



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# CARACTERIZACIÓN CELULAR Y FUNCIONAL DEL RECEPTOR PARA COLÁGENO DDR1 EN LA RESPUESTA DEL MICROAMBIENTE AL TUMOR METASTÁSICO.

Autor:

Mercedes González Cebollero

Director/a:

Beatriz Arteta Ruiz

Joana Márquez Clavijo

© 2015, Mercedes Gonzalez Cebollero

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 CÁNCER COLORRECTAL Y MICROAMBIENTE TUMORAL</b>	<b>1</b>
1.1.1 Fibroblastos asociados al tumor (FbAT)	1
1.1.2 Macrófagos asociados al tumor (MoAT)	2
1.1.2 Matriz extracelular	2
<b>1.3 RECEPTORES CON DOMINIO DISCOIDINA</b>	<b>2</b>
1.3.1 DDR1	2
<b>1.4 METALOPROTEASAS</b>	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>3. DESARROLLO</b>	<b>4</b>
<b>3.1 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>4</b>
3.1.1 Líneas celulares	4
3.1.2 Obtención medios condicionados	5
3.1.3 Obtención de lisados celulares para extracción de proteínas	5
3.1.4 Western Blot	5
3.1.5 Zimografía de gelatina	6
<b>3.2 RESULTADOS</b>	<b>6</b>
3.2.1 Efecto de factores solubles tumorales en la expresión del DDR1 por fibroblastos	6
3.2.2 Efecto de factores solubles tumorales en la expresión del DDR1 por macrófagos	7
3.2.3 Efecto de factores solubles de células estromales en la expresión del DDR1 por el tumor	8
3.2.4 Efecto de factores solubles tumorales en la expresión MMPs por células estromales	9
3.2.5 Efecto de factores solubles estromales en la expresión de MMPs en células tumorales	10
<b>3.3 DISCUSIÓN</b>	<b>11</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>13</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>13</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CÁNCER COLORRECTAL Y MICROAMBIENTE TUMORAL

El cáncer colorrectal es la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en países occidentales. La mortalidad ocasionada por dicho cáncer está causada en su mayoría por la diseminación a otro órgano más que por el tumor primario localizado. La diseminación tumoral es un proceso complejo basado en múltiples etapas, que requieren de la interacción coordinada a nivel molecular y celular de factores tanto tumorales como del hospedador. Un paso crítico en la diseminación tumoral es la proteólisis de la matriz extracelular (MEC), en la cual, las células tumorales se liberan del tumor primario e invaden los vasos sanguíneos y canales linfáticos (Greenlee, et al., 2001). Una vez alcanzado el órgano diana, las células malignas se adhieren a su endotelio y transmigran para alcanzar el parénquima del órgano. Durante este proceso, se establecen complejas interacciones con la MEC del microambiente tisular y con sus células. De esta forma, las células tumorales moldean el ambiente que les rodea en su propio beneficio, facilitando así su crecimiento y progresión.

Durante largo tiempo, el cáncer se ha considerado una enfermedad definida y dirigida por la inestabilidad genómica, las alteraciones cromosómicas y las mutaciones genéticas (Hanahan y Weinberg, 2011). Sin embargo en la actualidad, la influencia de las células estromales no malignas del microambiente tumoral está claramente establecida (Hanahan y Coussens, 2012; Quail y Joyce, 2013). Los tumores son tejidos complejos, compuestos sólo por las células malignas, sino también, por células estromales genéticamente estables, incluyendo a fibroblastos y macrófagos además de la MEC que producen. Al igual que en órganos sanos, estos compartimentos del microambiente no son meros espectadores, sino que regulan críticamente la iniciación tumoral, la progresión maligna y la metástasis. Más aún, los diferentes tipos estromales en diferentes contextos pueden exhibir capacidades promotoras u opuestas al tumor.

### 1.1.1 Fibroblastos asociados al tumor (FbAT)

Los fibroblastos constituyen una gran proporción de las células no epiteliales en un tumor (Nagasaki, et al., 2014). Tras la activación por el tumor los FbATs constituyen la mayor fuente de factores de crecimiento secretados y proteínas de la MEC, así como parte importante en la producción de metaloproteasas (MMPs).

### **1.1.2 Macrófagos asociados al tumor (MoAT)**

Los macrófagos, no sólo proporcionan defensa inespecífica, sino que, también regulan la homeostasis tisular y la cicatrización (Qian y Pollard, 2010). Sus funciones fisiológicas les predisponen a jugar un papel clave en las reacciones inflamatorias que tienen lugar en cáncer (Mantovani, et al., 2002). Además, los MoAT constituyen una fuente principal de proteasas, que dirigen la progresión tumoral. Los MoAT secretan MMPs, que no sólo degradan la MEC, sino que aumentan la disponibilidad de factores asociados a la misma.

