



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Facultad de Medicina

PAPEL DEL RECEPTOR Thy-1 (CD90) EN EL  
COMPORTAMIENTO DE FIBROBLASTOS  
PULMONARES HUMANOS

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

P R E S E N T A  
GUSTAVO RAMIREZ MARTINEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO

COMITÉ TUTORAL: DR. MOISES SELMAN LAMA

DR. FERNANDO LOPEZ CASILLAS

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)**

**A LOS APOYOS RECIBIDOS POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON NÚMERO DE BECARIO 199498, A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP) Y AL APOYO DE PAPIIT, IN203709, UNAM**

**A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. ANNIE PARDO CEMO, DR. MOISES SELMAN LAMA Y DR. FERNANDO LOPEZ CASILLAS.**

**A mi tutora:**  
**Dra. Annie Pardo,**  
**por sus invaluable enseñanzas**  
**y sobretodo**  
**por su infinita paciencia**  
**Al Dr. Moisés Selman**  
**por permitirme al igual que la Dra. Annie**  
**formar parte de su grupo de trabajo y por regalarme esos valiosos breves**  
**instantes del mejor sentido del humor**  
**y**  
**parafraseando lo que en su grupo de trabajo**  
**ya es una ideología,**  
**esta cita que usted, Dra. Annie ha utilizado en**  
**seminarios y conferencias en donde he tenido el placer de estar**  
**presente:**

**“ACERQUENSE A LA ORILLA, LES DIJO.**  
**NO PODEMOS, TENEMOS MIEDO, CONTESTARON.**  
**ACERQUENSE AL BORDE, REPITO. Y SE ACERCARON.**  
**EL LOS EMPUJÓ...Y EMPEZARON A VOLAR”**

**Guillaume Apollinaire**

**M I L      G R A C I A S**

**A LOS INVESTIGADORES Y COMPAÑEROS DE TRABAJO, VICTOR,  
MARTHA, CARLOS, CARINA, MARCO, ILIANA, PEPE, FELIPE, LOURDES,  
REMEDIOS, JORGE  
DE LOS DEPARTAMENTOS DE FIBROSIS PULMONAR E  
INMUNOQUIMICA DEL INER,  
ASÍ COMO AL LABORATORIO DE BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS DE LA UNAM, POR TODAS SUS ENSEÑANZAS.  
SIN SU AYUDA ESTE TRABAJO NO HUBIERA SIDO POSIBLE.**

**AL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE LA DRA MARTHA TORRES,  
POR DARME TODO SU APOYO Y FACILITARME EL USO DE SUS  
INSTALACIONES PARA LA REALIZACION DE LA PARTE FINAL DEL  
PROYECTO.**

**AL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER)  
Y A SU UNIDAD DE INVESTIGACION**

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	1
<b>INDICE</b>	4
<b>ABREVIATURAS</b>	7
<b>RESUMEN</b>	8
<b>ABSTRACT</b>	10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	12
Fibrosis Pulmonar Idiopática	12
Neumonitis por hipersensibilidad	16
El fibroblasto como célula efectora en la FPI	18
Formación de Focos de Fibroblastos	20
Thy-1 (CD90)	21
Thy-1 y Fibroblastos	22
Metaloproteasas de Matriz (MMPs)	24
Gelatinasa B (MMP-9)	27
Regulación de la actividad de la MMP-9	29
Activación del zimógeno	29
Sustratos de la MMP-9	30
Inhibición de la MMP-9 activa	30
Producción de MMP-9	31
<b>2. JUSTIFICACION</b>	32
<b>3. HIPÓTESIS</b>	32
<b>4. OBJETIVOS</b>	33
Objetivos generales	33
Objetivos específicos	33
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	34
Obtención de fibroblastos pulmonares	34
Análisis por citometría de flujo	35
Southern blot	36
Expresión de RNA mensajero por RT-PCR en tiempo real	36
Western blot	37
Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica	38
Ensayo de Tasa de Crecimiento	39
Ensayo de Migración	39
Ensayo de herida	40
Ensayo de contracción de colágena	40
Zimografía	41
Transfección de fibroblastos y separación celular	41
Cuantificación de TGF- $\beta$ 1	42
<b>6. RESULTADOS</b>	43
Expresión del receptor Thy-1 (CD90) en fibroblastos pulmonares humanos	43

Analisis genómico de Thy-1	46
Tasa de Crecimiento en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)	48
Capacidad de migración de los fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)	49
Contracción de colágena en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)	50
Efecto del TGF- $\beta$ en la expresión de MMP-9	52
Evaluación del efecto del restablecimiento de la expresión de Thy-1 en la producción de MMP-9	54
Expresión de MMP-9 inducida por TGF- $\beta$ dependiente de la vía de las MAP cinasas (ERK1/2)	57
<b>7. DISCUSIÓN</b>	58
<b>8. CONCLUSIONES</b>	67
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	68
<b>10. ANEXO</b>	76

Articulos publicados:

Absence of Thy-1 receptor results in TGF- $\beta$  induced MMP9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. Gustavo Ramírez, James Hagood, Yan Sanders, Remedios Ramírez, Carina Becerril, Lourdes Segura, Lourdes Barrera , Moisés Selman advance online publication, May 16, 2011; doi:10.1038/labinvest.2011.80

Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. Biofactors. 2009 May-Jun;35(3):258-65.

**INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

Figura 1. Patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática	15
Figura 2. Expresión del gen y proteína de Thy-1	44
Figura 3. Expresión de vimentina y producción de TGF- $\beta$ en fibroblastos pulmonares humanos	45
Figura 4. Inmunocitoquímica de pro-colágena I en fibroblastos pulmonares Thy-1(+) y Thy-1(-)	46
Figura 5. Detección del gen para Thy-1	47
Figura 6. Tasa de Crecimiento de Fibroblastos	48
Figura 7. Migración de Fibroblastos	49
Figura 8. Contracción de Colágena en Fibroblastos	51
Figura 9. Zimografía en gelatina de fibroblastos pulmonares estimulados con TGF- $\beta$	53
Figura 10. Localización celular y tisular de MMP-9	54
Figura 11. Transfección de Thy-1	55
Figura 12. Expresión de MMP-9 en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1 (-) derivados de pulmón normal	56
Figura 13. Inducción de la expresión de MMP-9 por TGF- $\beta$ en fibroblastos Thy-1 (-) a través de la vía de las ERK	57



**ABREVIATURAS**

α2M	Alfa 2 macroglobulina
APC	Allophycocyanina
CD	Cluster de diferenciación
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Fluoresceína
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
IGFBP	Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IP-10	Proteína inducida por interferón gamma
MBP	Proteína básica de mielina
MEC	Matriz extracelular
MEROPS	Base de datos de proteasas
MMP	Metaloproteasa de matriz
MMP-9	Metaloproteasa de matriz 9
MT-MMP	Metaloproteasa de matriz con unión a membrana
NH	Neumonitis por hipersensibilidad
NID	Neumopatías intersticiales difusas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PF-4	Factor de plaquetas 4
PMA	Phorbol 12-myristato 13-acetato
RNA	Acido ribonucleico
SDF-1	Factor derivado del estroma 1
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV	Radiación ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

## RESUMEN

Los fibroblastos difieren entre sí en una serie de características fenotípicas, incluyendo la expresión de Thy-1 (CD90), una glucoproteína anclada a glicosilfosfatidilinositol. Los fibroblastos en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) son Thy-1 negativos, mientras que los fibroblastos derivados de pulmón normal son predominantemente Thy-1 positivos.

Sin embargo, las consecuencias funcionales de la ausencia en la expresión de Thy-1 no están completamente entendidas. En el presente trabajo se encontró, analizando varios cultivos primarios de fibroblastos pulmonares, que una alta proporción de ellos, independientemente del origen (normal o de alguna enfermedad), expresan Thy-1 *in vitro*.

Se identificó un cultivo primario de fibroblastos derivado de pulmón de un paciente con neumonitis por hipersensibilidad (NH), que no expresa Thy-1, y se compararon varias características funcionales entre los fibroblastos Thy-1(-) y Thy-1(+).

Los fibroblastos Thy-1(-) son de menor tamaño (longitud:  $41.3 \pm 20.8 \mu$ ) en comparación con los Thy-1(+) ( $83.1 \pm 40 \mu$ ); muestran una incrementada capacidad de proliferación así como una mayor transmigración inducida por PDGF a través de colágena tipo I (59.9% vs 42.2%, sobre el control bajo condiciones basales,  $p < 0.01$ ).

Del mismo modo, los fibroblastos Thy-1(-), de manera espontánea o después de ser estimulados con TGF- $\beta$  durante 24 h, mostraron una mayor contracción de matrices de colágena.

Los fibroblastos Thy-1(-) estimulados con TGF- $\beta$ 1 expresan MMP-9, una enzima que generalmente no es producida por fibroblastos. La expresión de MMP-9 inducida por TGF- $\beta$  fué inhibida después de la re-expresión del gen de Thy-1. El  $\beta$ -glicano, un antagonista del receptor de TGF- $\beta$  inhibió la expresión de MMP-9. La expresión de MMP-9 inducida por TGF- $\beta$ 1 en los fibroblastos Thy-1(-) es dependiente de la activación de la vía de señalización que involucra a ERK1/2.

Finalmente, se demostró que los fibroblastos, de los focos de fibroblastos de pulmones con FPI, que no expresan Thy-1, presentan la proteína MMP-9 inmunorreactiva *in vivo*. Estos hallazgos indican que la ausencia en la expresión de Thy-1 en los fibroblastos pulmonares humanos favorecen la inducción de un fenotipo fibrogénico.

## ABSTRACT

Fibroblasts differ in a variety of phenotypic features, including the expression of Thy-1 (CD90) a glycoposphatidylinositol-linked glycoprotein. Fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are Thy-1-negative, while most fibroblasts from normal lungs are predominantly Thy-1-positive. However, the functional consequences of the absence of Thy-1 are not fully understood.

We found, analyzing several primary fibroblasts, that a high proportion, independently of their origin (normal or disease), expressed Thy-1 *in vitro*. We identified a primary culture of HP fibroblasts which did not express Thy-1, and compared several functional activities between Thy-1(-) and Thy-1(+) fibroblasts. Thy-1(-) fibroblasts were smaller (length:  $41.3 \pm 20.8 \mu$ ) in comparison with Thy-1(+) fibroblasts ( $83.1 \pm 40 \mu$ ), showed increased proliferative capacity and enhanced PDGF-induced transmigration through collagen I. Likewise, Thy-1(-) fibroblasts either spontaneously or after TGF- $\beta$  stimulation at 24 h demonstrated stronger contraction of collagen matrices. Thy-1(-) lung fibroblasts stimulated with TGF- $\beta$ 1 expressed MMP-9, an enzyme that is usually not produced by lung fibroblasts. TGF- $\beta$ -induced MMP-9 expression was inhibited upon re-expression of Thy-1 after transfection with full-length Thy-1.  $\beta$ -glycan, a TGF- $\beta$  receptor antagonist abolished MMP-9 expression. TGF- $\beta$ 1-induced MMP-9 in Thy-1(-) fibroblasts depended on the activation of ERK1/2 signalling pathway.

Finally, we demonstrated that fibroblasts from IPF fibroblastic foci which do not express Thy-1 exhibit strong staining for immunoreactive MMP-9 protein *in vivo*.

These findings indicate that loss of Thy-1 in human lung fibroblasts induces a fibrogenic phenotype.

## 1. INTRODUCCION

### ***Fibrosis Pulmonar Idiopática.***

La fibrosis pulmonar es el resultado común para un conjunto diverso de enfermedades que afectan al parénquima pulmonar, que se conocen como neumopatías intersticiales difusas (NID). Aunque difieren en varias características, son agrupadas así debido a que comparten muchas características clínicas y fisiológicas.

Algunas de estas NID son de etiología conocida como es la exposición a partículas orgánicas o inorgánicas (neumonitis por hipersensibilidad y asbestosis, respectivamente). Sin embargo cerca de la mitad de las enfermedades pulmonares intersticiales son de etiología desconocida y son clasificadas en la actualidad como neumonías intersticiales idiopáticas, de las cuales, la más agresiva es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), en donde los pacientes con FPI mueren de 3 a 5 años después del diagnóstico (1, 2).

Los pacientes con FPI se encuentran generalmente entre los 50 y 70 años de edad al momento en que se presenta la enfermedad. De estos, cerca de dos terceras partes son mayores de 60 años de edad. Además la incidencia, prevalencia y tasa de muerte se incrementa con la edad(3).

La principal característica de las neumonías intersticiales es una apariencia heterogénea del pulmón con áreas de pulmón sano, inflamación intersticial, focos de fibroblastos, fibrosis densa y panalización, así como cambios histológicos que afectan severamente al parénquima pulmonar(4)

Se ha propuesto que la FPI es el resultado de un daño inicial y activación aberrante de las células epiteliales alveolares, el cual promueve migración,

proliferación, y activación de células mesenquimatosas, con la formación de focos de fibroblastos y diferenciación de estos a miofibroblastos, conduciendo a una acumulación exagerada de matriz extracelular (MEC) lo cual produce una pérdida irreversible del parénquima pulmonar y en donde la inflamación no es un factor importante en la patogénesis de la enfermedad (3, 5).

En este proceso no inflamatorio participa activamente el epitelio alveolar, el cual está compuesto por dos tipos celulares: las células alveolares tipo I que comprenden cerca del 95% del epitelio, de forma alargada y con una geometría permite que se realice el intercambio gaseoso, son altamente sensibles a daños por agentes externos y tienen una capacidad de proliferación altamente reducida; cerca del 5% restante lo constituyen las células alveolares tipo II, de forma cuboidal, localizadas hacia los alvéolos, y son metabólicamente muy activas como células secretoras sintetizando principalmente el surfactante, que da la tensión superficial en la interfase alveolar aire-líquido, evitando que los alvéolos se colapsen; también estas células son capaces de proliferar y diferenciarse en células alveolares tipo I(3). En el pulmón fibrótico están presentes diversos tipos celulares con alteraciones morfológicas y funcionales. Entre las alteraciones se encuentra un incremento en las tasas de necrosis y apoptosis de las células epiteliales alveolares, afectándose la capacidad de las células alveolares tipo II para restablecer la población de células alveolares tipo I. Además las células epiteliales son capaces de sintetizar mediadores profibróticos como factores de crecimiento y citocinas que tienen influencia en la migración y proliferación de los fibroblastos, así como en los cambios en su fenotipo. Lo anterior sugiere que las células epiteliales son las principales

responsables del inicio de los eventos fibrogénicos(6). De manera interesante, se ha observado que en los pulmones derivados de FPI, existe un perfil transcripcional en donde existe una expresión incrementada de genes relacionados con el desarrollo embrionario del pulmón, lo que indica que en esta enfermedad, las vías de señalización embrionarias involucradas en la comunicación del epitelio-mesénquima así como la plasticidad de las células epiteliales están activadas de manera aberrante. Dentro del grupo de genes asociados a programas de desarrollo que se encuentran desregulados en la FPI se encuentran los miembros de familias de factores de transcripción como los relacionados con Sry, HMGB y la caja forkhead y a los genes relacionados con la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina(7).

La característica distintiva a nivel histológico de la FPI es la formación de agregados o focos de fibroblastos y miofibroblastos. Su presencia conduce a una remodelación anormal, un depósito excesivo y desordenado de matriz extracelular y la ruptura de la estructura pulmonar. Evidencia reciente ha demostrado que en la patogénesis de la FPI están involucrados una serie de mecanismos no solo de depósito y degradación de matriz extracelular, sino mecanismos de regulación génica, como es la mediada por modificaciones epigenéticas así como por microRNAs(8-10).

Otra vía en la patogénesis de la fibrosis pulmonar proviene de las neumonías intersticiales difusas, las cuales tienen un componente inflamatorio importante como característica común; una de estas patologías es la neumonitis por hipersensibilidad, en cuya manifestación clínica crónica, se presenta un



proceso inflamatorio que si no se resuelve, el daño es irreversible y hay progresión a fibrosis pulmonar (figura 1).

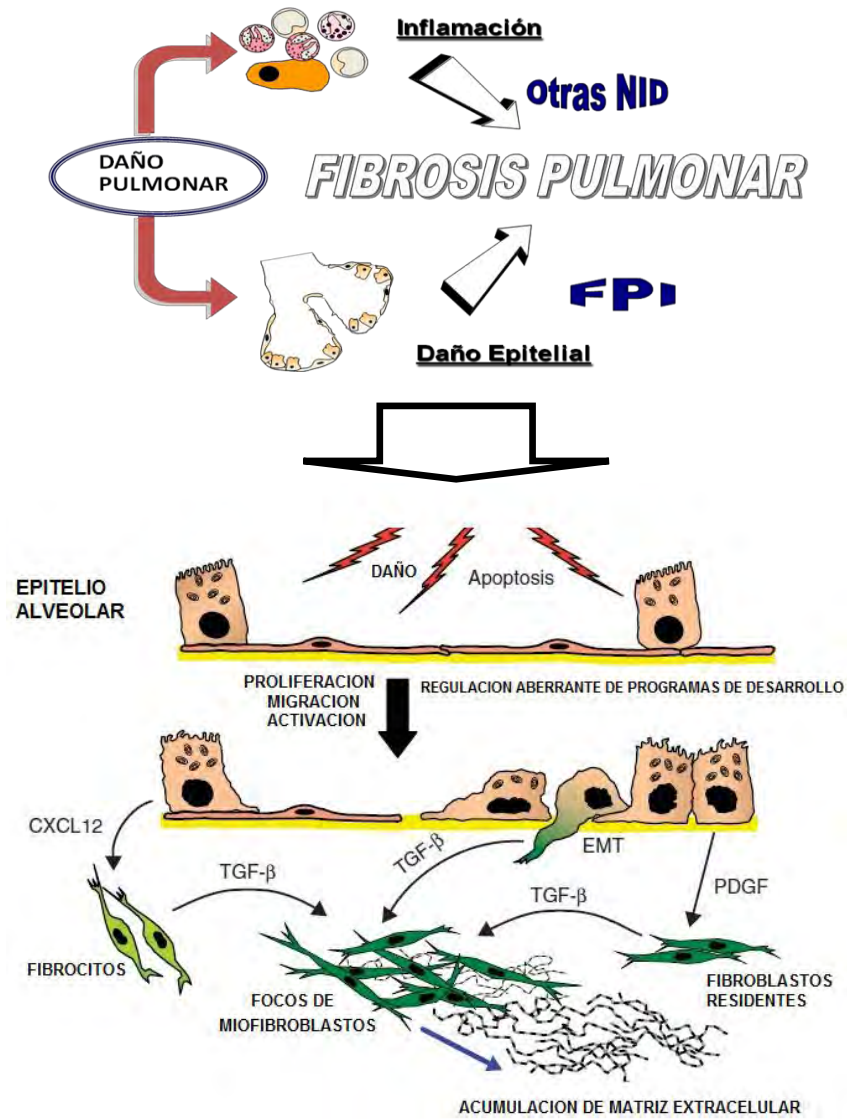


Figura 1. Patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática(10, 11)

### ***Neumonitis por Hipersensibilidad***

La neumonitis por hipersensibilidad, también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por la inhalación repetida de partículas orgánicas, hongos, bacterias y algunos compuestos químicos(12, 13). Los antígenos más comunes son proteínas de aves y actinomicetos termofílicos. Esta enfermedad afecta a bronquiolos, alvéolos y al espacio intersticial. Aunque la patogénesis de la NH no se conoce con precisión, hay evidencias que indican que las diferentes subpoblaciones de linfocitos T tienen un papel importante en el desarrollo y curso clínico de la enfermedad(14). Adicionalmente, las evidencias clínicas y experimentales sugieren que las citocinas tipo Th1 también contribuyen en la patogénesis de NH(14, 15).

En la patogénesis de la NH existen 3 manifestaciones clínicas:

1. Aguda: consiste en una respuesta macrófago-linfocitaria
2. Subaguda: formación de granulomas
3. Crónica: caracterizada por el desarrollo de fibrosis pulmonar

El perfil celular del lavado bronquioalveolar de pacientes con NH se caracteriza por un aumento de linfocitos T, con un predominio de linfocitos T citotóxicos, sin embargo, se ha reportado que un aumento en la subpoblación de linfocitos T CD4 está asociado a la progresión de la NH hacia fibrosis pulmonar. Alrededor del 30-40% de los pacientes con NH crónica o con episodios subagudos repetidos evolucionan hacia fibrosis intersticial difusa(13, 16). Sin embargo, los mecanismos moleculares asociados a este proceso, que

involucran pérdida en la resolución de la alveolitis linfocítica y regeneración tisular, remodelación anormal de la matriz extracelular y progreso a la fibrosis, aun no se conocen completamente.

Por otro lado, dado que la FPI, a diferencia de otras enfermedades intersticiales difusas que desencadenan en fibrosis como resultado de un proceso inflamatorio crónico e irreversible, representa un proceso de activación epitelial e independiente de inflamación, se han realizado numerosos estudios que demuestran que las células epiteliales alveolares activadas de manera anormal son capaces de sintetizar prácticamente todos los mediadores que provocan y mantienen el proceso fibrótico probablemente a través de la comunicación aberrante entre las células epiteliales y las células del mesénquima(3, 6). Análisis sobre el perfil transcripcional de la fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad han confirmado la divergencia entre las vías que conducen a la fibrosis pulmonar en estas dos patologías.

El patrón de expresión génica representada por la neumonitis por hipersensibilidad está constituida por una vía inflamatoria que se caracteriza por una sobre-expresión de genes relacionados con la activación de células T y la respuesta inmune incluidos genes de receptores de citocinas y quimiocinas; el patrón de la fibrosis pulmonar idiopática, por el contrario se distingue por la sobre-expresión de genes asociados a epitelio y fibroblasto-miofibroblasto así como genes involucrados en la reparación tisular(17).

Este análisis es importante, ya que la remodelación de la matriz extracelular es un proceso dinámico que bajo condiciones normales está altamente controlado y que está involucrado en procesos celulares como es la reparación, progresión

tumoral y metástasis. Cuando este control se pierde, dándose un desequilibrio entre la degradación y síntesis de matriz extracelular, empieza un proceso de remodelación anormal y acumulación de matriz extracelular, característico de la fibrosis pulmonar.

En el pulmón fibrótico, existe una proporción de matriz extracelular de dos a tres veces más que en el pulmón normal, y entre las moléculas incluidas están colágena, fibronectina, elastina y proteoglicanos. Además de estos componentes, las proteasas así como sus inhibidores juegan un papel importante en el proceso de degradación y depósito de moléculas de MEC; el conocer el degradoma de la FPI, es decir, el repertorio global de proteasas que se expresan en un tiempo específico por una célula, tejido u organismo así como su regulación y localización, permitirá diseñar estrategias terapéuticas más eficaces.

