obtained from pancreatic tumors. Hs766t [40] and RWP-1 [41] were obtained from metastasis of human pancreatic tumors. F88,2 is a spontaneously immortalized fibroblast cell culture obtained from a breast tumor. MEFs from both wild type and gal 1 knock-out mice were obtained from Françoise Poirier (Institut Jacques Monod, Paris, France) [42]. All cell lines were grown in DMEM 10% FBS (Invitrogen- Gibco, Long Island, NY) except HPDE, which were grown in KSFM supplemented with 0.1-0.2 ng/mL epidermal growth factor (EGF) and 25 μ g/mL bovine pituitary extract (BPE) (Invitrogen-Gibco, Long Island, NY).

Sepharose-tPA preparation. tPA (10 mg/mL) was exhaustively dialyzed against 0.9 M guanidine-HCl in PBS to eliminate excess arginine. After dialysis, the solution was made up to 0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.2 with coupling buffer and mixed with CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) (10 mg resin/mg of tPA). The coupling reaction was run for 2 h at 25°C with light shaking. Free CNBr groups were blocked with Tris-HCl buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.5 mM NaCl, pH 8, 2 h, 25°C) and alternate washes with Tris-HCl, pH 8, and acetate buffer (0.1 M sodium acetate, 0.5 M NaCl, pH 4) were performed. Sepharose-tPA was stored at 4°C in PBS containing 0.02% sodium azide. Final loading was 25-30 mg protein/mL resin. A similar procedure was performed to obtain BSA-Sepharose.

Pull down. A) 5 μg of recombinant protein (gal 1, AnxA2 or gal 3) was incubated with 5 μL of tPA-sepharose beads in 500 μL of PBS (2 h, 4°C). After three washes with cold PBS, samples were eluted with Laemmli buffer (5 min, 100°C). Proteins in both bound and unbound fractions were visualized by WB. BSA-Sepharose was used as control for unspecific binding. B) For cellular protein lysates, 1 mg of protein (prepared as mentioned below) was incubated with 10 μL of tPA-Sepharose and processed as described above. gal 1 was immunodetected by WB in bound, unbound and total lysate fractions. BSA-Sepharose was used as control for unspecific binding.

Western Blot. Protein extracts of eight cell lines (PANC-1, SK-PC-1, Hs766t, HPDE, SK-PC-3, BxPC-3, RWP-1 and F88,2) were prepared by extraction with 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.2, containing protease (10 μg/mL aprotinin, 2 mM pepstatin, 10 μg/mL leupeptin) and phosphatase inhibitors (10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium fluoride, 0.2 mM sodium orthovanadate) for 15 min in ice. Samples were centrifuged at 13,000 rpm and supernatant proteins were quantified with the Bradford assay. Solutions were mixed with Laemmli buffer and boiled (10 min, 100°C). After separation by SDS-PAGE (20 μg/lane), proteins were blotted onto nitrocellulose membranes and gal 1 and tPA detected by WB. Filters were blocked with 5% non-fat milk and incubated with primary antibody (rabbit α-gal 1 or α-tPA 374-B) for 1 h at 25°C. After washing with TBSt (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl 0.2% Tween20, pH 7.2), membranes were incubated with horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-mouse Ig antibody and finally developed using the ECL method (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Equal protein loading was confirmed by α-tubulin blotting.

BIAcore experiments. For immobilization of proteins over C5 chip, carboxyl groups on the chip dextran matrix were activated as esters by injecting a 0.025 M N-hydroxysuccinimide and 0.1 M EDC carbodiimide solution (7 min, 5 μL/min). tPA and BSA were immobilized by injecting 3 times a 10 mg/mL protein solution in HBS-P buffer for 2 min at 5 μL/min. Surface blocking was performed with ethanolamine (7 min, 5 μL/min) followed by two NaCl pulses (0.5 min at 10 μL/min) to eliminate unbound protein. Finally the surface was equilibrated with HBS-P buffer for 24 h (5 μL/min). Immobilization levels were 1,300 and 1,100 response units (RU) for tPA and BSA, respectively.

Experiments were carried out over a tPA-coated lane using a BSA-coated lane as blank. AnxA2, gal 1 and gal 3 dilutions covering each a 30 nM-4 μM concentration range were prepared in HBS-P buffer. Each dilution was injected over the lanes (3 min, 20 μL/min, association phase) following injection of HBS-P (5 min, 20 μL/min, dissociation phase). Lane regeneration was carried out by two pulses of NaCl 1 M (0.5 min, 10 μL/min) followed by stabilization in HBS-P (10 min, 10 μL/min) until base line was 2 +/- RU from initial value.

Thermodynamic affinity constants were obtained using the steady state model: RU values at equilibrium were plotted vs. concentration and the graph was adjusted to a hyperbolic equation [$y=ax/(1+bx)$] where b corresponds to the K_D of the interaction.

Wound healing experiments. Cells (PANC 1, SK-PC-1, F88,2 and HPDE) were grown to confluence on coverslips placed in a 24 well plate. Coverslips for HPDE were first coated with 1% gelatin (1 h, 37°C). A cell monolayer was wounded with a micropipette tip, wells were then washed three times with either 0.5% FBS in DMEM (PANC 1 SK-PC-1 and F88,2) or with EGF/BPE-supplemented KSFM (HPDE), to eliminate cells in suspension. Cells were then allowed to migrate over a period of time in accordance with their healing speed (16 h for F88,2 and HPDE, 24 h for SK-PC-1 and 48 h for PANC-1) in 500 μ L of either of the above media at 37°C.

Immunofluorescence and confocal microscopy. Coverslips from the wound healing experiment were washed with 1% BSA in DMEM, then incubated with 20 μ L of α -gal 1 antibody (40 μ g/mL in 1% BSA in DMEM, 15 min, 37°C). Three washes with 1% BSA in DMEM and two more with PBS were performed to eliminate unbound antibody. Cells were fixed with methanol (5 min, -20°C), coverslips again washed three times with 1% BSA in DMEM followed by blocking with 1% BSA in PBS (1 h, 37°C). For co-localization experiments, SK-PC-1 and HPDE-coated coverslips were incubated with 20 μ L of α -tPA 373 (10 μ g/mL in 1% BSA in PBS) for 1 h at 37°C. After three washes with 1% BSA in PBS, 20 μ L of secondary antibody solution was added (10 μ g/mL in 1% BSA in PBS) and incubated for 1 h, 37°C. Finally, coverslips were washed three times in PBS, once in MilliQ water and ethanol, air-dried, mounted over slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) and analyzed by fluorescent microscopy.

Immunofluorescent images were acquired with a Leica DMRB microscope adapted to a DC300F camera (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Germany) fitted with 488 nm (FITC) and 522 nm (TRITC) emission filters. Images were obtained with the x40 objective.

Confocal images were acquired with a TCS S2 microscope adapted to a DMIRBE inverted microscope (Leica, Germany) for sequential image acquisition for FITC and TRITC fluorochromes. Images were obtained with x63 and x40 Leica Plan-Apocromatco lens (N.A. 1,32 oil), with three digital magnifications. Exciting wavelengths were 488 nm with an Ar laser for FITC, and 543 nm with a He/Ne laser for TRITC. Images were obtained in a sequential mode through a spectral detection system, which allowed fitting the emission range for each fluorochrome to avoid cross-signaling. Image format was 1024x1024 pixels at 400 Hz scanning speed (line average 4).

Inhibition of gal 1 expression. HPDE and F88,2 cells were seeded on 24-well plates (20,000 cells/well) and allowed to grow for 24 h. Cells were transfected with either siRNA *SMARTpool*[®] against gal 1 or with *siCONTROL non-targeting siRNA pool*[®] using the lipofectamine/PLUS system (Invitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer protocols (10 nM siRNA, 5h, 37°C). After transfection cells were allowed to grow in EGF/BPE-supplemented KSFM (HPDE) or 10% FBS in DEMEM (F88,2) for 36 h. Inhibition of gal 1 expression was confirmed by WB analysis.

Erk1/2 activation analysis. HPDE cells treated with siRNA (as described above) or MEFs (wt or gal 1^{-/-}) (20,000 cells/well), starved by incubation with non-supplemented or serum free-medium for 72 h or 48 h respectively to induce cell cycle arrest. Cells were then treated with 10 μ g/mL tPA for 2, 5, 10 and 20 min. Cells treated with EGF/BPE (0.001 ng/mL, 40 ng/mL) (HPDE) or 1% FBS (MEFs) for 5 min were used as positive control, non-treated cells as negative control. Reaction was stopped by quickly

eliminating the medium and freezing in liquid nitrogen. Cells were lysed with Lammeli buffer (50 μL /well, 95°C), collected and boiled for 5 min. After centrifugation (13,000 rpm, 5 min) samples were stored at -20°C. Activation of Erk1/2 was detected by WB using a Phospho-p44/42 Map kinase rabbit polyclonal antibody against activated Erk1/2. Total levels of Erk1/2 were used for the normalization of protein levels.

Proliferation analysis by thymidine incorporation. HPDE and F88,2 treated with siRNA as described above were starved by incubation with non-supplemented or serum free-medium for 48 h to induce cell cycle arrest. Thymidine [Me^3H] (1 μCi /well) was added together with 2 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tPA for 24 h. Cells treated with EGF/BPE (10⁻³ ng/mL, 40 ng/mL) (HPDE) or 1% FBS in PBS (F88,2) for 24 h were positive control; non-treated cells were negative control. Wells were treated with 10% trifluoroacetic acid (20 min 25°C) and then with 500 μL of 0.5 M sodium hydroxide (1 h, 37°C). The incubation solution was neutralized with 250 μL of 1 M HCl and 4 mL of scintillation liquid (OptiPhase Hisafe 2, Fisher Chemicals, Loughborough, UK) was added to each sample. Radioactivity (dpm) was measured in a WinSpectral scintillation counter (PerkinElmer Sciex Instruments, Boston, MA).

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm sSD for minimum triplicates. Unless stated otherwise, studies were performed on three independent occasions.

RESULTS

Gal 1 is highly expressed in pancreatic cell lines and fibroblasts and is interacting with tPA.

Previous results from our proteomic study showed that gal 1 was interacting with tPA in pancreatic cell lines [33]. Other reports have described gal 1 overexpression in pancreatic cancer, though mainly restricted to fibroblasts of the surrounding desmoplasia, while tumoral cells seem to be negative [12,15,16]. However, gal 1 expression has never been studied in pancreatic cancer cell lines. In order to obtain information about gal 1 expression in pancreatic cancer, we analyzed a broad panel of human ductal pancreatic cell lines with different tumorigenic and differentiation properties: HPDE is a papilloma virus-immortalized non tumorigenic cell line, SK-PC-1, SK-PC-3, PANC-1 and BxPC-3 are derived from primary pancreatic tumors, and Hs766t and RWP-1 were obtained from cancer pancreas metastasis (lymph node and liver respectively). Figure 1, panel A, shows gal 1 immunodetection performed by WB analysis. Four of the pancreatic cell lines tested were clearly positive for gal 1 (SK-PC-1, HPDE, PANC-1 and Hs766t), two expressed low levels (BxPC-3, SK-PC-3) and one was clearly negative (RWP-1). As previous data had reported gal 1 expression restricted to the tumoral stroma, we also analyzed gal 1 expression in a fibroblast cell line (F88,2). As shown in Figure 1, F88,2 cells also express gal 1 although at lower levels in comparison with many of the pancreatic cell lines. We also analyzed gal 3 expression pattern in these cell lines, as gal 3 has been described to be overexpressed in tumoral cells of pancreatic cancer. tPA levels of the different cell lines were also analyzed in the same experiments although no clear correlation between gal 1, gal 3 and tPA expression levels was found.

We also analyzed tPA and gal 1 interaction in cell lysates from two of the pancreatic tumor cell lines (PANC-1 and SK-PC-1) and from the F88,2 fibroblast cell line. Affinity capture (pull-down) experiments using tPA-Sepharose on total cell lysates were

performed. Figure 1, panel B, shows that gal 1 from both pancreatic cells and fibroblast interacts with tPA in a similar way, suggesting the possibility of a cross-communication between tumor cells and the surrounding desmoplasia through gal 1/tPA interaction.

Gal 1 and tPA interaction is direct and displays a high affinity constant.

The above results and those from our previous work [33] strongly suggested that gal 1 and tPA were interacting, but it was not clear whether this interaction was direct or through other proteins. To clarify this point, we performed a pull-down experiment where recombinant gal 1 was incubated with tPA-Sepharose beads. Parallel runs were carried out with recombinant gal 3 and AnxA2, the former to verify whether tPA had a promiscuous interaction with other galectins, the latter as positive control with a protein known to interact with tPA. A BSA-Sepharose pull-down was also done to discard unspecific binding. Proteins in both bound and unbound fractions of the pull-down experiments were detected by WB (Figure 2, panel A). Gal 1 was positively identified in the bound fraction of the tPA-Sepharose pull down but was practically undetectable in the unbound fraction, indicating total gal 1 depletion from the lysate. AnxA2 was similarly detected in the tPA-bound fraction but not so strongly depleted as gal 1. Neither protein was present in the bound fraction of the BSA-Sepharose. For its part, gal 3 also interacted directly with tPA though with some unspecific binding to BSA-Sepharose. These results confirmed that gal 1 interacted directly with tPA with similar intensity than AnxA2.

In order to quantify the affinity of gal 1 for tPA and to compare it with that of the well known tPA receptor AnxA2, we determined the affinity constant of the interaction by surface plasmon resonance (SPR). tPA was covalently immobilized on a CM5 sensor chip and the association and dissociation of gal 1 was monitored at seven concentrations in the 15 nM-4 μ M range. The interaction of AnxA2 (30 nM-4 μ M range, nine points) and gal 3 (450 nM-9 μ M range, seven points) was studied in parallel on the same surface. SPR intensity correlates with mass changes on the sensor surface due to ligand interaction. In the sensorgrams (Figure 2, panel B, left), the time frame includes an association phase while ligand is injected (0 to 180 s) followed by a dissociation phase where running buffer is flushed over the surface (180 to 500 s). The sensorgrams for all three proteins (gal 1, AnxA2, gal 3) are indicative of a specific interaction with tPA concentration dependence; however, signal intensity for gal 3 is considerably lower than for gal 1 despite the higher concentration and MW of gal 3, clearly implying a weaker interaction of this galectin with tPA.

As the experimental data could not be fitted to a simple kinetic model, the K_D thermodynamic dissociation constant was determined by the steady state model, which assumes an equilibrium at the end of the association phase and derives K_D from the response signal at equilibrium vs. concentration plot (Figure 2, panel B, right, and Table 1). Quality of the adjustment is given by the χ^2 parameter on Table 1. For both gal 1 and AnxA2, a proper fitting to a steady state model was obtained, with K_D values of similar magnitude. The high χ^2 value for gal 3 (Table 1) indicates a poor fit of the model, suggesting that gal 3 has not reached equilibrium at the end of the injection cycle, in agreement with a smaller K_D and a weaker interaction with tPA. Again, this result is in agreement with the hypothesis of gal 1 as a tPA receptor.

Immunofluorescence detection of gal 1 and colocalization with tPA in the migrating front.

tPA is known to be expressed mainly at the migration front of pancreatic tumoral cells where it triggers the degradation of ECM through plasmin activation. As gal 1 seems to interact strongly with tPA, it was interesting to determine whether its localization correlated with that of tPA. To this end, a wound healing experiment over coverslips of three pancreatic cell lines (PANC-1, SK-PC-1 and HPDE) and the fibroblast-derived cell line F88,2 was performed. An immunofluorescence assay clearly detected gal 1 expression in the migration front of all cell lines (Figure 3, panel A, arrows). In contrast, gal 1 was barely visible in non-migrating confluent cells (Figure 3, panel A). Co-localization of tPA and gal 1 after wound healing was also investigated by double immunofluorescence. For this study only SK-PC-1 and HPDE cells were used, as only those express endogenous tPA. Figure 4, panel B, shows a clear localization of tPA at the migration front, with a distribution very similar to that of gal 1. Co-localization of both proteins was further proven by confocal microscopy (Figure 3, panel B, c, f), where the fluorochrome signals clearly overlap. This co-distribution of tPA and gal 1 suggests that the latter could be acting as tPA receptor during cell migration.

Gal 1 mediates tPA-induced Erk1/2 activation and cell proliferation in pancreatic and fibroblast cells.

Data from our laboratory indicate that tPA exerts mitogenic effects and that this signal is triggered by the activation of the MAP kinase Erk1/2 pathway (Ortiz-Zapater E. et al., manuscript in preparation). In order to analyze whether gal 1 could be involved in tPA-induced Erk1/2 activation, we decided to inhibit gal 1 by different strategies and examine the effects. Thus, on the one hand, we studied Erk1/2 activation after tPA treatment in HPDE cells either constitutively expressing gal 1 or with its expression down-regulated by small interference RNA (siRNA). Figure 4, panel A, shows that tPA exposure induces Erk1/2 activation at 2-5 min after treatment of cells transfected with an irrelevant siControl RNA. In contrast, cells transfected with si-gal 1 RNA showed a general reduction of Erk1/2 phosphorylation. WB analysis with α -gal 1 confirmed gal 1 down-regulation. On the other hand, tPA-induced Erk1/2 activation was tested in MEFs derived from either wild type or gal 1^{-/-} knock out mice (Figure 4, panel B). WB analysis of gal 1 levels showed low but detectable gal 1 levels in wild type MEFs and total lack of gal 1 in gal 1^{-/-} MEFs, as expected. Then, after 2-5 min of tPA treatment, an increase in Erk1/2 phosphorylation was found in wild type MEFs, in contrast with no Erk1/2 activation in gal 1^{-/-} MEFs, again indicating that gal 1 mediates tPA activation of Erk1/2.

Finally, the effect of si-gal 1 RNA on the induction of cellular proliferation by tPA on HPDE and F88,2 was also examined. In this experiment, cells were treated with two different tPA concentrations (2 and 10 μ g/mL) in the presence of thymidine [Me^3H] (1 μ Ci/well) for 24 h. Figure 5 shows a tPA dose-dependent, clear increase in proliferation for native, gal 1-expressing cells while cells transfected with si-gal 1 RNA show remarkably reduced proliferation.

Taken together, these results indicate that gal 1 mediates tPA-induced Erk1/2 activation and cellular proliferation, both in pancreatic and fibroblastic cells, and also suggest that gal 1 is implicated in other more general mechanisms of proliferation.

DISCUSSION

Pancreatic cancer is the fifth leading cause of cancer death in developed countries. Despite substantial advances in the understanding of its molecular basis, there is still no effective strategy for the diagnosis and treatment of this devastating disease. Identification of new molecular targets is an urgent need for the improvement of the pancreatic cancer therapy. In previous reports, our group identified tPA overexpression in the majority of the pancreatic adenocarcinomas (the most common type of human pancreatic cancer) [26,27] where it had a relevant role in tumor progression inducing cell proliferation, tumor invasion and angiogenesis [27]. We have recently proposed gal 1 as a putative tPA receptor [33]. In the present work, we provide evidence that gal 1 interacts directly and with high affinity with tPA and mediates tPA functions in pancreatic cancer. We also describe gal 1 as a tPA functional receptor in fibroblastic cells, thereby proposing a role for the tPA/gal 1 interaction in the communication between pancreatic epithelial tumoral cells and the surrounding stroma.

Expression of gal 1 in pancreatic cancer has been already described, although at a merely descriptive level and without providing insight on the molecular role of galectins in tumor formation or progression. Gal 1 overexpression in pancreatic tumors has been detected by gene expression microarrays [14,16] and proteomic analysis of tissue samples [13]. Immunohistochemical studies, on the other hand, show gal 1 strongly expressed in the stroma surrounding the cancer mass but absent from tumoral cells [12,13], suggesting that the presence of gal 1 in pancreatic tumor cells found by other methods might result from sample contamination with fibroblasts from the tumoral desmoplasia. Our study shows gal 1 as moderately-to-strongly expressed in five out of seven pancreatic cell lines analyzed, in addition to a fibroblastic cell line. A conflict thus appears to exist between our data and the above immunohistochemical reports on pancreatic cancer tissue. One must note, however, that in our immunofluorescence studies gal 1 expression is mainly detected at the migration front of cell lines, being almost undetectable in confluent cell monolayers. One may therefore reinterpret the results of Shen and Berberat [12,13] in a different light, by admitting that gal 1 expression is indeed positive in tumoral tissue though restricted to the invasion border. We would further submit that, in the above-mentioned works, the intense expression of gal 1 by fibroblasts may have masked the weaker gal 1 expression on tumor cell borders, thereby leading to a misinterpretation of the results.

Regarding the role of gal 1 as tPA mediator, our study provides clear evidence of gal 1 implication in tPA mitogenic signalling, by showing that inhibition of gal 1 expression by siRNA in pancreatic cell lines markedly decreases tPA-induced Erk1/2 activation and cellular proliferation. These data are fully consistent with gal 1 acting as a functional receptor for tPA in pancreas. Characterization of both upstream and downstream elements in the tPA-induced Erk1/2 activation mediated by gal 1 requires further studies. Interestingly, it has been shown that gal 1 regulates *ras* membrane anchorage and cell transformation [3,43], suggesting that this oncogene might be an intermediate effector in the activation of Erk1/2 by tPA via gal 1 interaction.

Abolishment of tPA effects on Erk1/2 activation and mitogenesis were also observed after gal 1 silencing in the fibroblastic cell line F88,2, indicating that gal 1 is also a tPA receptor in this system. This was further demonstrated using MEFs from wild type and gal 1^{-/-} mice. Pancreatic cancer is characterized by the presence of extensive stroma. Recent studies have shown that the interaction between tumor cells, the surrounding tissue and extracellular matrix proteins directs gene expression and determines

whether cancer is contained or spread [44]. Stroma is also believed to contribute to aberrant epithelial-mesenchymal interactions, which are partially accountable for acquired drug resistance during cancer treatment [45]. Therefore, the identification of gal 1 as a tPA receptor in both epithelial and fibroblastic cells provides a molecular basis for the cross-talk between these two cell types: tPA secreted by pancreatic cancer cells would act in a dual –auto- and paracrine- fashion, stimulating, via gal 1 interaction, proliferation and activation of both epithelial and fibroblastic tumor cells.

This work is the first characterization of gal 1 as a tPA functional receptor and for the first time proposes a role for this interaction in the progression of pancreatic cancer and associated dysplasia. Further work is required to analyze this interaction in more detail. For example, the co-localization of both tPA and gal 1 at the cell line migration front, where tPA plays a crucial role in ECM degradation, hints at the possibility of gal 1 implication in the catalytic activity of tPA. Finally, in addition to proposing a new molecular mechanism for tPA function, the present work highlights gal 1 as a relevant player in pancreatic cancer and thus a potential target in the design of novel therapies against this deadly disease.

BIBLIOGRAPHY

1. Scott K, Weinberg C: **Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation.** *Glycoconj J* 2004, **19**: 467-477.
2. Danguy A, Camby I, Kiss R: **Galectins and cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1572**: 285-293.
3. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y: **Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation.** *Oncogene* 2001, **20**: 7486-7493.
4. van den BF, Califice S, Castronovo V: **Expression of galectins in cancer: a critical review.** *Glycoconj J* 2004, **19**: 537-542.
5. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG: **Apoptosis of T cells mediated by galectin-1.** *Nature* 1995, **378**: 736-739.
6. Lotan R, Belloni PN, Tressler RJ, Lotan D, Xu XC, Nicolson GL: **Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion.** *Glycoconj J* 1994, **11**: 462-468.
7. Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS: **Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon.** *Cancer* 1995, **75**: 2818-2826.
8. Gillenwater A, Xu XC, Estrov Y, Sacks PG, Lotan D, Lotan R: **Modulation of galectin-1 content in human head and neck squamous carcinoma cells by sodium butyrate.** *Int J Cancer* 1998, **75**: 217-224.

9. Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den BF, Liu FT *et al.*: **Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression.** *Gastroenterology* 1997, **113**: 1906-1915.
10. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT: **Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma.** *Int J Cancer* 1999, **81**: 519-526.
11. Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz A: **Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system.** *Cancer* 1997, **80**: 776-787.
12. Berberat PO, Friess H, Wang L, Zhu Z, Bley T, Frigeri L *et al.*: **Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer.** *J Histochem Cytochem* 2001, **49**: 539-549.
13. Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D: **Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Cancer Res* 2004, **64**: 9018-9026.
14. Jacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K *et al.*: **Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies.** *Cancer Res* 2003, **63**: 8614-8622.
15. Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D: **Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Cancer Res* 2004, **64**: 9018-9026.
16. Grutzmann R, Pilarsky C, Ammerpohl O, Luttges J, Bohme A, Sipos B *et al.*: **Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays.** *Neoplasia* 2004, **6**: 611-622.
17. Kinder DH, Berger MS, Mueller BA, Silber JR: **Urokinase plasminogen activator is elevated in human astrocytic gliomas relative to normal adjacent brain.** *Oncol Res* 1993, **5**: 409-414.
18. Lindgren M, Johansson M, Sandstrom J, Jonsson Y, Bergenheim AT, Henriksson R: **VEGF and tPA co-expressed in malignant glioma.** *Acta Oncol* 1997, **36**: 615-618.
19. Sandstrom M, Johansson M, Sandstrom J, Bergenheim AT, Henriksson R: **Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression.** *Int J Dev Neurosci* 1999, **17**: 473-481.
20. Wilson EL, Jacobs P, Dowdle EB: **The secretion of plasminogen activators by human myeloid leukemic cells in vitro.** *Blood* 1983, **61**: 568-574.

21. Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA: **Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia.** *N Engl J Med* 1999, **340**: 994-1004.
22. Reiter LS, Spertini O, Kruithof EK: **Plasminogen activators play an essential role in extracellular-matrix invasion by lymphoblastic T cells.** *Int J Cancer* 1997, **70**: 461-466.
23. Wada H, Kumeda Y, Ogasawara Z, Minamikawa K, Wakita Y, Nakase T *et al.*: **Stimulation of tissue type plasminogen activator by leukaemic cell homogenates.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993, **4**: 591-597.
24. Saito K, Nagashima M, Iwata M, Hamada H, Sumiyoshi K, Takada Y *et al.*: **The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissues of patients with ovarian and uterine tumors.** *Thromb Res* 1990, **58**: 355-366.
25. De PG, Taviani D, Copeta A, Portolani N, Giulini SM, Barlati S: **Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 1998, **58**: 2234-2239.
26. Paciucci R, Tora M, Diaz VM, Real FX: **The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro.** *Oncogene* 1998, **16**: 625-633.
27. Aguilar S, Corominas JM, Malats N, Dufresne M, Real FX, Navarro P: **Tissue plasminogen activator in murine exocrine pancreas cancer: selective expression in ductal tumors and contribution to cancer progression.** *Am J Pathol* 2003.
28. Diaz VM, Planaguma J, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R: **Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells.** *Gastroenterology* 2002, **122**: 806-819.
29. Medina M.G., Ledesma M.D., Dominguez J.E., Medina M., Zafra D., Alameda F. *et al.*: **Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation.** *EMBO J* 2005.
30. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y: **Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression.** *J Biol Chem* 2005.
31. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET *et al.*: **The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling.** *Nat Med* 2001, **7**: 59-64.
32. Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R: **Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro.** *Gut* 2004, **53**: 993-1000.

33. Roda O, Chiva C, Espuna G, Gabius HJ, Real FX, Navarro P *et al.*: **A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells.** *Proteomics* 2006, **6**: S36-S41.
34. Kopitz J, von RC, Burchert M, Cantz M, Gabius HJ: **Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 11205-11211.
35. Hajjar KA, Guevara CA, Lev E, Dowling K, Chacko J: **Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 21652-21659.
36. Hirabayashi J, Ayaki H, Soma G, Kasai K: **Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human 14 kDa beta-galactoside-binding lectin.** *Biochim Biophys Acta* 1989, **1008**: 85-91.
37. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G: **Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas.** *Int J Cancer* 1975, **15**: 741-747.
38. Vila MR, Lloreta J, Schussler MH, Berrozpe G, Welt S, Real FX: **New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation.** *Lab Invest* 1995, **72**: 395-404.
39. Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C *et al.*: **Characterization of a new primary human pancreatic tumor line.** *Cancer Invest* 1986, **4**: 15-23.
40. Schmidt M, Deschner EE, Thaler HT, Clements L, Good RA: **Gastrointestinal cancer studies in the human to nude mouse heterotransplant system.** *Gastroenterology* 1977, **72**: 829-837.
41. Dexter DL, Matook GM, Meitner PA, Bogaars HA, Jolly GA, Turner MD *et al.*: **Establishment and characterization of two human pancreatic cancer cell lines tumorigenic in athymic mice.** *Cancer Res* 1982, **42**: 2705-2714.
42. Poirier F, Robertson EJ: **Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin.** *Development* 1993, **119**: 1229-1236.
43. Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ, Kloog Y: **Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 37169-37175.
44. Hede K: **Environmental protection: studies highlight importance of tumor microenvironment.** *J Natl Cancer Inst* 2004, **96**: 1120-1121.
45. Sausville EA: **The challenge of pathway and environment-mediated drug resistance.** *Cancer Metastasis Rev* 2001, **20**: 117-122.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1. **Gal 1 protein levels in pancreatic cancer cell lines and fibroblasts.** Panel A, Immunodetection with α -gal 1, α -gal 3 and α -tPA antibody was performed using seven pancreatic cell lines (PANC-1, SK-PC-1, Hs766t, HPDE, SK-PC-3, BxPC-3 and RWP-1) and a fibroblast cell line (F88,2). 20 μ g of total protein was loaded in each lane and incubated with rabbit α -gal 1, α -gal 3 or mouse α -tPA antibodies. Equal protein loading was confirmed by α -tubulin blotting. Panel B, 1 mg of total protein lysate of PANC-1, SK-PC-1 and F88,2 cell lines was incubated with 10 μ L of tPA- or BSA-sepharose beads as described in Materials and Methods. Gal 1 was immunodetected by WB in the bound (B), unbound (U) and total lysate (L) fractions.

Figure 2. **In vitro confirmation of direct interaction of gal 1 with tPA and Biacore analysis.** **Panel A:** 5 μ g of recombinant protein (gal 1, AnxA2 and gal 3) was incubated for 2 h at 4°C in 500 μ L of PBS with 5 μ L of hydrated beads with either tPA or BSA-sepharose. After three washes with cold PBS samples were eluted with laemmly buffer for 5 min at 100°C. Proteins were detected by WB in the bound (B) and unbound (U) fractions. **Panel B:** Gal 1, AnxA2 and gal 3 sensorgrams and hyperbole fit. Differential surface plasmon resonance experiments over flow cells coated with either tPA or BSA were performed for a range of concentrations of gal 1, AnxA2 and gal 3. Sensorgrams (left panel) show normalized response (RU) of tPA-BSA lanes over time (s) starting and ending injection spikes of sensorgrams were eliminated to clarify the graph. Each table shows concentration and signal just before dissociation. Right panel shows plots of maximum signal versus concentration and the regression to a hyperbole (red line) following the Steady State model.

Figure 3. **Immunofluorescence localization of gal 1 and tPA.** PANC-1, SK-PC-1, HPDE and F88,2 were grown on coverslips to confluence. Cell monolayers were scratched with a micropipette tip as described in Materials and Methods and allow to migrate for different time (PANC-1, 48h; SK-PC-1, 24 h and F88,2 and HPDE, 16 h). Gal 1 staining was performed *in vivo* whereas tPA staining was done after methanol fixation. Secondary antibodies were coupled with FITC for gal 1 and TRITC for tPA. **Panel A:** Gal 1 localization in the different cell lines (a, b, c, d), focusing on the migration front (e, f, g, h). **Panel B:** gal 1 (green, i, l) and tPA (red, j, m) localization in the migration front of SK-PC-1 (i, j, k) and HPDE (l, m, n) cells. Overlay of both gal 1 and tPA signal (in yellow, k, n) is shown in the merge panels. Bar 50 μ m for images a to d. Bar 10 μ m for images e to n.

Figure 4. **ERK 1/2 phosphorylation induced by tPA after inhibition of gal 1 expression.** **Panel A:** HPDE transfected with irrelevant siControl RNA (*siControl Non-targeting siRNA pool*[®]) or siGal 1 RNA (*siRNA SMARTpool*[®] against gal 1) were treated with 10 μ g/mL tPA for 2, 5, 10 and 20 min to induce Erk1/2 activation. As positive control, cells were treated with 40 ng/mL BPE and 10⁻³ ng/mL EGF for 2-5 min. Basal levels were set for cells grown in medium without growth supplements. Activation of Erk1/2 pathway was measured by WB using an antibody specific for phosphorylated-Erk1/2. The loaded amount of protein was valued using total Erk1/2 levels. Reduction of gal 1 levels after siRNA treatments were analyzed by WB analysis. Right panel shows quantification of the stimulation of Erk1/2 by tPA. Immunoreactivity to antibody against phosphorylated Erk1/2 was quantified by densitometry and normalized with respect to the values corresponding to antibody against total Erk1/2 (black=siControl, grey=si-gal 1 RNA). **Panel B:** Activation of Erk1/2 was measured by WB analysis in MEFs derived from wild type and gal 1^{-/-} mice, after 2, 5, 10 and 20 min of tPA treatment. Cells stimulated with 1% FBS or non-treated were used as positive or negative controls respectively. Total Erk1/2 levels were shown for protein normalization. Right panel shows quantification of the stimulation of Erk1/2 by tPA. Immunoreactivity to antibody against phosphorylated Erk1/2 was quantified by densitometry and normalized with respect to the values corresponding to antibody against total Erk1/2 (black=wt, grey=gal 1^{-/-}). Absence of gal 1 in MEFs gal 1^{-/-} was confirmed by WB.

Figure 5. **Gal 1 expression inhibition by siRNA reduces tPA-induced cellular proliferation in pancreatic and fibroblastic cells.** HPDE and F88,2 HPDE both transfected with irrelevant siControl RNA (*siControl Non-targeting siRNA pool*[®]) or siGal 1 RNA (*siRNA SMARTpool*[®] against gal 1) were treated with 2 or 10 μ g/mL of tPA in presence of Thymidine [³H] for 24 h as described in Materials and Methods. Cells were treated with 40 ng/mL BPE and 10⁻³ ng/mL (HPDE) or 1% FBS (F88,2) for positive control.

Basal levels were set for cells grown in medium without growth supplements. Thymidine [Me^3H] acquisition was counted as a measure of cell proliferation. Values were normalized with basal levels and set as percentage with value 100 corresponding to positive control of cells treated with siControl RNA. Values are means \pm SD of replicates (n=6 for F88,2, n=3 for HPDE) (black=si Control, grey=si-gal 1 RNA).

TABLES

Table 1. **Hyperbolic fit of SPR data for the interaction of gal 1, gal 3 and AnxA2 with tPA.** Maximum signal vs concentration graph was fitted to a hyperbolic regression with the equation $y=ax/(1+bx)$ following the Steady State model. Quality of the fit was determined by χ^2 , assessing a good correlation of the model in the case of gal 1 and AnxA2. For gal 3 χ^2 value indicates a poor correlation. B value corresponds to K_D of the ligand/tPA interaction. R^2 indicates the goodness of the B value in the regression.

	gal 1	AnxA2	gal 3
A=	414.9 ± 47.2	41.7 ± 7.02	9454.8 ± 24431
B=	9.1x10 ⁻⁶ ± 1.3x10 ⁻⁶	2.3x10 ⁻⁶ ± 8x10 ⁻⁷	1.7x10 ⁻⁴ ± 4.5x10 ⁻⁴
χ^2=	1.8	3.5	486.8
r^2=	0.993	0.933	0.998

Figure 1

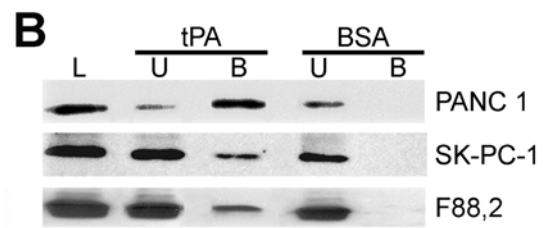
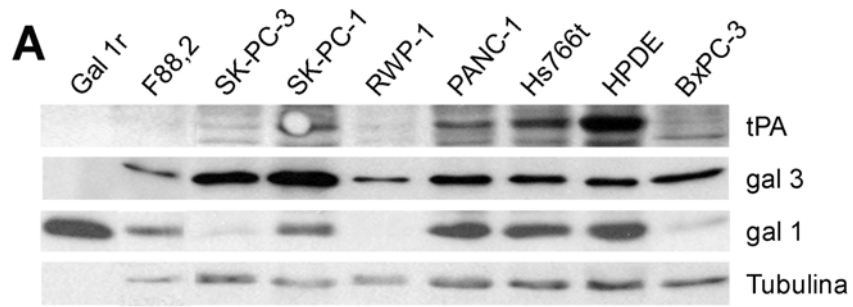
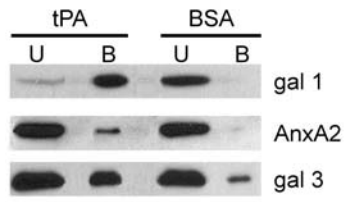


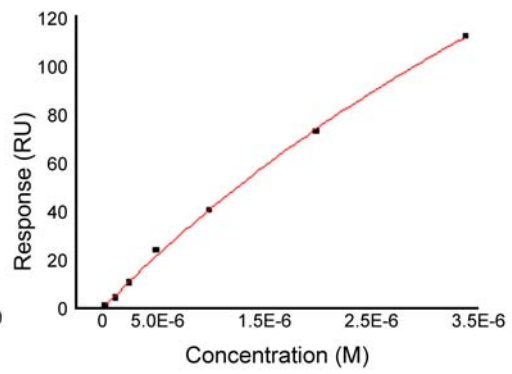
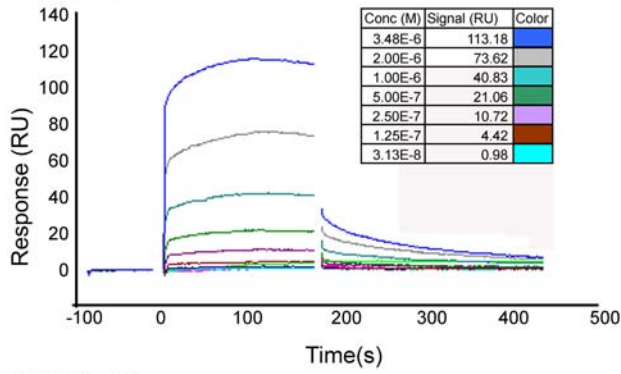
Figure 2

A

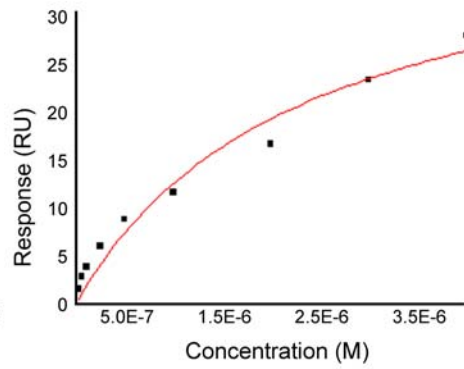
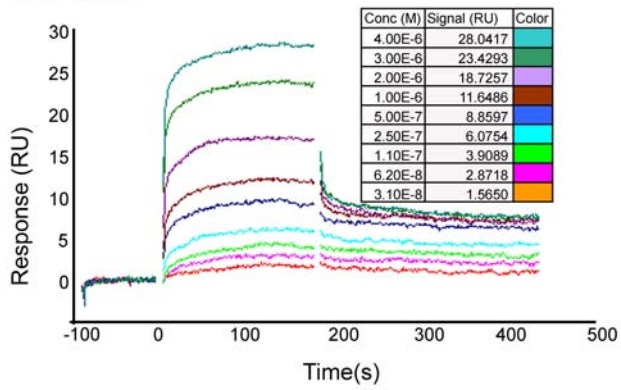


B

Galectin 1



Annexin A2



Galectin 3

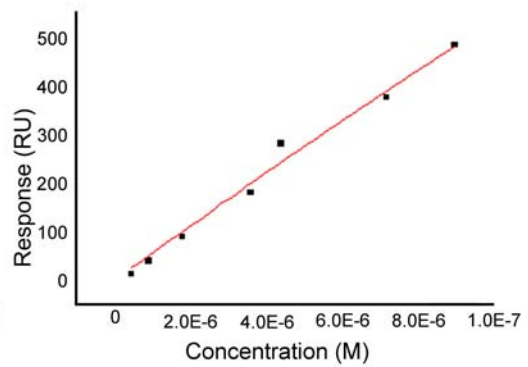
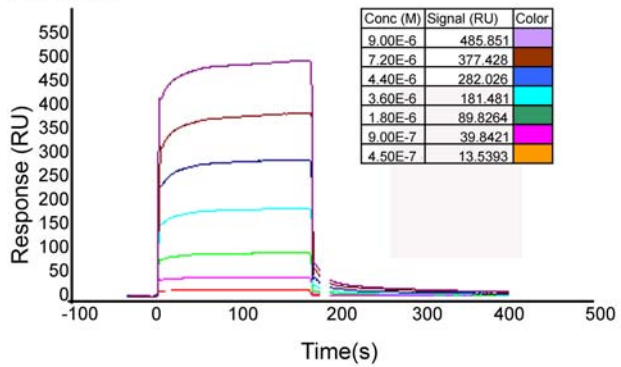
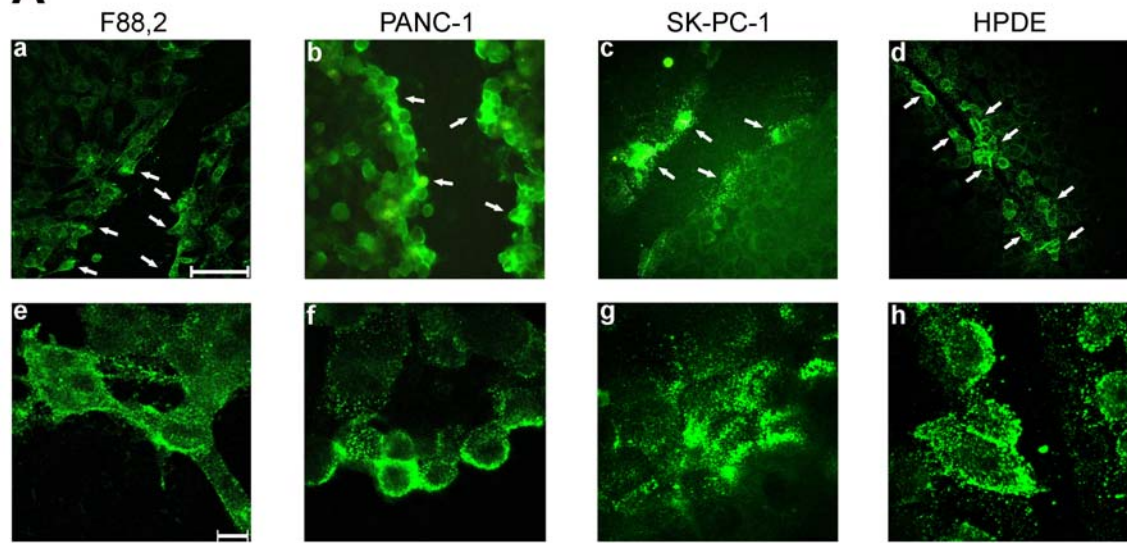


Figure 3

A



B

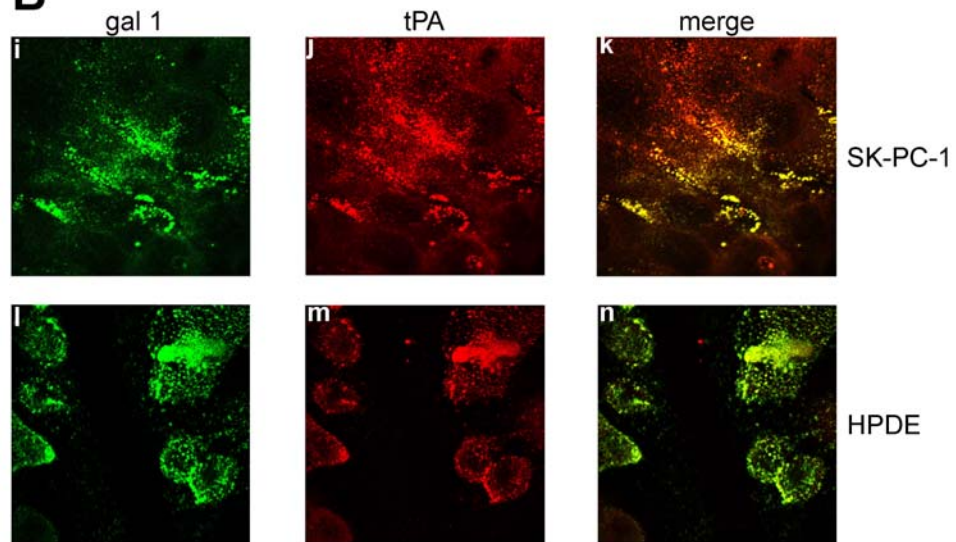
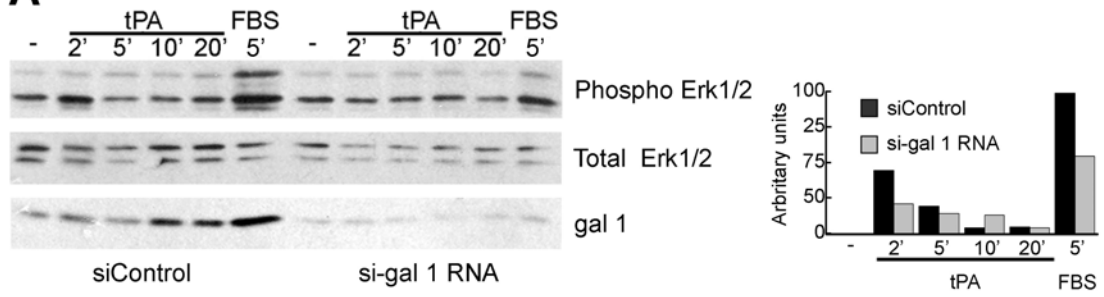


Figure 4

A



B

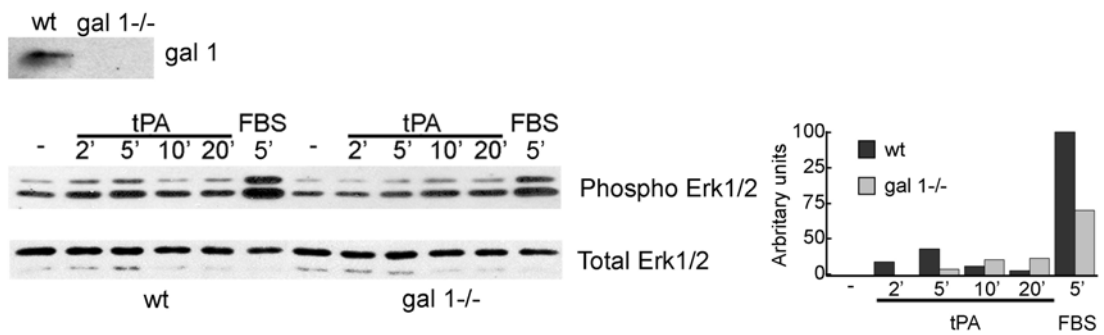
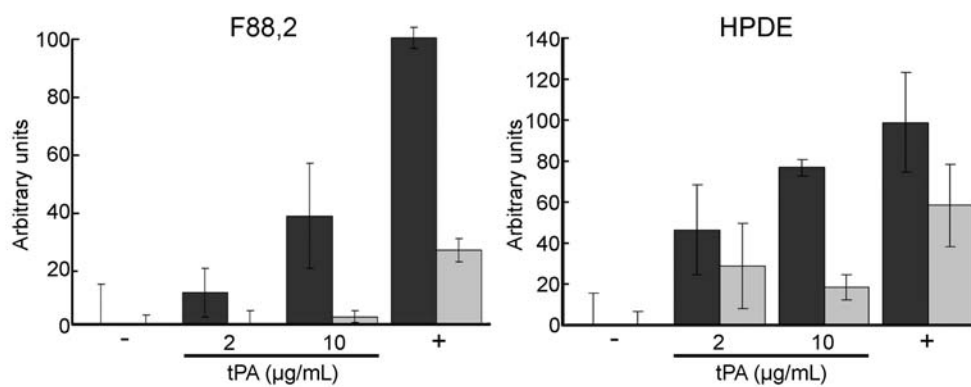