### **1.1.2 Matriz extracelular**

Todos los tipos celulares del microambiente tumoral producen proteínas de la MEC, una intrincada red fibrilar, que no solo proporciona apoyo estructural, sino que también integra señales locales y regula el movimiento celular, la proliferación, y la diferenciación (Hynes, 2009). La MEC asociada al microambiente tumoral es diferente de la del estroma de tejidos normales (Paszek, et al., 2005) y sirve de guía para el movimiento celular y la invasión tumoral (Friedl y Alexander, 2011). Paradójicamente, un aumento en la síntesis de MEC y un aumento en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno en el estroma maligno favorecen la invasión por la célula tumoral (Levental, et al., 2009)

## **1.3 RECEPTORES CON DOMINIO DISCOIDINA**

Una clase de receptores para el colágeno son los receptores con dominio discoidina (DDR). Estos receptores poseen la particularidad de ser los únicos receptores tirosina quinasa (RTKs), que se activan por su unión a una proteína de la MEC, el colágeno, en lugar de a factores de crecimiento. Por otro lado, también se diferencian de otros RTKs por el dominio discoidina en su dominio extracelular, el cual es importante para la regulación de la expresión celular y la morfogénesis (Park, et al., 2007) . La expresión de los DDRs es muy ubicua, detectándose en muchos tipos celulares, como por ejemplo en células epiteliales, leucocitos, células mesenquimales etc (Borza y Pozzi, 2014). Asimismo, poseen funciones importantes durante el desarrollo y en la edad adulta.

Hasta el momento se han descrito dos miembros de la familia DDR: el receptor con dominio discoidina 1 (DDR1) y el receptor con dominio discoidina 2 (DDR2) (Vogel, 1999).

### **1.3.1 DDR1**

El DDR1 presenta 5 isoformas diferentes (DDR1a-e), las cuales se generan por splicing alternativo. Las isoformas del DDR1a-c codifican un receptor con dominio tirosina kinasa funcional. Los DDR1d y DDR1e no tienen actividad quinasa y actualmente su función es desconocida (Alver, et al., 2001). Además, se han observado en ciertos tipos tumorales formas de bajo peso molecular todavía no identificadas (Song, et al., 2011). Entre los colágenos que se unen al DDR1 se encuentran los fibrilares de tipo I-IV y VI. La unión del colágeno con el receptor induce la autofosforilación del mismo y como consecuencia la transducción de señales (Park, et al., 2007).

El DDR1 se expresa en tejidos de adulto a altos niveles, particularmente en el epitelio de la piel, riñón, intestino, pulmón, colon y cerebro. (Ram, et al., 2006). Se ha observado que en tumores invasivos como mama, ovario, esófago, pulmón y colon hay una sobreexpresión del DDR1 (Castro Sánchez, et al., 2011), aunque su papel no está firmemente definido.

#### **1.4 METALOPROTEASAS**

Uno de los procesos claves durante la progresión tumoral es la migración de las células tumorales, la cual requiere de la degradación activa de la MEC, un proceso mediado mayoritariamente por MMPs.

Las MMPs son una familia de 29 endopeptidasas dependientes de Zinc capaces de degradar múltiples componentes de la MEC (Coussens, et al., 2002). Además de en la migración, las MMPs están implicadas en procesos de invasión, proliferación, apoptosis, y angiogénesis, entre otros, regulando así aspectos clave de la progresión tumoral. (Castro-Sánchez, et al., 2011). Por ello, la expresión de las MMPs debe regularse muy estrechamente por medio del contacto célula-célula o mediante factores solubles liberados por células adyacentes, entre otras. Otra forma de regulación se lleva a cabo mediante la acción de inhibidores específicos de metaloproteasas (TIMPs), los cuales reducen la migración celular durante el desarrollo tumoral. (Nabeshima, et al., 2002)

Las MMPs más importantes implicadas en la invasión metastática son las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 (Park, et al., 2007), consideradas especialmente importantes en el comportamiento maligno de células tumorales debido a su capacidad de degradar colágeno de tipo IV y su elevada expresión en este tipo de células (Castro-Sánchez, et al., 2011). Se ha descrito que el aumento de la MMP-2 y de la MMP-9 está relacionado con el fenotipo invasivo de ciertas células tumorales (Ram, et al., 2006).

Además, se ha comprobado que la activación del DDR1 en células tumorales desencadena la transducción de vías de señalización y procesos celulares que promueven la secreción de MMP-2 y MMP-9 y por tanto, contribuyen a la degradación de la MEC y la invasión (Castro-Sánchez, et al., 2011).

## **2. OBJETIVOS**

- 1-. Estudiar la modulación de la expresión de DDR1 en células estromales (fibroblastos y macrófagos) por factores solubles derivados del tumor.
- 2-. Estudiar la modulación de la expresión de DDR1 en células de carcinoma de colon C26 por factores solubles derivados de células estromales activadas por el tumor.
- 3-. Relacionar los niveles de DDR1 con la expresión de MMP-2 y MMP-9 en las condiciones experimentales anteriores.

## **3. DESARROLLO**

### **3.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.1 Líneas celulares**

##### **3.1.1.1 Carcinoma de colon murino C26**

La línea celular de carcinoma de colon murino C26 (a partir de ahora denominada C26), es singénica con la cepa de ratón Balb/c, que se obtuvo de la American Tissue and Cell Collection (ATCC, LG Standard, Spain). La línea celular se mantuvo en condiciones estándar, en medio completo, consistente en RPMI-1640 (Life technologies, MD, USA) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 250 ng/ml de anfotericina B (Life Technologies, MD, USA) y 10% de suero bovino fetal (SBF) (Life Technologies, MD, USA). La línea celular se mantuvo en cultivo durante un máximo de 10 pases.

##### **3.1.1.2 Fibroblastos 3T3**

Los fibroblastos murinos 3T3 singénicos con la cepa de ratón Balb/c, se obtuvieron de la ATCC (LG Standard, Spain), y se mantuvieron en medio completo a condiciones estándar. La línea celular se mantuvo en cultivo durante un máximo de 10 pases.