En el pulmón fibrótico ocurren eventos dinámicos e intensos de remodelación de la MEC y que generan microambientes o “parches” pulmonares característicos de esta enfermedad(18, 19).

#### ***El fibroblasto como célula efectora en la FPI.***

Aunque la evidencia indica que el epitelio en muchos casos inicia y mantiene la señalización celular para que el proceso fibrogénico se perpetúe, el fibroblasto es la principal célula efectora en la fibrosis. La persistencia de los fibroblastos en la matriz extracelular alterada dentro de los espacios pulmonares dañados, y su excesivo depósito de matriz, como ocurre en la FPI en los focos de fibroblastos son las características que correlacionan con una fibrosis más

severa. Los fibroblastos están presentes en muchos tejidos, particularmente en aquellos con componentes epiteliales y microvasculares prominentes como son piel, pulmón, hígado y riñón, pero sin embargo carecen de un marcador universal. Frecuentemente se definen por su localización en compartimentos intersticiales/mesenquimatosos y por su morfología alargada. En cultivo, frecuentemente se definen morfológicamente y por la ausencia de otros marcadores específicos. Evidencias histológicas y funcionales como son la expresión de colágena tipo I,  $\alpha$ -actina de musculo liso, enzimas como la telomerasa y la ciclooxigenasa así como receptores como Thy-1, indican que los fibroblastos son células heterogéneas y constituyen diferentes subpoblaciones con características fenotípicas y funcionales particulares, dependiendo del microambiente en el que se encuentren y con los mediadores presentes (factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, etc) (20). El origen de estos fibroblastos con fenotipos diferentes no es claro, aunque se ha sugerido su posterior diferenciación a partir de las poblaciones celulares residentes y/o migración dentro del pulmón desde una fuente extrapulmonar con o sin diferenciación local(21, 22). Los miofibroblastos, una de las subpoblaciones mas importantes en la FPI, pueden originarse a partir de fibroblastos residentes diferenciándose fenotípicamente a miofibroblastos bajo la influencia de algunos mediadores como TGF- $\beta$ 1, IL-4 e IL-13(23). Los fibroblastos en el pulmón fibrótico difieren de los fibroblastos en el pulmón normal en una serie de características fenotípicas, incluyendo marcadores de superficie, composición del citoesqueleto, síntesis de colágena, capacidad de proliferación, resistencia a apoptosis, perfil transcripcional, entre otros(23-26)

### ***Formación de Focos de Fibroblastos.***

Posteriormente a la activación de las células epiteliales, ocurre la formación de los focos de fibroblastos, caracterizados por estar constituidos por un grupo característico de fibroblastos y miofibroblastos subepiteliales con un arreglo paralelo a la pared alveolar. Estos focos representan zonas microscópicas de lesión pulmonar activa en donde las células alveolares que delimitan el área son destruidas, produciéndose una ruptura en la membrana basal del epitelio y generándose zonas de producción y depósito de matriz extracelular(27).

Los fibroblastos tienen importantes funciones en tres mecanismos biológicos: desarrollo, homeostasis del tejido y reparación. De acuerdo a la heterogeneidad que existe en las subpoblaciones de fibroblastos, se cree que para la formación de los focos de fibroblastos y el progreso del proceso fibrótico, los fibroblastos adquieren primero un fenotipo que les facilita la migración, un fenotipo proliferativo en el sitio de la lesión y finalmente una conversión a miofibroblasto siendo el fenotipo profibrótico que causa la producción y depósito de matriz extracelular, además del desequilibrio en la producción de MMPs/TIMPs(28). La persistencia de los miofibroblastos juega un papel importante en la progresión de la fibrosis con una evolución al estado terminal del pulmón fibrótico(29).

Uno de los modelos *in vitro* para estudiar la heterogeneidad de los fibroblastos se basa en la expresión de la glicoproteína Thy-1. Los fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) en ratones son morfológicamente distintos; ambas subpoblaciones difieren en la producción de citocinas y factores de crecimiento(28, 30). Estudios recientes han demostrado que Thy-1 participa de manera importante

de la activación de TGF- $\beta$  latente, diferenciación de miofibroblastos y resistencia a apoptosis(31, 32). Se ha demostrado que los miofibroblastos en los focos de fibroblastos de pacientes con FPI son Thy-1 negativos, mientras que la mayoría de los fibroblastos de pulmones normales son Thy-1 positivos, probablemente como resultado de una modificación epigenética(33, 34). Todas estas evidencias indican que la ausencia de Thy-1 favorece la inducción de un fenotipo profibrótico, predominantemente compuesto por miofibroblastos resistentes a la apoptosis.

### ***Thy-1 (CD90)***

La proteína Thy-1, llamada también CD90, es una glucoproteína anclada a glicosilfosfatidilinositol que se expresa en la superficie de varios tipos celulares incluidos los fibroblastos(35). En humanos, el gen para Thy-1 (CD90) está localizado en el cromosoma 11q22.3 y contiene cuatro exones y tres intrones. Thy-1 fue el primer antígeno de superficie observado en linfocitos y cuya expresión estaba restringida en ciertas subpoblaciones de linfocitos (como por ejemplo linfocitos T en ratón), encontrándose que tenía un papel central en el desarrollo de la inmunidad celular. También fue una de las primeras moléculas secuenciadas, indicando la gran importancia de los dominios de inmunoglobulina y los anclajes de GPI como motivos estructurales.

En el timo, Thy-1 es probablemente la glicoproteína más abundante en la superficie de timocitos y puede representar entre el 10 y 20% de su superficie(36).

Esta molécula constituye uno de los mayores componentes de la superficie de varios tipos celulares. En humano, Thy-1 (CD90) está altamente expresado en la superficie de neuronas en ciertas etapas de desarrollo. Es una de las glucoproteínas más expresadas en mamíferos y su presencia está altamente regulada en sistema nervioso siendo importante en el crecimiento axonal y en el control de la diferenciación neuronal(37, 38).

Aunque ha sido implicada en adhesión celular e inhibición de crecimiento de neuritas, la función de Thy-1 no es muy clara. También se ha localizado en varias líneas celulares pertenecientes al tejido conectivo, principalmente fibroblastos y también en células T y B inmaduras, células de médula ósea CD34<sup>+</sup> (entre un 10-40% de células CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup> del total), así como en algunas líneas celulares derivadas de leucemias y linfomas(39-41).

Como miembro de la familia de las inmunoglobulinas, Thy-1 posiblemente funcione como molécula de adhesión y además de poder modular las vías de señalización celular a través de su anclaje con GPI, aunque su ligando se desconoce(42).

### ***Thy-1 y Fibroblastos***

La expresión de Thy-1 divide a los fibroblastos de varios tejidos, incluyendo pulmón humano y el tracto reproductor femenino, en dos subpoblaciones: fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-), con características funcionales diferentes. Por ejemplo, solo los fibroblastos Thy-1(+) expresan CD40, una proteína de superficie involucrada en la activación y en la proliferación de células T, así como en la producción de citocinas(43, 44).



Thy-1 está involucrado en la adhesión de los fibroblastos a componentes de la matriz extracelular como son la fibronectina y la colágena tipo I. Los fibroblastos expresan Thy-1 en una alta proporción por lo que es considerado como un marcador para este tipo celular. (45, 46).

Otra característica significativa del tejido fibrótico es la alteración de sus propiedades mecánicas como es la contractibilidad. El miofibroblasto, debido en parte a su expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso, exhibe esta propiedad mecánica como ocurre en la contracción de las heridas, o la contracción *in vitro* en redes de colágena pobladas de fibroblastos. Los miofibroblastos juegan un papel mecánico en la fibrosis pulmonar y pueden ser responsables de algunas de las características de una lesión fibrótica: depósito de matriz extracelular y alteración de las propiedades mecánicas. Thy-1 activa múltiples vías de señalización, afectando las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, teniendo influencia en una amplia variedad de funciones celulares como son proliferación celular, diferenciación y sobrevivencia(41, 47).

Los efectos de la ausencia de Thy-1 en la programación génica para definir una característica fenotípica particular en fibroblastos es aun incompleta y en particular no se ha descrito el efecto de esta ausencia en la expresión de metaloproteasas de matriz (MMPs) así como en la homeostasis de la matriz extracelular.

### ***Metaloproteasas de Matriz (MMPs)***

Las MMPs comprenden una familia de enzimas estructuralmente relacionadas, bastante conservada a lo largo de la escala evolutiva, presente en invertebrados, bacterias y plantas. De acuerdo a la base de datos MEROPS, que clasifica a las proteasas de acuerdo a sus similitudes en secuencia, estructura, evolución y sobretodo al mecanismo catalítico, se encuentran 67 familias agrupadas en 5 clases de proteasas: a) cisteína (19 familias); b) serina (17 familias); c) aspártico (3 familias); d) treonina (3 familias) y e) metalo (24 familias)(19).

Las características que distinguen a las MMPs del resto de las proteasas son: a) presencia de un ion zinc en el sitio catalítico; b) tienen una secuencia de aminoácidos conservada; c) se secretan en forma inactiva (zimógeno); d) tienen especificidad para la degradación de componentes de la matriz extracelular y e) son inhibidas por inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP)(48).

Dependiendo de sus características estructurales y funcionales, las MMPs son clasificadas a su vez en diferentes subgrupos tomando en cuenta la similitud en la afinidad por el sustrato. Así, son divididas en a) colagenasas, b) gelatinasas, c) estromelinas, d) matrilisinas, e) MMPs asociadas a membrana (MT-MMPs) y f) otras MMPs(49)

Las MMPs tienen una serie de dominios conservados y que son característicos: péptido señal, que dirige a la proteína a la secreción extracelular. El propéptido, responsable de la latencia de las MMPs y posee un residuo de cisteína altamente conservado el cual es responsable de la estabilización de la

estructura inactiva de la proenzima, formando un enlace con el ion de zinc, en el dominio catalítico, manteniendo de esta forma la latencia de la enzima. Para la activación de la proenzima, es necesario el rompimiento de este enlace. El dominio catalítico presenta una secuencia conservada (-His-Glu-x-Gli-His-) que incluye un dominio de unión al zinc. Se reconocen dos sitios de unión al  $Zn^{2+}$ , el estructural y el catalítico, siendo en este último en donde se lleva a cabo la actividad proteolítica para los diferentes sustratos. El dominio tipo hemopexina, localizado en el extremo carboxilo terminal, de 3 o 4 secuencias repetidas, conectadas por un puente disulfuro entre residuos de cisteína, lo que ayuda a la unión del sustrato y de los inhibidores. Solo la MMP-7 y la MMP-26 no poseen este dominio. Además de estos dominios estructurales, existen otros dominios accesorios presentes solo en algunas MMPs como son las de unión a membrana (MT-MMPs)(50-52)

La regulación de las MMPs ocurre a diferentes niveles: expresión, activación de las proenzimas y el control de la actividad por inhibidores específicos. La expresión de las MMPs se induce rápidamente cuando hay remodelamiento del tejido.(53)

Se ha observado que algunas citocinas y factores de crecimiento actúan como inductores o represores de diferentes MMPs, dependiendo de sus promotores. El efecto de estas moléculas sobre la expresión de MMPs, dentro de ellas la gelatinasa B (MMP-9), ha sido reportado en varios tipos celulares implicados en la patogénesis de la FPI(54). Se ha observado que las acciones de las MMPs

pueden resultar en la liberación de factores de crecimiento y citocinas, los cuales a su vez tienen efecto en el crecimiento celular y proliferación. Como se ha mencionado, durante el desarrollo de la FPI, las células epiteliales alveolares son las responsables de expresar y liberar la mayoría de las citocinas y factores de crecimiento profibrosantes. Se ha reportado que las células epiteliales alveolares tipo II y macrófagos alveolares son los principales sitios de síntesis de TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ (55).

El TGF- $\beta$  se expresa en tres diferentes formas, de las cuales el TGF- $\beta$ 1 tiene su mayor asociación con FPI y se ha demostrado su sobre-expresión en el pulmón fibrótico en sitios donde hay formación de focos de fibroblastos(56). Se ha demostrado que la MMP-9 y MMP-2 están involucradas en la activación proteolítica del TGF- $\beta$  latente, además de existir una estrecha relación entre la expresión del receptor de superficie CD44, MMP-9 y TGF- $\beta$ (57, 58). CD44 se acopla proteolíticamente con MMP-9, facilitando la ruptura y activación del TGF- $\beta$  latente. El TGF- $\beta$  es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de moléculas de MEC, por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales, además de inducir la expresión de integrinas y receptores que participan en la interacción célula-MEC, por lo que es considerada como la principal molécula profibrosante. La vía de señalización del TGF- $\beta$  es una vía multifuncional la cual tiene su principal efecto en la proliferación celular; tiene diversas funciones por medio de la interacción con sus dos principales receptores de superficie TGF- $\beta$ R1 y TGF- $\beta$ R2, formándose un complejo y promoviendo la activación de la vía de señalización(59). El TGF- $\beta$ R3, conocido también como beta glicano, no tiene dominio de señalización intracelular y

puede ser anclado a la membrana o secretado. Se ha propuesto que en su forma soluble el beta glicano actúa secuestrando los ligandos de sus receptores de señalización, mecanismo por el cual es considerado como un antagonista(60-62). En términos de la FPI, puede considerarse como una molécula antifibrosante(63).

### ***Gelatinasa B (MMP-9)***

Las gelatinasas han sido implicadas en la ruptura de membrana basal contribuyendo a un remodelamiento aberrante del tejido pulmonar, impidiendo la re-epitelialización alveolar y promoviendo la migración e invasión de los fibroblastos hacia los espacios alveolares(64). En modelos experimentales, después de la instilación (administración intratraqueal) con bleomicina a ratones deficientes para producir MMP-9, desarrollan fibrosis de igual manera que los ratones silvestres instilados; sin embargo, los pulmones de los ratones deficientes de MMP-9 muestran una mínima bronquiolización alveolar, lo que sugiere que la MMP-9 facilita la migración celular hacia las regiones de daño alveolar(65). Por otro lado, en ratones transgénicos que sobre-expresan MMP-9, instilados con bleomicina, hay un menor desarrollo de fibrosis, lo cual sugiere que estos efectos opuestos pueden deberse al tipo celular que la produce, la localización donde se lleva a cabo su actividad así como sus niveles de expresión, definiendo las diferentes vías de respuesta ante el daño tisular(66). Así, el remodelamiento de la MEC no consiste solo de proteólisis para la eliminación de restos proteicos. Las acciones de las MMPs son importantes en

la regulación de procesos de desarrollo y están involucradas en condiciones de homeostasis como patológicas.

Niveles incrementados de algunas MMPs (colagenasas, estromelisininas y gelatinasas) han sido detectados y han sido asociados con enfermedades inflamatorias del tejido conectivo y procesos invasivos de cáncer(67, 68). La MMP-9 ha sido clonada en numerosas especies de mamíferos con una homología de aproximadamente 80% a nivel de RNA mensajero entre ratón, rata, conejo y humano. La MMP-9 humana es sintetizada como proenzima con un peso molecular de 92 kDa, mientras que en ratón el tamaño de la proenzima es de 105 kDa. La región promotora de la MMP-9 se encuentra en la región 5' de 2 kb que contiene los sitios de unión AP-1, AP-2 y SP-1. El gen de humano contiene adicionalmente sitios de unión para NF- $\kappa$ B y Ets(68). La MMP-9 en humano está localizada en el cromosoma 20q11.1-13.1, posición asociada con hiper-respuesta bronquial(69).

Las gelatinasas contienen un pro-dominio que las mantiene inactivas, seguido por un dominio activo y un dominio de unión al zinc que forma el sitio catalítico. El dominio hemopexina participa en la especificidad del sustrato y la unión a los TIMPs. Además, las gelatinasas tienen un dominio extra tipo fibronectina. Este consiste de tres repeticiones de fibronectina II y le permite la unión a la gelatina (colágena desnaturalizada), elastina, laminina y colágena tipo I y IV. La MMP-9 posee un dominio adicional de colágena tipo V y se encuentra altamente glicosilado. Los azúcares pueden hacer que este dominio sirva de espaciador entre el dominio de unión a zinc de la MMP-9 y el extremo carboxilo-terminal del dominio hemopexina, teniendo también efecto en la especificidad por el

sustrato y en resistencia a la degradación(67, 70). La función de la glucosilación en la pro-MMP-9 aun no se ha determinado, sin embargo se ha sugerido que puede tener un papel importante en su activación y catálisis(71).

### ***Regulación de la actividad de la MMP-9***

La actividad de la MMP-9 está regulada por tres mecanismos principales: transcripción, activación de la proenzima e inhibición. Existen otros mecanismos como son la glucosilación, compartimentalización y secreción de la enzima, reclutamiento en la superficie celular, endocitosis y degradación intracelular (72, 73).

### ***Activación del zimógeno.***

La pro-MMP-9, como todas las MMPs, es producida como un zimógeno que requiere de activación para tener actividad enzimática. La activación de la enzima puede ocurrir por mecanismos proteolíticos o no proteolíticos, pero en ambos casos se produce un cambio conformacional que rompe la interacción entre el prodominio y el sitio catalítico. Por ejemplo, la MMP-3 es capaz de activar a la MMP-9, hidrolizando el enlace peptídico entre Glu<sup>59</sup>-Met<sup>60</sup>, generando una especie activa de 82 kDa; esta a su vez puede ser procesada en una nueva especie activa de 64 kDa por la eliminación de un fragmento en el COOH-terminal(74). Los mecanismos no proteolíticos de activación comprenden la interacción de la pro-MMP-9 con su sustrato (gelatina o colágena tipo IV) a través del dominio tipo hemopexina, llevando a un cambio conformacional produciendo una disociación entre el pro-dominio y el dominio catalítico, causando su activación. El óxido nítrico (NO) también activa a la pro-

MMP-9 reaccionando con el residuo de cisteína en el pro-dominio, formándose un derivado S-nitrosilado. La S-nitrosilación es una modificación post-traducciona análoga a la fosforilación y acetilación, que modula específicamente la actividad biológica de las proteínas(75).

### ***Sustratos de la MMP-9***

Dentro de los sustratos de la MMP-9 se encuentran: colágena tipo I, IV, V, VII, XI XIV, gelatina (colágena desnaturalizada), elastina, fibrilina, tenascina, osteonectina, osteopontina, agrecano, versicano, fibronectina, vitronectina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, decorina, MBP, precursor de TNF, IGFBP, plasminógeno, TGF- $\beta$ , pro- IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IP-10, SDF-1, VEGF y PF-4(67, 72, 76-78).

### ***Inhibición de la MMP-9 activa***

La inhibición de la actividad de la MMP-9 ocurre por la unión específica y no covalente de los TIMPs (1-4) con el sitio activo de la enzima. El principal inhibidor circulante de la MMP-9 es la  $\alpha_2$  macroglobulina, la cual puede atrapar las formas activas de la MMP-9 y removerlas de la circulación a través de la vía de los receptores "scavenger". Dentro de los TIMPs, los cuatro tienen afinidad por la MMP-9, pero típicamente la enzima es secretada por las células en forma de complejo no covalente con TIMP-1. La MMP-9 es única en relación a que forma complejo con TIMP-1 con el carboxilo terminal de la proenzima así como con el dominio catalítico de la forma activa(79).



### ***Producción de MMP-9***

La MMP-9 es producida, bajo diversas condiciones de estimulación, por células epiteliales bronquiales, células de Clara (células localizadas en los bronquiolos y que participan en su regeneración), células alveolares tipo II, células de musculo liso, células endoteliales y astrocitos, además de los leucocitos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos, células NK y células dendríticas(68, 80-84). Por otro lado, las células derivadas de cáncer pulmonar pueden producir MMP-9 de manera constitutiva y puede ser un marcador del potencial metastásico(85).

En relación a la FPI, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 y MMP-28 están elevadas en esta patología(19). En lavado bronquioalveolar de pacientes con FPI, se encuentran niveles elevados de MMP-9, especialmente en pacientes con una evolución más rápida de la enfermedad(86). En tejidos de FPI, la tinción por inmunohistoquímica de MMP-9 es mayor en las células epiteliales, neutrófilos y macrófagos. Como posibles funciones de la MMP-9 en FPI están el de promover la migración de células epiteliales en sitios dañados, activación de TGF- $\beta$  latente y facilitar la migración de leucocitos a través del depósito excesivo de MEC(87).

Evidencia sugiere que existe una asociación entre la MMP-9 y la fibrosis pulmonar. Sin embargo, los modelos animales han mostrado resultados contradictorios; algunas evidencias sugieren que la MMP-9 tiene un papel patológico, otras sugieren que el proceso fibrogénico es independiente de MMP-9(65, 88)

La relación entre la expresión de MMP-9 y las subpoblaciones de fibroblastos importantes en la FPI, específicamente en la subpoblación de fibroblastos que se define por la expresión del receptor Thy-1, se desconoce.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad cuyos mecanismos celulares y moleculares no se conocen con precisión. Los fibroblastos desempeñan un papel central en la patogénesis de la enfermedad, pero su relación con la expresión o ausencia de la molécula Thy-1 en la patogénesis de la FPI no se conocen con precisión. Es importante conocer la influencia que tiene la expresión de esta molécula en los mecanismos de fibrogénesis para posiblemente ser considerado como un blanco terapéutico

## **3. HIPÓTESIS**

Existen diferencias en el comportamiento celular de los fibroblastos en relación a la ausencia o presencia del receptor Thy-1, generándose un fenotipo profibrosante debido a la ausencia de esta molécula.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivos Generales

- 1) Caracterizar la expresión de Thy-1 en fibroblastos pulmonares humanos derivados de pulmón normal, de neumonitis por hipersensibilidad y de fibrosis pulmonar idiopática.
- 2) Evaluar el efecto de la expresión de Thy-1 en el comportamiento de fibroblastos humanos normales con respecto a la migración, proliferación y la expresión de moléculas relacionadas con la remodelación de la matriz extracelular.

### Objetivos específicos

- Caracterizar la expresión en Thy-1 en fibroblastos pulmonares humanos por citometría de flujo.
- Obtener poblaciones enriquecidas de fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)
- Evaluar la diferencia en la capacidad de migración en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) utilizando cámaras de Boyden así como por el método de cicatrización.
- Determinar la tasa de proliferación en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)
- Determinar la capacidad de contracción de colágena de fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) controles y estimulados con TGF- $\beta$ .
- Evaluar la diferencia en la producción de metaloproteasas de matriz entre fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) controles y estimulados con TGF- $\beta$  por zimografía, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

- Transfectar el gen Thy-1 en fibroblastos Thy-1(-) y evaluar el posible cambio en su fenotipo principalmente en la producción de metaloproteasas de matriz.
- Separar células Thy-1(-) a partir de fibroblastos normales y evaluar su comportamiento bajo el estímulo de TGF- $\beta$ , en relación a la producción de MMP-9.
- Caracterizar la vía de señalización que interviene en la producción de MMP-9.