Figure 5



INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

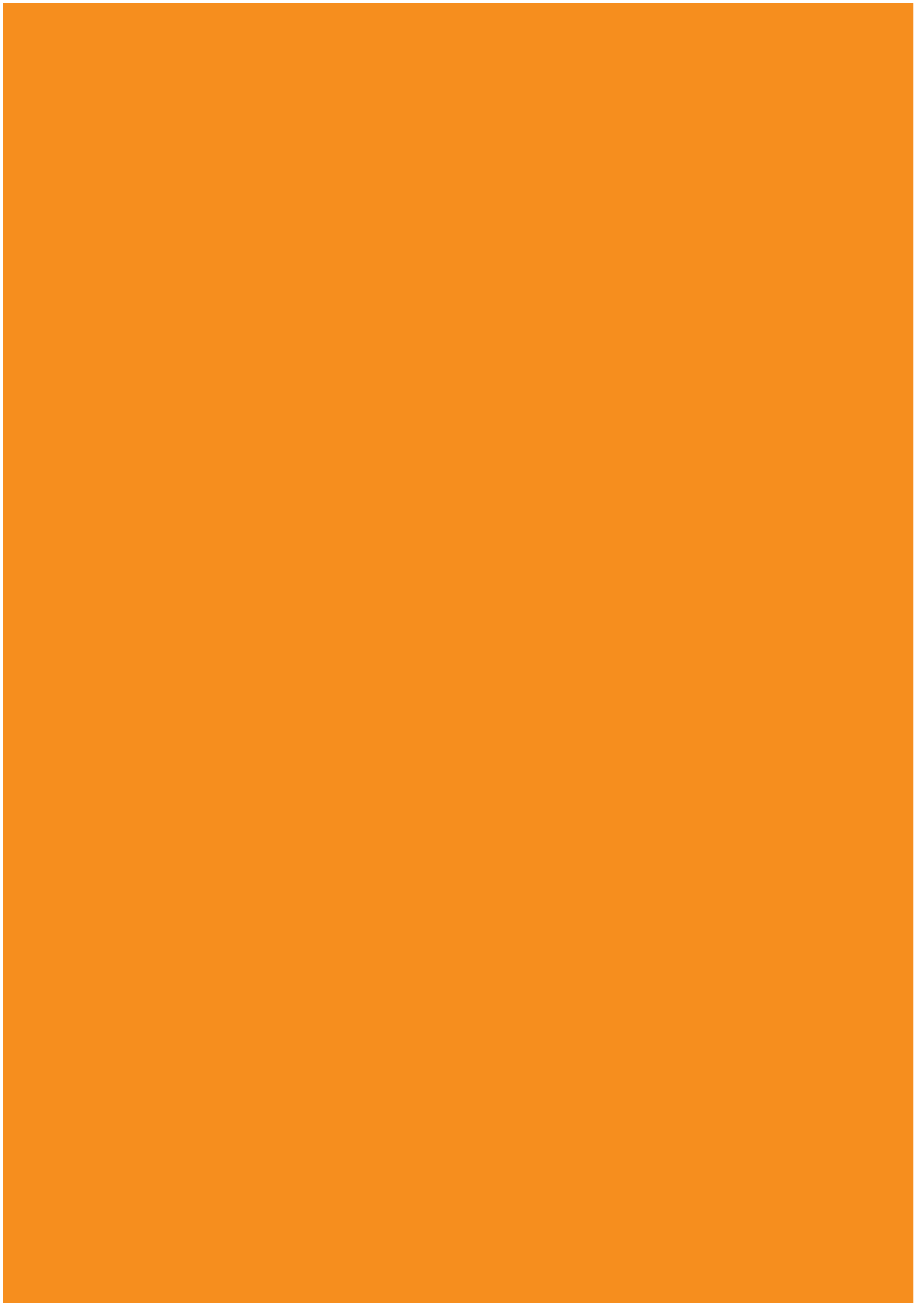
RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

MATERIALS I MÈTODES

BIBLIOGRAFIA



El càncer de pàncrees és la cinquena causa de mort per càncer en els països desenvolupats. La agressivitat d'aquest tumor és tant alta que la taxa de supervivència als cinc anys és inferior al 2% [306]. Avanços en el coneixement molecular d'aquesta patologia poden aportar nous enfocaments terapèutics que millorin aquesta mala prognosi.

Estudis anteriors fets per el nostre grup havien permès la identificació de la sobreexpressió del tPA en tumors pancreàtics respecte el teixit normal. Posteriorment altres estudis *in vitro* i *in vivo* van permetre demostrar l'important paper que juga aquesta proteasa en migració, invasió, proliferació cel·lular i angiogènesi. És confirmava, així, la seva participació en progressió tumoral.

Tant mateix, existeixen moltes evidències que relacionen l'activitat del tPA amb els seus receptors cel·lulars. Aquests poden actuar tant augmentant i localitzant la seva activitat proteolítica [182,202], com en altres funcions independents d'aquesta [165,307]. La present tesi s'ha plantejat amb els objectius de caracteritzar els receptors del tPA en el sistema de càncer de pàncrees així com estudiar la seva implicació en les funcions del tPA en aquesta patologia.

New insights into tPA/AnxA2 interaction (Roda et al. JBC vol 278 pp. 5702–5709, 2003)

Inicialment vam centrar l'estudi en el receptor del tPA més ben caracteritzat en cèl·lules endotelials: l'AnxA2, ja que en el nostre laboratori s'havia provat la sobreexpressió d'aquesta proteïna en els tumors pancreàtics.

En la literatura s'havia descrit que la regió d'interacció de l'AnxA2 amb el tPA es situa en l'extrem N-terminal i més concretament en els residus 7 i 12 amb seqüència LCKLSL [206]. Aquesta afirmació es basava en part en experiments que demostraven l'efecte inhibitori en l'interacció tPA/AnxA2 d'un seguit de pèptids creats a partir de diferents fragments de la regió N-terminal de l'AnxA2. També s'havia descrit que HCy era capaç de bloquejar l'interacció tPA/AnxA2 al formar un pont disulfur amb la Cys⁸ suggerint, doncs, un rol important d'aquest residu en la interacció.

A partir d'aquesta informació vam dissenyar una llibreria peptídica basada en la seqüència consens LCKLSL, amb diferents modificacions que ens permetessin identificar els residus essencials per a mantenir la seva activitat inhibidora de cara a caracteritzar millor la interacció tPA/AnxA2 i, eventualment, identificar les possibles aplicacions terapèutiques d'aquests pèptids com a inhibidors de l'activitat del tPA en el càncer de pàncrees. L'activitat dels pèptids es va testar mitjançant un assaig ELISA competitiu per tal de determinar la seva capacitat inhibidora (veure resultats, capítol 1).

Els nostres resultats, però, van demostrar que qualsevol pèptid que contingués una Cys, independentment de la seva posició i de la resta de residus, era capaç d'inhibir la interacció entre les dues proteïnes. De fet, tant la seqüència consens LCKLSL com l'enantiòmer "lcklsl" i el retroenantiòmer "lslkcl" tenien uns efectes inhibitoris pràcticament iguals, indicant uns requeriments independents de l'estructura secundària del pèptid. Aquest mateix experiment es va realitzar també sobre unes cèl·lules HUVEC que expressen el tPA, on vam comprovar que el comportament dels pèptids es reproduïa en una situació més *in vivo*.

Aquests resultats semblaven indicar que el mecanisme d'inhibició de la interacció tPA/AnxA2 dels pèptids no era via competició amb l'AnxA2 pel lloc d'unió del tPA si no amb un mecanisme semblant al de HCy mitjançant la formació d'un pont disulfur sobre

la Cys⁸ de l'AnxA2. Aquesta hipòtesi es va confirmar per espectrometria de masses on en l'espectre corresponent a l'AnxA2, després de ser incubada amb el pèptid LCKLS, s'observà un augment de massa equivalent al pes del pèptid. La seqüenciació dels pèptids tríptics d'aquesta AnxA2 va acabar de confirmar que el pont disulfur format era sobre la Cys⁸ (veure resultats, capítol 1, resultats addicionals).

Els resultats obtinguts qüestionen la correcta assignació de la seqüència LCKLSL com a única regió de l'AnxA2 d'interacció amb el tPA. És evident que aquesta regió, i en concret la Cys⁸, hi està implicada, però no es poden descartar altres factors estructurals que hi contribueixin. Cal tenir en compte que la forma predominant de l'AnxA2 en membrana és l'AnxA2t formada per dues unitats de l'AnxA2m i dues de la p11. S'ha demostrat que aquesta forma és molt més bona activadora de la capacitat catalítica del tPA que no pas l'AnxA2m [203]. Curiosament, però, la unió entre l'AnxA2m i la p11 es produeix a través de l'extrem N-terminal d'on correspon la seqüència LCKLSL. Cal afegir que la zona d'interacció d'unió de la p11 a l'AnxA2m té certa homologia de seqüència amb la zona d'unió del tPA a l'AnxA2 (domini dit) [308]. Això podria portar a pensar en una competició entre la p11 i el tPA per la unió a l'AnxA2. Aquesta hipòtesi, però, no explica el fet que l'AnxA2t sigui més afí al tPA que no pas l'AnxA2m. Sembla, doncs, que la interacció entre el tPA i l'AnxA2 és més complexa del que s'havia cregut fins ara.

Finalment cal tenir present que un tPA mutant, que li manca el domini-dit, és encara capaç d'unir-se a cèl·lules endotelials, tot i que en menor proporció que el tPA natiu [309]. Aquest fet es podria explicar si en la interacció tPA/AnxA2 hi intervinguessin altres dominis estructurals del tPA, però també podria indicar l'existència d'altres receptors del tPA funcionals a part de l'AnxA2.

Aquesta segona possibilitat apareix en la literatura on s'ha proposat que l'AnxA2 només pot explicar el 50% del tPA unit a les cèl·lules tumorals pancreàtiques [217]. Això implica que existien altres receptors del tPA que podien ser de gran importància per explicar tant la unió del tPA a la membrana cel·lular com la seva activitat pro-invasiva en aquest tumor. Tenint en compte que l'AnxA2 és el principal receptor del tPA en endoteli i responsable de l'eficiència de la seva activitat fibrinolítica, qualsevol alteració d'aquesta interacció a nivell terapèutic portaria associats un seguit de problemes col·laterals sobre la homeòstasi de la coagulació sanguínia. Per aquest motiu ens vam proposar identificar altres receptors del tPA que poguessin ser més específics del pàncrees.

A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells (Roda et al. *Proteomics* vol 6 pp. S36–S41, 2006)

De cara a identificar nous receptors pancreàtics del tPA vam desenvolupar una metodologia basada en la precipitació de proteïnes afins al tPA utilitzant una resina on hi havíem unit covalentment el tPA recombinant (sefarosa-tPA).

Per obtenir el lisats proteics es va escollir la línia cel·lular PANC-1 originària d'un adenocarcinoma ductal de pàncrees que es caracteritzava per no tenir tPA endogen que pogués competir amb la sefarosa-tPA. La mostra es va preparar de dues maneres diferents. D'una banda utilitzant un lisat cel·lular total i per altra purificant la fracció corresponent als rafts de la membrana. En aquesta fracció es concentren gran part dels receptors de membrana que possibiliten la senyalització cel·lular i és on s'ha localitzat l'AnxA2. Per aquesta raó vam creure adequat buscar-hi altres receptors del tPA.

Degut a que la sefarosa-tPA alliberava part de la proteïna tPA unida en el procés d'elució de la mostra, va caldre portar un control amb una mostra de la sefarosa-tPA incubada només amb tampó de lisi per tal de discriminar les bandes corresponents al tPA d'aquelles corresponents a les proteïnes enganxades al tPA. Una resina unida a BSA (sefarosa-BSA) es va utilitzar de control per detectar proteïnes unides inespecíficament a la resina.

La separació de la mostra es va fer mitjançant E2D. Les bandes obtingudes s'analitzaren per espectrometria de masses, obtenint un patró de masses característic anomenant *mas fingerprint* que es va comparar amb la base de dades *on line* de NCBI utilitzant el motor de cerca MASCOT. Es consideraren com a proteïnes positivament identificades totes aquelles que presentaven un ajust estadísticament significatiu entre el patró de masses obtingut i el predit amb una tolerància màxima de 50 ppms.

El nostre interès primordial era la identificació de receptors específics del pàncrees. Per això es va realitzar un assaig en paral·lel sobre unes cèl·lules endotelials HUVEC originàries de cordó umbilical humà per tal de comparar els patrons de E2D obtinguts i identificar aquelles proteïnes que es trobessin només en la mostra originària del pàncrees.

Finalment es va obtenir un llistat de 31 proteïnes. De les quals 12 només es van trobar en el pàncrees. Cinc d'aquestes proteïnes ja havien estat descrites com a receptors del tPA (l'AnxA2, l'enolasa, les citoqueratines 8 i 18 i la tubulina). Aquest fet corroborava la validesa de la nostra metodologia.

La naturalesa de l'experiment fa que no només s'identifiquessin proteïnes adherides directament al tPA sinó també d'altres unides indirectament. Un altre conjunt de proteïnes que, segurament, són falsos positius són aquelles que es localitzen en compartiments on el tPA no ha estat descrit: el nucli i les mitocondries. Tot i així cal tenir en compte que els lligands del tPA descrits en la literatura no sempre compleixen les característiques típiques d'un receptor, com per exemple: estar localitzat en membrana. Així doncs, vam optar per enumerar totes les proteïnes trobades sabent que segurament estàvem incloent-hi alguns falsos positius.

Entre les proteïnes trobades que probablement no s'unien directament al tPA hi ha la tioredoxina que està descrita com a lligand de l'AnxA2 [310] i la vimentina que interacciona amb l'inhibidor dels activadors del plasminogen i el seu receptor en les plaquetes [311]. L'Erk1/2 també és un exemple de proteïna que, probablement, no s'associa directament al tPA, però que juga un paper en la seva funció ja que el

tractament de cèl·lules amb el tPA indueix una activació de la ruta de l'Erk1/2 [217](Ortiz-Zapater E. *et. al.* manuscrit en preparació).

Dintre del llistat de proteïnes n'hi ha un total de nou que formen part del citoesquelet (la cortactina, les citoqueratina 8 i 18 i 19, la vimentina, la tubulina, l'actina i l'ARP3). Aquest resultat és congruent amb el paper del tPA en mobilitat cel·lular en els processos migratoris.

No deixa de ser interessant que moltes de les proteïnes que, d'entrada, podrien semblar falsos positius, com ara: la piruvat quinasa o les proteïnes mitocondrials, estan sobre-expressades en el càncer de pàncrees [139]. Les *RNA binding proteins* i les xaperones són un altre conjunt de possibles falsos positius. No cal oblidar, però, que recentment s'ha descrit que l'AnxA2 pot actuar com una proteïna d'unió al RNA [312] i, per tant, podria interaccionar amb les proteïnes mencionades a través de la seva unió al tPA.

Hi ha també un altre seguit de proteïnes que tot i no tenir una funció coneguda en aquest sistema podrien realment ser receptors del tPA. Un d'aquests casos és la proteïna *valosin containing protein* que es va identificar inequívocament en varis dels experiments fets. Aquesta proteïna actua en el transport i la unió de vesícules i no es descarta que es localitzi en la membrana cel·lular. La gal 1 també és un candidat molt probable a receptor del tPA. Aquesta proteïna, malgrat no tenir pèptid senyal, es capaç d'unir-se a la membrana cel·lular. A més està implicada en varis processos carcinogènics, com ara l'arrest de limòcits T i la conseqüent inhibició de la resposta immunològica sobre el càncer [284]. També és capaç d'interaccionar amb el proto-oncogen *H-ras*, augmentant-ne la seva activitat [241]. Per aquest motiu aquesta proteïna ha estat estudiada més exhaustivament a la part final d'aquesta tesi.

Per tal de confirmar els resultats obtinguts per E2D/espectrometria, de masses es va prosseguir a la immunodetecció d'algunes de les proteïnes trobades en el *pull down* (l'ènolesa, l'AnxA2, la cortactina, la citoqueratina 18 i la gal 1) mitjançant WB. Totes elles van ser clarament identificades. Cal destacar que la gal 1, tot i no ser molt abundant en el lisat total, era completament depletada de la solució incubada amb la resina, indicant una interacció molt forta.

Aquest mateix experiment es va realitzar sobre tres línies cel·lulars d'origen pancreàtic per tal de descartar la possibilitat que els resultats fossin casos particulars de la línia cel·lular PANC-1. Les línies analitzades van ser: SK-PC-1, com exemple de cèl·lules amb un fenotip ben diferenciat i que expressen grans quantitats del tPA; Hs766T, una línia poc diferenciada i que no expressa el tPA i HPDE, originària de cèl·lules normals immortalitzades amb el virus del papilloma humà i que expressen baixos nivells del tPA. En totes elles els resultats de la interacció del tPA amb les corresponents proteïnes (l'ènolesa, l'AnxA2, la cortactina, la citoqueratina 18 i la gal 1) es van confirmar. Com a control negatiu es va utilitzar citoqueratina 7 que, suposadament, no interacciona amb el tPA. Curiosament en la línia cel·lular HPDE es va detectar la proteïna en la fracció de pull down del tPA i no pas en la de BSA indicant un patró d'interacció tPA/citoqueratina 7 diferent en aquesta línia respecte les altres, suggerint un paper diferent entre línies tumorals i cèl·lules normals.

Identification of a new tissue-plasminogen activator receptor: galectin-1 mediates tPA functions in pancreatic cancer (Manuscrit en preparació)

A partir dels resultats obtinguts en l'apartat anterior hem iniciat la tercera fase d'aquesta tesi on ens centrem en la caracterització de la interacció tPA/gal 1. Aquesta proteïna reuneix totes les característiques per a ser un receptor del tPA: està implicada en els processos de la comunicació i l'adhesió ECM/cèl·lula [259-261], participa en la regulació del creixement cel·lular [219]., es localitza en la membrana i és capaç d'unir-se a la laminina i la fibronectina (substrats del tPA) [254]. A això podem afegir que, en els experiments *pull down* realitzats, el tPA és capaç de depletar completament la gal 1 del medi, indicant una interacció molt forta. També cal tenir en compte que existeixen moltes evidències del paper de les galectines en els diferents tipus de tumors [241,257,285]. Concretament en el càncer de pàncrees s'ha descrit la sobre-expressió tant de la gal 1 com de la gal 3 (un altre membre de la família de les galectines) [289-291,313,314].

Per confirmar una interacció directa entre el tPA i la gal 1 s'ha fet un *pull down* de la gal 1 recombinant amb la sefàrosa-tPA i una ressonància de plasmó superficial on es detectava la unió de la gal 1 al tPA unit a la superfície d'un xip. Ambdós experiments corroboren la hipòtesi de la interacció directa. També demostren que és d'una intensitat molt semblant a la de l'AnxA2, el receptor més important del tPA en les cèl·lules endotelials. Aquests mateixos experiments realitzats sobre gal 3 recombinant indiquen que tot i que aquesta galectina també interacciona amb el tPA ho fa amb una intensitat molt més baixa que no pas la gal 1.

Diferents estudis han demostrat la sobre-expressió de la gal 1 i gal 3 en els tumors de pàncrees. Tot i així hi ha certa discrepància sobre la expressió de la gal 1 en les cèl·lules tumorals. Bereberat *et. al.* han estudiat l'expressió de la gal 1 en tumors pancreàtics mitjançant Northern blot i WB. Els seus resultats indiquen que tant els nivells del RNA com de la proteïna gal 1 augmenten en els tumors pancreàtics comparats amb el teixit sa. Altres autors també han demostrat que uns nivells més elevats de la gal 1 en els tumors pancreàtics amb estudis fets per E2D i per microarrays [289,290,314]. Aquests resultats, però, no coincideixen amb les dades obtingudes per hibridació *in situ* i immunohistoquímica que semblen indicar que l'expressió de la gal 1 es dona, essencialment, en els fibroblasts de l'estroma circumdant [291]. Per aquest motiu s'ha proposat que la gal 1 juga un paper sobretot en la reacció desmoplàsica dels tumors. En canvi la sobre-expressió de la gal 3 s'ha detectat en la majoria de les cèl·lules tumorals del càncer de pàncrees i se li ha suggerit un paper en la proliferació cel·lular.

Els nostres experiments demostren que la gal 1 s'expressa a alts nivells en 5 de les 7 línies cel·lulars derivades de tumors pancreàtics analitzades mitjançant WB, en contrast amb els resultats anteriorment mencionats. Tot i així, mitjançant immunofluorescència s'observa que l'expressió de la gal 1 es dona, essencialment, en el front de migració cel·lular, essent pràcticament indetectable en les cèl·lules confluents (veure figura 3 del tercer capítol dels resultats). Aquests resultats permeten explicar la divergència entre les dades obtingudes mitjançant tècniques que quantifiquen els nivells totals de proteïna o RNA d'aquelles que permeten identificar les zones on es localitza aquesta expressió. La identificació negativa de la gal 1 mitjançant una immunohistoquímica o una hibridació *in situ* en els estudis publicats anteriorment indica una manca d'anàlisi en detall les zones limítrofes del tumor o, en tot cas, una confusió amb l'expressió elevada de la gal 1 per part dels fibroblasts.

El tPA també participa en els processos de migració i invasió cel·lular [97], per tant vam decidir analitzar la expressió del tPA en els experiments de migració on ja havíem estudiat la localització de la gal 1. Sorprenentment els patrons de localització del tPA i la gal 1 se superposen i la seva detecció resulta en una senyal creuada molt intensa situada essencialment en el front de migració cel·lular, suggerint una possible relació funcional.

Com ja hem comentat anteriorment, el paper de la gal 1 ha estat més descrit en els fibroblasts que no pas en les cèl·lules epitelials, suggerint la seva participació en la reacció estromal del tumor. Recentment s'han publicat varis estudis que demostren que la gal 1 estimula l'activació de les cèl·lules pancreàtiques estelades o miofibroblasts pancreàtics [292,293]. Aquestes cèl·lules, en ser activades en el cas d'una neoplàsia o una pancreatitis, es transformen en fibroblasts que, mitjançant l'augment de la seva producció de l'ECM, donen lloc a la desmoplàsia tumoral. La presència excessiva d'estroma és, de fet, una característica del càncer de pàncrees i es creu que la comunicació entre les cèl·lules tumorals, el teixit circumdant i l'ECM és un pas clau en el control de l'expansió del tumor. Així, doncs, sembla que la desmoplàsia tumoral contribueix a les interaccions aberrants epiteli/mesènquima que poden ser, en part, responsables de la resistència a les drogues en el tractament del càncer i, per tant, l'estudi de la interacció epiteli/fibroblasts és essencial en el càncer de pàncrees. Per aquesta raó en el nostre estudi també hem analitzat el comportament de la gal 1 com a receptor funcional del tPA en les cèl·lules tumorals pancreàtiques com en els fibroblasts.