##### **3.1.1.3 Macrófagos J774A.1**

Los macrófagos murinos J774A.1 singénicos con la cepa de ratón Balb/cN, se obtuvieron de la ATCC (LG Standard, Spain) y se mantuvieron en medio completo a condiciones estándar. La línea celular se mantuvo en cultivo durante un máximo de 10 pases.

### 3.1.2 Obtención medios condicionados

Para la obtención de medios condicionados (MC) de C26, 3T3 y J774A.1 se cultivaron dichas células en placas de cultivo previamente cubiertas con colágeno, excepto la placa para los J774A.1, a una concentración de  $5 \cdot 10^4$  cel/cm<sup>2</sup> con medio completo al 5% de suero durante 24 horas. Tras este tiempo, se sustituyó el medio completo con RPMI-1640. Después de una incubación adicional de 24 horas se recolectó el sobrenadante del cultivo, y se centrifugó a 3345 G durante 3 min. a 4°C para eliminar los restos celulares. Los medios se conservaron a una temperatura de -20 °C hasta el momento de su utilización. Para aquellos cultivos con tratamiento, las últimas 24 horas de incubación se realizaron con los MCs correspondientes a cada situación experimental diluidos 1:2 en RPMI-1640 (**Figura 1**).

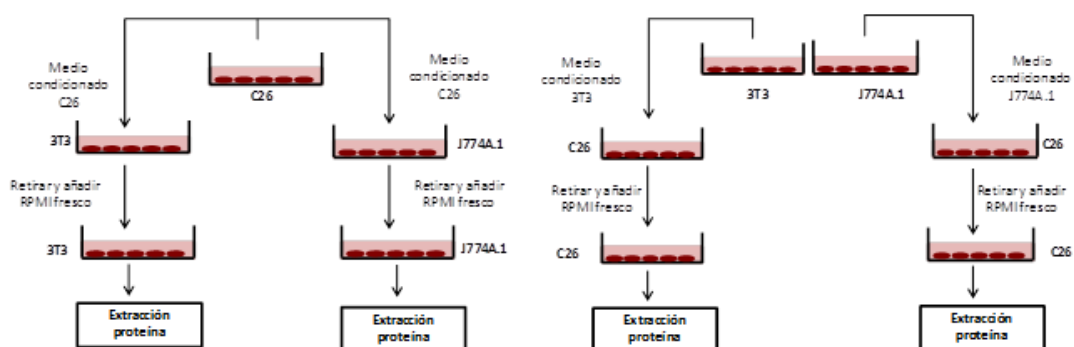


Figura 1. Esquema de la obtención de los MC y lisados celulares de C26, fibroblastos y macrófagos.

### 3.1.3 Obtención de lisados celulares para extracción de proteínas

Para la extracción de proteína, las células se cultivaron y trataron como se ha descrito en la **Figura 1**. Tras los tiempos de tratamiento, los cultivos se lavaron con PBS1x frío extensivamente y se lisaron en tampón Laemli (Sigma –Aldrich, MO, USA). El lisado se centrifugó durante 15 minutos a 137008 G, de la suspensión resultante se recogió el sobrenadante consistente en extractos proteicos libres de RNA y DNA.

### 3.1.4 Western Blot

Los análisis de niveles de expresión de DDR1 en C26, 3T3 y J774A.1 se llevaron a cabo mediante Western Blot. Las muestras desnaturalizadas a 80 °C se sometieron a electroforesis

en gel al 30% bis-acrilamida, tras los que se transfirió a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) en sistema semi-húmedo (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Para la detección de proteínas las membranas primero se bloquearon con tampón al 5 % de leche desnatada y después se incubaron con anticuerpos para DDR1 murino (Gene Tex, Aachen, Germany) (1:1000), el cual reconoce el extremo amino terminal del receptor y el GAPDH de cabra (1:1000) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Los anticuerpos secundarios utilizados se conjugaron posteriormente con streptavidina-HRP (1:500) (Life Technologies, MD, USA) y se revelaron con sustrato para HRP (Life Technologies, MD, USA). La cuantificación se realizó mediante el software de análisis de imagen ImageJ (National Institutes of Health, USA). Los datos se normalizaron con los niveles de expresión de GAPDH.

### 3.1.5 Zimografía de gelatina

Para la detección de MMP-2 y MMP-9 las muestras se sometieron a electroforesis en gel al 30% bis-acrilamida (BioRad Laboratories, CA, USA) suplementado con gelatina tipo A de piel de cerdo (Sima-Aldrich, MO, USA). Después se procedió a la eliminación del SDS, permitiendo la re-naturalización de las MMPs.