## **5. MATERIAL Y METODOS**

### **Obtención de fibroblastos pulmonares**

Los fibroblastos de pulmón fueron obtenidos de biopsias de pacientes con FPI (n=5), NH (n=4) cuyo diagnóstico fue confirmado por histopatología(17). Los fibroblastos de pulmón normal (n=3) fueron obtenidos de pacientes a los que se realizó lobectomía/pneumonectomía para remover un tumor primario, de áreas con ninguna evidencia histológica de enfermedad. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Los fibroblastos fueron aislados por tratamiento enzimático con Tripsina-EDTA (Tripsina-EDTA [1X] 0.5 grs. de tripsina porcina y 0.2 grs. EDTA, SIGMA) a 37°C, 20 min. Posteriormente los fibroblastos (pasajes 5-9) se cultivaron en cajas de cultivo COSTAR T-25 cm<sup>2</sup> con medio Ham F-12 (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (GIBCO

BRL), 100 U/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomicina, a 37°C en 5%CO<sub>2</sub> / 95%O<sub>2</sub> como se describió previamente(89).

Para algunos experimentos los fibroblastos pulmonares fueron cultivados en medio Ham F-12 sin suero por 24 horas y estimuladas con TGF-β<sub>1</sub> humano recombinante a una concentración de 5 ng/ml (R&D Systems, MN USA). Los fibroblastos estimulados con TGF-β<sub>1</sub> fueron pretratados con el inhibidor de MEK 1/2 PD98059 (10 μM; Calbiochem-Novabiochem, San Diego CA) y β-glicano<sub>33</sub> (100nM; gentilmente proporcionado por el Dr. López Casillas, UNAM).

### **Análisis por citometría de flujo**

Los fibroblastos se cultivaron hasta llegar a confluencia temprana (80-90%), hasta pasajes entre 4 y 9; posteriormente se trataron con tripsina y se lavaron con PBS a 500 x g, 10 min., a 4°C para eliminar la tripsina. Posteriormente se contaron en cámara de Neubauer para marcar 2.5 x 10<sup>5</sup> células por tubo y fueron resuspendidas en 50 μL de Buffer con BSA 1%. Los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos monoclonales conjugados: anti-Thy-1-APC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego CA) en superficie con 10 μL /2.5 x 10<sup>5</sup> células o anti-vimentina-FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego CA). Se incubaron durante 60 min en la oscuridad. Posteriormente se lavaron 2 veces con 1.2 mL de PBS, y centrifugados a 500 x g, 10 min a 4°C. Desechando el sobrenadante, los fibroblastos se fijaron en 500 μL de p-formaldehído al 1%. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACS Aria (BD, Palo Alto

CA) utilizando el programa FACSDiva versión 6.1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego CA).

### **Southern blot**

Para determinar la presencia del gen Thy-1, el DNA genómico de fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) fue digerido con la enzima de restricción HindIII y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El DNA fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con una sonda conteniendo un fragmento de Thy-1 obtenido del plásmido recombinante pcDNA3.1 liberado con las enzimas de restricción EcoRI y NotI. El fragmento recuperado fue marcado con digoxigenin-11-dCTP. El DNA fue inmovilizado por UV e hibridado toda la noche a 42 °C con 10 ng/ml de buffer de hibridación con la sonda de Thy-1 (10% de dextran sulfato, 1% de SDS, 1 M de NaCl, 100 ng/ml de DNA de esperma de salmón), La señal de hibridación fue detectada con radiografía de rayos X.

### **Expresión de RNA mensajero por RT-PCR en tiempo real**

El RNA total fue extraído a partir de fibroblastos pulmonares utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). 1 µg de RNA total fue utilizado para la obtención de cDNA por medio de transcripción reversa utilizando el estuche comercial iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la realización de la PCR en tiempo real fue utilizado el iCycler iQ Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y las sondas Taqman para Thy-1, Hs00264235\_s1

(Applied Biosystems, CA) y para el rRNA 18S, 4352930E, usada como control endógeno (Applied Biosystems, CA). Las muestras fueron amplificadas por triplicado utilizando la solución Mastermix (Applied Biosystems, CA) y los resultados expresados en media  $\pm$  desviación estándar del número de copias del gen blanco normalizado con el gen endógeno 18S. Cada cDNA fue cuantificado en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto. Para determinar el número de copias, se realizó una curva estándar usando un producto de PCR para Thy-1 y para el rRNA 18S por medio de diluciones seriadas en un rango dinámico de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^9$ . La detección de Thy-1 en DNA genómico también fue por medio de sonda Taqman,

### **Western blot**

Se obtuvieron extractos celulares de fibroblastos usando buffer RIPA (Pierce, Cheshire UK) con un coctel de inhibidores de proteasas (P8340; Sigma St Louis MO). Las concentraciones de proteína fueron determinadas por el método de Bradford. Se usaron 30  $\mu$ g de proteína y se separaron electroforéticamente (SDS-PAGE) en un gel de acrilamida al 12.5% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Después de bloquear las membrana con 5% de leche libre de grasa, fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-Thy-1 (dilución 1:10,000; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-ERK1/2 (dilución 1:2000; Calbiochem, San Diego CA) anti-ERK1/2 fosforilada (dilución 1:2000; Calbiochem, San Diego CA) y anti-  $\beta$ -tubulina (dilución 1:200; Santa Cruz Biotechnology, CA).

Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS+Tween-20 al 0.1% por 10 minutos cada uno. Después de los lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. La inmunodetección se realizó por quimioluminiscencia utilizando el sistema Molecular Imager Chemidoc XR+ con el programa Quantity One v4.6.9 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### **Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica**

Para la inmunocitoquímica los fibroblastos humanos fueron sembrados sobre portaobjetos de vidrio tratados como previamente se ha descrito(90). Las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-procolágena-I (dilución 1:100; Chemicon Europe Ltd, Hampshire UK) y anti-MMP-9 (dilución 1:700; Chemicon Temecula, CA). Para la inmunohistoquímica, cortes de tejido de pacientes con FPI, NH y controles fueron tratados como se describe previamente(91). La recuperación del antígeno fue realizada con buffer de citratos 10 mM, pH 6.0 durante 6 min en microondas. Las muestras fueron incubadas con anti-MMP-9 (2.5 µg/ml; Chemicon International Inc, Temecula, CA) a 4°C toda la noche.

Las células y los tejidos fueron incubados después con un anticuerpo secundario conjugado a biotina seguido de un anticuerpo con estreptavidina conjugada a peroxidasa (BioGenex, San Ramon, CA) siguiendo las instrucciones de fabricante, revelando la reacción con 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, BioGenex) en buffer de acetatos y 0.05% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los tejidos y las células se contratiñieron con hematoxilina. Para los controles negativos, se sustituyeron los anticuerpos primarios por suero. Adicionalmente, laminillas de



tejido pulmonar de pacientes con NH, incluyendo el tejido Thy-1 negativo, fueron teñidos con un anticuerpo monoclonal anti-Thy-1 (dilución 1:50, Epitomics, Burlingame CA).

### **Ensayo de Tasa de Crecimiento**

Los fibroblastos fueron plaqueados en una placa de 96 pozos a una densidad de  $1.5 \times 10^3$  células/pozo y sincronizadas con medio sin suero por 24 hrs y posteriormente el medio fue sustituido por medio Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino al 1% y el crecimiento fue monitoreado durante 8 días usando el reactivo de proliferación WST-1 (Roche, Mannheim Germany) como se describe previamente(25). Los cambios en la absorbancia fueron considerados como el porcentaje en el incremento de la tasa de crecimiento relacionado con valores basales.

### **Ensayo de Migración**

La migración de los fibroblastos pulmonares humanos fue medida usando cámaras de Boyden recubiertas en su base con colágena tipo I (Chemicon Temecula, CA) con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ . Los fibroblastos ( $3 \times 10^5$ ) se agregaron en la cámara superior y 0.3 ml de medio Ham F-12 con PDGF-BB (20 ng/ml; R&D Systems, MN). Después de la incubación por 8 hrs a 37°C las células que no migraron en la parte superior de la cámara fueron recuperadas y lavadas. Las células que migraron fueron cuantificadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante como se describe previamente(25). Brevemente, las células fueron teñidas y el color fue eluido con 300  $\mu\text{l}$  de buffer de

extracción, y alícuotas de 150  $\mu$ l fueron medidas en un lector de ELISA a 545 nm. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

### **Ensayo de Herida**

Los fibroblastos humanos fueron sembrados en placas de 6 pozos (Corning, New York) a una concentración de  $2.5 \times 10^4$  células/pozo con 3 ml de medio Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Después de 48 hrs, las monocapas fueron separadas mecánicamente con una punta estéril de 200  $\mu$ l. El experimento fue realizado por duplicado. Los pozos fueron fotografiados cada 12 hrs.

### **Ensayo de contracción de colágena**

Para evaluar la capacidad contráctil de los fibroblastos, se utilizó el método in vitro de contracción de colágena en geles flotantes. Los fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml fueron homogenizadas por separado con una solución de colágena a pH 7.2 (2 mg/ml; INAMED; Fremont CA) y 0.5 ml/pozo de esta solución conteniendo los fibroblastos fueron sembrados en una placa de 24 pozos. Las placas fueron incubadas por 2 hrs a 37°C, para producirse la polimerización de las fibras de colágena. Después de esas 2 hrs, los geles fueron desprendidos de las paredes con una punta delgada y estéril. Finalmente, se agregó a cada pozo 0.5 ml de medio Ham F-12 sin suero con o sin TGF- $\beta$  (5 ng/ml). El experimento se realizó por duplicado. La capacidad de contracción fue fotografiada y calculada usando un sistema de análisis de imágenes Kodak.

## **Zimografía**

Se recolectaron medios condicionados provenientes de fibroblastos en cultivo bajo condiciones basales así como estimulados con TGF- $\beta$  (5 ng/ml). En algunos experimentos se adicionó  $\beta$ -glicano (100 nM) previamente a la estimulación con TGF- $\beta$ . Las muestras fueron separadas electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 10% conteniendo 1 mg/ml de gelatina como sustrato.

Los medios condicionados de los fibroblastos pulmonares humanos y de las células U2-OS estimuladas con PMA fueron utilizados como controles positivos para la MMP-2 y la MMP-9, respectivamente.

## **Transfección de fibroblastos y separación celular**

Se cultivaron fibroblastos pulmonares humanos Thy-1(-) en medio Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Los fibroblastos fueron transfectados con el vector de expresión para mamíferos pcDNA3.1 Zeo que contiene el cDNA completo correspondiente a la molécula Thy-1 humana o con el vector vacío, utilizando un electroporador con el reactivo para transfección de fibroblastos pulmonares (AMAXA Biosystems, Gaithersburg, MD). Después de la transfección, las células fueron separadas por citometría de flujo en base a la expresión de Thy-1 utilizando un citómetro FACS Calibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células transfectadas así como los fibroblastos Thy-1(-) fueron sembrados en una placa para su posterior estimulación con TGF- $\beta$ . Por otro lado, fibroblastos obtenidos de pulmón normal fueron también separados por citometría de flujo en base a la expresión de Thy-1. Las células Thy-1(+) y Thy-1(-) fueron cultivadas bajo las

condiciones establecidas. Posteriormente el medio fue sustituido por medio (Ham F-12 sin suero y las células fueron estimuladas durante 40 hrs con TGF- $\beta$  (5 ng/ml). Estas células fueron utilizadas para inmunocitoquímica y los medios condicionados utilizados para zimografía en gelatina.

### **Cuantificación de TGF- $\beta$ 1**

Se cuantificó TGF- $\beta$ 1 en medios condicionados obtenidos de fibroblastos utilizando un estuche comercial sensible y específico para detección por ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). TGF- $\beta$ 1 es expresado en picogramos por mililitro de proteína.

## 6. RESULTADOS

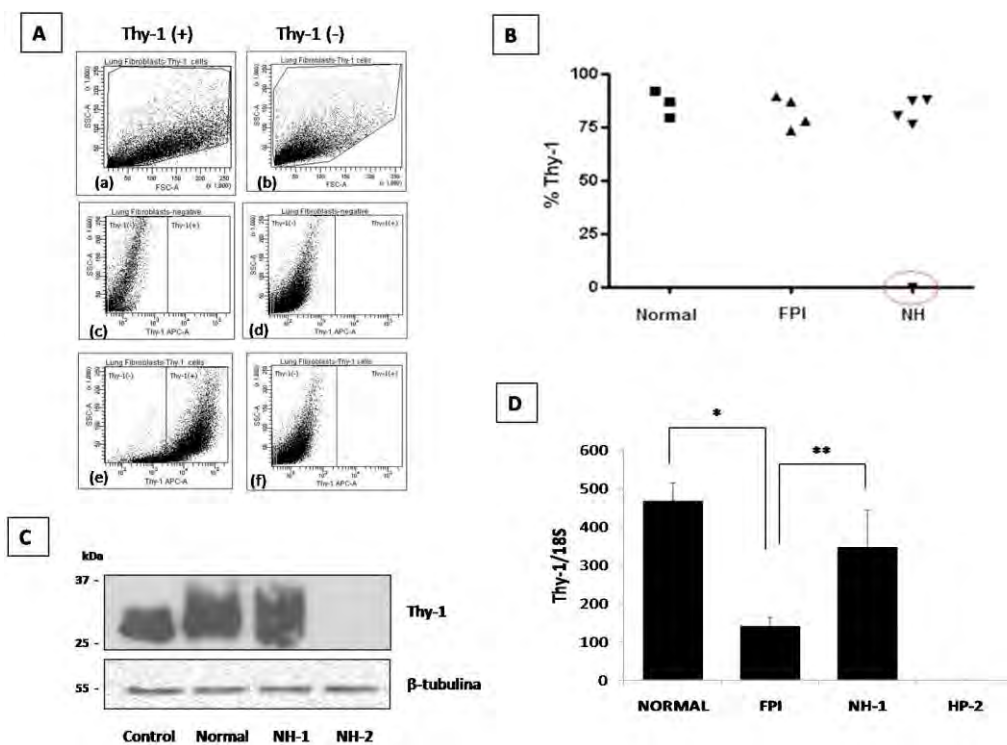
### **Expresión del receptor Thy-1 (CD90) en fibroblastos pulmonares humanos.**

Para determinar el porcentaje de expresión de Thy-1 en los fibroblastos pulmonares humanos obtenidos de pulmón normal, de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y neumonitis por hipersensibilidad (NH), se hizo la caracterización por citometría de flujo (figura 2A).

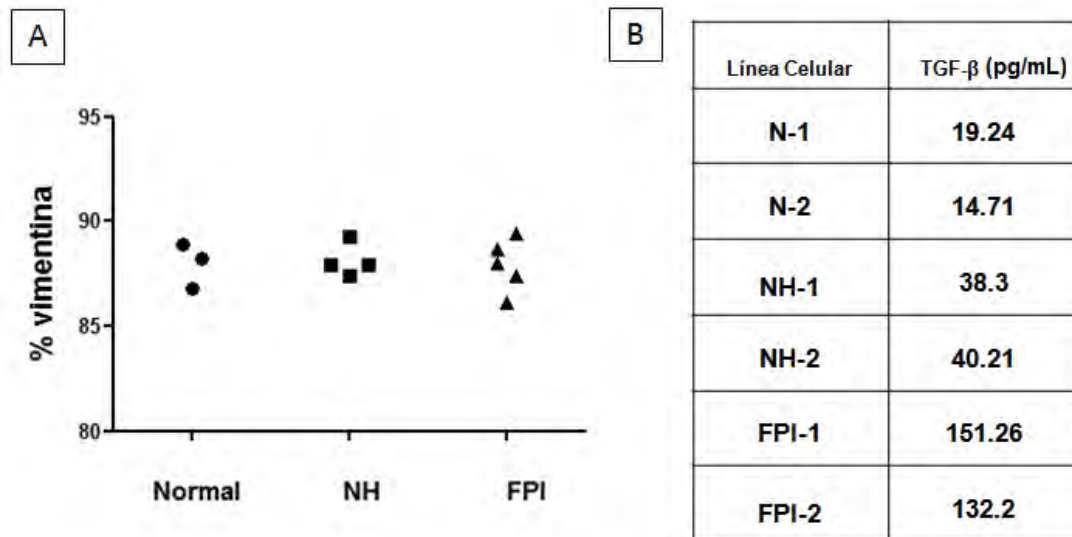
Existe una alta proporción de fibroblastos Thy-1 positivos en todos los cultivos primarios (entre 75 y 95% en todas las muestras) y como se muestra en la figura 2B, no se encontraron diferencias significativas entre grupos. Se observó, en fibroblastos provenientes de pulmones con FPI, niveles significativamente menores de RNA mensajero de Thy-1 comparado con los niveles observados en los fibroblastos normales ( $141 \pm 23$  vs  $468 \pm 48$ ;  $p < 0.01$ ; Figura 2D). De este estudio se encontró un cultivo primario de fibroblastos derivados de neumonitis por hipersensibilidad con ausencia en la expresión de Thy-1. Este cultivo primario provenía de una biopsia tomada a una paciente de 54 años de edad quien mostró un patrón funcional restrictivo moderado al momento del diagnóstico (capacidad vital forzada de 58%) con hipoxemia en reposo ( $\text{PaO}_2 = 60$  mmHg, cuyos valores normales a la altitud de la ciudad de México son de  $67 \pm 3$  mmHg) que empeoraba con ejercicio ( $\text{SpO}_2$  en reposo del 90% y al término de caminar durante 6 minutos de 81%) y que a pesar del tratamiento con prednisona y azatioprina, una terapia inmunomoduladora usada en el tratamiento de la fibrosis pulmonar, la paciente empeoró y murió 5 años después del diagnóstico. a ausencia en la expresión de Thy-1 en estos

fibroblastos fue corroborado a nivel de proteína por Western blot y a nivel de RNA mensajero por RT-PCR cuantitativo (figuras 2C y 2D, respectivamente). Estos fibroblastos Thy-1 negativos (HP-2) mostraron diferencias en cuanto a tamaño, siendo más pequeños en comparación con los fibroblastos Thy-1 positivos como se muestra en la figura 2A, a y b. No se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de vimentina entre los fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) (figura 3A). En relación a la expresión de Thy-1 en los fibroblastos derivados de HP, no se encontraron diferencias en cuanto a la producción de TGF- $\beta$  (figura 3B).

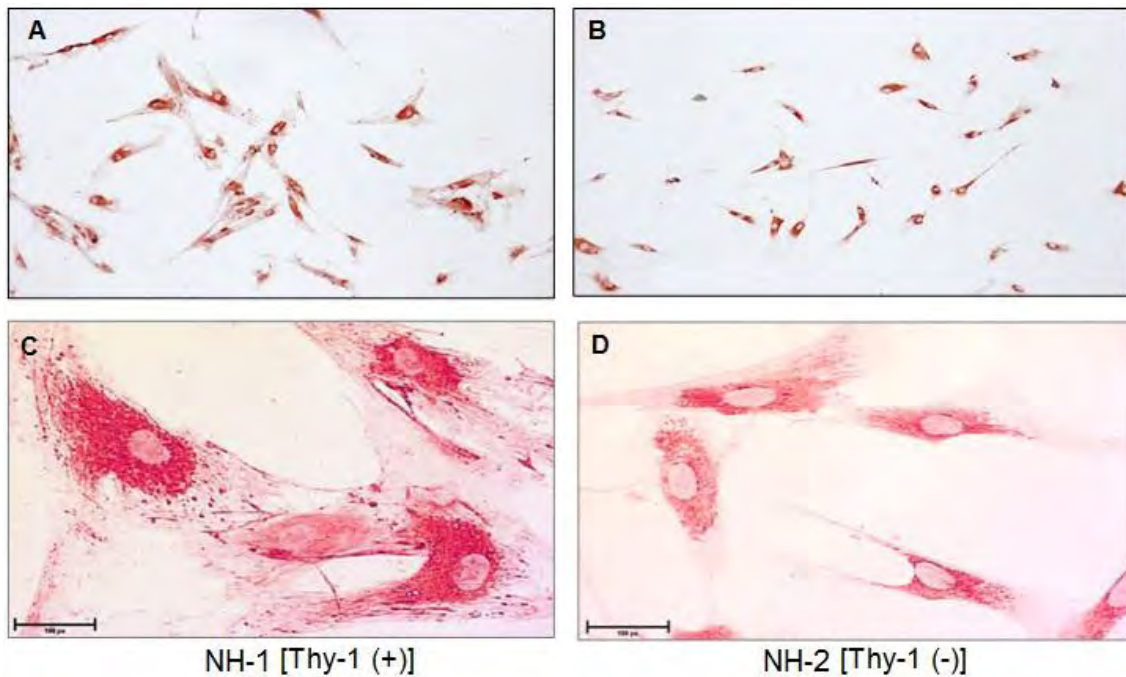
La diferencia en tamaño de los fibroblastos Thy-1(-) fue corroborada por microscopia después de realizarse una tinción para procolágena tipo I (Figura 4). Los fibroblastos Thy-1 negativos fueron dos veces más pequeños que los fibroblastos Thy-1 positivos ( $41.3 \pm 20.8\mu$  vs  $83.1 \pm 40\mu$ ).



**Figura 2. Expresión del gen y proteína de Thy-1 en fibroblastos pulmonares humanos.** A, análisis representativo por citometría de flujo de fibroblastos pulmonares humanos derivados de dos pacientes con NH. B, porcentaje de expresión de Thy-1 en cultivos primarios de fibroblastos de 3 sujetos normales (control), 4 de pacientes con FPI y 5 de pacientes con NH, analizados por citometria de flujo. C, Western blot para Thy-1. Se usó un lisado celular IMR-32 como control positivo. D, expresión génica para Thy-1 por RT-PCR cuantitativa de fibroblastos normales, derivados de FPI y de NH (valores expresados como el promedio  $\pm$  SD; \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).