Anteriorment, el nostre grup havia demostrat que el tPA és capaç d'induir una senyal mitogènica en les cèl·lules pancreàtiques mitjançant l'activació de la ruta de la MAP quinasa Erk1/2 (Ortiz-Zapater E. *et. al.* manuscrit en preparació). Aquesta activació de l'Erk1/2 després d'un tractament amb el tPA també s'observa en les neurones [307]. En experiments realitzats sobre la línia cel·lular HPDE s'havia identificat un pic en la fosforilació de l'Erk1/2 entre 2 i 5 min. Aquest mateix experiment es va repetir sobre MEFs i la línia cel·lular F88,2 obtenint resultat semblants i fins i tot més intensos (dades no mostrades). La implicació de la gal 1 en activitat mitogènica ha estat àmpliament descrita [274,275]. Vam voler, doncs, comprovar si també estava implicada en la senyalització i la proliferació induïda pel tPA. Per això es va treballar amb cèl·lules on s'havia reduït la expressió de gal 1 mitjançant dues estratègies diferents: per una banda les HPDE i les F88,2 amb la gal 1 inhibida mitjançant un siRNA i per l'altra una línia de MEFs originàries de ratolins deficientes de la gal 1. En ambdós casos es pot veure clarament com l'exposició del tPA entre 2 i 5 minuts induïx la fosforilació de l'Erk1/2 en les cèl·lules control amb l'expressió de la gal 1 normal. Per contra la eliminació de la gal 1 porta a una baixada important de la fosforilació de l'Erk1/2.

L'estudi dels efectes de la inhibició de la gal 1 es van estendre a uns assaigs de proliferació cel·lular. Tant cèl·lules HPDE com F88,2 mostren un augment de la proliferació després del tractament amb el tPA, que és significativament inhibit per la presència del siRNA per la gal 1. Aquestes dades concorden amb les obtingudes per l'Erk1/2, indicant que la gal 1 participa en l'activació de l'Erk1/2 i subseqüent resposta proliferativa induïda pel tPA tant en les cèl·lules pancreàtiques tumorals com en els fibroblasts, suggerint un mecanisme molecular comú per la funció del tPA en els dos tipus cel·lulars. Això fa pensar en la possibilitat que el tPA i la gal 1 estiguin actuant com agents en la comunicació entre el tumor i la desmoplàsia circumdant en el càncer de pàncrees com ja s'ha proposat en altres tumors [285,288].

En aquesta tercera part de la tesi demostrem, doncs, que el tPA i la gal 1 interaccionen directament amb una alta afinitat. També demostrem que la gal 1 s'expressa en la majoria de les línies cel·lulars pancreàtiques analitzades i en fibroblasts. A més la gal 1 es localitza en el front de migració de les cèl·lules i colocalitza amb el tPA. Finalment demostrem que l'activitat mitogènica i la senyalització induïda pel tPA està relacionada amb la gal 1 tant sobre les cèl·lules epitelials com els fibroblast.

Aquests resultats ens porten a pensar que el tPA i la gal 1 estan jugant un paper en la proliferació del tumor i en la seva comunicació amb l'estroma circumdant, identificant la gal 1 com una nova diana terapèutica en el càncer de pàncrees. Queda encara per analitzar si la gal 1 està implicada en el paper proteolític del tPA. Aquesta possibilitat lligaria, també amb la seva localització en el front de migració cel·lular. També és important estudiar el mecanisme molecular pel qual el tPA, via la gal 1, activa la ruta de l'Erk1/2 i caracteritzar els elements *upstream* i *downstream* de la cascada. En aquest sentit s'ha descrit que la gal 1 interacciona amb la H-*ras* i propicia els seu ancoratge en la membrana i la transformació cel·lular [241] pel que seria possible que l'activació de l'Erk1/2 mitjançant l'interacció tPA/gal 1 fos facilitada per *ras*. Tot plegat obre varies línies d'investigació i enriqueix el coneixement del comportament del càncer de pàncrees i quines proteïnes estan implicades en la seva alta malignitat.

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

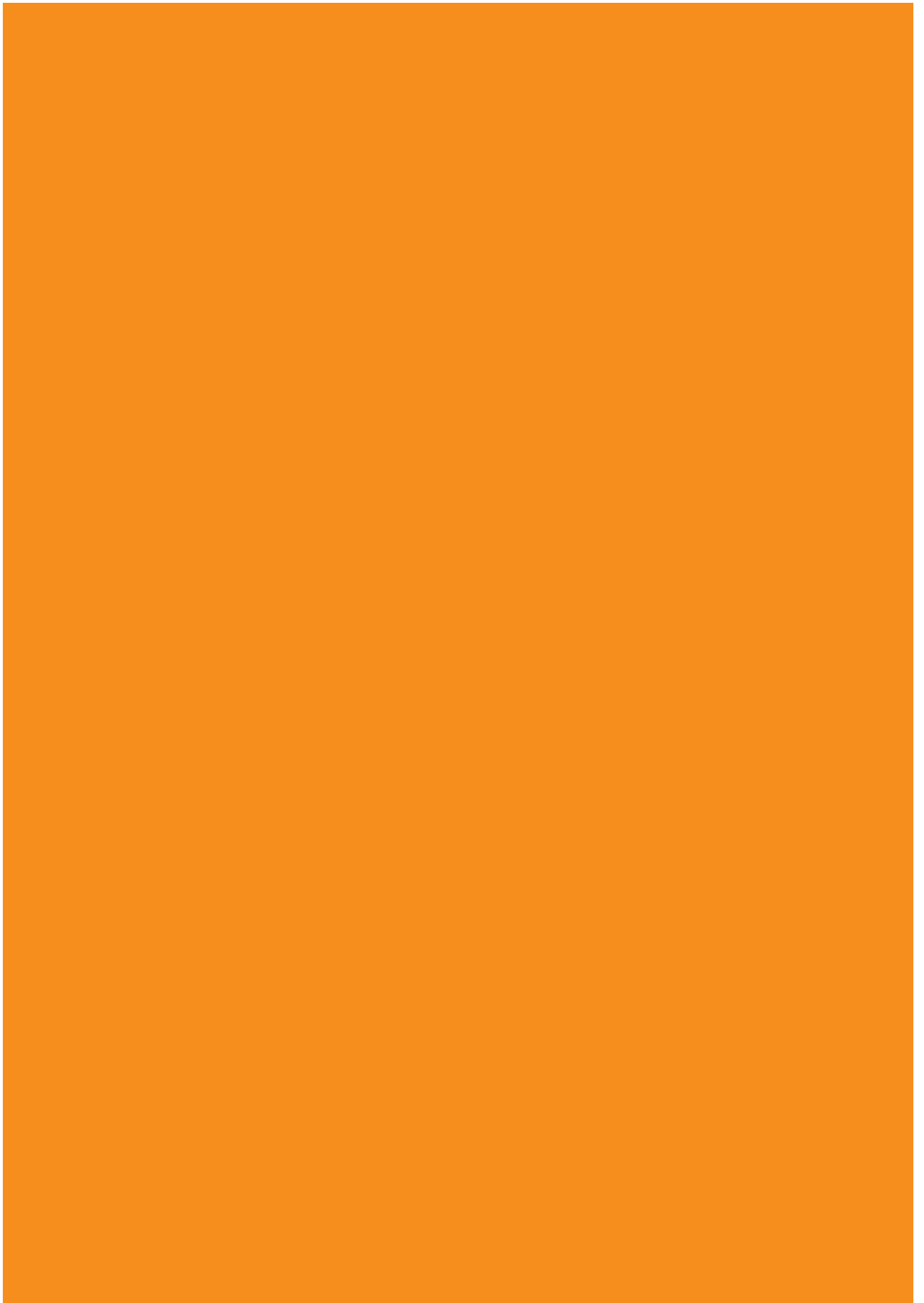
RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

MATERIALS I MÈTODES

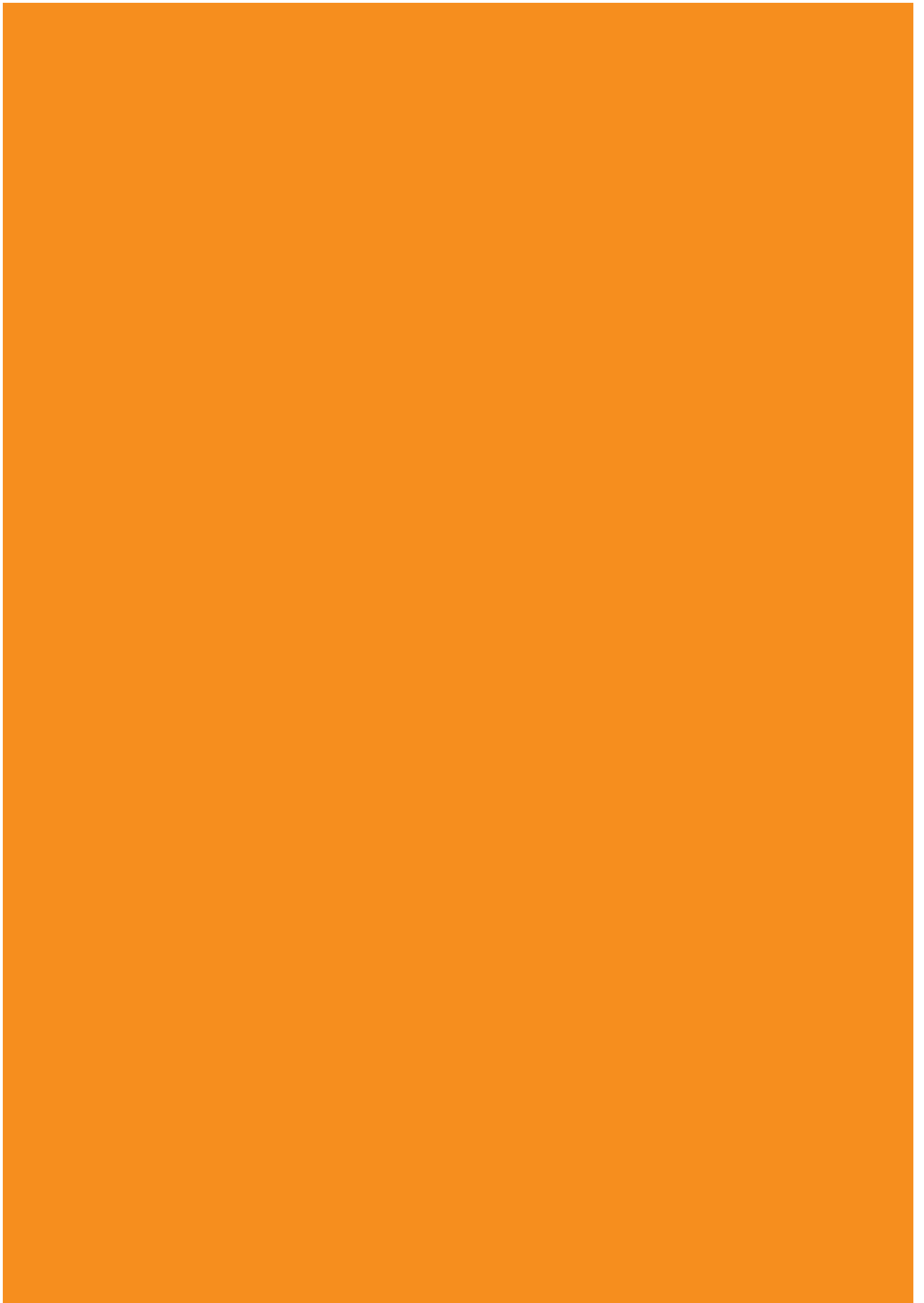
BIBLIOGRAFIA



1. La presència d'una Cys o Hcy en un pèptid és l'únic requisit perquè aquest actui com a inhibidor de la interacció tPA/AnxA2 *in vitro* i per inhibir l'adhesió del tPA a les cèl·lules HUVEC.
2. El mecanisme pel qual els pèptids portadors d'una Cys o Hcy inhibeixen la interacció tPA/AnxA2 consisteix en el bloqueig de la Cys⁸ de l'AnxA2 per formació d'un pont disulfur, un mecanisme força inespecífic i que no es correspon amb el descrit anteriorment per altres autors.
3. S'ha establert la validesa de la metodologia de captura per afinitat i identificació de nous receptors del tPA basada en un assaig *pull down* i una posterior caracterització proteòmica.
4. S'han identificat un total de 31 proteïnes que interaccionen amb el tPA en una línia cel·lular originària d'un tumor de pàncrees.
5. La gal 1 és expressada per la major part de línies cel·lulars de tumors pancreàtics estudiades on interacciona directament amb el tPA amb una forta afinitat.
6. La gal 1 es localitza en el front de tancament d'una ferida sobre la monocapa cel·lular, on colocalitza amb el tPA.
7. La gal 1 és necessària per a la fosforilació de l'Erk1/2 induïda pel tPA. Per tant participa en la senyalització mitogènica del tPA a través de la via de les MAP quinases.



INTRODUCCIÓ
OBJECTIUS
RESULTATS
DISCUSSIÓ
CONCLUSIONS
MATERIALS I MÈTODES
BIBLIOGRAFIA



1) Materials

1.1) Aparells utilitzats

Aparell	Funció	Fabricant
HPLC preparatiu LC-8A	Purificació de pèptids	Shimadzu, Kioto, Japó
Miniprotean 3	Electroforesi de proteïnes	BioRad, Hercules, CA, EEUU
Voyager DE-STR	Espectròmetre de masses	Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU
API QStar Pulsar	Espectròmetre de masses	PerkinElmer Sciex Instruments, Boston, MA, EEUU
Cytofluor 235	Fluorímetre	Millipore, Bedford, MA, EEUU
Branson Digital Sonifier	Sonicador	Branson, Danbury, CT, EEUU
Bekman XL-70	Ultracentrifuga	Bekman, Fullerton, CA, EEUU
IPGphor	IEF en E2D	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Ethan Dalt II	E2D	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Multiprobe II Ex	Robot digestor	Packard bioscience company, Meriden, CT, EEUU
Savant Speed-vac	Centrifuga amb bomba de buit	Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN, EEUU
Leica DMRB	Microscopi d'immunofluorescència	Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemanya
Leica DC300F	Càmera acoblada al microscopi de fluorescència	Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemanya
Leica TCS SP2	Microscopi confocal	Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemanya
BIAcore 3.000	Ressonància de plasmó superficial	Biacore, Uppsala, Suècia
WinSpectral	Contador de centelleig per radioactivitat	PerkinElmer Sciex Instruments, Boston, MA, EEUU

Taula 1. Aparells utilitzats.

1.2) Reactius

Tots els reactius utilitzats van ser adquirits a Sigma excepte els especificats en la següent taula.

Reactiu	Fabricant
Medi modificat Dulbecco (DMEM)	Invitrogen/Gibco, Long Island NY, EEUU
Sèrum fetal boví (FBS)	Invitrogen/Gibco, Long Island NY, EEUU
Medi de queranòcits lliure de sèrum (KSM)	Invitrogen/Gibco, Long Island NY, EEUU
Medi 199	Invitrogen/Gibco, Long Island NY, EEUU
OPTIMEM	Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU
Enhanced ChemiLuminiscence (ECL)	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
tPA recombinant (Actilyse)	Boehringer Ingelheim, Alemanya
Sulfo-NHS-LC-biotin	Pierce, Rockford, IL, EEUU
Sephadex G25	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Reactiu de Bradford	Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU
Tripsina modificada de porc	Promega, Madison, WI, EEUU
Sepharose 4B CNBr-Activated	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Tampó IPG 3-10 NL	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Dithiothreitol (DTT)	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Tires de 24 cm d'IEF	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Gel precast 12,5% d'acrilamida	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
Iodoacetamida	Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU
Comassie brillant blue R-350	Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU
Fluoromont-G	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EEUU
Xip CM5	BIAcore, Uppsala, Suècia
SMARTpool®	Dharmacon, Lafayette, CO, EEUU
siCONTROL Non-targeting siRNA pool®	Dharmacon, Lafayette, CO, EEUU
PLUS	Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU
Lipofectamina	Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU
Timidina [Me^3H]	Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia
OptiPhase Hisafe 2	Fisher Chemicals, Loughborough, Gran Bretanya

Taula 2. Reactius utilitzats no adquirits a SIGMA.

1.3) Anticossos

Anticòs	Animal	Origen o fabricant	Ref.
α -AnxA2	Conill	Produït en el nostre laboratori	[167]
α -gal 1	Conill	Donat pel Dr. H.J. Gabius, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Alemanya	[315]
α -tPA 373	Ratolí	American Diagnostics, Stamford CT, EEUU	
α -tPA 387	Cabra	American Diagnostics, Stamford CT, EEUU	
α -tPA 374-B	Ratolí	American Diagnostics, Stamford CT, EEUU	
α -Cortactina	Conill	Donat pel Dr. J. Cheng, Mayo Clinic, Rochester, MN, EEUU	[316];
α -Enolasa	Rata	Donat pel Dr. G. Adamus, Oregon Health Science University, Beaverton, OR, EEUU	
α -Citoqueratina 18	Ratolí	Donat pel Dr. E. B. Lane, Dundee University, UK	[317]
α -Citoqueratina 7 RCK105	Ratolí	Donat pel Dr. F. Ramaekers, Maastricht University, Holanda	
α -Tubulina	Ratolí	Pierce, Rockford, IL, EEUU	
α -Erk1/2-P	Conill	Cellsignalling, Boston MA, EEUU	
α -Erk1/2 total	Conill	Upstate, Charlottesville, VA, EEUU	
Estreptoavidina acoblada a fosfatasa alcalina		Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, EEUU	
Anticossos secundaris acoblats a HRP, FITC i TRITC	Ratolí i Conill	Dako, Glostrup, Dinamarca	

Taula 3. Anticossos utilitzats. S'especifica la proteïna que reconeixen, l'animal on ha estat produït, la font d'origen o fabricant i, si s'escau, la referència bibliogràfica.

1.4) Tampons

Tampó	Composició
De mostres o <i>Laemmli</i>	62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0,005% blau de bromofenol, pH 6,8
Tris-Glicina-SDS (TGS)	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,5% SDS, pH 8,3-8,6
De transferència	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, pH 8,3-8,6.
Salí Tris-HCl (TBS)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,2
Salí Tris-HCl amb Tween20 (TBSt)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl 0,2% Tween20 pH 7,2
Fosfat salí (PBS)	100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_3$, 125 mM NaCl, pH 7,2
Fosfat salí amb tween20 (PBSt)	100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_3$, 125 mM NaCl, 0,2% Tween20, pH 7,2
D'incubació d'ELISA (TIE)	11 mM Hepes, 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 1 mM glucosa, 0,5% BSA, pH 7.2
D'acoblament (TA)	0,1 M NaHClO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,2
De rentat Tris-HCl a pH 8	0,1 M Tris-HCl, 0,5 mM NaCl, pH 8
De rentat acetat a pH 4	0,1 M Acetat sòdic, 0,5 M NaCl, pH 4
De lisi 1%Ttx-100	0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 7,2, inhibidors de fosfatases* i de proteases**
De lisi 2% SDS	62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6.8
Salí d'àcid 4-morfolinoetan-sulfònic (MBS)	25 mM àcid 4-morfolinoetanesulfonic, 0,15 M NaCl pH 6.5
Solució d'equilibrat E2D	50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0,005% blau de bromofenol pH 6,8
DMEM-B	DEMEM 1% BSA
Salí hepes amb surfactant P20 (HBS-P)	0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 0,005% Surfactant P20, pH 7.4
IEF	7 M Urea, 2 M Tiourea, 4% de 1-propano sulfonat de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamoni], 1% DTT

*Inhibidors de fosfatases: 10 mM Pirofosfat, 1 mM NaF, 0,2 mM Ortovanadat

**Inhibidors proteases: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinina, 2 mM Pefabloc, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptina

Taula 4. Tampons utilitzats.

1.5) Cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades s'enumeren a la taula 5. Totes elles, exceptuant la HPDE i la HUVEC, van ser cultivades en DMEM, suplementat amb 10% FBS. Les cèl·lules HPDE es van cultivar en medi KSFM suplementat amb EGF (0,1-0,2 ng/mL) i extracte de pituitària bovina (25 µg/mL) [318]. Les cèl·lules HUVEC (entre el passatge 2 i 6) es van cultivar amb medi M199 amb 10% de FBS suplementat amb heparina i EGF [319]. Els tres medis de cultiu estaven enriquits amb 1 mg/mL penicil·lina/estreptomicina, 2 mM glutamina i 1 mM piruvat sòdic. El material estèril de plàstic utilitzat va ser adquirit a Nunc (Naperville, IL, EEUU)

Línia cel·lular	Origen	Ref.
HPDE	Cèl·lules pancreàtiques ductals immortalitzades mitjançant la infecció amb un retrovirus que conté els gens E6 i E7 del papil·loma humà	[320]
PANC-1	Cèl·lules epitelioïdes adherents originaries d'un tumor pancreàtic ductal	[320]
SK-PC-1	Cèl·lules epitelials originaries d'un tumor pancreàtic ductal	[321]
SK-PC-3	Cèl·lules epitelials i fibroblasts originaris d'un tumor pancreàtic exocrí	[321]
Hs766t	Cèl·lules epitelials adherents originaries d'una metàstasi d'un tumor pancreàtic en els nodes limfàtics	[322]
BxPC-3	Cèl·lules epitelials adherents originaries d'un tumor pancreàtic ductal	[323]
RWP-1	Cèl·lules epitelials originaries d'una metàstasi d'un tumor pancreàtic en fetge	[324]
F88,2	Fibroblasts originaris d'un tumor de mama .	
MEFs	Fibroblasts d'embrió de ratolí	
MEFs gal 1 ^{-/-}	Fibroblasts d'embrió de ratolí deficients per la gal 1	[325]

Taula 5. Línies cel·lulars utilitzades. S'especifica el nom de la línia, l'origen i, si s'escau, la referència bibliogràfica.

2) Mètodes

2.1) Preparació de l'AnxA2 recombinant

Es va preparar l'AnxA2 recombinant a partir de l'*Escherichia coli* BL21 transformada amb el vector pET21b(+) que contenia el cDNA de l'AnxA2 humana amb una cua de 6 His (proporcionat per la Dra. K. A. Hajjar, Cornell University Medical College, New York, NY, EEUU) [181]. La subsegüent purificació es va dur a terme en una columna d'agarosa funcionalitzada amb l'àcid nitrilotriacètic, eluïda amb un PBS ajustat a un gradient de pH entre 8 i 4,8. Es van col·lectar les fraccions de pH 5,2 i pH 4,8, corresponents al monòmer i al dímer de l'AnxA2, respectivament. Les dues fraccions es van ajuntar i guardar a -80°C .

2.2) Biotinilació del tPA

Per tal d'eliminar el gran excés ($> 100x$ molar) d'Arg que conté el tPA com a excipient estabilitzant, es va dialitzar 1 mL de la solució comercial (10 mg/mL, emmagatzemada a -80°C) contra 0,9 M de clorur de guanidini en PBS (2 L, 2 x 2 h i després tota la nit, 4°C) emprant una membrana de 12-14 kDa d'exclusió (Medicell, Londres, Gran Bretanya).

Per a obtenir el tPA biotinitat, 2 mg del tPA dialitzat es van fer reaccionar amb 0,4 mg de la sulfo-NHS-LC-biotina (20 x en excés) en PBS durant 2 h a temperatura ambient. L'excés de biotina es va eliminar per cromatografia d'exclusió amb sephadex G25. La integritat del tPA biotinitat es va examinar per electroforesi en gel d'acrilamida (10%) i posterior tinció amb *Coomassie Brilliant Blue*. La concentració de proteïna es va mesurar pel mètode de Bradford [326].