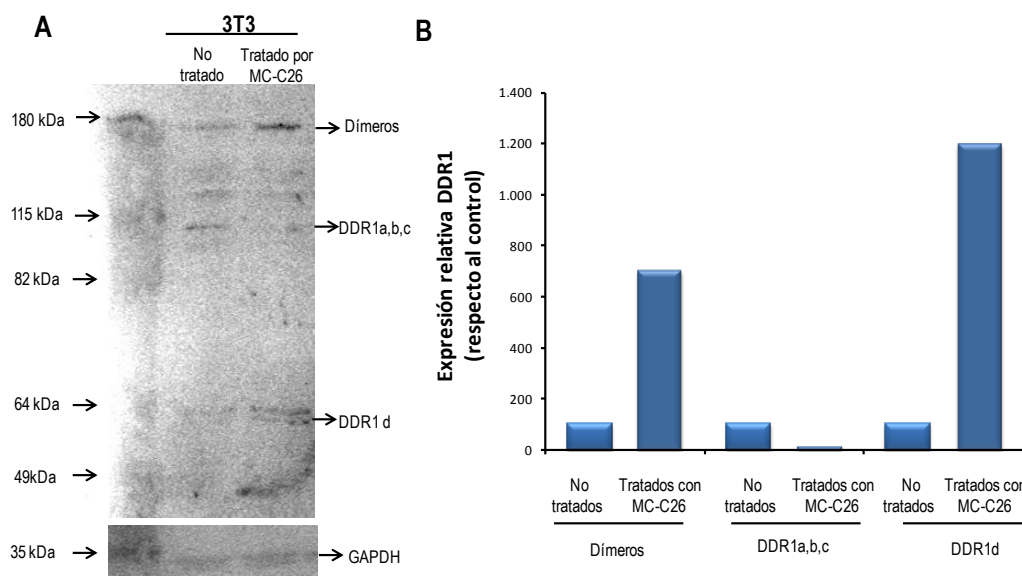
Tras 24 horas en tampón de incubación con cationes divalentes el gel se tiñó con Azul Comassie (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). A continuación se destiñeron los geles en tampón de fijación se obtuvieron imágenes en el Gel Doc 2000 (Bio Rad Laboratories, CA,USA) y se cuantificaron utilizando el software de análisis de imagen ImageJ (National Institutes of Health, USA).

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Efecto de factores solubles tumorales en la expresión del DDR1 por fibroblastos

En primer lugar se analizó la expresión del DDR1 en fibroblastos y el efecto de factores tumorales en la misma por Western Blot. Como se observa en la **Figura 2**, en muestras de fibroblastos basales se detectaron dímeros de 180 kDa y las isoformas de 105-120 kDa correspondientes a las isoformas a, b y c con diferentes grados de glicosilación. Debido a las mínimas diferencias en peso molecular de estas isoformas, es imposible distinguirlas de forma independiente en el Western Blot. Además, se detectó la expresión de la isoforma DDR1d de 56-68 kDa. Sin embargo, la isoforma DDR1e no se observó a niveles detectables. Tras la activación con factores derivados del tumor, se detectó un aumento en el nivel de expresión de dímeros y de la isoforma DDR1d, mientras que las formas a, b, y c disminuyeron su nivel de expresión (**Figura 2**).

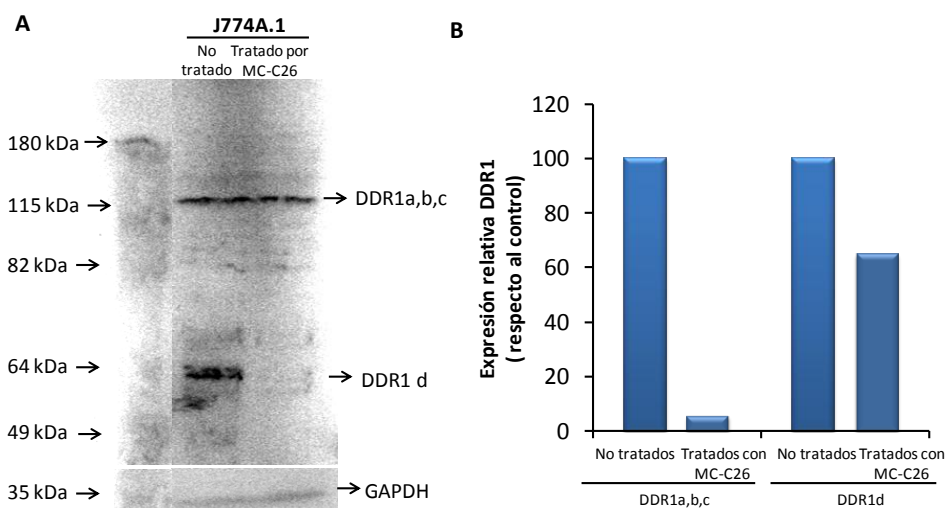




**Figura 2. Efecto de factores tumorales en la expresión del DDR1 por fibroblastos.** Para analizar la expresión de DDR1 en fibroblastos se realizó un Western Blot de lisados celulares. Los fibroblastos se activaron o no con MC de C26 durante 18 horas. A) Western Blot mostrando los niveles de expresión de las isoformas DDR. La primera línea corresponde al marcador de peso molecular. B) Cuantificación de la expresión de las diferentes isoformas.