**Figura 3. Expresión de vimentina (A) y producción de TGF- $\beta$  (B) en fibroblastos pulmonares humanos,** normales (N), de neumonitis por hipersensibilidad (NH) y de fibrosis pulmonar idiopática (FPI)



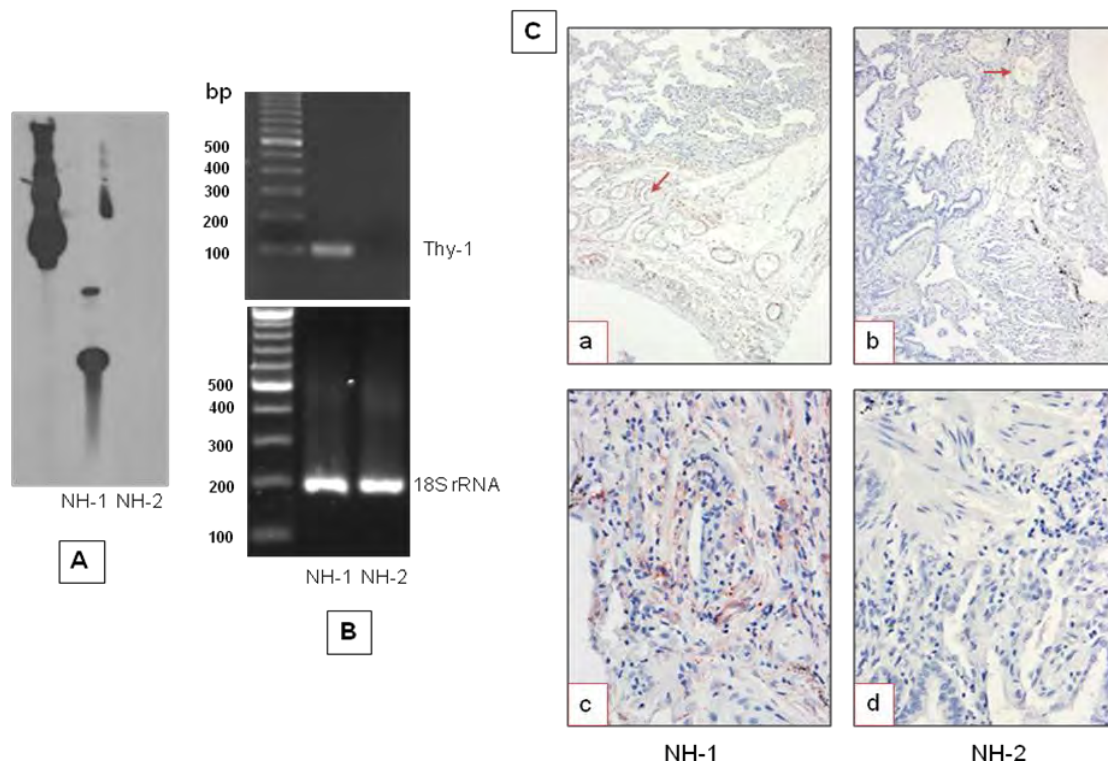
**Figura 4. Inmunocitoquímica de pro-colágena I en fibroblastos pulmonares Thy-1(+) y Thy-1(-).** A y C: fibroblastos NH-1 Thy-1 (+); B y D: fibroblastos NH-2 Thy-1 (-). Se observa que los fibroblastos Thy-1(-) son más pequeños que los fibroblastos Thy-1(+). A y B, 10X; C y D, 60X. Barra=20 μm

#### **Análisis genómico de Thy-1**

Se utilizó DNA genómico de fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) para analizar la presencia o ausencia del gen de Thy-1. Como se muestra en la figura 5A cuando se analizó por Southern blot, hubo hibridación de la sonda, formada de un producto de PCR correspondiente a Thy-1 amplificado por sonda taqman, con el DNA genómico de los fibroblastos Thy-1(+), mientras que no se observó hibridación en el DNA de los fibroblastos Thy-1(-). Este resultado fue confirmado por PCR en donde solo el producto de PCR correspondiente a Thy-1 fue amplificado en los fibroblastos NH-1 mientras que no se observó amplificación en los fibroblastos NH-2 (Figura 5B), indicando la ausencia de



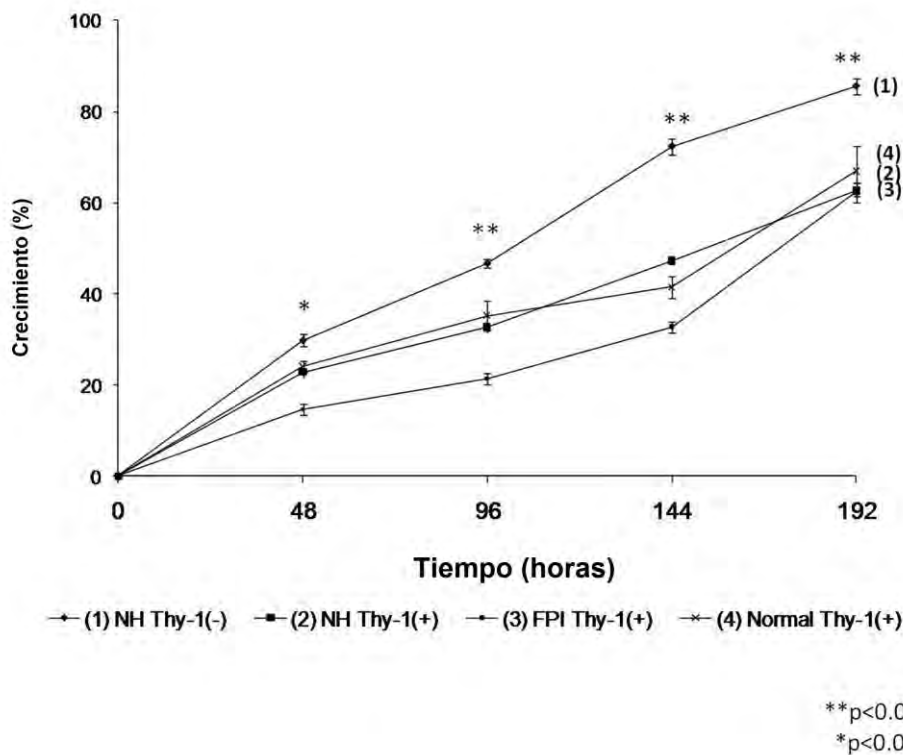
Thy-1 en estos fibroblastos. Este hallazgo se corroboró por inmunohistoquímica en tejido pulmonar de los mismos pacientes con neumonitis por hipersensibilidad. No se observó tinción positiva en el tejido pulmonar del paciente NH-2 (figura 5C, b y d), mientras que en el tejido pulmonar del paciente NH-1 se observó tinción positiva para Thy-1 en varios tipos celulares, incluyendo células endoteliales y células en el intersticio (figura 5C,a y c).



**Figura 5. Detección del gen para Thy-1.** A, análisis por Southern blot de fibroblastos Thy-1 (+) y (-). B: PCR para Thy-1 de DNA genómico de fibroblastos Thy-1 (+) y (-). C: Análisis Inmunohistoquímico donde se muestra la tinción para Thy-1 en las células endoteliales (panel a, señalado por la flecha) y en células intersticiales (panel c) en el tejido de pulmón NH-1. No se observa tinción en el tejido pulmonar NH-2. Aumento: 10X (a, b); 40X (c, d).

### Tasa de Crecimiento en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)

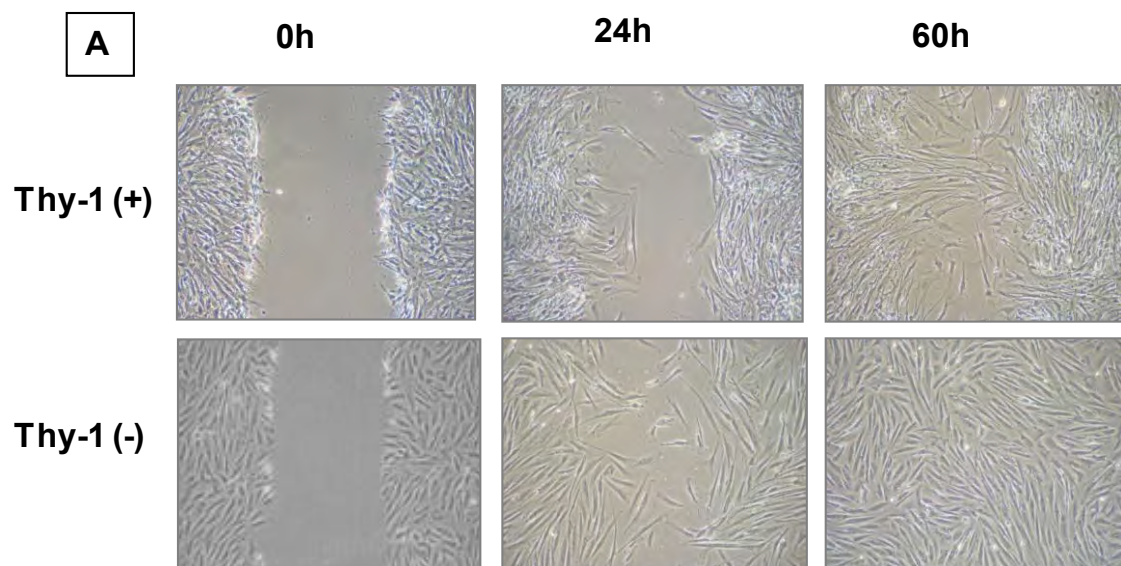
Se comparó la tasa de crecimiento de los fibroblastos Thy-1(-) con tres cultivos primarios de fibroblastos Thy-1(+) derivados de pulmón normal, de FPI y de NH utilizando el reactivo WST-1. Como se observa en la figura 6, los fibroblastos Thy-1(-) en presencia de medio de cultivo Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino al 1%, mostraron una tasa de crecimiento significativamente mayor (de alrededor del 20%,  $p < 0.01$ ) en comparación con los diferentes cultivos de fibroblastos Thy-1(+), a partir de las 48 horas.

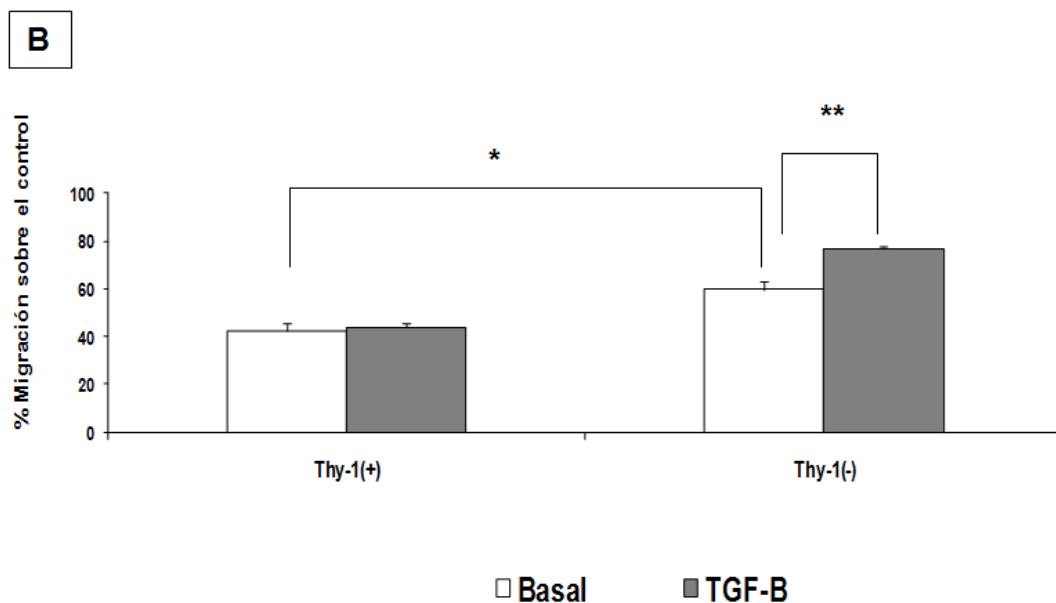


**Figura 6. Tasa de Crecimiento de Fibroblastos.** Crecimiento de fibroblastos pulmonares humanos determinado por el método de WST-1. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE. El experimento fue realizado por triplicado.

### Capacidad de migración de los fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)

Para evaluar el efecto de la expresión del receptor Thy-1 sobre el comportamiento migratorio de fibroblastos, se emplearon los métodos de cicatrización in vitro y de trans migración a través de cámaras de Boyden. Los fibroblastos Thy-1(-) cerraron más rápidamente la herida hecha in vitro que los fibroblastos Thy-1(+), quedando completamente cerrada a las 60 horas (figura 7A). Asimismo, la trans migración celular a través de las cámaras de Boyden recubiertas con colágena tipo I, en respuesta a PDGF-B fue significativamente mayor en los fibroblastos Thy-1(-) comparado con los fibroblastos Thy-1(+) en condiciones basales ( $p < 0.01$ ). Estimulación con TGF- $\beta$  incrementó la trans migración de los fibroblastos Thy-1(-) ( $p < 0.05$ ) mientras que en los fibroblastos Thy-1 (+) no se observó cambio (figura 7B).

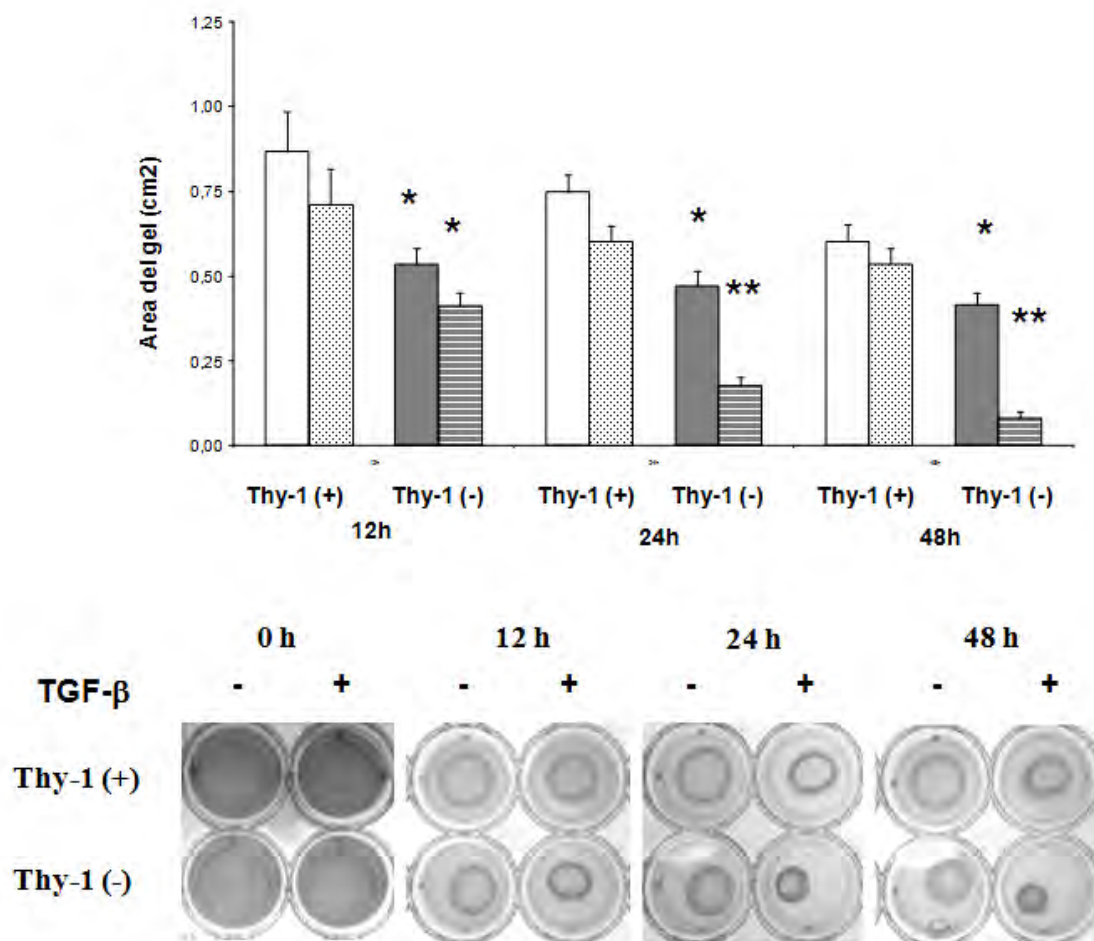




**Figura 7. Migración de Fibroblastos.** A, ensayo de cicatrización. B: ensayo de trans migración en cámaras de Boyden recubiertas de colágena I. PDGF-B fue usado como quimioatrayente en el compartimiento inferior. Cada barra representa un experimento por duplicado; \*p < 0.01, \*\* p< 0.05.

### Contracción de colágena en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)

Se examinó la contracción de fibras de colágena en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-). Los fibroblastos se incubaron en geles de colágena durante 2 horas en una placa a 37°C. Al cabo de este tiempo los geles fueron desprendidos del pozo y el diámetro del gel fue fotografiado durante varios tiempos. Como se muestra en la figura 8, en condiciones basales, los fibroblastos Thy-1(-) mostraron un incremento significativo de contracción de colágena en comparación con los fibroblastos Thy-1(+). Este efecto fue notablemente mayor con el estímulo de TGF- $\beta$  (0.17 +0.03 vs 0.6 + 0.05 cm<sup>2</sup> a las 24 h; p<0.01)



**Figura 8. Contracción de Colágena.** Geles representativos de matrices flotantes de colágena y fibroblastos después de 12 h, 24 y 48 h con medio Ham F-12 sin suero o estimulados con TGF- $\beta$  (5 ng/ml). Las barras blancas representan a las células Thy-1 (+) en condiciones basales. Las barras punteadas representan a las células Thy-1 (+) bajo el estímulo de TGF- $\beta$ . Las barras grises muestran a las células Thy-1 (-) en condiciones basales y las barras con líneas horizontales representan a las mismas células estimuladas con TGF- $\beta$ . \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

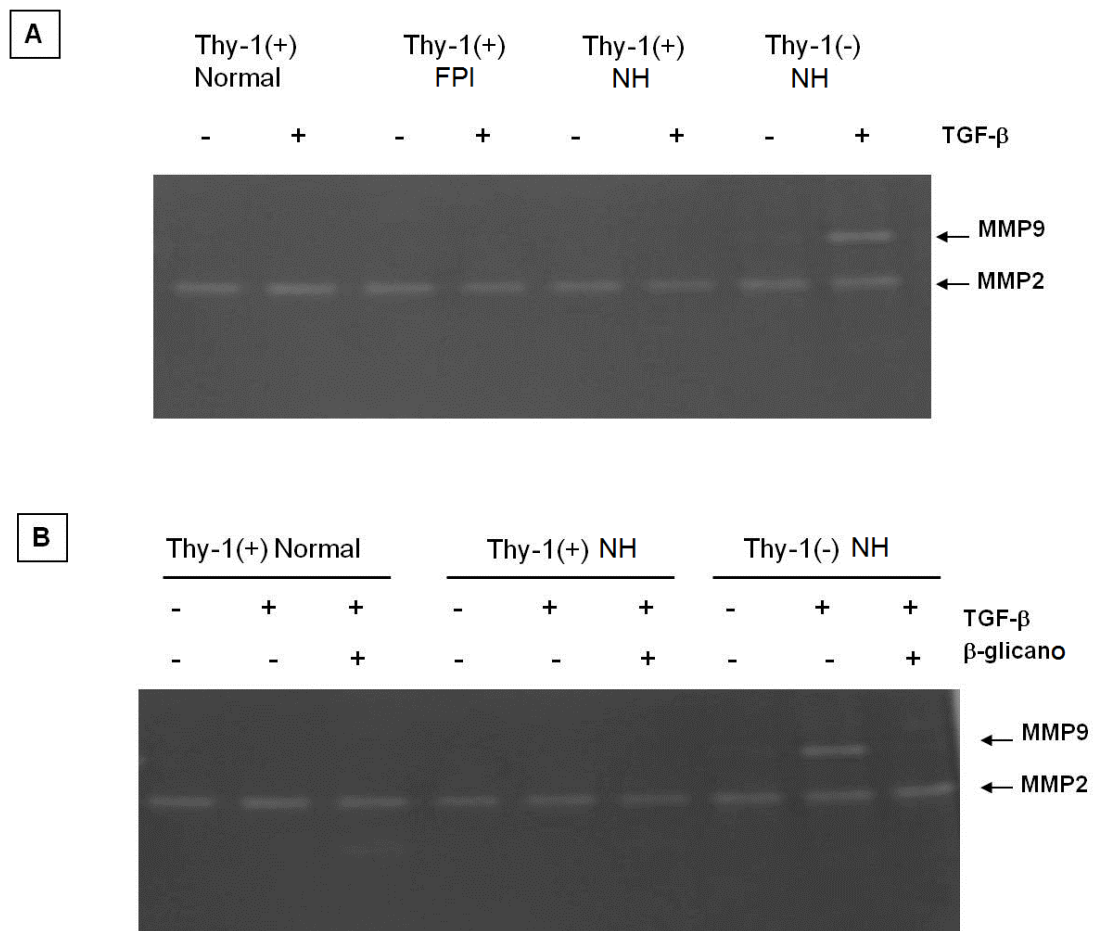
### **Efecto del TGF- $\beta$ en la expresión de MMP-9**

Se ha demostrado que el TGF- $\beta$ 1, conocido como la principal molécula profibrosante, implicada en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, induce la expresión de MMP-9 en varios tipos celulares.

Por esta razón, se midió el efecto de TGF- $\beta$ 1 en la expresión de la MMP-2 y MMP-9. Para ello, cultivos de fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) se estimularon con TGF- $\beta$ 1 y la MMP-2 y MMP-9 fueron analizadas por zimografía e inmunocitoquímica. Como se muestra en la figura 9A, la estimulación de los fibroblastos Thy-1(-) con TGF- $\beta$ 1 induce la expresión de MMP-9, una metaloproteasa de matriz usualmente no producida por fibroblastos, mientras que no se observaron cambios en la producción de MMP-2.