2.3) Síntesi de pèptids

Els pèptids utilitzats al capítol 1 de resultats [174] van ser dissenyats basant-se en la seqüència LCKLSL descrita per a la interacció tPA/AnxA2 [206]. Es van sintetitzar en fase sòlida funcionalitzats com a carboxamida C-terminal utilitzant una química Boc sobre una resina *p*-metilbenzidrilamina. Un cop sintetitzats, es van desprotegir i desancorar mitjançant una acidòlisi amb l'HF anhidre. La purificació es va dur a terme per HPLC preparativa en fase inversa [327], que va furnir productes entorn a un 90% de puresa (per HPLC analític). Els pèptids van ser també caracteritzats per espectrometria de masses MALDI-TOF, que permet controlar l'estat d'oxidació de la Cys en aquells pèptids que en contenen. A la Taula 6 s'enumeren les seqüències sintetitzades i quina mena de modificacions s'hi va fer.

Seqüència	Modificació
LCKLSL	Consens
I <u>C</u> KLSL L <u>C</u> KLSL L <u>C</u> kLSL LCK <u>I</u> SL LCKL <u>S</u> L LCKLS <u>I</u>	Escombrat de D-aa.
<u>G</u> CKLSL L <u>G</u> KLSL L <u>C</u> GLSL LCK <u>G</u> SL LCKL <u>G</u> L CLKL <u>S</u> G	Escombrat de Gly
<u>A</u> CKLSL L <u>A</u> KLSL L <u>C</u> ALS LCK <u>A</u> SL LCKL <u>A</u> L LCKLS <u>A</u>	Escombrat d'Ala
I <u>C</u> KLSL LCK <u>I</u> SL LCKLS <u>I</u> <u>V</u> CKLSL LCK <u>V</u> SL LCKLS <u>V</u> L <u>C</u> RLSL LCKL <u>I</u> L	Substitucions conservadores
LC[<u>Acm</u>]KLSL	Cys protegida
lcklsl	Enantiòmer
lslkcl	Retroenantiòmer
SFQTTTTYTPSHPQTLPC	Irrellevant
KLLCLS	Aleatori
LCKL	Tetrapèptid
L[<u>Hcy</u>]KLSL	Canvi de Cys per Hcy

Taula 6. Pèptids assajats com a possibles inhibidors de l'interacció tPA/AnxA2. A partir de la seqüència LCKLSL de l'AnxA2 descrita com a regió d'interacció amb el tPA es va sintetitzar un seguit de pèptids amb diferents modificacions per tal de mesurar-ne l'efecte inhibitori. Les modificacions que es van realitzar foren: 1) Substitucions per D aminoàcids 2) Substitucions de cada aminoàcid per Ala o Gly; 3) Substitucions conservadores Leu→Ile, Leu→Val, Lys→Arg, Ser→Tyr; 4) Seqüència consens amb la Cys protegida; 5) Enantiòmer; 6) Retroenantiòmer; 7) Pèptid irrellevant amb una Cys; 8) Seqüència desordenada; 9) Seqüència consens truncada entre Leu i Ser; 10) Substitució de Cys per Hcy.

2.4) Assaig ELISA competitiu

L'AnxA2 (10 µg/mL) es va incubar tota la nit a 4°C en plaques de 96 pous (50 µg/pou). Els pous es van rentar 3 vegades i després es van deixar bloquejant durant 2 h a 37°C amb el TIE. El tPA biotinilat (100 nM en TIE) es va incubar en els pous en presència o absència dels pèptids competidors (a una concentració entre 10 i 1.000 µM) durant 2 h a 37°C. Per eliminar el tPA lliure es van rentar els pous 3 vegades amb PBSt amb 0,5% de BSA.

Per detectar el tPA enganxat s'afegí als pous una dilució d'estreptavidina acoblada a la fosfatasa alcalina (1 µg/mL en PBS) durant 1 h a 37°C. L'activitat enzimàtica es mesurà amb el reactiu fosfat de 4-metilumbeliferil (1 mg/mL en 0,2 M trietanolamina a pH 8.5) durant 20 min a temperatura ambient. La quantificació del tPA unit es va realitzar per fluorimetria amb filtres d'excitació i d'emissió a 360/40 i 460/40 nm, respectivament.

L'assaig d'interacció del tPA sobre cèl·lules HUVEC es va fer en plaques de 96 pous on s'havia fet créixer una monocapa de cèl·lules HUVEC fins a confluència. Els pous es van bloquejar amb TIE durant 1 h a 37°C, el tPA es va incubar durant 1 h a 37°C en condicions iguals a les descrites més amunt, els pous es van rentar 3 cops amb TIE i un cop més amb PBS, i seguidament es van fixar les cèl·lules amb metanol durant 5 min a -20°C. Posteriorment es rentaren els pous amb PBSt 0,5% BSA i es va prosseguir a la detecció amb estreptavidina acoblada a la fosfatasa alcalina com ja s'ha descrit. Per a determinar si el senyal obtingut era degut a l'interacció específica del tPA es va portar un control afegint el tPA no biotinilat en excés (5 µM) que competia amb el tPA biotinilat.

2.5) Espectrometria de masses per determinar l'interacció del pèptid LCKLSL i els seus derivats amb l'AnxA2

20 µL d'una solució 450 µM de l'AnxA2 recombinant i 5 mM de pèptid (LCKLSL, LAKLSL, L(Hcy)KLSL o Hcy sola) en PBS es va incubar durant 3 h a 37°C. El pH de la solució s'havia ajustat abans a 7,4 amb NH₄CO₃. La reacció es va aturar amb 1 µL d'àcid fòrmic i posteriorment es va diluir 1:5 amb solució al 50% de metanol i 0,1% d'àcid trifluoroacètic. 1 µL de la solució resultant es va barrejar amb l'àcid sinapínic (1:1) i es va analitzar mitjançant una espectrometria de masses MALDI-TOF obtenint l'espectre de masses de l'AnxA2 i de l'AnxA2 unida als pèptids.

En un altre experiment realitzat de la mateixa manera la mostra resultant es va separar mitjançant una electroforesi de proteïnes (gel al 10% d'acrilamida). El gel es va visualitzar mitjançant *Coomassie Brilliant Blue*. La banda a 36 kDa es va retallar i digerir amb tripsina segons el protocol descrit més avall. Els pèptids tríptics resultants van ser separats mitjançant nanoHPLC de fase inversa (nanocolumna de 75 µm de diàmetre interior i 15 cm de llarg reblida amb sílica C₁₈ de 3 µm de talla de partícula) en un gradient d'aigua/acetonitril (5-65% d'acetonitril en 80 min, 200 nL/min). Les masses dels pèptids i les seves seqüències es van determinar mitjançant una espectrometria de masses en tàndem amb un mètode dinàmic d'adquisició depenent de la informació obtinguda en cada moment de l'experiment (IDA) (càrrega des de 2 fins a 5 i l'indiar de la intensitat en 75 contatges) en un aparell API QStar Pulsar. La seqüència del pèptid corresponent a l'extrem N-terminal de l'AnxA2 es va determinar tenint en compte el possible augment de massa corresponent al fragment LCK en l'aminoàcid Cys⁸.

2.6) Acoblament del tPA a la sepharose CNBr

La resina *sepharose 4B CNBr-Activated* (10 mg de resina/mg del tPA) es va hidratar mitjançant 2 rentats de 15 min amb HCl 1 mM (pH 3) seguit d'un rentat amb TA. Sobre aquesta resina s'afegí el tPA (prèviament dialitzat com s'ha descrit en l'apartat de biotinilació del tPA) degudament ajustat amb una solució de TA concentrat 4 vegades i es va incubar durant 2 h a temperatura ambient amb una lleugera agitació.

Un cop finalitzada la reacció es centrifugà la solució a 2.000 rpm i s'eliminà el sobrenedant tot prosseguint a la inactivació dels grups funcionals no reaccionats de la resina amb 5 mL de tampó de rentat Tris-HCl a pH 8 durant 2 h a temperatura ambient amb agitació. Finalment es va eliminar qualsevol residu de proteïna no acoblada amb 3 cicles de rentats alternant els tampons de rentat Tris-HCl a pH 8 i acetat a pH 4. La resina es va emmagatzemar a 4°C en PBS amb 0,02% d'azida sòdica (5 µL per 1 mL de resina hidratada). Les substitucions obtingudes foren de 25-30 mg del tPA per 1 mL de resina hidratada.

Per a determinar les proteïnes unides inespecíficament a la resina es va preparar una resina unida a BSA de la mateixa manera que s'ha descrit pel tPA.

2.7) Pull down

Unes cèl·lules PANC-1 o HUVEC es van fer créixer en unes plaques p150 fins a confluència. Després de rentar dues vegades amb PBS a 37°C s'afegí 0,5 mL per placa del tampó de lisi 1% Txt-100 i es va incubar 15 min sobre gel. Seguidament es va centrifugar la mostra a 10.000 rpm (10 min, 4°C) i es va descartar el precipitat. El sobrenedant es va quantificar pel mètode de Bradford.

L'assaig *pull down* es va realitzar amb 10 µL de resina hidratada (Sefarosa-tPA o Sefarosa-BSA) per cada mg de proteïna total en el lisat (5 mg de proteïna per experiment) amb un temps d'incubació de 2 h a 4°C amb agitació. Un cop finalitzat s'eliminà el sobrenedant i es va rentar la resina tres vegades amb tampó de lisi txt-100. L'elució de les proteïnes unides al tPA es va fer de dues maneres diferents depenent del mètode d'anàlisi posterior. Per mostres analitzades per E2D les proteïnes es van eluir mitjançant dos rentats de 15 min de 50 µL seguit d'un altre rentat de 1 min amb 350 µL del tampó IEF obtenint un volum final de 450 µL i procurant sempre no emportar-se cap partícula de resina. Per mostres analitzades per WB es van diluir les mostres en tampó *laemmli* i es van incubar 10 min a 100°C i centrifugar 1 min a 13.000 rpm per tal de precipitar possibles partícules en suspensió.

2.8) Preparació de fraccions de membrana riques en colesterol (rafts)

Unes cèl·lules PANC-1 es van fer créixer fins a confluència en unes plaques p150 i van ser lisades amb 1 mL/placa d'una solució de Na₂CO₃ 0,5 M, pH 11 en fred. La mostra es va homogeneïtzar mitjançant sonicació (3 polsos de 20 s a un 20% d'amplitud amb 10 s entre pols i pols). La solució resultant es va barrejar 1:1 amb una solució al 90% de sacarosa en MBS obtenint una solució final al 45% de sacarosa. Dues altres solucions al 5% i 35% de sacarosa en MBS 250 mM de Na₂CO₃ es van utilitzar per crear un gradient discontinu de sacarosa (4 mL de la solució al 45%, 4 mL de la del 35% i 3 mL de la del 5%). Es va prosseguir a la ultracentrifugació de la mostra durant

20 h a 39.000 rpm. La fracció de rafts es podia visualitzar com un anell entre les fraccions de 35% i 5%. Es va recollir aquesta fracció i es va diluir tres vegades en MBS (amb inhibidors de proteases i fosfatases) i centrifugar 1 h a 13.000 rpm a 4°C. El precipitat obtingut es va redissoldre en tampó de lisi txt-100 contenint 20 mM d'òctilglucòsid i inhibidors de proteases i fosfatases. Un cop quantificada per Bradford, la proteïna obtinguda representava entorn de l'1% del material de partida per la qual cosa va caldre repetir les purificacions fins a obtenir suficient material per realitzar un assaig *pull down* (5 mg de proteïna).

2.9) Separació de les proteïnes mitjançant E2D

La solució del tampó IEF amb les proteïnes dissoltes va ser suplementada amb 0,5% del tampó IPG 3-10 NL i 1% de DTT. La IEF es va dur a terme amb tires de 24 cm amb un gradient no lineal de pH de 3 a 10 aplicant 50 µA per tira en un aparell IPGphor. Es va seguir el següent protocol d'enfocament: 12 hores d'hydratació activa a 50 V, 2 h a 200 V, 1 h a 500 V, 1 h a 1.000 V, 30 min de gradient de 1.000 V a 8.000 V i finalment 8 h 20 min a 8.000 V. Les tires es podien emmagatzemar a -80°C just finalitzar la IEF en cas de ser necessari.

Per a la segona dimensió es van fer, sobre cada tira, quatre rentats de 15 min amb la solució d'equilibrat d'IE. Els dos primers amb un 1% de DTT per tal de reduir els ponts disulfur i els dos següents amb 4% iodoacetamida per acetilar les Cys lliures. A continuació es van muntar les tires sobre un gel *precast* de 12,5% d'acrilamida fixant la tira amb una solució al 0,5% d'agarosa en TGS. Els gels es van córrer en un aparell Ethan Dalt II. Com a tampons d'electroforesi es van emprar TGS en el càtode (compartiment superior) i una solució al 2,86% (v/v) d'àcid acètic i 4,84% (v/v) de dietanolamina en l'ànode (compartiment inferior). Per resoldre els gels es va seguir el següent protocol: 3 wats/gel durant 30 min, 18 wats/gel fins que el front sortís del gel (6 h aproximadament)

La visualització de les proteïnes es va fer principalment mitjançant tinció amb *comassie brilliant blue R-350* i en cas de ser necessari augmentar la sensibilitat es van retenir els gels amb AgNO₃. El destenyiment dels gels es va fer amb una solució 14 mM de tiosulfat sòdic i 6 mM de K₃[Fe(CN)₆].

La tinció amb AgNO₃ es va dur a terme seguint el següent protocol: primer es van fixar les bandes amb una solució d'etanol al 40% i d'àcid acètic al 10% (30 min). Seguidament es va sensibilitzar les bandes amb una solució d'etanol al 30% amb 6,8% p/v d'acetat de sodi i 3% p/v de tiosulfat sòdic (30 min). El gel es va netejar amb tres rentats de 5 min d'aigua MilliQ i es prosseguí a la tinció amb una solució de AgNO₃ al 0,25% i 0,015% de formaldehid. Per tal d'eliminar el AgNO₃ no precipitat, es realitzaren dos rentats d'un minut amb aigua MilliQ i es va revelar el gel amb una solució amb 2,5% de Na₂CO₃ i 0,007% de formaldehid (10 min aproximadament). Finalment es va aturar la reacció afegint una solució de 1,46% p/v àcid etilendiaminatetracètic (EDTA) (10 min). Els gels es conservaren en 8,7% de glicerol.

2.10) Digestió i identificació de les mostres mitjançant espectrometria de masses

Es va comparar el patró de bandes obtinguts en els diferents gels i es van seleccionar aquelles que eren presents en el gel del *pull down* amb sefarosa-tPA i no pas en de

sefarosa-BSA o sefarosa-tPA sense lisat (per descartar bandes derivades del propi tPA). Les bandes van ser retallades i digerides utilitzant un robot digester *Multiprobe II Ex*.

Per tal d'eliminar el *comassie brillant blue R-350* de les bandes es prosseguí a rentar-les dos cops amb 30 μL una solució al 50% acetonitril (15 min a temperatura ambient). A continuació es deshidrataven les bandes amb 30 μL d'acetonitril (15 min a temperatura ambient) i es rehidrataven amb 30 μL d'una solució 0,1 M de NH_4HCO_3 (15 min a temperatura ambient). Finalment es tornaren a deshidratar amb 2 rentats d'acetonitril (15 min cada un a temperatura ambient).

Per tal de digerir les bandes, primer es dugué a terme la reducció dels ponts disulfur amb 30 μL d'una solució 10 mM de ditiotreitòl i 0,1 M NH_4HCO_3 (45 min a 56°C). Les Cys lliures es van acetilar amb 30 μL d'una solució 55 mM de iodoacetamida i 0,1 M NH_4HCO_3 (30 min a temperatura ambient sense llum). Les bandes es van rentar amb 30 μL d'una solució al 50% d'acetonitril (2 min temperatura ambient) i es deshidrataven amb 30 μL d'acetonitril (5 min a temperatura ambient). A continuació s'assecaven amb *speed-vac* (30 min). Les bandes es van rehidratar amb 10 μL de la solució de tripsina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 0,05 M NH_4HCO_3) (30 min en gel). Finalment, i de cara a evitar que les bandes s'assequessin, s'addicionà 30 μL més del mateix tampó 0,05 M NH_4HCO_3 i es deixà reaccionar tota la nit a 37°C. La reacció es va aturar addicionant 5 μL d'àcid fòrmic. Les bandes es van emmagatzemar a -20°C.

A fi de concentrar i dessalar la solució amb els pèptids tríptics es van passar 10 μL de la solució de digerit per una microcolumna Empore (Proxeon, Odense, Dinamarca) que immobilitzà els pèptids presents. Les sals retingudes s'eliminaren per rentat amb aigua MilliQ i els pèptids s'el·luïren sobre la placa de MALDI tractant la columna amb 1 μL (10 microgotetes d'aproximadament 0,1 μL) d'una solució de 20 mg/mL d'àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic en acetonitril al 70% en 0,1% d'àcid trifluoroacètic aquós.

El mapa peptídic (tríptic) de cada digerit es va analitzar en un espectròmetre de massa MALDI-TOF Voyager DE-STR operant en mode *reflectron*. La identificació de cada proteïna es va realitzar aplicant el motor de cerca MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) a la base de dades de seqüències NCBI, amb una tolerància de 50 ppm entre les masses experimentals i del possible pèptid tríptic. La interacció del tPA amb alguna de les proteïnes així identificades fou posteriorment confirmada mitjançant WB utilitzant els següents anticossos: α -enolasa, α -AnxA2 α -cortactina, α -citoqueratina 18, α -gal 1, i α -citoqueratina 7 RCK105.

2.11) Experiments de migració mitjançant la curació d'una ferida.

Es van fer créixer unes cèl·lules sobre uns cobreobjectes de vidre (PANC-1, SK-PC-1, HPDE i F88,2) fins a confluència. En el cas de les cèl·lules HPDE els cobreobjectes s'havien tractat prèviament amb 1% gelatina durant 1 h a 37°C.

Amb una punta groga de micropipeta de 20-200 μL es va fer una ferida a la monocapa cel·lular. Els cobreobjectes es van rentar 3 vegades amb DMEM 0,5% FBS (o medi KFSM suplementat en el cas de HPDE) per eliminar les cèl·lules desenganxades. Finalment s'afegí 500 μL de DEMEM 0,5% FBS (o KFSM suplementat) a cada pou. Les cèl·lules van migrar depenent de la cinètica de cada línia cel·lular (16 h per F88,2 i HPDE, 24 h per SK-PC-1 i 48 h per PANC-1). A continuació els cobreobjectes van ser analitzats mitjançant immunofluorescència com es descriu en el següent apartat.

2.12) Immunofluorescència i microscòpia confocal

Els cobreobjectes sobre els quals s'havia realitzat un assaig de migració per curació de ferida (veure apartat anterior) es van rentar en DMEM-B i es van incubar amb l'anticòs α -gal 1 diluït en DMEM-B (40 μ g/mL) durant 15 min a 37°C (20 μ L/cobreobjectes). Seguidament es va rentar 3 vegades els cobreobjectes amb DMEM-B i 2 cops més amb PBS. Les cèl·lules es fixaren amb metanol a -20°C durant 5 min. Els cobreobjectes d'aquelles línies cel·lulars que expressen el tPA s'incubaren amb l'anticòs α -tPA 373 (10 μ g/mL en DMEM-B, 20 μ L/cubre) durant 1 hora a 37°C. De nou es rentaren 3 vegades els cobreobjectes, les dues primeres vegades de DMEM-B i la darrera amb PBS amb 1% BSA. Es procedí a la incubació amb l'anticòs secundari (acoblat a FITC o TRITC, 10 μ g/mL en PBS amb 1% BSA, 20 μ L/cobreobjectes) durant 1 h a 37°C. Finalment es rentaren els cobreobjectes 3 vegades amb PBS, una vegada més amb aigua MilliQ i una darrera amb etanol. Els cobreobjectes es van deixar assecar i es fixaren sobre els portaobjectes utilitzant el reactiu Fluoromont-G.

Les imatges de fluorescència convencional es van adquirir en un microscopi Leica DMRB amb una càmera Leica DC300F utilitzant els filtres d'emissió a 488 nm (FITC) i 522 nm (TRITC). Les imatges van ser preses amb els objectius de 40 i 100 augments.

Les imatges de microscòpia confocal foren adquirides en un equip Leica TCS SP2 adaptat a un microscopi invertit Leica DMIRBE per la captació seqüencial d'imatges corresponents al doble marcatge de les cèl·lules. Els objectius utilitzats van ser Leica Plan-Apocromàtic de 63 i 40 augments (N.A 1,32 *oil*) amb tres augments digitals. Les longituds d'ona d'excitació van ser de 488 nm d'un làser d'Ar (FITC) i de 543 nm d'un làser de HeNe (TRITC). La captació de les imatges es va realitzar de forma seqüencial mitjançant un sistema de detecció espectral que va permetre ajustar convenientment els rangs d'emissió per cada fluorocrom, evitant els possibles problemes de creuament de senyals. El format de les imatges era de 1024 x 1024 píxels i la velocitat d'escaneig fou de 400 Hz (*line average 4*).

2.13) WB (WB)

L'electroforesi de proteïnes es va realitzar en minigels miniprotean 3 d'entre el 10 i el 15% de poliacrilamida, en condicions desnaturalitzants. Les mostres havien estat prèviament bullides en tampó *Laemmli*. Els gels es van resoldre en el tampó balancejat TGS seguint el protocol clàssic (100 V, 1 h a temperatura ambient) i posteriorment es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa en tampó de transferència (100 V, 70 min a 4°C).

La immunodetecció es va realitzar amb un protocol WB usual.

2.14) Ressonància de plasmó superficial

Tots els experiments de ressonància de plasmó superficial es van realitzar amb un aparell BIAcore 3.000 utilitzant un xip CM5 i el tampó HBS-P.

2.14.1) Immobilització de les proteïnes en el xip

Els grups carboxil de la matriu de dextrà dels xip CM5 es van activar mitjançant la formació del corresponent èster d'N-hidroxisuccinimida, seguint el protocol recomanat per BIAcore. Breument: un cop inserit el xip a l'aparell es fixà un flux de 5 µL/min amb tampó HBS-P fins obtenir un valor estable de línia base (+/- 2ru); seguidament es van injectar 35 µL (7 min) d'una solució 0,025 M d'N-hidroxisuccinimida i 0,1 M de carbodiimida (EDC) acabades de preparar.

Les immobilitzacions del tPA i la BSA es van fer mitjançant tres injeccions de 2 min a 5 µL/min d'una solució de 10 µg/mL de cada proteïna en HBS-P. La solució del tPA es va preparar a partir del tPA dialitzat contra 0,9 M clorur de guanidini en PBS, com s'ha descrit anteriorment. A continuació es bloquejà la superfície amb l'etanolamina (7 min, 5 µL/min) i es realitzaren dos polsos de 30 s de NaCl 1M (10 µL/min) per eliminar proteïna adherida no covalentment. Finalment la superfície es va equilibrar durant un mínim de 24 h amb HBS-P (5 µL/min). Els nivells d'immobilització finals van ser de 1.300 ru pel tPA i 1.100 ru per la BSA. (on "ru" són a unitats arbitràries de resposta proporcionals a l'acoblament del lligant a la superfície).

2.14.2) Interacció de la gal 1, l'AnxA2 i la gal 3 amb les superfícies del tPA la BSA

Els experiments d'interacció es van fer sobre la superfície modificada amb el tPA utilitzant la de BSA com a blanc. Les tres proteïnes es van analitzar en un rang de concentracions entre 30 nM i 4 µM. Cada solució es va injectar per duplicat seguint el següent cicle: 3 min d'associació (60 µL, 20 µL/min); 5 min de dissociació amb 100 µL de tampó HBS-P (20 µL/min); regeneració de la superfície amb dos polsos de 30 s de 5 µL de 1 M NaCl (10 µL/min); 10 min d'estabilització amb HBS-P (10 µL/min) fins a obtenir un senyal amb una desviació de +/-2 ru respecte a la inicial.