### 3.2.2 Efecto de factores solubles tumorales en la expresión del DDR1 por macrófagos

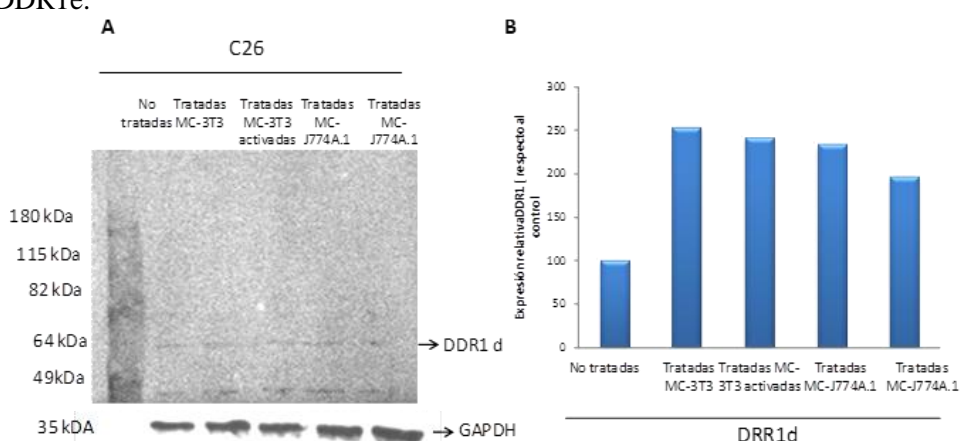
Seguidamente se comprobó la expresión de DDR1 en macrófagos mediante Western Blot. Como se observa en la **Figura 3**, los macrófagos en condiciones basales expresan las isoformas de 105-120 kDa correspondientes a las a, b y c con diferentes grados de glicosilación. Además, se detectó la expresión de la isoforma DDR1d de 56-68 kDa. Sin embargo, no se observaron dímeros 180kDa ni la isoforma DDR1e a niveles detectables. Tras la activación con factores derivados del tumor, se detectó una disminución en el nivel de expresión tanto de las isoformas DDR1a, b, c como de la isoforma DDR1d (**Figura 3**).



**Figura 3. Efecto de factores tumorales en la expresión del DDR1 por macrófagos.** Para analizar la expresión de DDR1 en macrófagos se realizó un Western Blot de lisados celulares. Los macrófagos se activaron o no con MC de C26 durante 18 horas. A) Western Blot mostrando los niveles de expresión de las isoformas DDR. La primera línea corresponde al marcador de peso molecular. B) Cuantificación de la expresión de las diferentes isoformas.

### 3.2.3 Efecto de factores solubles de células estromales en la expresión del DDR1 por el tumor

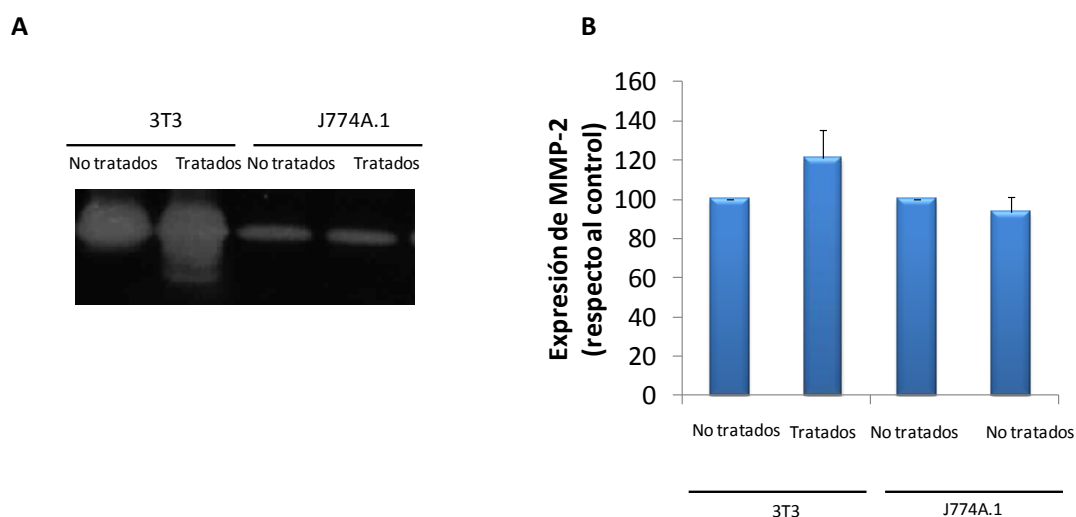
La expresión de DDR1 en células tumorales se analizó mediante Western Blot. Como se observa en la **Figura 4**, hay un aumento del nivel de expresión de la de la isoforma DDR1d en células tumorales tratadas con MC de células estromales. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre los efectos de MCs de células estromales tratadas o no por MC del tumor. Es de notar que en las células C26 no tratadas se pudo detectar levemente la expresión del DDR1e.



**Figura 4. Efecto de los fibroblastos y macrófagos en la expresión del DDR1 por C26.** Las C26 se activaron o no con MC de fibroblastos y macrófagos tratados o no con MC tumoral. A) Western Blot mostrando los niveles de expresión de las isoformas DDR. La primera línea corresponde al marcador de peso molecular. B) Cuantificación de la expresión de las diferentes isoformas.

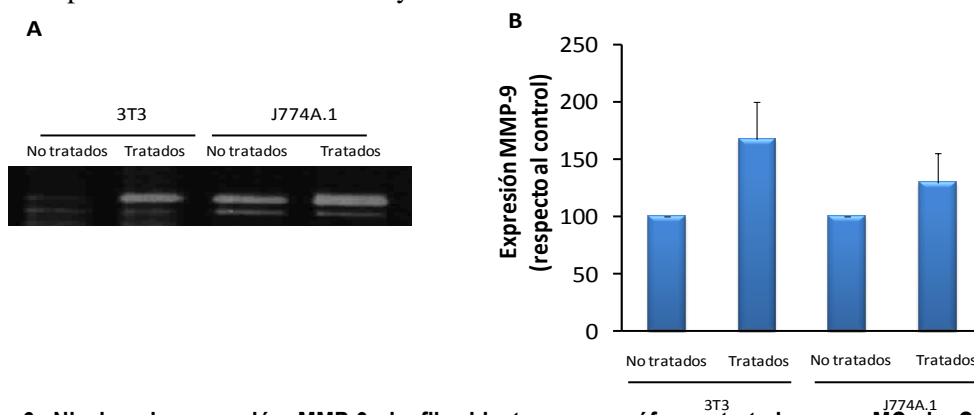
### 3.2.4 Efecto de factores solubles tumorales en la expresión MMPs por células estromales

La MMP-2 y la MMP-9 se cuantificaron mediante análisis zimográfico. Tal y como se observa en la **Figura 5** factores solubles liberados por el tumor inducen un aumento en el nivel de expresión de MMP-2 en fibroblasto. Sin embargo, no se pudo detectar ningún cambio aparente en la expresión de esta MMP por los macrófagos.