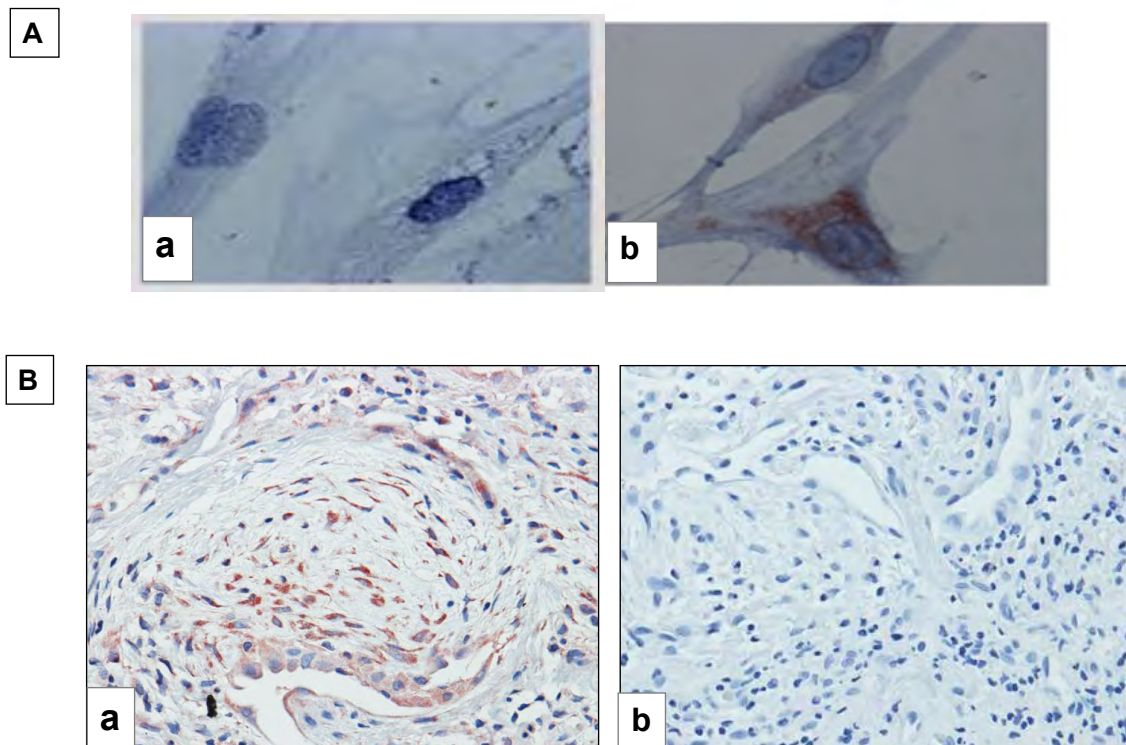
Asimismo, cuando fibroblastos Thy-1(-) fueron expuestos a TGF- $\beta$ RIII soluble, un antagonista conocido también como  $\beta$ -glicano previamente a la estimulación con TGF- $\beta$ 1, la producción de MMP-9 fué inhibida (Figura 9B).

Por otro lado, se corroboró la producción de MMP-9 por inmunocitoquímica. Como se muestra en la figura 10A, después de la estimulación con TGF- $\beta$ 1, se observó una fuerte tinción citoplásmica de MMP-9 solo en los fibroblastos Thy-1(-). Adicionalmente, y como se ha reportado previamente una ausencia en la expresión de Thy-1 en los focos de fibroblastos(33), se evaluó por inmunohistoquímica si los fibroblastos en esos focos expresaban MMP-9. Como se observa en la figura 10B, fibroblastos en el foco mostraron intensa tinción para MMP-9 asimismo células epiteliales como se ha descrito previamente(91).



**Figura 9. Zimografía en gelatina de fibroblastos pulmonares estimulados con TGF- $\beta$ .** A. Zimografía de medios condicionados derivados de fibroblastos pulmonares con medio Ham F-12 sin suero o estimulados durante 24h con TGF- $\beta$  (5 ng/ml). B. El  $\beta$ -glicano (donado generosamente por el Dr. López-Casillas; UNAM) bloquea la inducción de MMP-9 por acción de TGF- $\beta$ .





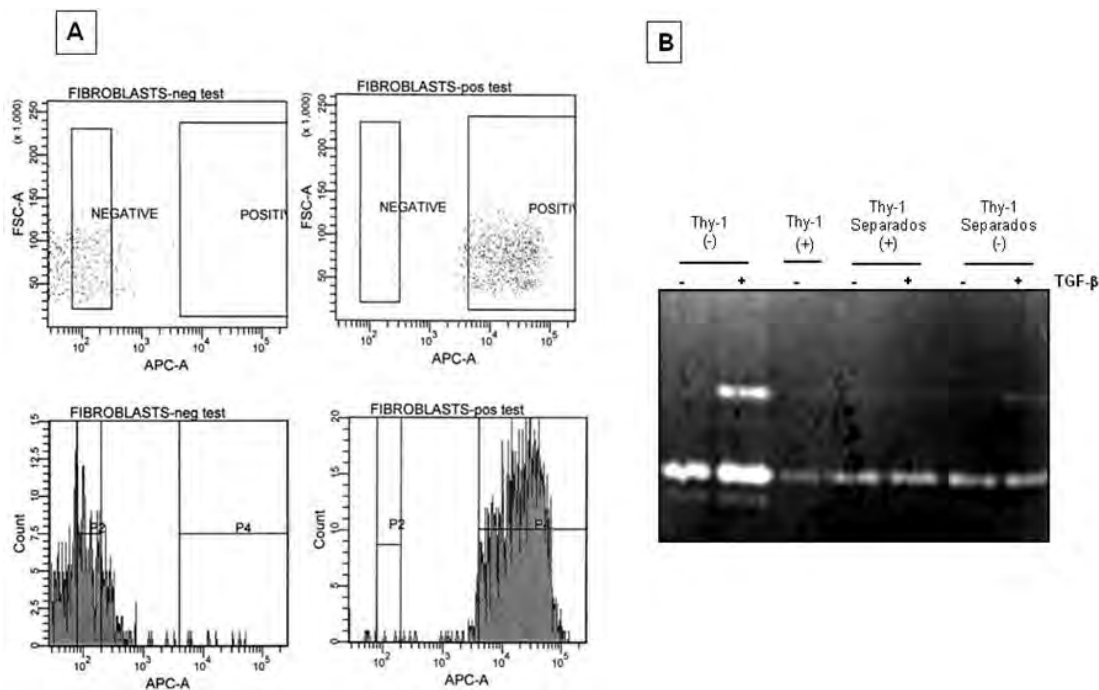
**Figura 10. Localización celular y tisular de MMP-9.** A. Inmunocitoquímica representativa de la expresión de MMP-9 en los fibroblastos NH-1 Thy-1 (+) (a) y NH-2 Thy-1(-) (b) estimulados con TGF- $\beta$  (5 ng/ml) por 24 h. B. Immunohistoquímica de MMP-9 en tejido pulmonar derivado de FPI (a). Control negativo de tejido pulmonar derivado de FPI (b). Aumento 40X.

### **Evaluación del efecto del restablecimiento de la expresión de Thy-1 en la producción de MMP-9**

Los fibroblastos pulmonares Thy-1(-) fueron transfectados con el gen correspondiente a Thy-1 y posteriormente separados y reanalizados por citometría de flujo para confirmar la expresión de Thy-1 (figura 11A). El 42% de los fibroblastos Thy-1(-) fueron transfectados. Después del análisis por citometría de flujo, los fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) fueron sembrados y estimulados con TGF- $\beta$  (5 ng/ml) durante 24 h. El medio condicionado



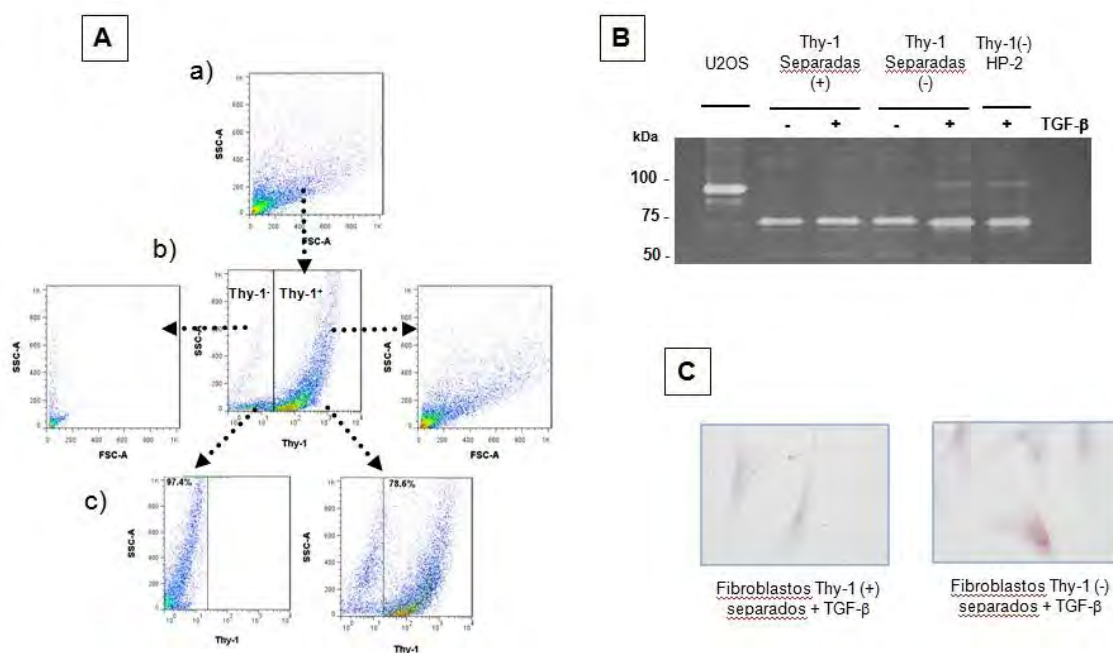
recuperado fue usado para evaluar la producción de MMP-9 por zimografía. Como se muestra en la figura 11B, la inducción de MMP-9 por efecto de TGF- $\beta$  desaparece con el restablecimiento en la expresión de Thy-1 en los fibroblastos Thy-1(-) transfectados.



**Figura 11. Transfección de Thy-1.** A. Fibroblastos NH-2 Thy-1(-), transfectados con Thy-1, separados y confirmados para la expresión de Thy-1, por citometría de flujo. B. Zimografía en gelatina de medios condicionados, incluyendo los fibroblastos transfectados, estimulados con TGF- $\beta$ .

Para comparar estas características de los fibroblastos Thy-1(-), se tomaron fibroblastos derivados de pulmón normal y se separaron por citometría de flujo en base a la expresión de Thy-1. Como se observa en la figura 12A(b) los fibroblastos separados Thy-1(-) fueron más pequeños que los fibroblastos Thy-1(+). Para evaluar el efecto de TGF- $\beta$ , los fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-)

fueron estimulados y se realizó la detección de MMP-9 por zimografía e inmunocitoquímica. En los fibroblastos Thy-1(-) separados por citometría de flujo estimulados con TGF- $\beta$ , se induce la producción de MMP-9 (figura 12B y 12C).

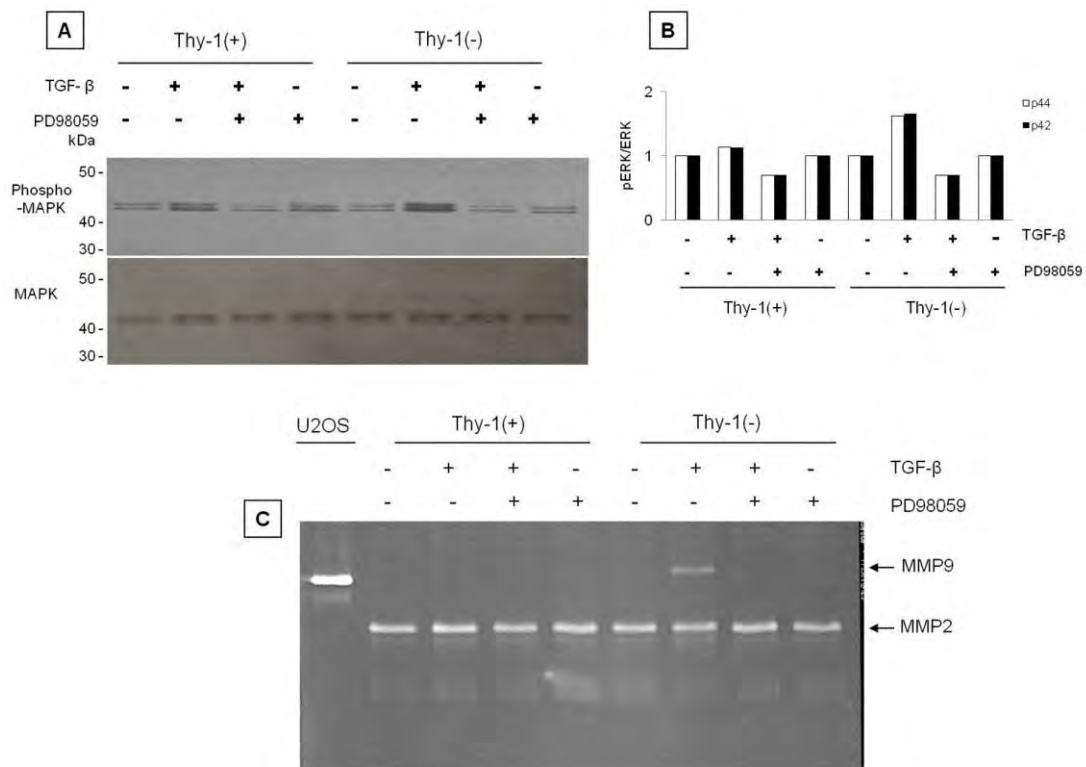


**Figura 12. Expresión de MMP-9 en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1 (-) derivados de pulmón normal separados por citometría de flujo.**

A. Gráficas de puntos de citometría de flujo de fibroblastos teñidos y separados en base a la expresión de Thy-1. B. Zimografía en gelatina de medios condicionados de fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) separados por citometría de flujo y estimulados con TGF- $\beta$ . Se usó medio condicionado de las células U2OS derivadas de osteosarcoma como control positivo para MMP-9. C. Inmunocitoquímica de MMP-9 en los fibroblastos Thy-1 (+) y Thy-1(-) separados y estimulados con TGF- $\beta$ .

### Expresión de MMP-9 inducida por TGF- $\beta$ dependiente de la vía de las MAP cinasas (ERK1/2)

Se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 por sí mismo o en combinación con otros mediadores induce la expresión de MMP-9 a través de la activación de las ERKs(92). Ambas subpoblaciones de fibroblastos, Thy-1(+) y Thy-1(-) activan la vía de las ERKs después del estímulo con TGF- $\beta$ , aunque el efecto es mayor en los fibroblastos Thy-1(-). El uso de PD98059, un inhibidor farmacológico de las ERKs, redujo significativamente su fosforilación (Figura 13A,B) y analizando el efecto de este inhibidor se observó por zimografía que en su presencia, aun bajo el estímulo de TGF- $\beta$ , la producción de MMP-9 se abate (figura 13C).



**Figura 13. Inducción de la expresión de MMP-9 por TGF- $\beta$  en fibroblastos Thy-1 (-) a través de la vía de las ERK.** A y B. Western blot y densitometría de MAPK p42 y p44 fosforilada y total en fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-). C. Zimografía en gelatina que demuestra la ausencia de inducción en la

producción de MMP-9 por TGF- $\beta$  cuando se inhibe la fosforilación de la vía de las ERK.

---

## 7. DISCUSION

La fibrosis pulmonar es una consecuencia de una variedad de daños, caracterizada por una expansión de la población de fibroblastos acompañada de un cambio fenotípico a miofibroblastos, acumulación de matriz extracelular y pérdida de la arquitectura normal del pulmón.

La FPI representa la forma más agresiva de fibrosis pulmonar y por ende el padecimiento fibrótico pulmonar más estudiado. En esta enfermedad se ha reportado que los fibroblastos obtenidos de áreas fibróticas presentan características únicas que los hacen diferentes a los fibroblastos pulmonares normales(23-26). Cada vez está más aceptado el papel de los fibroblastos no solo como una célula estructural sino como una célula multifuncional y con amplia plasticidad fenotípica.

La función de los fibroblastos en el proceso fibrogénico se ha tomando en cuenta desde el punto de vista de su capacidad para producir matriz extracelular y citocinas así como en la regulación de las propiedades mecánicas del tejido. Sin embargo, pensando en la FPI como una enfermedad en la que existe una comunicación bidireccional entre epitelio y fibroblastos, se ha demostrado que los fibroblastos cercanos al epitelio tienen influencia importante sobre las características fenotípicas de las células epiteliales. Esta observación permite suponer que en los pulmones dañados existen fibroblastos

diferenciados que surgen *de novo* con características fenotípicas y funcionales muy particulares.

Una de estas características es la pérdida de expresión tanto en fibroblastos como en los miofibroblastos del receptor Thy-1, una proteína anclada a glucosilfosfatidilinositol. En esta ausencia de expresión están involucrados mecanismos epigenéticos, como es la hipermetilación de las islas citosina-guanina ubicadas en su región promotora(34).

La subpoblación de fibroblastos Thy-1(-) parece ser característica de un fenotipo fibrogénico, aunque gran parte de lo que se conoce en cuanto a las diferencias entre las subpoblaciones de fibroblastos Thy-1(+) y Thy-1(-) se basa en estudios de modelos experimentales. Por ejemplo, fibroblastos Thy-1(-) de rata responden a diferentes estímulos incrementando la expresión de moléculas de matriz extracelular como fibronectina,  $\alpha$ -actina de músculo liso, fosforilación de Smad3, mientras que los fibroblastos Thy-1(+) resisten al estímulo(32, 93).

Del mismo modo, el ratón deficiente de la expresión de Thy-1 desarrolla una fibrosis más severa y una incrementada activación de TGF- $\beta$ , en comparación con los ratones silvestres(33). Sin embargo las consecuencias funcionales de la ausencia de este receptor en los fibroblastos no están completamente entendidas y los estudios en fibroblastos pulmonares humanos son limitados.

En el presente trabajo se analizó la expresión de Thy-1 en varios cultivos primarios de fibroblastos derivados de pulmón normal, de neumonitis por hipersensibilidad y fibrosis pulmonar idiopática. En general, una alta proporción de los fibroblastos, independientemente de su origen, expresan Thy-1 *in vitro*,

sin embargo en los focos de fibroblastos en la FPI, donde existe una dinámica actividad fibrogénica, los fibroblastos son Thy-1(-). Esto puede estar regulado a diferentes niveles. El silenciamiento de Thy-1 en la FPI es específico a los focos de fibroblastos. Los fibroblastos en áreas no afectadas de pulmones fibróticos así como en zonas con fibrosis densa donde los miofibroblastos son menos abundantes, expresan Thy-1 de manera normal(33, 34).

Debido a que la histopatología de la FPI es heterogénea, es posible que los fibroblastos aislados sean obtenidos de áreas con pocos o prácticamente ausencia de focos de fibroblastos. Es también posible que la expresión de Thy-1 en los fibroblastos en cultivo cambie con el tiempo debido a que las condiciones *in vitro* difieren del microambiente que se presenta *in vivo*. De manera interesante, tanto fibroblastos de NH como de FPI mostraron una disminución significativa en los niveles de RNA mensajero para Thy-1, lo que sugiere que probablemente los mecanismos de silenciamiento de Thy-1 como ocurre *in vivo* pueden estar presentes, aunque en menor grado, *in vitro*. Como se ha mencionado antes, se ha demostrado la existencia de mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de Thy-1.

Estudios recientes demuestran que además de hipermetilación en su región promotora, existen modificaciones en la cromatina como son alteraciones en la acetilación de histonas y metilación, las cuales pueden generar niveles “intermedios” de expresión del RNA mensajero de Thy-1, controlándose así el parcial o completo silenciamiento dentro del microambiente de las lesiones fibróticas(94). La expresión de Thy-1 en fibroblastos derivados de neumonitis por hipersensibilidad, patología que en su forma crónica puede resultar en

fibrosis, no se ha descrito anteriormente. De manera inesperada, se identificó un cultivo primario de fibroblastos derivados de un paciente con NH, quien murió de fibrosis pulmonar 5 años después del diagnóstico, el cual no expresa el receptor Thy-1. Esta característica resultó muy útil para evaluar y comparar varios aspectos funcionales entre las subpoblaciones de fibroblastos pulmonares humanos Thy-1(+) y Thy-1(-), y así poder explorar la biología de una línea de fibroblastos pulmonares humanos Thy-1(-) para entender mejor el papel de este receptor en las enfermedades fibróticas pulmonares.

Dentro de estas características se encontró que los fibroblastos Thy-1(-) son más pequeños y muestran una capacidad proliferativa incrementada así como una mayor trans migración inducida por PDGF a través de colágena tipo I comparada con los fibroblastos Thy-1(+), dos efectos que son fundamentales para la reparación y cicatrización. Los resultados obtenidos del ensayo de cicatrización *in vitro*, el cual determina el promedio y la migración direccional de la población celular, y que parcialmente refleja la tasa de crecimiento, fue consistente con esos hallazgos y con resultados previos en fibroblastos pulmonares de roedores(95). De manera interesante, la migración de los fibroblastos Thy-1(-) estuvo incrementada después de la estimulación con TGF- $\beta$ , lo cual puede estar al menos parcialmente relacionado con la expresión de MMP-9.

La capacidad de los fibroblastos para reorganizar y contraer matrices de colágena *in vitro* ha sido usada como modelo para estudiar los eventos que ocurren de la reparación así como en la fibrogénesis. En el modelo del “gel flotante”, la matriz de colágena recién polimerizada con los fibroblastos

inmersos en ella, es desprendida de las paredes de la placa de cultivo permitiendo que flote en el medio, ocurriendo la contracción sin una fuerza mecánica externa y reduciéndose paulatinamente el diámetro del gel(96). En este modelo, el TGF- $\beta$  promueve la contracción de la matriz y promueve la diferenciación a miofibroblastos(97). En este contexto, en los focos de fibroblastos en la FPI, se representa un evento temprano de cicatrización activo en donde ocurre migración de fibroblastos, adhesión a la matriz extracelular, así como proliferación y diferenciación de miofibroblastos. En el presente trabajo observamos que los fibroblastos Thy-1(-) de manera espontánea o bajo el estímulo de TGF- $\beta$  demostraron una mayor contracción de matrices de colágena, consistente con lo observado en las células de roedores, las cuales además poseen un mayor grado de diferenciación a miofibroblastos, son más resistentes a apoptosis y muestran un perfil de expresión génica miogénico tanto a niveles basales como en respuesta al estímulo con moléculas fibrogénicas, que se correlaciona con una capacidad de contracción incrementada(31). En este contexto, se ha demostrado recientemente que Thy-1 interactúa con la integrina  $\alpha\beta 5$  a través de un motivo tipo-RGD, probablemente interfiriendo con la unión del complejo latente TGF- $\beta 1$ (93). Esta interacción inhibe la activación del TGF- $\beta 1$  latente y la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto dependiente de TGF- $\beta 1$ . Los miofibroblastos resistentes a apoptosis dentro de los sitios de daño tisular pueden contribuir de manera directa a una acumulación excesiva y prolongada de matriz extracelular conduciendo a la fibrogénesis(31).



Así, el estudio de la biología del fibroblasto en matrices tridimensionales de colágena permite nuevas oportunidades para entender las interacciones que ocurren entre las células y la matriz que los rodea en condiciones similares al microambiente pulmonar en el que ocurre la reparación tisular y/o el proceso fibrogénico.