El càlcul de les constants termodinàmiques de l'interacció tPA/gal 1 i tPA/AnxA2 es va realitzar ajustant els valors del senyal a l'equilibri de cada concentració (X=concentració; Y=senyal) a una hipèrbola on el valor "b" equival a la constant de dissociació K_D de la reacció.

$$y = \frac{ax}{1 + bx}$$

$$b = K_D$$

2.15) Inhibició de l'expressió de la gal 1 mitjançant interferència de RNA (siRNA)

La interferència de RNA per la gal 1 es va realitzar sobre unes cèl·lules F88,2 i HPDE. Les cèl·lules es van sembrar sobre plaques de 24 pous (10^4 cèl·lules/pou per les F88,2 i 2×10^4 cèl·lules/pou per les HPDE) i es van transfectar amb el siRNA *SMARTpool*[®] específic per la gal 1 amb *siCONTROL Non-targeting siRNA pool*[®] com a control.

Les cèl·lules, un cop sembrades, es van deixar en DMEM 10% FBS (F88,2) o KFSM suplementat (HPDE) durant 24 h. Per a cada transfecció (12 pous) es van dissoldre 0,5 µL de siRNA 50 µM juntament amb 60 µL del reactiu PLUS en OPTIMEM fins a 320 µL i es va deixar incubar 15 min a temperatura ambient. A continuació es va afegir 290 µL d'OPTIMEM i 30 µL de lipofectamina i es va incubar 15 min més a temperatura ambient. Mentrestant els pous es van rentar amb PBS i es van cobrir amb 150 µL/pou d'OPTIMEM. Finalment es va afegir 50 µL/pou de la solució amb siRNA aconseguint un volum final de 200 µL a una concentració de 10 nM de siRNA. La mescla de transfecció es va incubar 5 h a 37°C. A continuació s'eliminà el medi de transfecció i s'afegí a cada pou 1 mL de DMEM 10% FBS (F88,2) o KSFM suplementat (HPDE) durant 36 h a 37°C.

2.16) Assaig d'activació de la MAP quinasa Erk1/2

Aquest assaig es va realitzar sobre uns MEFs (*wild type* o gal 1^{-/-}) i unes HPDE (tractades amb el siRNA control o el siRNA contra la gal 1). Per aturar el creixement cel·lular i reduir els nivells basals d'activació de l'Erk1/2 es van deixar les cèl·lules en 500 µL de DMEM sense FBS durant dos dies (MEFs) o KSFM no suplementat durant tres dies (HPDE). L'activació de l'Erk1/2 es va mesurar afegint a cada pou tPA (10 µg/mL finals). Com a control positiu s'utilitzà DMEM 1% FBS (MEFs) i KSFM amb 40 ng/mL d'extracte de pituitària bovina i 0,001 ng/mL de EGF (HPDE). Els nivells d'activació de l'Erk1/2 es van comparar amb els de les cèl·lules crescudes en medis no suplementats (nivell basal). L'activació del tPA es va mesurar a 2, 5 10 i 20 min, els control positiu i negatiu es van mesurar a 10 min. L'activació es va aturar eliminant el medi i congelant les plaques ràpidament amb nitrogen líquid. Les plaques es van guardar a -80°C fins a ser processades.

Les cèl·lules es van lisar afegint 50 µL/pou de tampó *Laemmli* a 90°C. Es va rascar cada pou amb una punta de micropipeta i es va deixar 15 min. Es van recollir els lisats i es van bullir 10 min a 95°C i centrifugar a 13.000 rpm durant 10 min.

La quantificació de l'activació de l'Erk1/2 es va fer mitjançant un WB amb un anticòs específic per l'Erk1/2 fosforilada, utilitzant l'Erk1/2 total com a control de càrrega.

2.17) Assaig de proliferació cel·lular

La proliferació cel·lular es va mesurar a partir de la incorporació de timidina [Me^3H] per part d'unes cèl·lules tractades amb diferents concentracions del tPA.

Per aturar el creixement cel·lular les plaques es van incubar amb DMEM sense FBS o KSFM no suplementat (500 μL /pou) durant dos dies. A continuació es va afegir als pous una solució que contenia timidina [Me^3H] (1 μCi /pou final) en presència del tPA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ finals). Com a control positiu s'utilitzà 1% FBS (F88,2) o 40 ng/mL d'extracte de pituitària bovina i 0,001 ng/mL de EGF (HPDE). Com a control negatiu s'utilitzaren unes cèl·lules crescudes en medi sense FBS o suplementes durant 24 h a 37°C.

Un cop eliminat el medi, cada pou va ser tractat amb 10% d'àcid tricloroàcetic (750 μL /pou) durant 20 min a temperatura ambient. A continuació es van lisar les cèl·lules amb 500 μL /pou de 0,5 M de NaOH durant 1 h a 37°C. Per neutralitzar la solució es va afegir 250 μL /pou de 1 M d'HCl. Els 750 μL finals es van transvasar a un tub de centelleig i s'hi afegí 4 mL de líquid de centelleig OptiPhase Hisafe 2. La radioactivitat [^3H , dpm] es va mesurar en un comptador de centelleig.

3) Protocols

3.1) ELISA competitiu

1. **Incubació** de l'AnxA2 (10 µg/mL en TIE) en plaques de 96 pous (50 µL/pou) tota la nit a 4°C.
2. **Rentats** 3 vegades en TIE (200 µL/pou).
3. **Bloqueig** en TIE (100 µL/pou) 2 h a 37°C.
4. **Incubació** del tPA biotinitat (100 nM en TIE) en presència o absència dels pèptids competidors (10 i 1.000 µM) (50 µL/pou) 2 h a 37°C.
5. **Rentats** 3 vegades amb PBSt amb 0,5% de BSA (200 µL/pou).
6. **Incubació** d'estreptavidina acoblada a fosfatasa alcalina (1 µg/mL en PBS) (50 µL/pou) 1 h a 37°C.
7. **Rentats** 3 vegades amb PBS (200 µL/pou).
8. **Incubació** amb fosfat de 4-metilumbeliferil (1 mg/ml en 0,2 M trietanolamina a pH 8.5) (50 µL/pou) 20 min a temperatura ambient.
9. **Quantificació** amb el fluorímetre Cytofluor 235 amb filtres d'excitació i d'emissió de 360/40 i 460/40 nm, respectivament.

3.2) ELISA competitiu sobre HUVEC

1. **Creixement** de cèl·lules HUVEC en plaques de 96 pous fins a confluència.
2. **Bloqueig** amb TIE (200 µL/pou) 1 h a 37°C.
3. **Incubació** del tPA biotinitat (100 nM en TIE) en presència o absència dels pèptids competidors (10 i 1.000 µM) (50 µL/pou) 1 h a 37°C.
4. **Rentats** 3 cops amb TIE i un cop més amb PBS (200 µL/pou).
5. **Fixació** amb metanol (200 µL/pou) 5 min a -20°C.
6. **Rentats** 3 cops amb PBSt 0,5% BSA (200 µL/pou).
10. **Incubació** d'estreptavidina acoblada a fosfatasa alcalina (1 µg/mL en PBS) (50 µL/pou) 1 h a 37°C.
11. **Rentats** 3 vegades amb PBS (200 µL/pou).
12. **Incubació** amb fosfat de 4-metilumbeliferil (1 mg/ml en 0,2 M trietanolamina a pH 8.5) (50 µL/pou) 20 min a temperatura ambient.
13. **Quantificació** amb el fluorímetre Cytofluor 235 amb filtres d'excitació i d'emissió de 360/40 i 460/40 nm, respectivament.

3.3) Preparació de resina Sefarosa-CNBr acoblada al tPA

1. **Dissolució** del tPA comercial (Actilyse) en aigua MilliQ a una concentració final de 10 mg/mL.
2. **Aliquotació** (1 mL, 10 mg) i emmagatzematge a -80°C .
3. **Diàlisi** 1 mL tPA (10 mg/mL) dintre una membrana de diàlisi de 12-14 kDa de límit d'exclusió contra 2 L de clorur de guanidini 0,9 M en PBS (2 rentats de 2 h i un darrer tota la nit a 4°C).
4. **Hidratar** la resina *Sepharose 4B CNBr-Activated* (100 mg) amb 2 rentats amb HCl 1 mM (pH 3) 5 min a temperatura ambient.
5. **Rentar** resina amb TA. S'obtenen 350 μL de resina hidratada.
6. **Acoblament** del tPA (pH ajustat amb TA 4x) a la resina, 2 h a temperatura ambient amb lleugera agitació.
7. **Inactivació** de la resina amb 5 ml tampó de rentat Tris-HCl a pH 8, 2 h a temperatura ambient amb agitació.
8. **Rentat** en 3 cicles de rentats amb tampó de rentat Tris-HCl a pH 8 i acetat a pH 4.
9. **Emmagatzemament** en PBS, 0,02% amb azida sòdica a 4°C en una dilució 1:5 respecte la resina hidratada.

Les centrifugacions s'han de fer a menys de 2.000 rpm.

Totes les agitacions es realitzaran amb un agitador orbital.

3.4) Pull down

1. **Creixement** de cèl·lules PANC-1 o HUVEC en plaques p150.
2. **.Rentats** dues vegades amb PBS a 37°C.
3. **Lisi** amb tampó de lisi 1% Ttx amb inhibidors de proteases i fosfatases (0,5 mL/placa) 15 min sobre gel.
4. **Centrifugar** a 10.000 rpm 10 min, 4°C i es descarta el precipitat.
5. **Quantificació** mitjançant el mètode de Bradford.
6. **Incubació** de la resina (10 µL/mg de proteïna total) amb en PBS 1% BSA 30 min 4°C.
7. **Incubació** de la resina amb lisat cel·lular 2 h, 4°C amb agitació.
8. **Rentar** 3 cops amb tampó de lisi 1% Ttx 4°C.
9. **Elució** amb tampó IEF en dos rentats de 50 µL 15 min seguit d'un altre rentat de 350 µL de 1 min. El volum final a de ser de 450 µL. Procurar no emportar-se cap partícula de resina.

Les centrifugacions s'han de fer a menys de 2.000 rpm.

Totes les agitacions es realitzaran amb un agitador orbital

Per eliminar els sobrenedants de la resina s'utilitza una xeringa d'insulina amb cura de no arrossegar cap partícula de Sefarosa.

3.5) Purificació de rafts

1. **Creixement** de cèl·lules PANC-1 fins a confluència en plaques p150.
2. **Lisi** amb 0,5 M Na_2CO_3 a pH 11, 1 mL/placa 15 min en fred.
3. **Homogenització** mitjançant sonicació (3 polsos de 20 s a un 20% d'amplitud amb 10 s entre pols i pols).
4. **Barreja** 1:1 amb una solució al 90% de sacarosa en MBS obtenint una solució final al 45% de sacarosa.
5. **Preparació** de dues altres solucions, al 5% i 35%, de sacarosa en MBS, 250mM en Na_2CO_3 , pH 11
6. **Preparació** d'un gradient discontinu de sacarosa (4 mL de la solució al 45%, 4 mL de la del 35% i 3 mL de la del 5%).
7. **Ultracentrifugació** 39.000 rpm 20 h a 4°C.
8. **Recollir** la fracció de rafts entre les fraccions de 35% i 5%.
9. **Diluir** 1:3 en MBS (amb inhibidors de proteases i fosfatases).
10. **Centrifugar** a 13.000 rpm 1 h a 4°C.
11. **Redissolució** del precipitat en TBS, 1% Triton X-100, 20 mM octilglucòsid, amb inhibidors de proteases i fosfatases.
12. **Emmagatzematge a -80°C.**

3.6) Tinció de gels amb nitrat de plata

- 1) **Fixació** 30 min (40% etanol, 10% àcid acètic).
- 2) **Sensibilització** 30 min (6,8% p/v acetat de sodi, 3% p/v tiosulfat sòdic 30% etanol).
- 3) **Rentats** tres canvis de 5 min amb aigua MilliQ.
- 4) **Tinció** amb plata (0,25% nitrat de plata, 0,015% formaldehid).
- 5) **Rentats** dos canvis d'un minut amb aigua MilliQ.
- 6) **Revelat** 10min aproximadament (2,5% carbonat sòdic, 0,007% formaldehid).
- 7) **Aturada** 10 min (1,46% p/v d'EDTA; conservació (8,7% glicerol).

3.7) Digestió enzimàtica de bandes de gels acrilamida

3.7.1) Destenyiment de les bandes tenyides amb *Coomassie Brilliant Blue*

1. **Rentats** dos cops amb 30 μL una solució 50% acetonitril 50% aigua 15 min a temperatura ambient.
2. **Deshidratació** amb 30 μL d'acetonitril 15 min a temperatura ambient.
3. **Rehidratació** amb 30 μL 0,1 M NH_4HCO_3 15 min a temperatura ambient.
4. **Deshidratació** amb 2 rentats d'acetonitril 15 min a temperatura ambient.

3.7.2) Digestió

1. **Reducció** amb 30 μL (10 mM de ditiotretitol en 0,1 M NH_4HCO_3 pH 8-8,3) 45 min a 56°C.
2. **Acetilació** amb 30 μL 55 mM de iodoacetamida (0,1 M NH_4HCO_3 pH 8-8,3) 30 min a temperatura ambient sense llum.
3. **Rentat** amb 30 μL aigua/acetonitril 1:1 2 min temperatura ambient.
4. **Deshidratació** amb 30 μL d'acetonitril 5 min.
5. **Assecat** de la mostra en *speed-vac* 30 min.
6. **Digestió** amb 10 μL de tripsina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0,05 M NH_4HCO_3 pH 8-8,3 durant 30 min en gel.
7. **Addició** de 30 μL del tampó 0,05 M NH_4HCO_3 pH 8-8,3 a temperatura ambient.
8. **Incubació** a 37°C tota la nit.
9. **Aturada** addicionant 5 μL d'àcid fòrmic i emmagatzemat a -20°C.

3.8) Immunofluorescència i migració per curació de ferida

1. **Semrar** cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre. Per HPDE els cobreobjectes són tractats prèviament amb 1% gelatina (1 h, 37°C).
2. **Creixement** de les cèl·lules fins a confluència.
3. **Ferida** a la monocapa cel·lular amb una punta de micropipeta de 100 µL (grogà).
4. **Rentat** amb DMEM 1% BSA per eliminar cèl·lules mortes en suspensió.
5. **Addició** de 1 mL de DMEM 0,5% FBS (F88,2. Sk-PC-1 i PANC-1) i KSFM suplementat (HPDE).
6. **Curació** de la ferida (16 h per F88,2 i HPDE, 2 4h per SK-PC-1, 48 h per PANC-1) a 37°C.
7. **Rentat** 1 cop amb DMEM-B
8. **Incubació amb α-gal 1** (40 µg/mL en DMEM-B) durant 15 min a 37°C (20 µL/cobreobjectes).
9. **Rentats** 3 cops amb DMEM-B i 2 cops més amb PBS.
10. **Fixació** amb metanol a -20°C durant 5 min.
11. **Rentat** amb DMEM 1% BSA.
12. **Incubació amb α-tPA 373** (10 µg/mL en PBS 1% BSA) durant 1 h a 37°C (20 µL/cobreobjectes).
13. **Rentat** 3 vegades amb PBS 1% BSA.
14. **Incubació amb anticòs secundari** de conill acoblat a FITC per a la gal 1 i de ratolí acoblat a TRITC pel tPA (10 µg/mL en PBS 1% BSA) durant 1 h a 37°C (20 µL/cobreobjectes).
15. **Rentat** 3 vegades amb PBS 1% BSA, una vegada amb PBS, una vegada més amb aigua MilliQ i una darrera amb etanol.
16. **Assecat dels cobreobjectes i muntatge** sobre portaobjectes utilitzant el reactiu Fluoromont-G.

3.9) WB

1. **Bloqueig** d'una hora en TBSt amb 5% de llet desnatada en pols.
2. **Incubació** amb l'anticòs primari corresponent (diluït en TBSt amb 1% BSA i 0,5% de llet desnatada en pols) durant 1 h a temperatura ambient.
3. **Rentar** 3 cops de 10 min en TBSt.
4. **Incubació** amb l'anticòs secundari acoblat a peroxidasa de rave (HRP) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBSt) durant 1h a temperatura ambient.
5. **Rentar** 3 vegades de 10 min de TBSt,
6. **Revelat** amb el substrat específic de HRP, *ECL*, durant 1 minut.
7. **Exposició** de la membrana sobre pel·lícules fotogràfiques Agfa-Curix.

3.10) Inhibició de l'expressió de la gal 1 mitjançant siRNA

1. **Sembrar HPDE** sobre plaques de 24 pous (2×10^4 cèl·lules/pou).
2. **Estabilització** de les cèl·lules en KSFM suplementat durant 24 h a 37°C.
3. **Incubació** de 0,5 µL de siRNA (50 µM) i 60 µL de PLUS en OPTIMEM fins a 320 µL (per cada transfecció de 12 pous) 15 min a temperatura ambient.
4. **Addició i incubació** de 290 µL d'OPTIMEM i 30 µL de lipofectamina 15 min a temperatura ambient.

Rentar els pous amb PBS i cobrir amb 150 µL/pou d'OPTIMEM.

5. **Addició** de 50 µL/pou de la solució amb siRNA a cada pou (concentració final: 10 nM de siRNA).
6. **Incubar** 5 h a 37°C.
7. **Eliminació** el medi de transfecció.
8. **Incubació** en KSFM suplementat (HPDE) 1 mL/pou durant 36 h a 37°C.

3.11) Assaig d'activació de la MAP quinasa Erk1/2

1. **Aturada del cicle cel·lular** deixant les cèl·lules amb DMEM sense FBS 2 dies (MEFs) o KSFM no suplementat 3 dies 37°C (HPDE) 500 µL/pouet.
2. **Activació de l'Erk1/2** amb el tPA (10 µg/mL finals) 2, 5, 10 i 20 min a 37°C. Com a control positiu DMEM 1% FBS (MEFs) o KSFM amb 40 ng/mL d'extracte de pituitària bovina i 0,001 ng/mL de EGF (HPDE). El nivell basal es considerà per cèl·lules tractades amb medi no suplementat.
3. **Aturada** eliminant el medi i congelant les plaques ràpidament amb nitrogen líquid.
4. **Emmagatzematge** de les plaques a -80°C fins a ser processades.
5. **Lisi** amb tampó *Laemmli* 50 µL/pou a 90°C. Rascar cada pou amb una punta de micropipeta i deixar 10 min en gel.
6. **Bullir** durant 10 min.
7. **Centrifugació** a 13.000 rpm durant 10 min.
8. **Qualificació** de l'activació de l'Erk1/2 mitjançant WB amb un anticòs específic per Erk1/2 fosforilada, utilitzant Erk1/2 total com a control de càrrega.

3.12) Assaig de proliferació cel·lular mitjançant incorporació de timidina tritiada

1. **Aturada del cicle cel·lular** deixant les cèl·lules amb DMEM sense FBS (F88,2) o KSFM no suplementat (HPDE) (500 µL/pou) 2 dies 37°C.
2. **Activació de la proliferació** amb el tPA (2 µg/mL o 10 µg/mL finals) en presència de timidina [^3H] (1 µCi/pou) 24 h a 37°C. Com a control positiu DMEM 1% FBS (F88,2) o KSFM amb 40 ng/mL d'extracte de pituitària bovina i 0,001 ng/mL de EGF (HPDE). El nivell basal es considerarà per cèl·lules tractades amb medi no suplementat.
3. **Eliminació del medi.**
4. **Precipitació** amb 10% d'àcid tricloroacètic 750 µL/pou 20 min a temperatura ambient.
5. **Lisi** de les cèl·lules amb 0,5 M NaOH 500 µL/pou 1 h a 37°C.
6. **Neutralització** amb 1 M HCl 250 µL/pou.
7. **Traspàs a un tub de centelleig.**
8. **Addició** de 4 mL de líquid de centelleig OptiPhase Hisafe 2.
9. **Comptatge** de radiació (^3H , dpm) amb el comptador de centelleig "WinSpectral".

INTRODUCCIÓ
OBJECTIUS
RESULTATS
DISCUSSIÓ
CONCLUSIONS
MATERIALS I MÈTODES
BIBLIOGRAFIA



1. Edlund H: **Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**: 524-532.
2. Slack JM: **Developmental biology of the pancreas.** *Development* 1995, **121**: 1569-1580.
3. Garcia SB, Novelli M, Wright NA: **The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours.** *Int J Exp Pathol* 2000, **81**: 89-116.
4. Going JJ: **Epithelial carcinogenesis: challenging monoclonality.** *J Pathol* 2003, **200**: 1-3.
5. Ilyas M, Tomlinson IP: **Genetic pathways in colorectal cancer.** *Histopathology* 1996, **28**: 389-399.
6. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**: 57-70.
7. Klöppel G, Fitzgerald PJ: In *The exocrine pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases*. Edited by Go VLW, Brooks FP, Di Magno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Scheele GA. New York: Raven Press; 1986:649-674.
8. Longnecker DS: **Experimental models of exocrine pancreatic tumors.** In *The Exocrine Pancreas Biology: Biology, Pathobiology and Diseases*. Edited by Go VLW, Brooks FP, Di Magno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Scheele GA. New York: Raven Press; 1986:443-458.
9. Klein WM, Hruban RH, Klein-Szanto AJ, Wilentz RE: **Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression.** *Mod Pathol* 2002, **15**: 441-447.
10. Real FX: **A "catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression.** *Gastroenterology* 2003, **124**: 1958-1964.
11. Paciucci R, Vila MR, Adell T, Diaz VM, Tora M, Nakamura T *et al.*: **Activation of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system and redistribution of E-cadherin are associated with hepatocyte growth factor-induced motility of pancreas tumor cells overexpressing Met.** *Am J Pathol* 1998, **153**: 201-212.
12. Kiehne K, Herzig KH, Folsch UR: **c-met expression in pancreatic cancer and effects of hepatocyte growth factor on pancreatic cancer cell growth.** *Pancreas* 1997, **15**: 35-40.
13. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: **Fibroblast growth factor.** *Mol Cell Endocrinol* 1986, **46**: 187-204.
14. Leung HY, Gullick WJ, Lemoine NR: **Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer.** *Int J Cancer* 1994, **59**: 667-675.

15. Lawrence DA: **Transforming growth factor-beta: a general review.** *Eur Cytokine Netw* 1996, **7**: 363-374.
16. Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI *et al.*: **Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival.** *Gastroenterology* 1993, **105**: 1846-1856.
17. Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W *et al.*: **High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.** *Cell* 1993, **72**: 835-846.
18. Itakura J, Ishiwata T, Friess H, Fujii H, Matsumoto Y, Buchler MW *et al.*: **Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression.** *Clin Cancer Res* 1997, **3**: 1309-1316.
19. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE, Jr.: **Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** *FASEB J* 1993, **7**: 1434-1441.
20. Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR: **Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma.** *J Pathol* 1997, **182**: 347-355.
21. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M: **Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes.** *Cell* 1988, **53**: 549-554.
22. Hilgers W, Kern SE: **Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma.** *Genes Chromosomes Cancer* 1999, **26**: 1-12.
23. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC *et al.*: **AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**: 9267-9271.
24. Lemoine NR, Hughes CM, Barton CM, Poulson R, Jeffery RE, Kloppel G *et al.*: **The epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer.** *J Pathol* 1992, **166**: 7-12.
25. Hall PA, Hughes CM, Staddon SL, Richman PI, Gullick WJ, Lemoine NR: **The c-erb B-2 proto-oncogene in human pancreatic cancer.** *J Pathol* 1990, **161**: 195-200.
26. Serrano M, Hannon GJ, Beach D: **A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.** *Nature* 1993, **366**: 704-707.
27. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB *et al.*: **Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma.** *Nat Genet* 1994, **8**: 27-32.