**Figura 5. Niveles de expresión MMP-2 de fibroblastos y macrófagos tratados con MC de C26.** A) Zimografía mostrando los niveles de expresión de la MMP-2. Se ha elegido la imagen más representativa. B) Cuantificación de la expresión de la MMP-2 en fibroblastos tratados y no tratados.

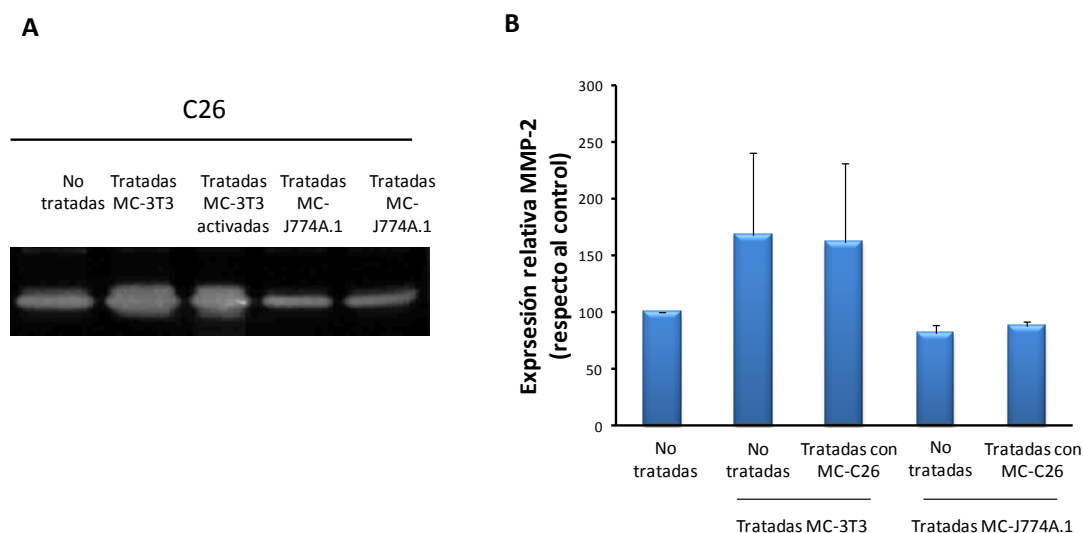
En la **Figura 6** se observa que la MMP-9 se expresa a mayores niveles en macrófagos. Sin embargo, el efecto de factores solubles producidos por el tumor, mucho más evidente en la expresión de MMP-9 por los fibroblastos observándose una mayor diferencia entre la producida por fibroblastos no tratados y los tratados con MC tumoral.



**Figura 6. Niveles de expresión MMP-9 de fibroblastos y macrófagos tratados con MC de C26.** A) Zimografía mostrando los niveles de expresión de la MMP-9. Se ha elegido la imagen más representativa. B) Cuantificación de la expresión de la MMP-9 en fibroblastos tratados y no tratados.

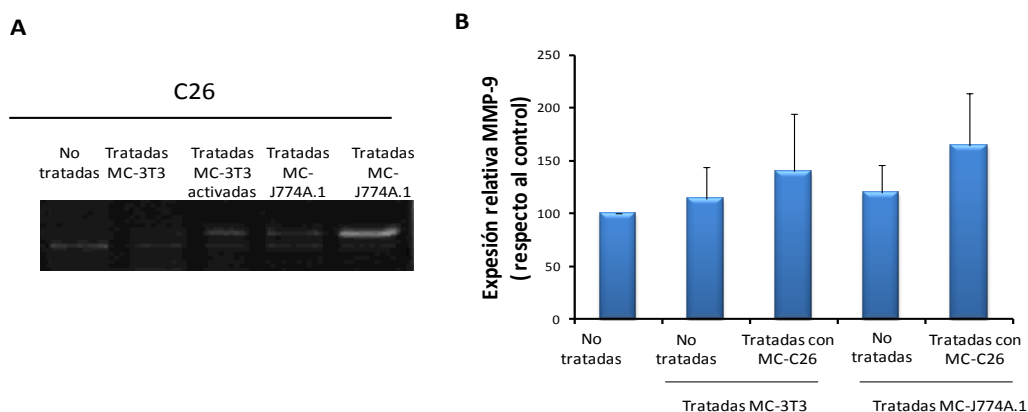
### 3.2.5 Efecto de factores solubles estromales en la expresión de MMPs en células tumorales

Tras examinar por zimografía los niveles de expresión de la MMP-2 y la MMP-9 en células tumorales se observó un aumento de MMP-2 inducido por factores derivados de fibroblastos. Por el contrario, no existe una variación evidente en los niveles de expresión de MMP-2 de C26 estimuladas con factores solubles producidos por macrófagos.