Por otro lado, la migración celular desempeña un papel importante en una amplia variedad de procesos biológicos tanto normales como patológicos y es esencial para la homeostasis como es la respuesta inmune y la reparación del tejido(98). Las MMPs y el TGF- $\beta$  tienen un papel central en los cambios patológicos en el pulmón relacionados con fibrosis. Se ha observado que moléculas como las MAPK están involucradas en la regulación de MMP-9, la cual es crucial para la regulación la migración celular en varios tipos celulares(99-101), y la migración celular incrementada asociada a la acción de TGF- $\beta$  está mediada por la sobre-expresión y actividad de MMP-9(84).

La incrementada capacidad de migración y proliferación así como la fuerte inducción de contracción de matrices de colágena soporta la noción de que la ausencia de Thy-1 induce un fenotipo fibrogénico en fibroblastos, e indica que las células mesenquimatosas en los focos de fibroblastos, que son Thy-1(-), tienen una mayor capacidad fibrogénica.

Los fibroblastos Thy-1(-) estimulados con TGF- $\beta$ 1 expresan MMP-9, mientras que los fibroblastos Thy-1(+) no la expresan bajo el mismo estímulo. Por otro lado, el tratamiento de los fibroblastos Thy-1(-) con  $\beta$ -glicano, el cual se piensa secuestra al TGF- $\beta$ , probablemente funcionando como un receptor antagonista, inhibe la producción de MMP-9(102). Dentro de estos hallazgos, encontramos

que los fibroblastos de los focos de fibroblastos en la FPI, los cuales no expresan Thy-1, muestran una fuerte tinción para la MMP-9 *in vivo*. Estos datos sugieren que *in vivo*, en los focos de fibroblastos, los fibroblastos han perdido la expresión de Thy-1(33), probablemente permitiendo la activación del TGF- $\beta$ 1 latente que, así como una variedad de efectos profibróticos, puede inducir la expresión de MMP-9 como se ha demostrado en este trabajo.

Para demostrar que la pérdida en la expresión de Thy-1 está relacionada con la expresión de MMP-9, se transfectó el gen de Thy-1 en los fibroblastos Thy-1(-) para posteriormente separarlas por citometría de flujo. Después de la separación, los fibroblastos transfectados perdieron la capacidad de producir MMP-9 bajo el estímulo de TGF- $\beta$ 1.

La regulación transcripcional es el paso determinante en la síntesis de MMP-9 y los elementos que actúan en cis encontrados en el promotor incluyen sitios de unión AP-1, NF- $\kappa$ B, Sp1 y Ets-1(53, 103).

Además, la coordinación de la señalización celular incluye la vías de señalización de las ERKs como se ha encontrado en este trabajo, así también como remodelamiento de la cromatina, modificaciones de histonas y el reclutamiento paulatino de reguladores transcripcionales, los cuales se ha observado que son críticos para la regulación de la expresión de la MMP-9(104).

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) son componentes esenciales de la red de señalización que permite a las células realizar funciones de una manera integral como parte del organismo. La familia de las MAP cinasas, tienen funciones conservadas en todos los

eucariontes y una regulación anormal ha sido reportada en una amplia variedad de enfermedades incluyendo cáncer, obesidad, diabetes, enfermedades renales, cardiovasculares, neurodegenerativas así como enfermedades pulmonares.

Estímulos extracelulares como factores de crecimiento, citocinas, mitógenos, hormonas y estrés oxidativo desencadenan una cascada de señalización que activa a las MAPK, fosforilando a su vez a múltiples sustratos en sus residuos de serina o treonina seguidos de un residuo de prolina, regulando actividades celulares como expresión génica, mitosis, embriogénesis, diferenciación celular, movimiento, metabolismo y apoptosis. Un miembro de la familia de las MAPK cinasas, es la cinasa regulada por señales extracelulares conocida también como ERK1/2, y ha sido ampliamente estudiada por su papel en actividades relacionadas con fosforilación así como sus inhibidores para el bloqueo de esta vía como posibles estrategias terapéuticas para el tratamiento de patologías como el cáncer(84, 105-107).

Se ha demostrado previamente que la co-estimulación de células HK-2, una línea celular inmortalizada derivada de epitelio de túbulo proximal, con EGF y TGF- $\beta$ 1 incrementa la migración celular la cual se asocia con un incremento sinérgico de la actividad de MMP-9(92). La acción de EGF y TGF- $\beta$ 1 en esta línea celular epitelial conduce a una temprana y pronunciada activación de ERK indicando que la cascada de señalización de ambos factores convergen en la vía de activación de las ERK para influenciar la expresión de MMP-9 y la migración celular. Otros reportes también indican que el promotor de la MMP-9 está parcialmente regulado a través de la activación de la vía de ERK1/2. Esto

se ha demostrado interfiriendo la señalización de ERK1, ya sea de manera farmacológica por el inhibidor PD098059 o con una construcción para la expresión de un dominante negativo, y en ambas se reduce la actividad gelatinolítica de 92 kDa y la actividad del promotor de la MMP-9, respectivamente(108).

Se ha demostrado también que la activación de FAK en células epiteliales pulmonares activa la vía ERK1/2-MMP-9 promoviendo la migración celular e invasión. Este mismo mecanismo de inducción e inhibición de MMP-9 ha sido descrito en varios tipos celulares(109).

En el presente trabajo, demostramos que el mecanismo por el cual se produce MMP-9 inducida por TGF- $\beta$ 1 en los fibroblastos pulmonares Thy-1(-) también depende de la activación de la vía de señalización ERK1/2. La fosforilación de ERK producida en respuesta a TGF- $\beta$ 1 tanto en los fibroblastos Thy-1(+) aunque más fuerte en los Thy-1(-), reduce la fosforilación de ERK y mediante la inhibición con PD98059, un inhibidor farmacológico de ERK, se inhibe la expresión de MMP-9. De manera interesante, fibroblastos embrionarios de ratón Thy-1(-) muestran una expresión incrementada de MMP-9 inducida por TNF- $\alpha$ , la cual está mediada por una activación de las cinasas de la familia Src(110).

La MMP-9, conocida también como gelatinasa B, se ha propuesto que juega un papel importante en la patogénesis de la FPI. Se ha observado una síntesis y activación incrementada en esta enfermedad asociada con degradación de colágena tipo IV, el principal componente de la membrana basal. Sin embargo las MMPs, además de su habilidad para degradar proteínas de la matriz

extracelular, también regulan la disponibilidad y función de citocinas y factores de crecimiento a través de cortes secuencia-específicas(53).

La MMP-9 activa proteolíticamente a TGF- $\beta$  contribuyendo a incrementar las concentraciones de TGF- $\beta$  activo en el microambiente(111). De este modo la inducción de MMP-9 por el TGF- $\beta$  en los fibroblastos Thy-1(-) puede ser parte de un mecanismo fibrogénico de retroalimentación positiva, además de que se ha reportado que numerosas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento son capaces de inducir la expresión de MMP-9(73).

## **8. CONCLUSIONES**

Nuestros resultados muestran que la ausencia en la expresión de Thy-1 en fibroblastos pulmonares humanos favorece la inducción un fenotipo fibrogénico. Estos fibroblastos Thy-1(-) presentaron una mayor capacidad de proliferación y migración, mayor contracción de colágena y de manera importante, expresión de MMP-9 inducida por TGF- $\beta$ , proceso reversible con la re-expresión de Thy-1. Se requieren nuevos estudios para entender los mecanismos moleculares por los cuales Thy-1 modula la respuesta a TGF- $\beta$  y se produce el fenotipo fibrogénico, así como la expresión de MMP-9 en los fibroblastos pulmonares.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. King TE, Jr., Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. 2001. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1171-81
2. Harari S, Caminati A. 2010. IPF: new insight on pathogenesis and treatment. *Allergy* 65: 537-53
3. Selman M, King TE, Pardo A. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136-51
4. Gross TJ, Hunninghake GW. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345: 517-25
5. Selman M, Pardo A. 2002. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res* 3: 3
6. Selman M, Pardo A. 2006. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 3: 364-72
7. Selman M, Pardo A, Kaminski N. 2008. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* 5: e62
8. Jiang X, Tsitsiou E, Herrick SE, Lindsay MA. 2010. MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J* 277: 2015-21
9. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, Kaminski N, Abraham E. 2010. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 207: 1589-97
10. Selman M, Pardo A, Richeldi L, Cerri S. 2011. Emerging drugs for idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Emerg Drugs*
11. Pardo A, Selman M. 2002. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci* 7: d1743-61
12. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y. 2003. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 952-8
13. Selman M. 2004. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin Chest Med* 25: 531-47, vi
14. Barrera L, Mendoza F, Zuniga J, Estrada A, Zamora AC, Melendro EI, Ramirez R, Pardo A, Selman M. 2008. Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 44-55
15. Gudmundsson G, Hunninghake GW. 1997. Interferon-gamma is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 99: 2386-90
16. Murayama J, Yoshizawa Y, Ohtsuka M, Hasegawa S. 1993. Lung fibrosis in hypersensitivity pneumonitis. Association with CD4+ but not CD8+ cell dominant alveolitis and insidious onset. *Chest* 104: 38-43
17. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. 2006. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 188-98

18. Lopez-Otin C, Overall CM. 2002. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 509-19
19. Pardo A, Selman M, Kaminski N. 2008. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1141-55
20. Laurent GJ, McAnulty RJ, Hill M, Chambers R. 2008. Escape from the matrix: multiple mechanisms for fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 5: 311-5
21. Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2129-40
22. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. 2010. Fibrocytes: bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 535-42
23. Phan SH. 2008. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 5: 334-7
24. Larsson O, Diebold D, Fan D, Peterson M, Nho RS, Bitterman PB, Henke CA. 2008. Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control. *PLoS One* 3: e3220
25. Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A. 2001. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 591-8
26. Moodley YP, Scaffidi AK, Misso NL, Keerthisingam C, McAnulty RJ, Laurent GJ, Mutsaers SE, Thompson PJ, Knight DA. 2003. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol* 163: 345-54
27. Kuhn C, McDonald JA. 1991. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 138: 1257-65
28. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. 2009. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 175: 3-16
29. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170: 1807-16
30. Phipps RP, Penney DP, Keng P, Quill H, Paxhia A, Derdak S, Felch ME. 1989. Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MHC. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1: 65-74
31. Sanders YY, Kumbala P, Hagood JS. 2007. Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(-) lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 226-35
32. Zhou Y, Hagood JS, Murphy-Ullrich JE. 2004. Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am J Pathol* 165: 659-69
33. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbala P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, Ortiz LA, Schoeb T, Siegal GP, Alexander CB, Pardo A, Selman M.

2005. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol* 167: 365-79
34. Sanders YY, Pardo A, Selman M, Nuovo GJ, Tollefsbol TO, Siegal GP, Hagood JS. 2008. Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39: 610-8
35. Barker TH, Hagood JS. 2009. Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1793: 921-3
36. Killeen N. 1997. T-cell regulation: Thy-1 - hiding in full view. *Curr Biol* 7: R774-7
37. Morris R. 1992. Thy-1, the enigmatic extrovert on the neuronal surface. *Bioessays* 14: 715-22
38. Rege TA, Hagood JS. 2006. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 20: 1045-54
39. Henniker AJ. 2001. Cd90. *J Biol Regul Homeost Agents* 15: 392-3
40. Zucchini A, Del Zotto G, Brando B, Canonico B. 2001. Cd90. *J Biol Regul Homeost Agents* 15: 82-5
41. Rege TA, Hagood JS. 2006. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* 1763: 991-9
42. Rege TA, Pallero MA, Gomez C, Grenett HE, Murphy-Ullrich JE, Hagood JS. 2006. Thy-1, via its GPI anchor, modulates Src family kinase and focal adhesion kinase phosphorylation and subcellular localization, and fibroblast migration, in response to thrombospondin-1/hep I. *Exp Cell Res* 312: 3752-67
43. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP. 1994. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 283-92
44. Koumas L, King AE, Critchley HO, Kelly RW, Phipps RP. 2001. Fibroblast heterogeneity: existence of functionally distinct Thy 1(+) and Thy 1(-) human female reproductive tract fibroblasts. *Am J Pathol* 159: 925-35
45. Saalbach A, Haustein UF, Anderegg U. 2000. A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 115: 882-8
46. Schubert K, Polte T, Bonisch U, Schader S, Holtappels R, Hildebrandt G, Lehmann J, Simon JC, Anderegg U, Saalbach A. 2011. Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur J Immunol* 41: 645-56
47. Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. 2009. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors* 35: 258-65
48. Armstrong DG, Jude EB. 2002. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc* 92: 12-8
49. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. 2006. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the



- respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 533: 133-44
50. Mott JD, Werb Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 558-64
  51. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. 2003. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 4: 216
  52. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 221-33
  53. Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C. 2010. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 1803: 3-19
  54. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. 2007. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 87: 69-98
  55. Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. 1995. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2163-9
  56. Lasky JA, Brody AR. 2000. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4: 751-62
  57. Lambert E, Bridoux L, Devy J, Dasse E, Sowa ML, Duca L, Hornebeck W, Martiny L, Petitfrere-Charpentier E. 2009. TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1102-15
  58. Yu Q, Stamenkovic I. 2004. Transforming growth factor-beta facilitates breast carcinoma metastasis by promoting tumor cell survival. *Clin Exp Metastasis* 21: 235-42
  59. Moustakas A, Heldin CH. 2009. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 136: 3699-714
  60. Garcia-Sainz JA, Vilchis-Landeros MM, Juarez P, Lopez-Casillas F, Hernandez-Pando R, Massague J. 2003. [Receptors and functions of TGF-beta, a crucial cytokine in wound healing]. *Gac Med Mex* 139: 126-43
  61. Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernandez G, Lopez-Casillas F. 2001. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J* 355: 215-22
  62. Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124: 557-68
  63. Hermida N, Lopez B, Gonzalez A, Dotor J, Lasarte JJ, Sarobe P, Borrascueta F, Diez J. 2009. A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 81: 601-9
  64. Ruiz V, Ordonez RM, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, Pardo A, Selman M. 2003. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and

- epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1026-36
65. Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, Senior RM. 2000. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 157: 525-35
  66. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramirez R, Jara P, D'Armiento J, Richards T, Selman M, Pardo A. 2007. Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2324-38
  67. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. 2002. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 375-536
  68. Atkinson JJ, Senior RM. 2003. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 12-24
  69. Daniels SE, Bhattacharrya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO. 1996. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383: 247-50
  70. Mattu TS, Royle L, Langridge J, Wormald MR, Van den Steen PE, Van Damme J, Opdenakker G, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM. 2000. O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme. *Biochemistry* 39: 15695-704
  71. Kotra LP, Zhang L, Fridman R, Orlando R, Mobashery S. 2002. N-Glycosylation pattern of the zymogenic form of human matrix metalloproteinase-9. *Bioorg Chem* 30: 356-70
  72. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 22: 571-9
  73. Muroski ME, Roycik MD, Newcomer RG, Van den Steen PE, Opdenakker G, Monroe HR, Sahab ZJ, Sang QX. 2008. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 9: 34-46
  74. Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R. 2003. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 386-95
  75. McCarthy SM, Bove PF, Matthews DE, Akaike T, van der Vliet A. 2008. Nitric oxide regulation of MMP-9 activation and its relationship to modifications of the cysteine switch. *Biochemistry* 47: 5832-40
  76. Hijova E. 2005. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy* 106: 127-32
  77. Guo W, Ran Y, Wang G, Liu J, Yu L, Sun L, Yang Z. 2002. [Expression and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in esophageal carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 24: 44-7

78. Zhong C, Guo RP, Shi M, Wei W, Yu WS, Li JQ. 2006. [Expression and clinical significance of VEGF and MMP-9 in hepatocellular carcinoma]. *Ai Zheng* 25: 599-603
79. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. 1992. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267: 4583-91
80. Betsuyaku T, Shipley JM, Liu Z, Senior RM. 1999. Neutrophil emigration in the lungs, peritoneum, and skin does not require gelatinase B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1303-9
81. Yao PM, Lemjabbar H, D'Ortho MP, Maitre B, Gossett P, Wallaert B, Lafuma C. 1999. Balance between MMP-9 and TIMP-1 expressed by human bronchial epithelial cells: relevance to asthma. *Ann N Y Acad Sci* 878: 512-4
82. Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, D'Orazi G, Murphy AN, Bird RE, Hoythya M, Fuerst TR, French DL, et al. 1993. Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 156: 235-46
83. Kenagy RD, Clowes AW. 1994. A possible role for MMP-2 and MMP-9 in the migration of primate arterial smooth muscle cells through native matrix. *Ann N Y Acad Sci* 732: 462-5
84. Hsieh HL, Wang HH, Wu WB, Chu PJ, Yang CM. 2010. Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF-kappaB pathways. *J Neuroinflammation* 7: 88
85. Jensen SA, Vainer B, Bartels A, Brunner N, Sorensen JB. 2010. Expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) by colorectal cancer cells and adjacent stroma cells--associations with histopathology and patients outcome. *Eur J Cancer* 46: 3233-42
86. Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J, Gaxiola M, Perez-Padilla R, Navarro C, Richards T, Dauber J, King TE, Jr., Pardo A, Kaminski N. 2007. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* 2: e482
87. Lemjabbar H, Gosset P, Lechapt-Zalcman E, Franco-Montoya ML, Wallaert B, Harf A, Lafuma C. 1999. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: effects of steroid and immunosuppressive treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 903-13
88. Lim DH, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Broide DH. 2006. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L265-71
89. Becerril C, Pardo A, Montano M, Ramos C, Ramirez R, Selman M. 1999. Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1020-7

90. Ramos C, Montano M, Becerril C, Cisneros-Lira J, Barrera L, Ruiz V, Pardo A, Selman M. 2006. Acidic fibroblast growth factor decreases alpha-smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L871-9
91. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. 2000. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L562-74
92. Tian YC, Chen YC, Chang CT, Hung CC, Wu MS, Phillips A, Yang CW. 2007. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res* 313: 2367-77
93. Zhou Y, Hagood JS, Lu B, Merryman WD, Murphy-Ullrich JE. 2010. Thy-1-integrin alpha5 beta5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor-beta1 activation and myofibroblast differentiation. *J Biol Chem* 285: 22382-93
94. Sanders YY, Tollefsbol TO, Varisco BM, Hagood JS. 2010. Epigenetic Regulation of Thy-1 by Histone Deacetylase Inhibitor in Rat Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*
95. Barker TH, Grenett HE, MacEwen MW, Tilden SG, Fuller GM, Settleman J, Woods A, Murphy-Ullrich J, Hagood JS. 2004. Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Exp Cell Res* 295: 488-96
96. Grinnell F. 2000. Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends Cell Biol* 10: 362-5
97. Grinnell F. 1999. Signal transduction pathways activated during fibroblast contraction of collagen matrices. *Curr Top Pathol* 93: 61-73
98. Entschladen F, Drell TL, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS. 2005. Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res* 307: 418-26
99. Hsieh HL, Wu CY, Yang CM. 2008. Bradykinin induces matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration through a PKC-delta-dependent ERK/Elk-1 pathway in astrocytes. *Glia* 56: 619-32
100. Mantuano E, Inoue G, Li X, Takahashi K, Gaultier A, Gonias SL, Campana WM. 2008. The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurosci* 28: 11571-82
101. Shinohara M, Adachi Y, Mitsushita J, Kuwabara M, Nagasawa A, Harada S, Furuta S, Zhang Y, Seheli K, Miyazaki H, Kamata T. 2010. Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloprotease-9 production and cell migration. *J Biol Chem* 285: 4481-8
102. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan

- betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67: 785-95
103. Pardo A, Selman M. 2006. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 3: 383-8
  104. Ma Z, Shah RC, Chang MJ, Benveniste EN. 2004. Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol Cell Biol* 24: 5496-509
  105. Lengyel E, Gum R, Stepp E, Juarez J, Wang H, Boyd D. 1996. Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by an ERK1-dependent signaling pathway in a squamous cell carcinoma cell line. *J Cell Biochem* 61: 430-43
  106. Atamas SP, Luzina IG, Choi J, Tsybalyuk N, Carbonetti NH, Singh IS, Trojanowska M, Jimenez SA, White B. 2003. Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 743-9
  107. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8: 1168-75
  108. Gum R, Wang H, Lengyel E, Juarez J, Boyd D. 1997. Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene* 14: 1481-93
  109. Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, Zhu J, Zhao YZ, Wang Z, Chen F, Lee KY, Fu SB. 2009. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 101: 327-34
  110. Shan B, Hagood JS, Zhuo Y, Nguyen HT, MacEwen M, Morris GF, Lasky JA. 2010. Thy-1 attenuates TNF-alpha-activated gene expression in mouse embryonic fibroblasts via Src family kinase. *PLoS One* 5: e11662
  111. Yu Q, Stamenkovic I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14: 163-76

ANEXO

# Absence of Thy-1 results in TGF- $\beta$ induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts

Gustavo Ramírez<sup>1,4,\*</sup>, James S Hagood<sup>2,3</sup>, Yan Sanders<sup>4</sup>, Remedios Ramírez<sup>1</sup>, Carina Becerril<sup>5</sup>, Lourdes Segura<sup>1</sup>, Lourdes Barrera<sup>5</sup>, Moisés Selman<sup>5</sup> and Annie Pardo<sup>1</sup>

Fibroblasts differ in a variety of phenotypic features, including the expression of Thy-1 a glycoprophosphatidylinositol-linked glycoprotein. Fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are Thy-1 negative, whereas most fibroblasts from normal lungs are Thy-1 positive. However, the functional consequences of the absence of Thy-1 are not fully understood. We analyzed the expression of Thy-1 in several primary fibroblasts lines derived from IPF, hypersensitivity pneumonitis (HP), and normal human lungs. We found that a high proportion, independently of their origin, expressed Thy-1 *in vitro*. We identified a primary culture of HP fibroblasts, which did not express Thy-1, and compared several functional activities between Thy-1 (–) and Thy-1 (+) fibroblasts. Thy-1 (–) fibroblasts were smaller (length:  $41.3 \pm 20.8 \mu$  versus  $83.1 \pm 40 \mu$ ), showed increased proliferative capacity and enhanced PDGF-induced transmigration through collagen I ( $59.9\%$  versus  $42.2\%$  over control under basal conditions,  $P < 0.01$ ). Likewise, Thy-1 (–) fibroblasts either spontaneously or after TGF- $\beta$  stimulation demonstrated stronger contraction of collagen matrices (eg,  $0.17 \pm 0.03$  versus  $0.6 \pm 0.05 \text{ cm}^2$  after TGF- $\beta$  stimulation at 24 h;  $P < 0.01$ ). Thy-1 (–) lung fibroblasts stimulated with TGF- $\beta$ 1 expressed MMP-9, an enzyme that is usually not produced by lung fibroblasts. TGF- $\beta$ -induced MMP-9 expression was reversible upon re-expression of Thy-1 after transfection with full-length Thy-1.  $\beta$ -glycan, a TGF- $\beta$  receptor antagonist abolished MMP-9 expression. TGF- $\beta$ 1-induced MMP-9 in Thy-1 (–) fibroblasts depended on the activation of ERK1/2 signaling pathway. Finally, we demonstrated that fibroblasts from IPF fibroblastic foci, which do not express Thy-1 exhibit strong staining for immunoreactive MMP-9 protein *in vivo*. These findings indicate that loss of Thy-1 in human lung fibroblasts induces a fibrogenic phenotype.