28. Levine AJ: **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell* 1997, **88**: 323-331.
29. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E *et al.*: **K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions.** *Cancer Res* 1994, **54**: 1556-1560.
30. Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL *et al.*: **DPC4 gene in various tumor types.** *Cancer Res* 1996, **56**: 2527-2530.
31. Albert BL: **Risk factors for pancreatic cancer.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2005, **95**: 649-656.
32. Bardeesy N, Sharpless NE, DePinho RA, Merlino G: **The genetics of pancreatic adenocarcinoma: a roadmap for a mouse model.** *Semin Cancer Biol* 2001, **11**: 201-218.
33. Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE: **Synthesis of human plasminogen by the liver.** *Science* 1980, **208**: 1036-1037.
34. Robbins KC, Summaria L, Hsieh B, Shah RJ: **The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin.** *J Biol Chem* 1967, **242**: 2333-2342.
35. Forsgren M, Raden B, Israelsson M, Larsson K, Heden LO: **Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen.** *FEBS Lett* 1987, **213**: 254-260.
36. Cesarman-Maus G, Hajjar KA: **Molecular mechanisms of fibrinolysis.** *Br J Haematol* 2005, **129**: 307-321.
37. Hajjar KA: **The molecular basis of fibrinolysis.** In: *Hematology of Infancy and Childhood*. Edited by D.G.Nathan, A.T.Look, D.Ginsburg, S.H.Orkin. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Co.; 2003:1497-1514.
38. Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L: **Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer.** *Adv Cancer Res* 1985, **44**: 139-266.
39. DeClerck YA, Imren S, Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Laug WE: **Proteases and protease inhibitors in tumor progression.** *Adv Exp Med Biol* 1997, **425**: 89-97.
40. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P *et al.*: **Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation.** *Nat Genet* 1997, **17**: 439-444.
41. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK: **Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA.** *Am J Pathol* 1993, **143**: 949-958.

42. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: **Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 26031-26037.
43. Saksela O, Rifkin DB: **Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions.** *Annu Rev Cell Biol* 1988, **4**: 93-126.
44. Kasai S, Arimura H, Nishida M, Suyama T: **Primary structure of single-chain pro-urokinase.** *J Biol Chem* 1985, **260**: 12382-12389.
45. Birchmeier C, Gherardi E: **Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase.** *Trends Cell Biol* 1998, **8**: 404-410.
46. Keski-Oja J, Vaheri A: **The cellular target for the plasminogen activator, urokinase, in human fibroblasts - 66 000 dalton protein.** *Biochim Biophys Acta* 1982, **720**: 141-146.
47. Nielsen LS, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Skriver L, Dano K: **Plasminogen activators catalyse conversion of inhibitor from fibrosarcoma cells to an inactive form with a lower apparent molecular mass.** *FEBS Lett* 1986, **196**: 269-273.
48. Blasi F: **Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system.** *Thromb Haemost* 1999, **82**: 298-304.
49. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ: **The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.** *Int J Cancer* 1997, **72**: 1-22.
50. Huai Q, Mazar AP, Kuo A, Parry GC, Shaw DE, Callahan J *et al.*: **Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor.** *Science* 2006, **311**: 656-659.
51. Lijnen HR: **Elements of the fibrinolytic system.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **936**: 226-236.
52. Sasaki T, Morita T, Iwanaga S: **Identification of the plasminogen-binding site of human alpha 2-plasmin inhibitor.** *J Biochem (Tokyo)* 1986, **99**: 1699-1705.
53. Aoki N, Moroi M, Tachiya K: **Effects of alpha2-plasmin inhibitor on fibrin clot lysis. Its comparison with alpha2-macroglobulin.** *Thromb Haemost* 1978, **39**: 22-31.
54. Rijken DC, Juhan-Vague I, Collen D: **Complexes between tissue-type plasminogen activator and proteinase inhibitors in human plasma, identified with an immunoradiometric assay.** *J Lab Clin Med* 1983, **101**: 285-294.
55. Huisman LG, van Griensven JM, Kluft C: **On the role of C1-inhibitor as inhibitor of tissue-type plasminogen activator in human plasma.** *Thromb Haemost* 1995, **73**: 466-471.

56. Ny T, Sawdey M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ: **Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**: 6776-6780.
57. Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ: **Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide.** *J Clin Invest* 1996, **97**: 37-46.
58. Ehrlich HJ, Keijer J, Preissner KT, Gebbink RK, Pannekoek H: **Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin.** *Biochemistry* 1991, **30**: 1021-1028.
59. Cubellis MV, Andreasen P, Ragno P, Mayer M, Dano K, Blasi F: **Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**: 4828-4832.
60. Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL: **Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2.** *Blood* 1995, **86**: 4007-4024.
61. Uhrin P, Dewerchin M, Hilpert M, Chrenek P, Schofer C, Zechmeister-Machhart M *et al.*: **Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility.** *J Clin Invest* 2000, **106**: 1531-1539.
62. Stump DC, Thienpont M, Collen D: **Purification and characterization of a novel inhibitor of urokinase from human urine. Quantitation and preliminary characterization in plasma.** *J Biol Chem* 1986, **261**: 12759-12766.
63. Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, Sonderegger P: **Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor.** *EMBO J* 1996, **15**: 2944-2953.
64. Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF: **Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system.** *J Clin Invest* 1995, **96**: 2534-2538.
65. Navarro P: **The plasminogen system and pancreas cancer.** In *Exocrine pancreas cancer*. Edited by Gress TM, Neoptolemos J, Lemoine NR, Real FX. Solvay; 2005:456-470.
66. Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S: **Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane.** *J Neurochem* 1994, **63**: 2048-2057.
67. Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA: **The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells.** *Eur J Biochem* 1995, **227**: 407-415.
68. Parkkinen J, Rauvala H: **Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-**

- PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin.** *J Biol Chem* 1991, **266**: 16730-16735.
69. Miles LA, Ginsberg MH, White JG, Plow EF: **Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms.** *J Clin Invest* 1986, **77**: 2001-2009.
70. Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV: **Characterization of the plasminogen receptors of normal and rheumatoid arthritis human synovial fibroblasts.** *J Biol Chem* 1994, **269**: 4360-4366.
71. Miles LA, Dahlberg CM, Levin EG, Plow EF: **Gangliosides interact directly with plasminogen and urokinase and may mediate binding of these fibrinolytic components to cells.** *Biochemistry* 1989, **28**: 9337-9343.
72. Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y: **The plasminogen activator system: biology and regulation.** *Cell Mol Life Sci* 1999, **56**: 104-132.
73. Hajjar KA: **Cellular receptors in the regulation of plasmin generation.** *Thromb Haemost* 1995, **74**: 294-301.
74. Xue W, Kindzelskii AL, Todd RF, III, Petty HR: **Physical association of complement receptor type 3 and urokinase-type plasminogen activator receptor in neutrophil membranes.** *J Immunol* 1994, **152**: 4630-4640.
75. Ellis V, Behrendt N, Dano K: **Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor.** *J Biol Chem* 1991, **266**: 12752-12758.
76. Konakova M, Hucho F, Schleuning WD: **Downstream targets of urokinase-type plasminogen-activator-mediated signal transduction.** *Eur J Biochem* 1998, **253**: 421-429.
77. Blasi F, Carmeliet P: **uPAR: a versatile signalling orchestrator.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**: 932-943.
78. Chapman HA: **Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration.** *Curr Opin Cell Biol* 1997, **9**: 714-724.
79. Blasi F: **uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?** *Immunol Today* 1997, **18**: 415-417.
80. Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL et al.: **Plasminogen and wound healing.** *Nat Med* 1996, **2**: 725.
81. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH: **The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis.** *Cell Mol Life Sci* 2000, **57**: 25-40.
82. Friedman GC, Seeds NW: **Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system.** *Brain Res Dev Brain Res* 1994, **81**: 41-49.

83. Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC, Degen JL: **Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction.** *Genes Dev* 1995, **9**: 794-807.
84. Gyetko MR, Chen GH, McDonald RA, Goodman R, Huffnagle GB, Wilkinson CC *et al.*: **Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model.** *J Clin Invest* 1996, **97**: 1818-1826.
85. Medina MG, Ledesma MD, Dominguez JE, Medina M, Zafra D, Alameda F *et al.*: **Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation.** *EMBO J* 2005.
86. Mazar AP, Henkin J, Goldfarb RH: **The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis.** *Angiogenesis* 1999, **3**: 15-32.
87. Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM *et al.*: **Emerging roles for proteinases in cancer.** *Invasion Metastasis* 1997, **17**: 221-239.
88. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ *et al.*: **Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section.** *Am J Pathol* 2004, **164**: 1131-1139.
89. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: **Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.** *Cell* 1991, **64**: 327-336.
90. Nguyen DH, Hussaini IM, Gonias SL: **Binding of urokinase-type plasminogen activator to its receptor in MCF-7 cells activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 which is required for increased cellular motility.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 8502-8507.
91. Busso N, Masur SK, Lazega D, Waxman S, Ossowski L: **Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells.** *J Cell Biol* 1994, **126**: 259-270.
92. Wilson AJ, Gibson PR: **Role of urokinase and its receptor in basal and stimulated colonic epithelial cell migration in vitro.** *Gut* 2000, **47**: 105-111.
93. Stahl A, Mueller BM: **Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro.** *Cancer Res* 1994, **54**: 3066-3071.
94. Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB: **Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade.** *Cell* 1986, **47**: 487-498.
95. Harvey SR, Hurd TC, Markus G, Martinick MI, Penetrante RM, Tan D *et al.*: **Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**: 4935-4943.

96. Cantero D, Friess H, Deflorin J, Zimmermann A, Brundler MA, Riesle E *et al.*: **Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma.** *Br J Cancer* 1997, **75**: 388-395.
97. Paciucci R, Tora M, Diaz VM, Real FX: **The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro.** *Oncogene* 1998, **16**: 625-633.
98. Friess H, Cantero D, Graber H, Tang WH, Guo X, Kashiwagi M *et al.*: **Enhanced urokinase plasminogen activation in chronic pancreatitis suggests a role in its pathogenesis.** *Gastroenterology* 1997, **113**: 904-913.
99. Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HR: **Tissue-type plasminogen activator, a new prognostic marker in breast cancer.** *Cancer Res* 1988, **48**: 1348-1349.
100. Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P: **Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer.** *Cancer Res* 1990, **50**: 6827-6829.
101. Oka T, Ishida T, Nishino T, Sugimachi K: **Immunohistochemical evidence of urokinase-type plasminogen activator in primary and metastatic tumors of pulmonary adenocarcinoma.** *Cancer Res* 1991, **51**: 3522-3525.
102. Hasui Y, Marutsuka K, Suzumiya J, Kitada S, Osada Y, Sumiyoshi A: **The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer.** *Int J Cancer* 1992, **50**: 871-873.
103. Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K *et al.*: **Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer.** *Cancer Res* 1994, **54**: 2900-2907.
104. Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP *et al.*: **Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer.** *Lancet* 1994, **344**: 583-584.
105. Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T: **Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus.** *Cancer Res* 1994, **54**: 6539-6548.
106. Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Janicke F *et al.*: **Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy.** *Gynecol Oncol* 1994, **55**: 401-409.
107. Hofmann R, Lehmer A, Hartung R, Robrecht C, Buresch M, Grothe F: **Prognostic value of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in renal cell cancer.** *J Urol* 1996, **155**: 858-862.

108. Zhang X, Bu X, Zhen H, Fei Z, Wu J, Gu J *et al.*: **Expression and significance of urokinase-type plasminogen activator in human gliomas.** *Chin Med J (Engl)* 2000, **113**: 802-804.
109. Choong PF, Ferno M, Akerman M, Willen H, Langstrom E, Gustafson P *et al.*: **Urokinase-plasminogen-activator levels and prognosis in 69 soft-tissue sarcomas.** *Int J Cancer* 1996, **69**: 268-272.
110. Evans DM, Lin PL: **Suppression of pulmonary metastases of rat mammary cancer by recombinant urokinase plasminogen activator inhibitor.** *Am Surg* 1995, **61**: 692-696.
111. Nagayama M, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A: **Plasminogen activators and their inhibitors in non-small cell lung cancer. Low content of type 2 plasminogen activator inhibitor associated with tumor dissemination.** *Cancer* 1994, **73**: 1398-1405.
112. Ganesh S, Sier CF, Heerding MM, Griffioen G, Lamers CB, Verspaget HW: **Urokinase receptor and colorectal cancer survival.** *Lancet* 1994, **344**: 401-402.
113. Duggan C, Maguire T, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Duffy MJ: **Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer.** *Int J Cancer* 1995, **61**: 597-600.
114. Pedersen H, Brunner N, Francis D, Osterlind K, Ronne E, Hansen HH *et al.*: **Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue.** *Cancer Res* 1994, **54**: 4671-4675.
115. Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW *et al.*: **Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer.** *Nat Med* 1995, **1**: 1035-1039.
116. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA *et al.*: **Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli.** *Nature* 1983, **301**: 214-221.
117. Tate KM, Higgins DL, Holmes WE, Winkler ME, Heyneker HL, Vehar GA: **Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis.** *Biochemistry* 1987, **26**: 338-343.
118. JuanFran, de la Peca X, Cabeza Bolo M: **High expression of tPA in armenian citizens leads into an increased comercialization of raisins.** *J of JuanFran friends* 2006, **1**: 1-2.
119. Otter M, Kuiper J, van Berkel TJ, Rijken DC: **Mechanisms of tissue-type plasminogen activator (tPA) clearance by the liver.** *Ann N Y Acad Sci* 1992, **667**: 431-442.
120. Einarsson M, Smedsrod B, Pertoft H: **Uptake and degradation of tissue plasminogen activator in rat liver.** *Thromb Haemost* 1988, **59**: 474-479.

121. Ahern TJ, Morris GE, Barone KM, Horgan PG, Timony GA, Angus LB *et al.*: **Site-directed mutagenesis in human tissue-plasminogen activator. Distinguishing sites in the amino-terminal region required for full fibrinolytic activity and rapid clearance from the circulation.** *J Biol Chem* 1990, **265**: 5540-5545.
122. Collen D, Stassen JM, Larsen G: **Pharmacokinetics and thrombolytic properties of deletion mutants of human tissue-type plasminogen activator in rabbits.** *Blood* 1988, **71**: 216-219.
123. Orth K, Madison EL, Gething MJ, Sambrook JF, Herz J: **Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**: 7422-7426.
124. Willnow TE, Goldstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J: **Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 26172-26180.
125. Otter M, Barrett-Bergshoeff MM, Rijken DC: **Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor.** *J Biol Chem* 1991, **266**: 13931-13935.
126. Hajjar KA, Reynolds CM: **alpha-Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells.** *J Clin Invest* 1994, **93**: 703-710.
127. Salonen EM, Saksela O, Vartio T, Vaheri A, Nielsen LS, Zeuthen J: **Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin.** *J Biol Chem* 1985, **260**: 12302-12307.
128. Moser TL, Enghild JJ, Pizzo SV, Stack MS: **The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin contain binding domains for human plasminogen and tissue plasminogen activator.** *J Biol Chem* 1993, **268**: 18917-18923.
129. Stack MS, Gray RD, Pizzo SV: **Modulation of murine B16F10 melanoma plasminogen activator production by a synthetic peptide derived from the laminin A chain.** *Cancer Res* 1993, **53**: 1998-2004.
130. Hajjar KA, Hamel NM, Harpel PC, Nachman RL: **Binding of tissue plasminogen activator to cultured human endothelial cells.** *J Clin Invest* 1987, **80**: 1712-1719.
131. Sanzo MA, Howard SC, Wittwer AJ, Cochrane HM: **Binding of tissue plasminogen activator to human aortic endothelial cells.** *Biochem J* 1990, **269**: 475-482.
132. Beebe DP: **Binding of tissue plasminogen activator to human umbilical vein endothelial cells.** *Thromb Res* 1987, **46**: 241-254.

133. Barnathan ES, Kuo A, Van der KH, McCrae KR, Larsen GR, Cines DB: **Tissue-type plasminogen activator binding to human endothelial cells. Evidence for two distinct binding sites.** *J Biol Chem* 1988, **263**: 7792-7799.
134. Reilly TM, Whitfield MD, Taylor DS, Timmermans PB: **Binding of tissue plasminogen activator to cultured human fibroblasts.** *Thromb Haemost* 1989, **61**: 454-458.
135. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J: **An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II.** *J Biol Chem* 1994, **269**: 21191-21197.
136. Ellis V, Whawell SA: **Vascular smooth muscle cells potentiate plasmin generation by both urokinase and tissue plasminogen activator-dependent mechanisms: evidence for a specific tissue-type plasminogen activator receptor on these cells.** *Blood* 1997, **90**: 2312-2322.
137. Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA: **An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation.** *J Biol Chem* 1994, **269**: 21198-21203.
138. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H: **30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane.** *J Biol Chem* 1991, **266**: 16722-16729.
139. Paciucci R, Berrozpe G, Tora M, Navarro E, Garcia dH, Real FX: **Isolation of tissue-type plasminogen activator, cathepsin H, and non-specific cross-reacting antigen from SK-PC-1 pancreas cancer cells using subtractive hybridization.** *FEBS Lett* 1996, **385**: 72-76.
140. Hembrough TA, Kralovich KR, Li L, Gonias SL: **Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation.** *Biochem J* 1996, **317 (Pt 3)**: 763-769.
141. Felez J, Chanquia CJ, Fabregas P, Plow EF, Miles LA: **Competition between plasminogen and tissue plasminogen activator for cellular binding sites.** *Blood* 1993, **82**: 2433-2441.
142. Razzaq TM, Bass R, Vines DJ, Werner F, Whawell SA, Ellis V: **Functional regulation of tissue plasminogen activator on the surface of vascular smooth muscle cells by the type-II transmembrane protein p63 (CKAP4).** *J Biol Chem* 2003, **278**: 42679-42685.
143. Bu G, Morton PA, Schwartz AL: **Identification and partial characterization by chemical cross-linking of a binding protein for tissue-type plasminogen activator (t-PA) on rat hepatoma cells. A**

- plasminogen activator inhibitor type 1-independent t-PA receptor. *J Biol Chem* 1992, **267**: 15595-15602.**
144. Beebe DP, Wood LL, Moos M: **Characterization of tissue plasminogen activator binding proteins isolated from endothelial cells and other cell types.** *Thromb Res* 1990, **59**: 339-350.
145. Hembrough TA, Li L, Gonias SL: **Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 25684-25691.
146. Grondahl-Hansen J, Bach F, Munkholm-Larsen P: **Tissue-type plasminogen activator in plasma from breast cancer patients determined by enzyme-linked immunosorbent assay.** *Br J Cancer* 1990, **61**: 412-414.
147. Verspaget HW, Sier CF, Ganesh S, Griffioen G, Lamers CB: **Prognostic value of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer.** *Eur J Cancer* 1995, **31A**: 1105-1109.
148. Cajot JF, Sordat B, Bachmann F: **Human primary colon carcinomas xenografted into nude mice. II. Modulation of tumor plasminogen activator activity by the host tissue environment.** *J Natl Cancer Inst* 1986, **77**: 1099-1107.
149. Cajot JF, Bamat J, Bergonzelli GE, Kruithof EK, Medcalf RL, Testuz J *et al.*: **Plasminogen-activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 6939-6943.
150. Nordengren J, Casslen B, Gustavsson B, Einarsdottir M, Willen R: **Discordant expression of mRNA and protein for urokinase and tissue plasminogen activators (u-PA, t-PA) in endometrial carcinoma.** *Int J Cancer* 1998, **79**: 195-201.
151. Herlyn D, Iliopoulos D, Jensen PJ, Parmiter A, Baird J, Hotta H *et al.*: **In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice.** *Cancer Res* 1990, **50**: 2296-2302.
152. Colombi M, Bellotti D, De PG, Barlati S: **Plasminogen activators in nude mice xenotransplanted with human tumorigenic cells.** *Invasion Metastasis* 1995, **15**: 22-33.
153. Sugiura Y, Ma L, Sun B, Shimada H, Laug WE, Seeger RC *et al.*: **The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis.** *Cancer Res* 1999, **59**: 1327-1336.
154. Kinder DH, Berger MS, Mueller BA, Silber JR: **Urokinase plasminogen activator is elevated in human astrocytic gliomas relative to normal adjacent brain.** *Oncol Res* 1993, **5**: 409-414.

155. Lindgren M, Johansson M, Sandstrom J, Jonsson Y, Bergenheim AT, Henriksson R: **VEGF and tPA co-expressed in malignant glioma.** *Acta Oncol* 1997, **36**: 615-618.
156. Sandstrom M, Johansson M, Sandstrom J, Bergenheim AT, Henriksson R: **Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression.** *Int J Dev Neurosci* 1999, **17**: 473-481.
157. Wilson EL, Jacobs P, Dowdle EB: **The secretion of plasminogen activators by human myeloid leukemic cells in vitro.** *Blood* 1983, **61**: 568-574.
158. Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA: **Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia.** *N Engl J Med* 1999, **340**: 994-1004.
159. Reiter LS, Spertini O, Kruithof EK: **Plasminogen activators play an essential role in extracellular-matrix invasion by lymphoblastic T cells.** *Int J Cancer* 1997, **70**: 461-466.
160. Wada H, Kumeda Y, Ogasawara Z, Minamikawa K, Wakita Y, Nakase T *et al.*: **Stimulation of tissue type plasminogen activator by leukaemic cell homogenates.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993, **4**: 591-597.
161. Saito K, Nagashima M, Iwata M, Hamada H, Sumiyoshi K, Takada Y *et al.*: **The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissues of patients with ovarian and uterine tumors.** *Thromb Res* 1990, **58**: 355-366.
162. Moser TL, Young TN, Rodriguez GC, Pizzo SV, Bast RC, Jr., Stack MS: **Secretion of extracellular matrix-degrading proteinases is increased in epithelial ovarian carcinoma.** *Int J Cancer* 1994, **56**: 552-559.
163. De PG, Taviani D, Copeta A, Portolani N, Giulini SM, Barlati S: **Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 1998, **58**: 2234-2239.
164. Medina MG, Ledesma MD, Dominguez JE, Medina M, Zafra D, Alameda F *et al.*: **Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation.** *EMBO J* 2005.
165. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y: **Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression.** *J Biol Chem* 2005.
166. Diaz VM, Planaguma J, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R: **Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells.** *Gastroenterology* 2002, **122**: 806-819.