**Figura 7. Niveles de expresión MMP-2 de C26 tratadas con factores solubles producidos por células estromales.** A) Imagen zimográfica de MMP-2 producida por C26 en presencia de MCs derivados de fibroblastos y macrófagos tratados o no con factores solubles tumorales. Se ha elegido la imagen más representativa. B) Cuantificación de la expresión de la MMP-2 en C26.

Las C26 aumentan levemente sus niveles de expresión de MMP-9 cuando han sido tratadas con fibroblastos no activados por medio tumoral. Por el contrario, cuando los fibroblastos liberan factores adicionales inducidos por el tumor aumentan de forma evidente los niveles de expresión de MMP-9 (**Figura 8**). Del mismo modo, las C26 tratadas con macrófagos aumenta los niveles de expresión de MMP-9 de forma similar a los fibroblastos no activados. En cambio, los macrófagos activados por el tumor aumentan considerablemente los niveles de expresión de MMP-9 (**Figura 8**).



**Figura 8. Niveles de expresión MMP-9 de C26 tratadas con factores solubles producidos por células estromales.** A) Imagen zimográfica de MMP-9 producida por C26 en presencia de MCs derivados de fibroblastos y macrófagos tratados o no con factores solubles tumorales. Se ha elegido la imagen más representativa. B) Cuantificación de la expresión de la MMP-9 en C26.

### 3.3 DISCUSIÓN

Los DDRs son receptores tirosina quinasa que unen varios tipos de colágeno y son reguladores clave de la morfogénesis celular, la diferenciación proliferación, migración e invasión (Borza y Pozzi, 2014). Existen dos tipos de quinasa DDR, el DDR1 y el DDR2. El DDR1 presenta una expresión alterada en varios tipos de tumores lo cual sugiere que posee algún papel potencial en la progresión tumoral. Además, se encuentra implicado en la invasión estromal por las células tumorales (Park, et al., 2007; Ram, et al., 2007). Sin embargo, su expresión dentro del contexto del microambiente tumoral no ha sido establecido.

El presente estudio, encontramos que las diferentes isoformas del DDR1 se expresan de forma específica en diferentes tipos celulares. Los fibroblastos expresan tanto las isoformas DDR1a, b, c y d, como dímeros, mientras que los macrófagos carecen de dímeros detectables del receptor y las células tumorales, únicamente expresan la isoforma DDR1d y levemente laDDR1e. Numerosos estudios (Park, et al., 2007; Castro-Sanchez, et al., 2011) se han enfocado en la expresión de este y otros receptores en las células tumorales sin tener en cuenta que las interacciones recíprocas podrían influenciar una alteración del DDR1 también en las células estromales. De hecho, nuestros resultados muestran que los factores derivados del tumor modulan la expresión de las isoformas del DDR1 de forma célula-específica. En fibroblastos, la presencia de factores derivados del tumor induce un aumento en la expresión de dímeros y de la isoforma DDR1d mientras que disminuye la expresión de DDR1 a, b y c. Por el contrario, la activación de los macrófagos únicamente disminuye la expresión de la isoforma DDR1d. Como se ha comentado anteriormente, en el microambiente tumoral se

establecen relaciones bidireccionales entre el tumor y las células estromales (Friedl y Alexander, 2011). Nuestros estudios muestran que las células estromales son capaces de inducir un aumento en la expresión del DDR1d en las células tumorales mientras que hacen desaparecer la tenue expresión de la DDR1e. Estos efectos no son alterados por factores derivados de células estromales activados por tumor.

Todos los tipos del microambiente tumoral producen proteínas de la MEC que envía señales, entre otros, a través de los DDR1. Un paso clave en estos procesos es la expresión de MMPs que degradan la MEC favoreciendo la invasión tumoral. La interacción entre el colágeno y el DDR1 puede provocar varios resultados (Castro-Sánchez, et al., 20011). En células de carcinoma hepatocelular se relacionó la expresión de MMP con una mayor expresión de DDR1 y su potencial migratorio (Park, et al., 2007). Sin embargo, se desconoce si existe alguna relación entre la expresión del DDR1 en el microambiente tumoral con la producción de MMPs. En el estudio realizado se observó que el tumor produce un aumento en la expresión de MMP-9 en fibroblastos y macrófagos directamente relacionado con el aumento de DDR1d y dímeros en fibroblastos e inversamente a la expresión de DDR1d en macrófagos. Es interesante destacar que la MMP-2 aumenta en relación directa con la expresión de las diferentes formas del DDR1 en fibroblastos. Mientras que en macrófagos no se ve alterada, al igual que la expresión de las isoformas DDR1 a, b y c.

De el mismo modo, las células tumorales modulan las funciones de las células estromales, estas pueden modular y favorecer el carácter agresivo de las primeras. Mientras que los fibroblastos estimulan la producción de MMP-2 por parte del tumor, los macrófagos fueron incapaces de inducir la expresión de esta proteasa. La activación previa del estroma por el tumor no indujo ningún efecto adicional. Por el contrario, la expresión de MMP-9 fue inducida tanto por fibroblastos como macrófagos, únicamente tras ser activados por el tumor. Aunque estos resultados muestran una relación entre la expresión del DDR1 y sus isoformas dependiente del tipo celular, son necesarios estudios adicionales para confirmar si el DDR1 regula la producción de MMPs o al contrario. Actualmente, estamos desarrollando líneas estables deficientes en DDR1 para dilucidar este punto, así como el significado funcional de estas observaciones.