Laboratory Investigation advance online publication, 16 May 2011; doi:10.1038/labinvest.2011.80

**KEYWORDS:** fibroblast; MMP; pulmonary fibrosis; Thy-1

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal disease of unknown etiology characterized by expansion of the fibroblast population, with transdifferentiation to myofibroblasts forming the so called fibroblast foci, and by the exaggerated accumulation of extracellular matrix with disruption of the normal lung architecture.<sup>1–3</sup> The persistence of myofibroblasts, likely by resistance to apoptosis, has an important role in the propagation of fibrosis, with evolution to terminal end-stage fibrotic lung.<sup>4</sup> Growing evidence indicates that the fibroblasts in fibrotic lungs differ from normal lung fibroblasts in a variety of phenotypic features, including surface markers, cytoskeletal composition, collagen

synthesis, proliferative capacity, survival, transcriptional signature, and ribosome recruitment, among others.<sup>5–8</sup>

Particularly, it has been demonstrated that myofibroblasts in the fibroblast foci from individuals with IPF are Thy-1 negative, whereas most fibroblasts from normal lungs are Thy-1 positive, most likely resulting from epigenetic reprogramming.<sup>9,10</sup> The absence of Thy-1 induces a profibrotic, myofibroblastic, apoptosis-resistant phenotype in lung fibroblasts.<sup>11</sup> In experimentally induced lung fibrosis, it has been shown that Thy-1-null mice exhibited increased TGF- $\beta$  activation and develop more extensive and severe fibrotic reaction than do wild-type mice.<sup>9</sup> Thy-1 or CD90 is a

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México; <sup>2</sup>University of California-San Diego, La Jolla, CA, USA; <sup>3</sup>Rady Children's Hospital, San Diego, CA, USA; <sup>4</sup>University of Alabama-Birmingham, Birmingham, AL, USA and <sup>5</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México DF, México

Correspondence: Dr A Pardo, PhD, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.

E-mail: apardos@unam.mx

\*This work was submitted in partial fulfillment of the requirements to obtain the PhD degree at Universidad Nacional Autónoma de México.

Received 9 August 2010; revised 3 January 2011; accepted 24 January 2011; published online 16 May 2011

glycophosphatidylinositol-linked glycoprotein expressed on the surface of various cell types including fibroblasts.<sup>12</sup> Thy-1 activates multiple signaling pathways, affecting cell–cell and cell–extracellular matrix interactions, and influencing a variety of cellular functions including cell proliferation, differentiation, and survival.<sup>13</sup> However, our knowledge of the effects of the absence of Thy-1 on fibroblast phenotype programming is still incomplete, and in particular the effects of Thy-1 expression on matrix metalloproteinases (MMPs) and ECM homeostasis have not been previously described. MMPs, primarily MMP-2 and MMP-9 are highly upregulated in IPF lungs, and have been implicated in the pathogenesis of IPF.<sup>14</sup>

In this study we analyze the profibrotic characteristics of a Thy-1-negative fibroblast line discovered in a study to evaluate the expression of Thy-1 in several primary fibroblast cell lines obtained from human normal lungs and lungs from patients with IPF and hypersensitivity pneumonitis (HP). Findings from this cell line were confirmed in sorted human lung fibroblasts. Our results showed that Thy-1 (–) fibroblasts exhibit increased proliferative and migratory capacity and stronger contraction of collagen matrices compared with the Thy-1 (+) fibroblasts. Importantly, Thy-1 (–) fibroblasts stimulated with TGF- $\beta$ 1 expressed MMP-9, an enzyme that is usually not synthesized by lung fibroblasts. This effect was reversed upon Thy-1 transfection, and it was mediated by extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation.

## MATERIALS AND METHODS

### Lung Fibroblasts

Fibroblasts were derived from lung tissue obtained from HP ( $n = 4$ ) and IPF ( $n = 5$ ) patients. Diagnosis of IPF and HP was carried out as described and confirmed by histopathology.<sup>15</sup> Control fibroblasts ( $n = 3$ ) were derived from lungs of patients undergoing lobectomy/pneumonectomy for removal of a primary lung tumor, from areas with no histologic evidence of disease. The protocol was approved by the Bioethics Committee at the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias in Mexico DF. Lung fibroblasts were isolated by trypsin dispersion, and cells were grown in Ham's F-12 medium (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (E2). Fibroblasts (passages 5–9) were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/95% air in T-25 cm<sup>2</sup> flasks (Corning, New York, NY, USA).

For some experiments lung fibroblasts were serum starved for 24 h and stimulated with 5 ng/ml recombinant human TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems, MN, USA). TGF- $\beta$ 1 stimulated fibroblasts were pretreated with MEK-1/2 inhibitor PD98059 (10  $\mu$ M; Calbiochem-Novabiochem, San Diego CA, USA), and  $\beta$ -glycan (100 nM; a generous gift of Dr López-Casillas, Universidad Nacional Autónoma de México).<sup>16</sup>

### Flow Cytometry Analysis

Cells were stained with anti-hThy-1-APC or anti-hThy-1-FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), conjugated monoclonal antibodies. Fibroblasts were incubated with the antibodies for 1 h at 4°C, washed with PBS and fixed with 1% p-formaldehyde. Stained cells were analyzed by flow cytometry in a FACSAria with the FACSDiva software version 6.1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### Southern Blot

To establish a Thy-1 fingerprint, genomic DNA from Thy-1 (+) and Thy-1 (–) fibroblasts was digested with *Hind*III and resolved by electrophoresis in 0.8% agarose. DNA was transferred to nylon membranes and was hybridized with a probe containing Thy-1 fragment recovered from the recombinant plasmid pcDNA3.1 using *Eco*RI and *Not*I. The Thy-1 fragment was labeled by random primer extension with digoxigenin-11-dCTP. Immobilized DNA was hybridized overnight at 42°C with 10 ng of Thy-1 probe per ml of hybridization buffer (10% dextran sulfate, 1% sodium dodecyl sulfate, 1 M NaCl, 100 ng of salmon sperm DNA per ml). Hybridization signals were detected with x-ray radiography.

### Real-Time Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from lung fibroblasts using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA). A measure of 1  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed cDNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR amplification was performed using an i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad Laboratories), Taqman probe Hs00264235\_s1 (Applied Biosystems, CA, USA) and 4352930E eukaryotic 18S rRNA that was used as endogenous control. Results from three different samples each in triplicate are expressed as mean  $\pm$  s.d. of the number of copies of the target gene normalized to 18S rRNA.

Each cDNA was quantified in triplicate using a Mastermix solution (Applied Biosystems). Thermal cycling conditions were 95°C for 3 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. A standard curve was built using a Thy-1 product of PCR on copy number serial dilutions in a dynamic range of  $1 \times 10^2$  to  $1 \times 10^9$ .

PCR was also performed to detect Thy-1 using fibroblast genomic DNA using the Taqman probe.

### Western Blot

Cells were lysed in RIPA buffer M-PER (Pierce, Cheshire, UK) containing a protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma St Louis MO, USA). Protein concentrations were determined by Bradford method. Equal amounts of proteins (30  $\mu$ g) were resolved on SDS-PAGE in 12.5% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories). After blocking with non-fat dried milk, the membranes were incubated with primary antibodies Thy-1 (1:10 000 dilution; Santa Cruz



Biotechnology), ERK1/2 (1:2000 dilution; Calbiochem, San Diego, CA, USA) phosphorylated ERK1/2 (1:2000 dilution; Calbiochem), and  $\beta$ -tubulin (1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology) followed by horseradish peroxidase-labeled antibody. Immunodetection was performed by chemiluminescence using the Molecular Imager ChemiDoc XR+ System and Quantity One software version 4.6.9 (Bio-rad Laboratories). Results were expressed as a ratio of band density to total  $\beta$ -tubulin.

### Immunocytochemistry and Immunohistochemistry

Human fibroblasts were seeded on glass cover slips and treated as previously described.<sup>17</sup> Cells were then incubated with primary monoclonal antibodies anti-procollagen-1 at (1:100 dilution; Chemicon Europe, Hampshire UK) and anti-MMP-9 (1:700 dilution; Chemicon Temecula, CA, USA). The length of 100 Thy-1 (+) and 100 Thy-1 (-) cells were measured with the program Image-Pro Plus, version 4.0 for Windows, Media Cybernetics. For this purpose, several areas of the slide were photographed at  $10\times$  and the calibration measurement was adjusted to  $100\mu$ , ( $100\mu = 36.83$ ).

Tissue sections from IPF and controls were treated as described.<sup>18</sup> Antigen retrieval was carried out in citrate buffer 10 mM, pH 6.0 for 6 min in a microwave. Samples were incubated with antiMMP-9 (2.5  $\mu$ g/ml; Chemicon International) at 4°C overnight. For cells and tissue sections after the primary antibody a secondary biotinylated anti-immunoglobulin followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA, USA) was used according to manufacturer instructions. 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC, BioGenex) in acetate buffer containing 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The sections or cells were counterstained with hematoxylin. The primary antibody was replaced by non-immune serum for negative controls. In addition, the lung specimen from the Thy-1 negative HP patient and from two HP patients were immunostained for Thy-1 using human anti-Thy-1 monoclonal antibody (Clone ID: EPR3133) Epitomics, Burlingame, CA, USA) at 1:50 dilution.

### Growth Rate Assay

Fibroblasts were plated in 96-well culture plates at a cell density of  $1.5 \times 10^3$  cells/well and synchronized with serum-free medium for 24 h and then replaced with Ham's F-12 medium supplemented with 1% FBS and the growth rate was followed every other day for 8 days using the cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) as previously described.<sup>5,17</sup> Absorbance changes were taken as percentage of growth rate increase related to basal values.

### Migration Assay

Migration of human lung fibroblasts was assayed using 24-well collagen I-coated Boyden chambers (Chemicon) with an 8- $\mu$ m pore size. Fibroblasts ( $3 \times 10^5$  cells) were added to the upper chamber and the lower chamber contained 0.3 ml of medium with PDGF-BB (20 ng/ml; R&D Systems). After

incubation for 8 h at 37°C the non-migrating cells on the top of the chamber were scraped and washed. The migrating cells were quantified according to manufacturer's instructions as described.<sup>19</sup> Briefly, the cells were stained and the color eluted with 300  $\mu$ l of extraction buffer, and 150- $\mu$ l aliquots were measured in an ELISA plate reader at 545 nm. All assays were carried out in duplicate.

### Wound Healing Scratch Assay

Human fibroblasts were seeded onto six-well plates (Corning) at  $2.5 \times 10^4$  cells/well with 3 ml of medium F12 with 10% FBS. At 2 days, the monolayers were mechanically disrupted with a sterile 200  $\mu$ l tip. The assay was performed for duplicate. The wells were photographed every 12 h.

### Collagen Matrix Contraction Assay

To determine the contractile capacity of fibroblasts, an *in vitro* floating collagen matrix contraction model was used. Briefly, Thy-1 (+) and Thy-1 (-) fibroblasts ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were added to a pH 7.4 collagen solution (2 mg/ml; INAMED; Fremont, CA, USA) and 0.5 ml were plated per well in a 24-well culture plate. Plates were incubated for 2 h at 37°C, which caused polymerization of collagen cell lattices. After 2 h, the gels were detached from the walls with a thin sterile spatula. Finally, 0.5 ml of serum-free F12 culture medium was applied with or without TGF- $\beta$ . Each condition was performed in duplicate. Contraction of the gel was photographed and measured using a Kodak image analysis system.

### Gelatin Zymography

Conditioned media (CM) were collected from fibroblasts grown under basal conditions and stimulated with TGF- $\beta$  (5 ng/ml). In some experiments  $\beta$ -glycan (100 nM), was added 30 min before TGF- $\beta$  stimulation. Briefly, samples were mixed with an equal volume of 2X sample buffer, resolved under non-reducing conditions on 10% SDS-PAGE containing 1 mg/ml gelatin as a substrate. CM from human lung fibroblasts and from U2-OS cells stimulated with PMA was used as MMP-2 and MMP-9 positive controls, respectively.<sup>15</sup>

### Lung Fibroblasts Transfection and Sorting

Thy-1 (-) human lung fibroblasts were cultured in F-12 media containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Fibroblasts were transfected with the mammalian expression vector pcDNA3.1 Zeo containing the full-length human Thy-1 cDNA or empty vector using a nucleoporator device and Lung Fibroblast Transfection reagent (AMAXA Biosystems, Gaithersburg, MD, USA). Cells were sorted on the basis of expression of Thy-1 by FACS using a FACS Calibur cytometer (BD Biosciences). Thy-1 (+) transfected cells (>95 %) and Thy-1 (-) sub-population cultures were seed in a plate for post-treatment with TGF- $\beta$ . In addition, fibroblasts derived from normal lungs were also sorted by FACS according to the expression of Thy-1. Sorted Thy-1

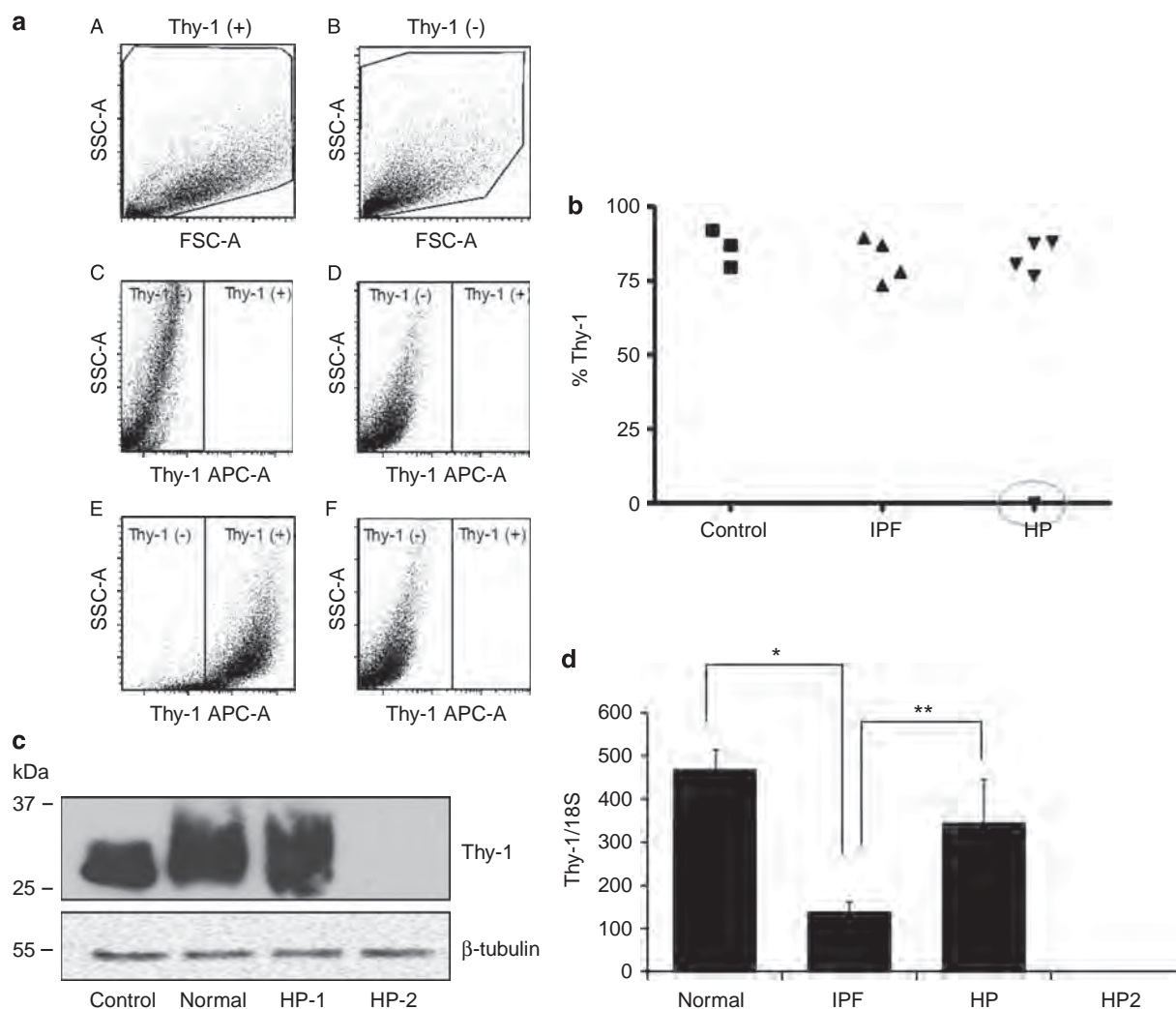
(+) and (-) cells were cultured under standard conditions and at early confluence were changed to serum-free medium and stimulated with 5 ng/ml of TGF- $\beta$  for 48 h. Cells were used for immunocytochemistry and CM were used for gelatin zymography.

**RESULTS**

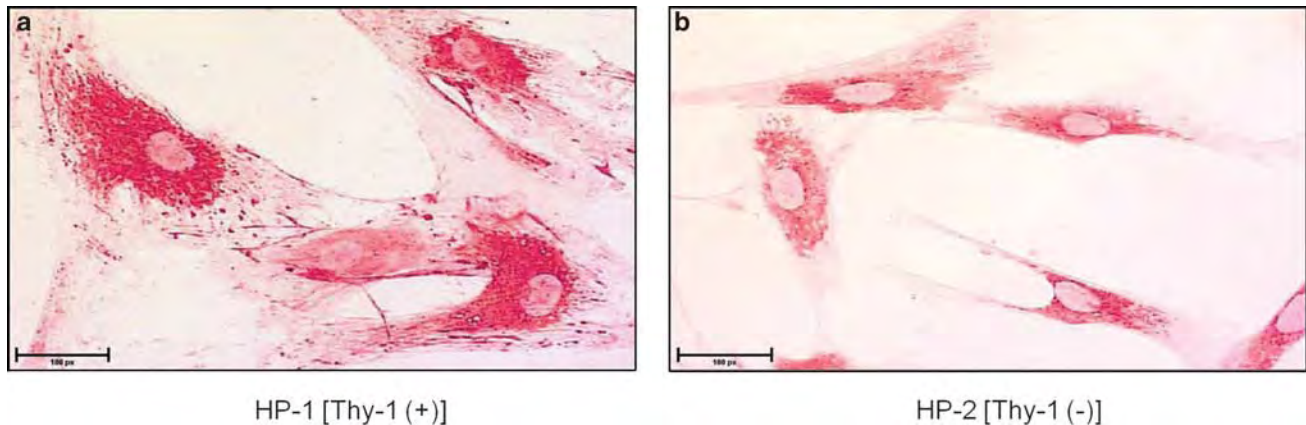
**Most fibroblasts Cultured from HP, IPF, and Normal Lungs Express Similar Levels of Thy-1, Despite Reduced Levels of mRNA in IPF Fibroblasts**

To determine the percentage of Thy-1-expressing lung fibroblast derived from controls, HP, and, IPF patients, we carried out a FACS analysis. As illustrated in Figures 1a and b, in general, high proportions of Thy-1-positive fibroblasts

(75–95%) were detected in all three groups without significant differences between groups. Fibroblasts from IPF were found to have significantly lower Thy-1 mRNA expression compared with control fibroblasts ( $141 \pm 22.8$  versus  $468 \pm 47.7$ ;  $P < 0.01$ ; Figure 1d). Unexpectedly, we found absent Thy-1 expression in a fibroblast primary cell-line obtained from a patient with HP (Figures 1a and b). This patient was a 54-year-old female, who showed a moderate restrictive functional pattern at the time of diagnosis (forced vital capacity of 58%) with hypoxemia at rest (PaO<sub>2</sub> = 60 mm Hg, normal values at the altitude of Mexico DF,  $67 \pm 3$  mm Hg), which worsened with exercise (resting SpO<sub>2</sub> 90% and at the end of a 6-min walk, 81%). Despite treatment with prednisone and azathioprine, the patient



**Figure 1** *Thy-1* gene and protein expression in human lung fibroblasts. (a) Representative flow-cytometry analysis of lung fibroblast cell lines derived from two HP patients showing the expression and the absence of Thy-1. Forward scatter dot plot (A and B) shows the smaller size of the Thy-1 (-) cells. Panels C and D show Thy-1-unstained fibroblasts; and E and F, Thy-1-stained fibroblasts. (b) Percentage of Thy-1 expression in three normal (control), 4 IPF, and 5 HP primary fibroblast cell-lines. The majority of the cell lines expressed Thy-1 except a fibroblast cell line derived from an HP patient. (c) Western blot for Thy-1 in the same fibroblasts used for gene expression.  $\beta$ -tubulin was used as house keeping gene. IMR-32 cell lysate (lane 1) was used as positive control. (d) Gene expression by quantitative real-time PCR showing samples from three normal, three IPF and two HP fibroblast lines analyzed in triplicate. Results were normalized with 18S rRNA and are expressed as mean  $\pm$  s.d.; \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ .



**Figure 2** Immunocytochemistry for pro-collagen I in Thy-1 (+) and (-) lung fibroblasts. (a) HP-1 Thy-1 (+) fibroblasts; (b) HP-2 Thy-1 (-) fibroblasts. Note that Thy-1 (-) cells are smaller than Thy-1 (+) lung fibroblasts. Magnification 60 ×. Each bar represents 100 µM.

worsened and died 5 years after diagnosis. The absence of Thy-1 expression at the mRNA and protein levels was confirmed by qRT-PCR and western blotting (Figures 1c and d). Thy-1-negative cells (named HP-2) appeared to be a population of smaller size than the Thy-1-positive fibroblasts as revealed by forward scatter in flow cytometry (Figure 1a, panels A and B).

The smaller size of Thy-1 (-) fibroblasts was corroborated by microscopy as shown after collagen I immunostaining (Figure 2). Thy-1 (-) fibroblasts showed a twofold decreased length compared with the Thy-1-positive cells ( $41.3 \pm 20.8 \mu$  versus  $83.1 \pm 40 \mu$ ). No differences were found in vimentin, collagen, or TGF- $\beta$  expression between Thy-1 (-) and Thy-1 (+) fibroblasts (not shown).