167. Aguilar S, Corominas JM, Malats N, Dufresne M, Real FX, Navarro P: **Tissue plasminogen activator in murine exocrine pancreas cancer: selective expression in ductal tumors and contribution to cancer progression.** *Am J Pathol* 2003.
168. Tran JT, Rosengarth A, Luecke H: **Cloning, purification and crystallization of full-length human annexin 2.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002, **58**: 1854-1857.
169. Waisman DM: **Annexin II tetramer: structure and function.** *Mol Cell Biochem* 1995, **149-150**: 301-322.
170. Gerke V, Moss SE: **Annexins: from structure to function.** *Physiol Rev* 2002, **82**: 331-371.
171. Brownstein C, Falcone DJ, Jacovina A, Hajjar KA: **A mediator of cell surface-specific plasmin generation.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **947**: 143-155.
172. Huang KS, Wallner BP, Mattaliano RJ, Tizard R, Burne C, Frey A et al.: **Two human 35 kd inhibitors of phospholipase A2 are related to substrates of pp60v-src and of the epidermal growth factor receptor/kinase.** *Cell* 1986, **46**: 191-199.
173. Radke K, Gilmore T, Martin GS: **Transformation by Rous sarcoma virus: a cellular substrate for transformation-specific protein phosphorylation contains phosphotyrosine.** *Cell* 1980, **21**: 821-828.
174. Roda O, Valero ML, Peiro S, Andreu D, Real FX, Navarro P: **New Insights into the tPA-Annexin A2 Interaction. IS ANNEXIN A2 CYS8 THE SOLE REQUIREMENT FOR THIS ASSOCIATION?** *J Biol Chem* 2003, **278**: 5702-5709.
175. MacLeod TJ, Kwon M, Filipenko NR, Waisman DM: **Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits: characterization of the interaction with tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 25577-25584.
176. Glenney J: **Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca²⁺-dependent manner.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**: 4258-4262.
177. Jost M, Thiel C, Weber K, Gerke V: **Mapping of three unique Ca(2+)-binding sites in human annexin II.** *Eur J Biochem* 1992, **207**: 923-930.
178. Kang HM, Kassam G, Jarvis SE, Fitzpatrick SL, Waisman DM: **Characterization of human recombinant annexin II tetramer purified from bacteria: role of N-terminal acetylation.** *Biochemistry* 1997, **36**: 2041-2050.
179. Gerke V, Weber K: **Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush**

- borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin.** *EMBO J* 1984, **3**: 227-233.
180. Nilius B, Gerke V, Prenen J, Szucs G, Heinke S, Weber K *et al.*: **Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 30631-30636.
181. Hajjar KA, Guevara CA, Lev E, Dowling K, Chacko J: **Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 21652-21659.
182. Hajjar KA, Krishnan S: **Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system.** *Trends Cardiovasc Med* 1999, **9**: 128-138.
183. Ohnishi M, Tokuda M, Masaki T, Fujimura T, Tai Y, Matsui H *et al.*: **Changes in annexin I and II levels during the postnatal development of rat pancreatic islets.** *J Cell Sci* 1994, **107 (Pt 8)**: 2117-2125.
184. Ahmed M, Forsberg J, Bergsten P: **Protein profiling of human pancreatic islets by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *J Proteome Res* 2005, **4**: 931-940.
185. Burgoyne RD, Morgan A, Roth D: **Characterization of proteins that regulate calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **710**: 333-346.
186. Gruenberg J, Emans N: **Annexins in membrane traffic.** *Trends Cell Biol* 1993, **3**: 224-227.
187. Nakata T, Sobue K, Hirokawa N: **Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry.** *J Cell Biol* 1990, **110**: 13-25.
188. Senda T, Okabe T, Matsuda M, Fujita H: **Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II.** *Cell Tissue Res* 1994, **277**: 51-60.
189. Blackwood RA, Ernst JD: **Characterization of Ca²⁺(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins.** *Biochem J* 1990, **266**: 195-200.
190. Johnstone SA, Hubaishy I, Waisman DM: **Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 25976-25981.
191. Faure AV, Migne C, Devilliers G, yala-Sanmartin J: **Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release.** *Exp Cell Res* 2002, **276**: 79-89.

192. Wirl G, Schwartz-Albiez R: **Collagen-binding proteins of mammary epithelial cells are related to Ca²⁺(+)- and phospholipid-binding annexins.** *J Cell Physiol* 1990, **144**: 511-522.
193. Robitzki A, Schroder HC, Ugarkovic D, Pfeifer K, Uhlenbruck G, Muller WE: **Demonstration of an endocrine signaling circuit for insulin in the sponge *Geodia cydonium*.** *EMBO J* 1989, **8**: 2905-2909.
194. Filipenko NR, Waisman DM: **The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 5310-5315.
195. Merrifield CJ, Rescher U, Almers W, Proust J, Gerke V, Sechi AS *et al.*: **Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing.** *Curr Biol* 2001, **11**: 1136-1141.
196. Babiychuk EB, Draeger A: **Annexins in cell membrane dynamics. Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains.** *J Cell Biol* 2000, **150**: 1113-1124.
197. Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C *et al.*: **AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture.** *J Cell Biol* 2004, **164**: 133-144.
198. Kumble KD, Vishwanatha JK: **Immunoelectron microscopic analysis of the intracellular distribution of primer recognition proteins, annexin 2 and phosphoglycerate kinase, in normal and transformed cells.** *J Cell Sci* 1991, **99 (Pt 4)**: 751-758.
199. Jindal HK, Chaney WG, Anderson CW, Davis RG, Vishwanatha JK: **The protein-tyrosine kinase substrate, calpactin I heavy chain (p36), is part of the primer recognition protein complex that interacts with DNA polymerase alpha.** *J Biol Chem* 1991, **266**: 5169-5176.
200. Kumble KD, Hirota M, Pour PM, Vishwanatha JK: **Enhanced levels of annexins in pancreatic carcinoma cells of Syrian hamsters and their intrapancreatic allografts.** *Cancer Res* 1992, **52**: 163-167.
201. Vishwanatha JK, Kumble S: **Involvement of annexin II in DNA replication: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs.** *J Cell Sci* 1993, **105 (Pt 2)**: 533-540.
202. Hajjar KA, Nachman RL: **Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys- plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface.** *J Clin Invest* 1988, **82**: 1769-1778.
203. Kassam G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Zackson T *et al.*: **The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 4790-4799.
204. Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P *et al.*: **The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation.** *Biochemistry* 1998, **37**: 16958-16966.

205. Choi KS, Ghuman J, Kassam G, Kang HM, Fitzpatrick SL, Waisman DM: **Annexin II tetramer inhibits plasmin-dependent fibrinolysis.** *Biochemistry* 1998, **37**: 648-655.
206. Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong F, Mirza UA, Padovan JC *et al.*: **Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 9987-9993.
207. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE *et al.*: **The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency.** *Am J Hum Genet* 1985, **37**: 1-31.
208. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG *et al.*: **A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.** *Nat Genet* 1995, **10**: 111-113.
209. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG: **A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.** *JAMA* 1995, **274**: 1049-1057.
210. Jacovina AT, Zhong F, Khazanova E, Lev E, Deora AB, Hajjar KA: **Neuritogenesis and the nerve growth factor-induced differentiation of PC-12 cells requires annexin II-mediated plasmin generation.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 49350-49358.
211. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL *et al.*: **Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo.** *J Clin Invest* 2004, **113**: 38-48.
212. Siao CJ, Tsirka SE: **Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II.** *J Neurosci* 2002, **22**: 3352-3358.
213. Emoto K, Sawada H, Yamada Y, Fujimoto H, Takahama Y, Ueno M *et al.*: **Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma.** *Anticancer Res* 2001, **21**: 1339-1345.
214. Kim J, Hajjar KA: **Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor.** *Front Biosci* 2002, **7**: D341-D348.
215. Vishwanatha JK, Chiang Y, Kumble KD, Hollingsworth MA, Pour PM: **Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers.** *Carcinogenesis* 1993, **14**: 2575-2579.
216. Mai J, Waisman DM, Sloane BF: **Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1477**: 215-230.
217. Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R: **Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with**

- annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro.** *Gut* 2004, **53**: 993-1000.
218. Scott K, Zhang J: **Partial identification by site-directed mutagenesis of a cell growth inhibitory site on the human galectin-1 molecule.** *BMC Cell Biol* 2002, **3**: 3.
219. Hsu DK, Liu FT: **Regulation of cellular homeostasis by galectins.** *Glycoconj J* 2004, **19**: 507-515.
220. Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O: **Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 1428-1432.
221. Bourne Y, Bolgiano B, Liao DI, Strecker G, Cantau P, Herzberg O *et al.*: **Crosslinking of mammalian lectin (galectin-1) by complex biantennary saccharides.** *Nat Struct Biol* 1994, **1**: 863-870.
222. Akimoto Y, Obinata A, Hirabayashi J, Sakakura Y, Endo H, Kasai K *et al.*: **Changes in expression of two endogenous beta-galactoside-binding isolectins in the dermis of chick embryonic skin during development in ovo and in vitro.** *Cell Tissue Res* 1995, **279**: 3-12.
223. Cooper DN, Barondes SH: **Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism.** *J Cell Biol* 1990, **110**: 1681-1691.
224. Muesch A, Hartmann E, Rohde K, Rubartelli A, Sitia R, Rapoport TA: **A novel pathway for secretory proteins?** *Trends Biochem Sci* 1990, **15**: 86-88.
225. Seelenmeyer C, Wegehingel S, Tews I, Kunzler M, Aebi M, Nickel W: **Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1.** *J Cell Biol* 2005, **171**: 373-381.
226. Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH *et al.*: **Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells.** *J Exp Med* 1995, **181**: 877-887.
227. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG: **Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death.** *J Mol Med* 1998, **76**: 402-412.
228. Allen HJ, Gottstine S, Sharma A, DiCioccio RA, Swank RT, Li H: **Synthesis, isolation, and characterization of endogenous beta-galactoside-binding lectins in human leukocytes.** *Biochemistry* 1991, **30**: 8904-8910.
229. Levi G, Teichberg VI: **The distribution of electrolectin in mouse: genetic and ontogenic variations.** *Biochem Biophys Res Commun* 1984, **119**: 801-806.

230. Wasano K, Hirakawa Y, Yamamoto T: **Immunohistochemical localization of 14 kDa beta-galactoside-binding lectin in various organs of rat.** *Cell Tissue Res* 1990, **259**: 43-49.
231. Catt JW, Harrison FL, Carleton JS: **Distribution of an endogenous beta-galactoside-specific lectin during foetal and neonatal rabbit development.** *J Cell Sci* 1987, **87 (Pt 5)**: 623-633.
232. Poirier F, Timmons PM, Chan CT, Guenet JL, Rigby PW: **Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development.** *Development* 1992, **115**: 143-155.
233. Hirabayashi J, Kasai K: **Human placenta beta-galactoside-binding lectin. Purification and some properties.** *Biochem Biophys Res Commun* 1984, **122**: 938-944.
234. Cerra RF, Gitt MA, Barondes SH: **Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins.** *J Biol Chem* 1985, **260**: 10474-10477.
235. Baum LG, Seilhamer JJ, Pang M, Levine WB, Beynon D, Berliner JA: **Synthesis of an endogeneous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation.** *Glycoconj J* 1995, **12**: 63-68.
236. Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL: **Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**: 6452-6456.
237. Puche AC, Key B: **Identification of cells expressing galectin-1, a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system.** *J Comp Neurol* 1995, **357**: 513-523.
238. Joubert R, Kuchler S, Zanetta JP, Bladier D, vellana-Adalid V, Caron M *et al.*: **Immunohistochemical localization of a beta-galactoside-binding lectin in rat central nervous system. I. Light- and electron-microscopical studies on developing cerebral cortex and corpus callosum.** *Dev Neurosci* 1989, **11**: 397-413.
239. Bladier D, Joubert R, vellana-Adalid V, Kemeny JL, Doinel C, Amouroux J *et al.*: **Purification and characterization of a galactoside-binding lectin from human brain.** *Arch Biochem Biophys* 1989, **269**: 433-439.
240. Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF: **Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains.** *J Cell Biol* 2003, **160**: 165-170.
241. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y: **Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation.** *Oncogene* 2001, **20**: 7486-7493.

242. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ: **Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**: 3595-3602.
243. Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G: **The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis.** *Cell* 1997, **90**: 1023-1029.
244. Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C: **Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**: 13014-13019.
245. Vespa GN, Lewis LA, Kozak KR, Moran M, Nguyen JT, Baum LG *et al.*: **Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation.** *J Immunol* 1999, **162**: 799-806.
246. Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG: **Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1.** *J Immunol* 1999, **163**: 3801-3811.
247. Hernandez JD, Baum LG: **Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate.** *Glycobiology* 2002, **12**: 127R-136R.
248. He J, Baum LG: **Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 4705-4712.
249. Nguyen JT, Evans DP, Galvan M, Pace KE, Leitenberg D, Bui TN *et al.*: **CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans.** *J Immunol* 2001, **167**: 5697-5707.
250. Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT, Baum LG: **CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death.** *J Immunol* 2000, **165**: 2331-2334.
251. Do KY, Smith DF, Cummings RD: **LAMP-1 in CHO cells is a primary carrier of poly-N-acetylactosamine chains and is bound preferentially by a mammalian S-type lectin.** *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **173**: 1123-1128.
252. Gu M, Wang W, Song WK, Cooper DN, Kaufman SJ: **Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation.** *J Cell Sci* 1994, **107 (Pt 1)**: 175-181.
253. van den Brule FA, Buicu C, Baldet M, Sobel ME, Cooper DN, Marschal P *et al.*: **Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **209**: 760-767.
254. Ozeki Y, Matsui T, Yamamoto Y, Funahashi M, Hamako J, Titani K: **Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1.** *Glycobiology* 1995, **5**: 255-261.

255. Chammas R, Veiga SS, Travassos LR, Brentani RR: **Functionally distinct roles for glycosylation of alpha and beta integrin chains in cell-matrix interactions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**: 1795-1799.
256. Scott K, Weinberg C: **Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation.** *Glycoconj J* 2004, **19**: 467-477.
257. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG: **Apoptosis of T cells mediated by galectin-1.** *Nature* 1995, **378**: 736-739.
258. Horie H, Kadoya T: **Galectin-1 plays essential roles in adult mammalian nervous tissues. Roles of oxidized galectin-1.** *Glycoconj J* 2004, **19**: 479-489.
259. Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP: **Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix.** *J Vasc Res* 1999, **36**: 47-58.
260. Moiseeva EP, Javed Q, Spring EL, de Bono DP: **Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation.** *Cardiovasc Res* 2000, **45**: 493-502.
261. Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, Samani NJ: **Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **310**: 1010-1016.
262. Elola MT, Chiesa ME, Alberti AF, Mordoh J, Fink NE: **Galectin-1 receptors in different cell types.** *J Biomed Sci* 2005, **12**: 13-29.
263. Almkvist J, Karlsson A: **Galectins as inflammatory mediators.** *Glycoconj J* 2004, **19**: 575-581.
264. Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS, Lehr J et al.: **Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin.** *J Natl Cancer Inst* 1995, **87**: 348-353.
265. Tanzer ML, Chandrasekaran S, Dean JW, III, Giniger MS: **Role of laminin carbohydrates on cellular interactions.** *Kidney Int* 1993, **43**: 66-72.
266. Allen HJ, Sucato D, Woynarowska B, Gottstine S, Sharma A, Bernacki RJ: **Role of galaptin in ovarian carcinoma adhesion to extracellular matrix in vitro.** *J Cell Biochem* 1990, **43**: 43-57.
267. Cooper DN, Massa SM, Barondes SH: **Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin.** *J Cell Biol* 1991, **115**: 1437-1448.
268. Wells V, Mallucci L: **Molecular expression of the negative growth factor murine beta-galactoside binding protein (mGBP).** *Biochim Biophys Acta* 1992, **1121**: 239-244.

269. Adams L, Scott GK, Weinberg CS: **Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1.** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1312**: 137-144.
270. Rabinovich GA, Modesti NM, Castagna LF, Landa CA, Riera CM, Sotomayor CE: **Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a beta-galactoside-binding lectin.** *J Biochem (Tokyo)* 1997, **122**: 365-373.
271. Wells V, Mallucci L: **Identification of an autocrine negative growth factor: mouse beta-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator.** *Cell* 1991, **64**: 91-97.
272. Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L et al.: **Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells.** *Eur J Immunol* 1998, **28**: 2311-2319.
273. Kopitz J, von RC, Burchert M, Cantz M, Gabius HJ: **Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 11205-11211.
274. Sanford GL, Harris-Hooker S: **Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins.** *FASEB J* 1990, **4**: 2912-2918.
275. Yamaoka K, Ingendoh A, Tsubuki S, Nagai Y, Sanai Y: **Structural and functional characterization of a novel tumor-derived rat galectin-1 having transforming growth factor (TGF) activity: the relationship between intramolecular disulfide bridges and TGF activity.** *J Biochem (Tokyo)* 1996, **119**: 878-886.
276. Cho M, Cummings RD: **Characterization of monomeric forms of galectin-1 generated by site-directed mutagenesis.** *Biochemistry* 1996, **35**: 13081-13088.
277. Wells V, Davies D, Mallucci L: **Cell cycle arrest and induction of apoptosis by beta galactoside binding protein (beta GBP) in human mammary cancer cells. A potential new approach to cancer control.** *Eur J Cancer* 1999, **35**: 978-983.
278. Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T: **Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties.** *Eur J Biochem* 2000, **267**: 2955-2964.
279. Fukaya K, Hasegawa M, Mashitani T, Kadoya T, Horie H, Hayashi Y et al.: **Oxidized galectin-1 stimulates the migration of Schwann cells from both proximal and distal stumps of transected nerves and promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2003, **62**: 162-172.
280. Novelli F, Allione A, Wells V, Forni G, Mallucci L: **Negative cell cycle control of human T cells by beta-galactoside binding protein (beta**

- GBP): induction of programmed cell death in leukaemic cells.** *J Cell Physiol* 1999, **178**: 102-108.
281. Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ, Kloog Y: **Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 37169-37175.
282. Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG: **Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes.** *J Exp Med* 1997, **185**: 1851-1858.
283. Fajka-Boja R, Szemes M, Ion G, Legradi A, Caron M, Monostori E: **Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines.** *Immunol Lett* 2002, **82**: 149-154.
284. Rabinovich GA: **Galectin-1 as a potential cancer target.** *Br J Cancer* 2005, **92**: 1188-1192.
285. van den BF, Califice S, Castronovo V: **Expression of galectins in cancer: a critical review.** *Glycoconj J* 2004, **19**: 537-542.
286. Kopitz J, von RC, Andre S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V et al.: **Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 35917-35923.
287. Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, Kirino T: **Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells.** *J Neurosci Res* 2000, **59**: 722-730.
288. Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den BF, Liu FT et al.: **Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression.** *Gastroenterology* 1997, **113**: 1906-1915.
289. Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D: **Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Cancer Res* 2004, **64**: 9018-9026.
290. Grutzmann R, Pilarsky C, Ammerpohl O, Luttges J, Bohme A, Sipos B et al.: **Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays.** *Neoplasia* 2004, **6**: 611-622.
291. Berberat PO, Friess H, Wang L, Zhu Z, Bley T, Frigeri L et al.: **Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer.** *J Histochem Cytochem* 2001, **49**: 539-549.
292. Masamune A, Satoh M, Hirabayashi J, Kasai K, Satoh K, Shimosegawa T: **Galectin-1 induces chemokine production and proliferation in pancreatic stellate cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005.

293. Fitzner B, Walzel H, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R: **Galectin-1 is an inducer of pancreatic stellate cell activation.** *Cell Signal* 2005, **17**: 1240-1247.
294. Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA: **Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages.** *Glycobiology* 2003, **13**: 119-128.
295. Chiariotti L, Berlingieri MT, De RP, Battaglia C, Berger N, Bruni CB *et al.*: **Increased expression of the negative growth factor, galactoside-binding protein, gene in transformed thyroid cells and in human thyroid carcinomas.** *Oncogene* 1992, **7**: 2507-2511.
296. van den BF, Califice S, Garnier F, Fernandez PL, Berchuck A, Castronovo V: **Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin.** *Lab Invest* 2003, **83**: 377-386.
297. Raz A, Meromsky L, Zvibel I, Lotan R: **Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins.** *Int J Cancer* 1987, **39**: 353-360.
298. Gabius HJ, Brehler R, Schauer A, Cramer F: **Localization of endogenous lectins in normal human breast, benign breast lesions and mammary carcinomas.** *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1986, **52**: 107-115.
299. Gillenwater A, Xu XC, el-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R: **Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma.** *Head Neck* 1996, **18**: 422-432.
300. van den Brule FA, Waltregny D, Castronovo V: **Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients.** *J Pathol* 2001, **193**: 80-87.
301. Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, de LY, Kaltner H *et al.*: **Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, **61**: 585-596.
302. Gabius HJ, Andre S, Gunsenhauser I, Kaltner H, Kayser G, Kopitz J *et al.*: **Association of galectin-1- but not galectin-3-dependent parameters with proliferation activity in human neuroblastomas and small cell lung carcinomas.** *Anticancer Res* 2002, **22**: 405-410.
303. van den Brule FA, Buicu C, Berchuck A, Bast RC, Deprez M, Liu FT *et al.*: **Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma.** *Hum Pathol* 1996, **27**: 1185-1191.

304. Cindolo L, Benvenuto G, Salvatore P, Pero R, Salvatore G, Mirone V *et al.*: **galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas.** *Int J Cancer* 1999, **84**: 39-43.
305. Francois C, van VR, De Lathouwer O, Moreno C, Peltier A, Kaltner H *et al.*: **Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas.** *Am J Clin Pathol* 1999, **112**: 194-203.
306. American Gastroenterological Association: **American gastroenterological association medical position statement: epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Gastroenterology* 1999, **117**: 1463-1484.
307. Medina M.G., Ledesma M.D., Dominguez J.E., Medina M., Zafra D., Alameda F. *et al.*: **Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation.** *EMBO J* 2005.
308. Beebe DP, Miles LA, Plow EF: **A linear amino acid sequence involved in the interaction of t-PA with its endothelial cell receptor.** *Blood* 1989, **74**: 2034-2037.
309. Barnathan ES, Cines DB, Barone K, Kuo A, Larsen GR: **Differential binding of recombinant wild type and variant t-PA to human endothelial cells.** *Fibrinolysis* 1988, **2**: 58.
310. Kwon M, Yoon CS, Jeong W, Rhee SG, Waisman DM: **A novel substrate of thioredoxin: Annexin A2-S100A10 heterotetramer.** *J Biol Chem* 2005.
311. Podor TJ, Singh D, Chindemi P, Foulon DM, McKelvie R, Weitz JI *et al.*: **Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 7529-7539.
312. Filipenko NR, MacLeod TJ, Yoon CS, Waisman DM: **Annexin A2 is a novel RNA-binding protein.** *J Biol Chem* 2004, **279**: 8723-8731.
313. Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D: **Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Cancer Res* 2004, **64**: 9018-9026.
314. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K *et al.*: **Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies.** *Cancer Res* 2003, **63**: 8614-8622.
315. Bardosi A, Dimitri T, Wosgien B, Gabius HJ: **Expression of endogenous receptors for neoglycoproteins, especially lectins, that allow fiber typing on formaldehyde-fixed, paraffin-embedded muscle biopsy specimens. A glycohistochemical, immunohistochemical, and glycochemical study.** *J Histochem Cytochem* 1989, **37**: 989-998.

316. Cao H, Orth JD, Chen J, Weller SG, Heuser JE, McNiven MA: **Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**: 2162-2170.
317. Lane EB: **Monoclonal antibodies provide specific intramolecular markers for the study of epithelial tonofilament organization.** *J Cell Biol* 1982, **92**: 665-673.
318. Furukawa T, Duguid WP, Rosenberg L, Viallet J, Galloway DA, Tsao MS: **Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16.** *Am J Pathol* 1996, **148**: 1763-1770.
319. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G et al.: **A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts.** *J Cell Biol* 1992, **118**: 1511-1522.
320. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G: **Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas.** *Int J Cancer* 1975, **15**: 741-747.
321. Vila MR, Lloreta J, Schussler MH, Berrozpe G, Welt S, Real FX: **New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation.** *Lab Invest* 1995, **72**: 395-404.
322. Schmidt M, Deschner EE, Thaler HT, Clements L, Good RA: **Gastrointestinal cancer studies in the human to nude mouse heterotransplant system.** *Gastroenterology* 1977, **72**: 829-837.
323. Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C et al.: **Characterization of a new primary human pancreatic tumor line.** *Cancer Invest* 1986, **4**: 15-23.
324. Dexter DL, Matook GM, Meitner PA, Bogaars HA, Jolly GA, Turner MD et al.: **Establishment and characterization of two human pancreatic cancer cell lines tumorigenic in athymic mice.** *Cancer Res* 1982, **42**: 2705-2714.
325. Poirier F, Robertson EJ: **Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin.** *Development* 1993, **119**: 1229-1236.
326. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**: 248-254.
327. Carreño C, Roig X, Cairó J, Camarero J, Mateu MG, Domingo E et al.: **Studies on antigenic variability of C strain of foot-and-mouth disease virus by means of synthetic peptides and monoclonal antibodies.** *Int J Peptide Protein Res* 92 A.D., **39**: 41-47.