Aunque los efectos del DDR1 en la migración celular en diferentes modelos es controvertida, los presentes resultados señalan un posible papel de estos receptores en la misma. Dado que se observa una correspondencia entre el nivel de expresión del DDR1 con los niveles de MMPs producidas por las mismas células sería tentador hipotetizar que ambos

parámetros indican un aumento de la agresividad de las células tumorales y del papel pro-tumoral del estroma que lo rodea. De hecho, resultados de nuestro grupo (Herrero, Trabajo Fin de Máster 2015) muestran que factores derivados de fibroblastos activados por tumor inducen una estimulación del potencial migratorio de las C26 directamente proporcional a la presencia de MMPs en los MCs de los fibroblastos activados por el tumor. Esto está en concordancia con resultados de otros grupos que muestran una asociación del DDR1 con la adhesión celular, la migración y la proliferación, procesos que implican interacciones coordinadas con la matriz (Park, et al., 2007; Ram, et al., 2007). Estudios en marcha con células deficientes en la expresión del DDR1 determinarán el significado funcional de estos resultados con procesos tumorales clave como la migración y la proliferación, entre otros.

#### **4. CONCLUSIONES**

1. El DDR1 se expresa de forma diferencial en los tres tipos celulares estudiados. El tumor induce la expresión de DDR1d y de las formas diméricas, y disminuye las isoformas DDR1a, b, y c en fibroblastos, mientras que estas no varían en macrófagos en los que la DDR1d disminuye. Las células estromales inducen la expresión de DDR1d en las células tumorales independientemente de su activación por el tumor.
2. Al igual que el DDR1, las MMPs se expresan de forma diferencial en los tres tipos celulares estudiados. El tumor indujo un aumento en la expresión de MMP-2 en fibroblastos, mientras que la MMP-9 aumentó en los dos tipos de células estromales. En C26, los fibroblastos estimulan la producción de MMP-2 independiente de su activación. Finalmente, tanto fibroblastos como macrófagos activados por el tumor indujeron un aumento en la expresión de la MMP-9 por el tumor.
3. En fibroblastos se observó una relación directa entre la estimulación de la expresión de dímeros y DDR1d con la secreción de MMPs. En macrófagos se observó una relación entre la expresión invariable de DDR1 a, b, y c y de MMP-2. Por otra parte, se detectó una relación directa entre la expresión de DDR1d en células tumorales con la de MMP-2 y MMP-9, siendo esta última aún más inducida por la preactivación tumoral de las células estromales.

#### **5. BIBLIOGRAFÍA**

1. Alver, F., Saupé S., Ledwon, M., Schaub, F., Hiddemann, W., Vogel, W. 2001. Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines. *The FASEB J.* 15(7):1321-1323.

2. Borza, C. M., & Pozzi, A. 2014. Discoidin domain receptors in disease. *Matrix Biology*. 34: 185–192.
3. Castro-Sanchez, L., Soto-Guzman, A., Guaderrama-Diaz, M., Cortes-Reynosa, P., & Salazar, E. P. 2011. Role of DDR1 in the gelatinases secretion induced by native type IV collagen in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis*. 28(5): 463–477.
4. Coussens, L. M., Fingleton, B., & Matrisian, L. M. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer—trials and tribulations. *Science*. 295(5564): 2387-2392.
5. Friedl, P., & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. 2011. *Cell*, 147(5): 992-1009.
6. Greenlee, R.T., Hill-Hamon, M.B., Murray, T., & Thun M. 2001. Cancer statistics, 2001. *CA: a cancer journal for clinicians*. 51(1): 15-36.
7. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5): 646–674.
8. Hanahan, D. & Coussens, L.M. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21(3): 309–322.
9. Hynes, R.O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 326 (5957): 1216–1219.
10. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 61(2):69-90.
11. Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., & Weaver, V. M. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. 2009. *Cell*, 139(5): 891-906.
12. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 23(11): 549-555.
13. Nabeshima, K., Inoue, T., Shima, Y., & Sameshima, T. 2002. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. *Pathol. Int*. 52(4): 255–264.
14. Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M., & Takeyama, H. Nagasaki, T. 2014. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumor angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br. J. Cancer*. 110 (2): 469–478.
15. Park, H. S., Kim, K. R., Lee, H. J., Choi, H. N., Kim, D. K., Kim, B. T., & Moon, W. S. 2007. Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase. *Oncology Reports*. 18(6): 1435–1441.
16. Paszek, M. J., Zahir, N, Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D.A., Weaver, V.M. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8 (3): 241–254.
17. Qian, B.Z. & Pollard, J.W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141(1): 39–51.
18. Quail, D.F. & Joyce, J.A. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med*. 19 (11): 1423–1437.
19. Ram, R., Lorente, G., Nikolich, K., Urfer, R., Foehr, E., & Nagavarapu, U. 2006. Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2. *Journal of neuro-oncology*. 76(3): 239-248.
20. Song, S., Shackel, N.A., Wang, X.M., Ajami, K., McCaughan, G.W., & Gorrell, M.D. 2011. Discoidin Domain Receptor 1: Isoform expression and potential functions in cirrhotic human liver. *Am J Pathol*. 178 (3): 1134-1144.
21. Vogel, W. 1999. Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J*. 1: 77– 82.