### Thy-1 Genomic Analysis

Genomic DNA from Thy-1 (+) and (-) fibroblasts was used to analyze the presence or absence of *Thy-1* gene. As shown in Figure 3a when analyzed by Southern blot there was hybridization with Thy-1 taqman probe in HP-1 fibroblasts. By contrast no hybridization was observed in HP-2 cells. This result was confirmed by PCR, in which Thy-1 product was amplified only in HP-1 cells and no amplification was observed in HP-2 fibroblasts (Figure 3b), indicating complete absence of the *Thy-1* gene in this cell line. In addition, the lung tissue of these HP patients was analyzed by immunohistochemistry for Thy-1. As illustrated in Figure 3c no immunostaining was observed in HP-2 lung tissue (panels B, D), whereas HP-1 lung-tissue stained positive for Thy-1 in several cell types, for example, endothelial cells, and some interstitial cells (panels A, C).

### Thy-1 (-) Fibroblasts Show Increased Growth Rate

Cell growth was examined in the Thy-1-negative fibroblasts and three Thy-1-positive fibroblast primary cultures from HP, IPF, and normal lungs, respectively, by using the WST-1 assay. As shown in Figure 4, Thy-1 (-) cells fibroblasts in the presence of 1% FBS, displayed a significant higher growth

rate in comparison with different cultures of Thy-1 (+) cells from the second day on.

### Thy-1 (-) Fibroblasts Exhibit Increased Migration Rate and *In Vitro* Wound Healing

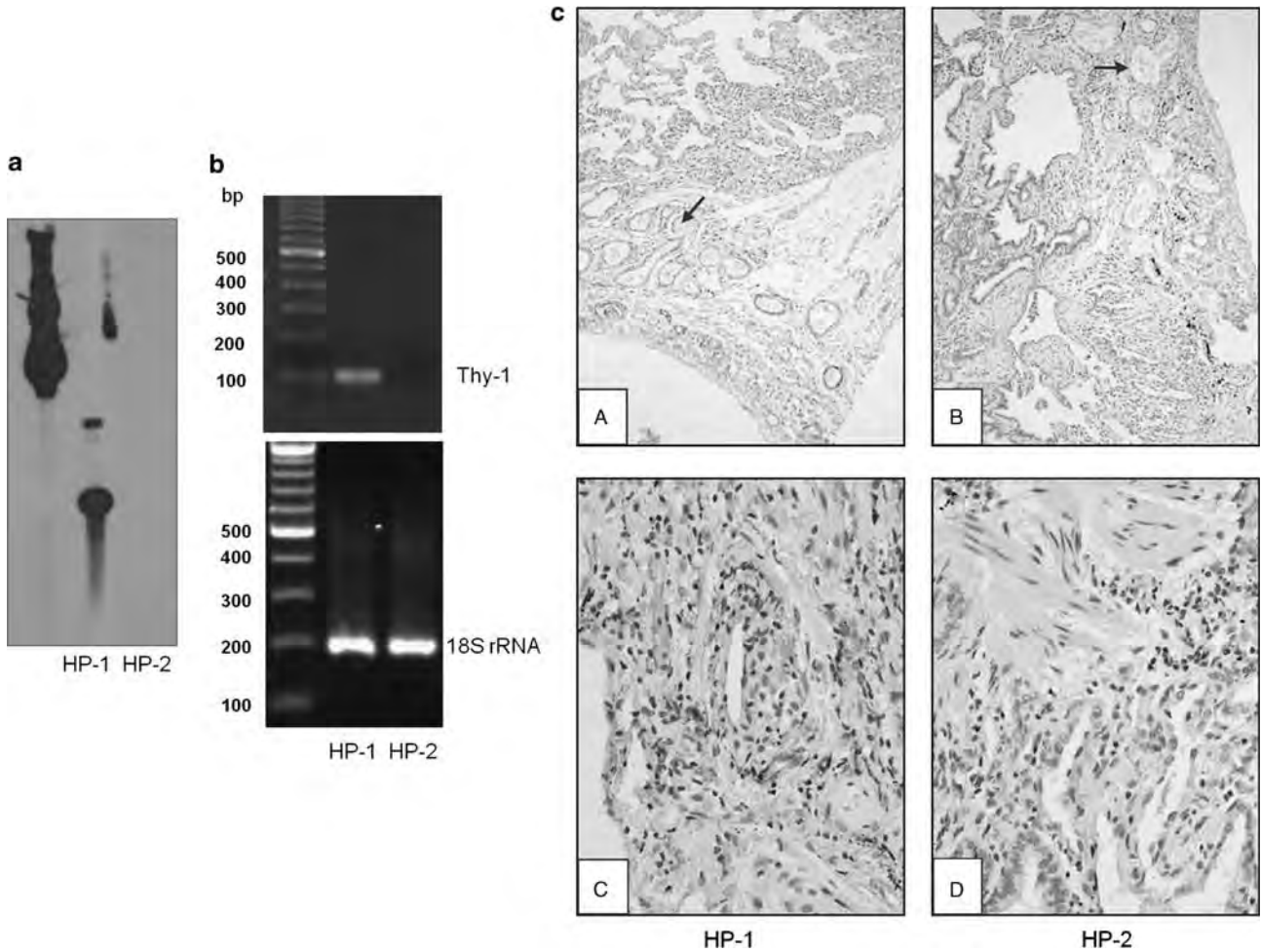
To analyze the effects of Thy-1 expression on fibroblast migration, we carried out a wound-healing scratch assay and a collagen transmigration assay using a Boyden chambers. As shown in Figure 5a HP-2 [Thy-1 (-)] fibroblasts closed the scratch wound more rapidly than HP-1 [Thy-1 (+)] and closed the linear wounds at 60 h. Likewise, cell transmigration through collagen I-coated Boyden chambers in response to PDGF-B was significantly higher in Thy-1 (-) compared with Thy (+) cells under basal conditions ( $P < 0.01$ ). TGF- $\beta$  stimulation further increased Thy-1 (-) fibroblast transmigration ( $P < 0.05$ ), whereas HP-1 [Thy-1 (+)] cells showed no change (Figure 5b).

### Thy-1 (-) Fibroblasts Induce A Strong Contraction of Collagen Matrices

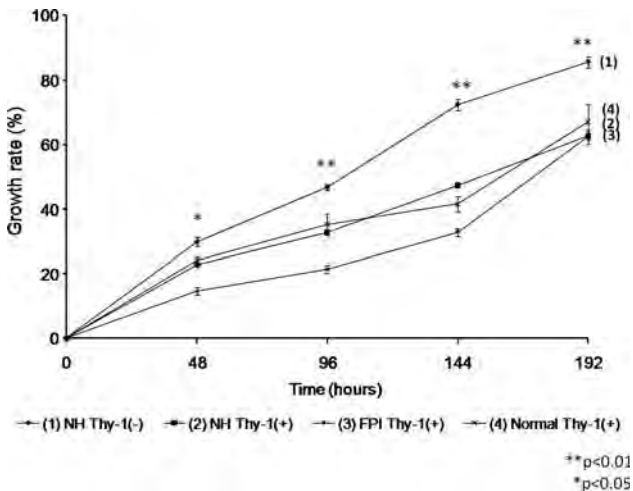
We examined the contraction of stress-relaxed collagen gels in HP-1 and HP-2 cells. Fibroblasts were incubated in collagen gels plated on rigid tissue-culture plastic for 2 h. Thereafter, collagen gels were released from the dish (stress-relaxed gels), and gel diameter was photographed over time. As shown in Figure 6, under basal conditions Thy-1 (-) (HP-2) fibroblasts demonstrated a significant increase of collagen gel contraction compared with Thy-1 (+) (HP-1) cells. This effect was further increased with TGF- $\beta$  stimulation (eg,  $0.17 \pm 0.03$  versus  $0.6 \pm 0.05 \text{ cm}^2$  at 24 h;  $P < 0.01$ ).

### TGF- $\beta$ 1 Induces the Expression of Mmp-9 in Thy-1 (-) Fibroblasts

It is known that TGF- $\beta$ 1, a major profibrotic mediator implicated in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, induces the expression of MMP-9 in several cell types. Therefore, we tested the effect of TGF- $\beta$ 1 on the expression of MMP-2 and



**Figure 3** Detection of *Thy-1* gene. (a) Southern blot analysis of *Thy-1* (+) and (-) fibroblasts. Genomic DNA was digested using *HindIII* enzyme and the membrane was hybridized with a *Thy-1* fragment. (b) *Thy-1* PCR on genomic DNA from *Thy-1* (+) and (-) fibroblasts. *Thy-1* product was amplified using a taqman probe. (c) Immunohistochemical analysis showing *Thy-1* endothelial staining (panel A, arrow) and interstitial cells (panel C) in HP-1 lung tissue. No staining was observed in the HP-2 lung tissue. Magnification: 10 × (A, C); 40 × (B, D).

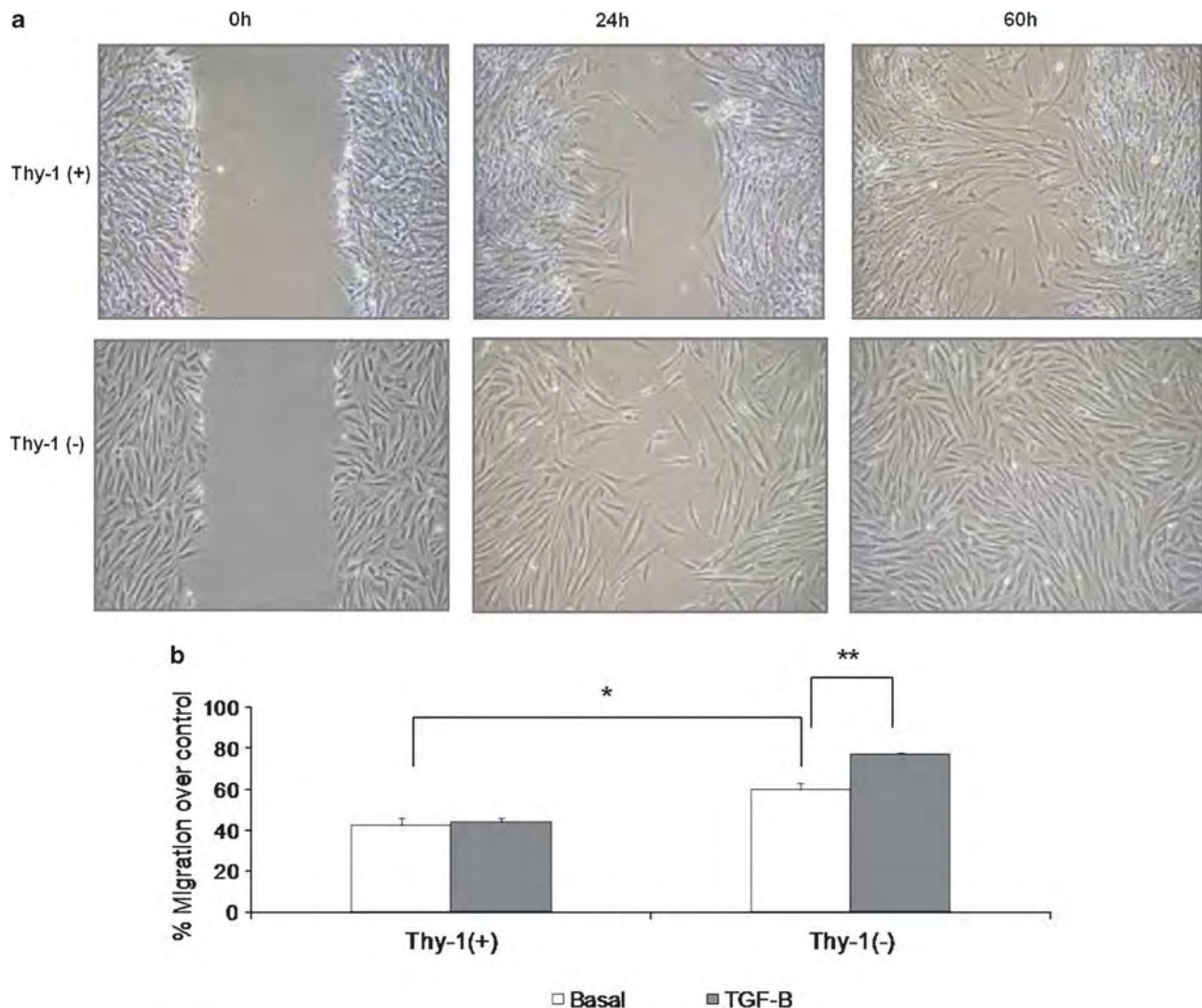


**Figure 4** Fibroblast growth rate. Human lung fibroblasts were cultured in 96-well culture plates. At 2, 4, 6, and 8 days, growth rate was evaluated by WST-1 assay. Each point represents mean ± s.d. of three independent experiments performed in triplicate.

MMP-9. *Thy-1* (-) and *Thy-1* (+) lung fibroblasts were cultured, stimulated with TGF- $\beta$ 1 and MMP-2 and MMP-9 were evaluated by gelatin zymography and immunocytochemistry. As illustrated in Figure 7a, stimulation of *Thy-1* (-) with TGF- $\beta$ 1 induced the expression of MMP-9, a matrix-metalloproteinase that is usually not produced by lung fibroblasts, whereas no changes were observed in MMP-2. When we exposed the *Thy-1* (-) fibroblasts to TGF- $\beta$ RIII, a TGF- $\beta$  receptor antagonist also known as  $\beta$ -glycan,<sup>20</sup> the MMP-9 activity band induced by TGF- $\beta$ 1 was abolished (Figure 7b).

Immunocytochemical staining further corroborated the expression of the MMP-9 immuno-reactive protein in *Thy-1* (-) fibroblasts. As shown in Figure 8a after TGF- $\beta$ 1 stimulation, strong cytoplasmic MMP-9 staining is revealed in the *Thy-1* (-) fibroblasts, whereas it was negative in the *Thy-1* (+) cells. It has been previously reported that fibroblastic foci in IPF lungs do not express *Thy-1*.<sup>9</sup> Therefore, we explored by immunohistochemistry whether fibroblasts in





**Figure 5** Fibroblast migration and collagen gel contraction assay. (a) Wound-healing scratch assay. Confluent monolayers of Thy 1 (+) and Thy 1 (-) HP fibroblasts were mechanically disrupted with a sterile 200  $\mu$ l tip, then photographed immediately (0h), or at the indicated hours after scratching. The assay was performed in duplicate. (b) Transmigration assay in collagen I-coated Boyden chambers, showing Thy-1 (+) and Thy-1 (-) fibroblasts in basal conditions and stimulated with TGF- $\beta$  PDGF-B was used as chemoattractant in the lower compartment. Each bar represents a duplicate experiment; \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ .

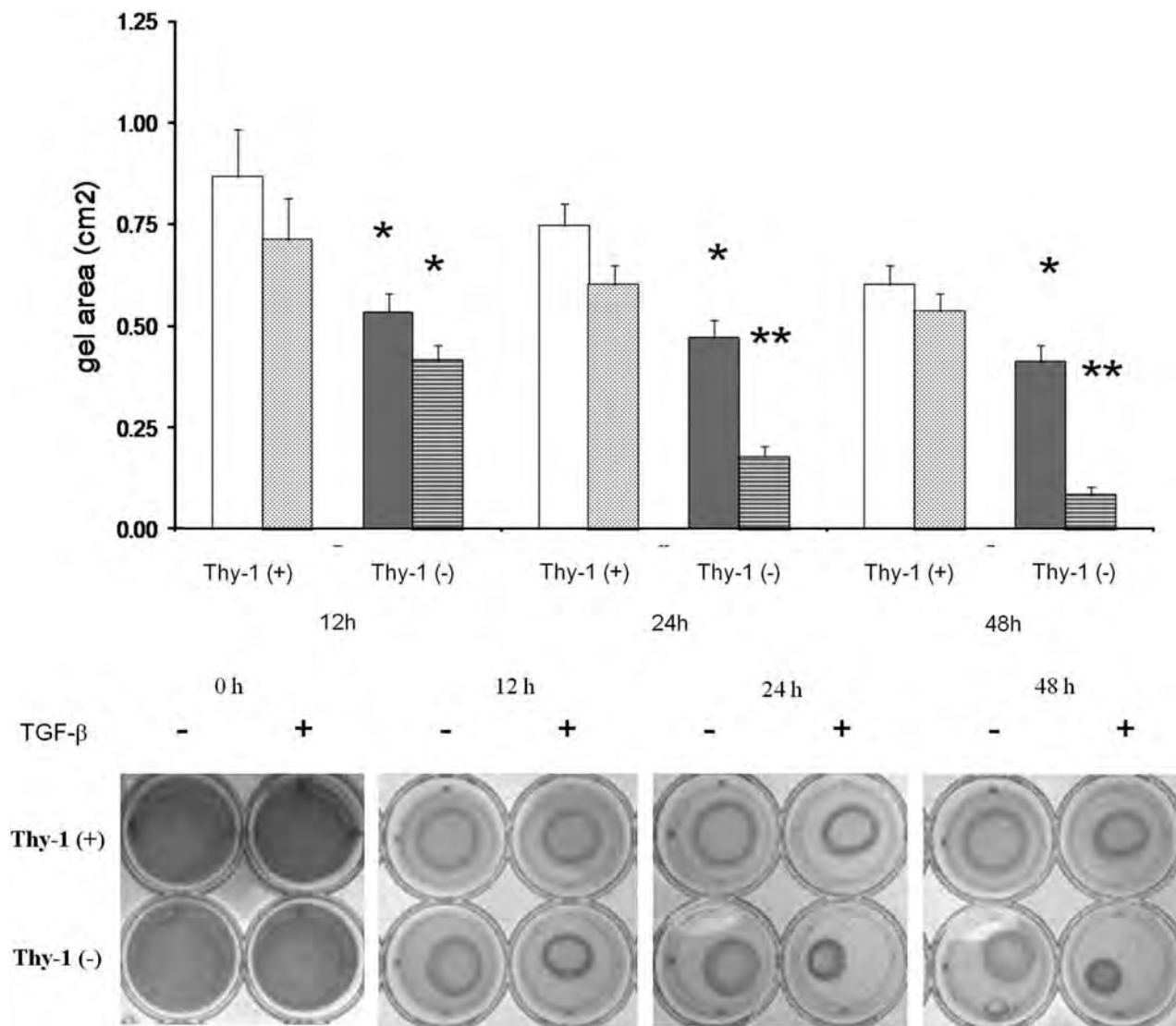
these foci express MMP-9. As shown in Figure 8b, numerous fibroblasts in the fibroblastic focus exhibit intense MMP-9 staining. As earlier found, epithelial cells also revealed positive MMP-9 staining.<sup>18</sup>

**Thy-1 Gene Transfection Inhibits TGF- $\beta$ 1-Induced MMP-9**  
Lung Thy-1 (-) fibroblasts were transfected with the *Thy-1* gene and then were sorted and re-analyzed by FACS to confirm Thy-1 expression (Figure 9a). In all, 42% of Thy-1 (-) fibroblasts were transfected. After that, sorted (>95%) Thy-1 (-) and Thy-1 (+) cells were plated and stimulated with TGF- $\beta$  (5 ng/ml) for 24h, and CM were used to run a gelatin zymography. As shown in Figure 9b, the induction of MMP-9 by TGF- $\beta$  disappears with the re-expression of Thy-1. To further corroborate some of the characteristics of Thy-1 (-) cell

line, fibroblasts derived from normal lungs were sorted on the basis of Thy-1 expression. As shown in Figure 10a(B) Thy-1 (-)-sorted cells were smaller than Thy-1 (+) fibroblasts. To evaluate the effect of TGF- $\beta$ , Thy-1-positive and -negative cells were stimulated with the growth factor and the expression of MMP-9 was analyzed. In sorted Thy-1-negative cells, TGF- $\beta$  induced the expression of MMP-9 as shown by gelatin zymography and immunocytochemistry (Figures 10b and c).

**TGF- $\beta$ 1-Induces MMP-9 Expression Through p44 and p42 Extracellular Signal-regulated MAP Kinase (ERK1/2) Pathway**

It has been demonstrated that TGF- $\beta$ 1 alone or in combination with epidermal growth factor (EGF) induces the



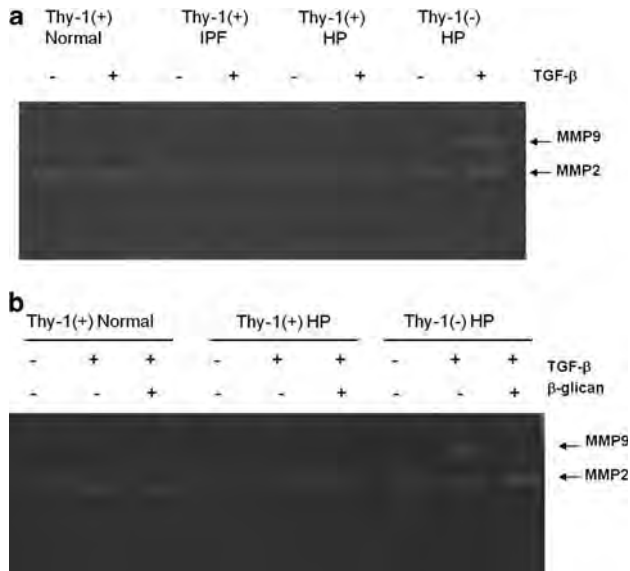
**Figure 6** Collagen-gel contraction assay. Representative gels of floating-populated collagen matrices after 12, 24, and 48 h with serum-free Ham's F-12 medium or stimulated with TGF- $\beta$  (5 ng/ml). Thy-1 (-) cells showed higher contractibility, than Thy-1 (+) cells. The graphic shows the gel area of the cells measured under basal and after TGF- $\beta$  stimulation. White bars represent Thy-1 (+) cells under basal conditions. Dotted bars represent same cells under TGF- $\beta$  stimulation. Gray bars show Thy-1 (-) in basal conditions and bars with horizontal lines, same cells stimulated with TGF- $\beta$ . \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01 comparing Thy-1 (-) with Thy-1 (+) fibroblasts under the same experimental conditions.

expression of MMP-9 through ERK activation.<sup>21</sup> Both, Thy-1 (-) and Thy-1 (+) fibroblasts activate ERK after TGF- $\beta$ 1 stimulation, although this effect was stronger in the Thy-1 (-) cells (Figures 11a and b). The use of PD98059, a pharmacological inhibitor of ERK, significantly reduced ERK phosphorylation (Figures 11a and b). We then investigated the effect of PD98059 on MMP-9 in gelatin zymography. As shown in Figure 11c, the ERK inhibitor abolished the MMP-9 activity band.

**DISCUSSION**

Lung fibrosis is a common consequence of a variety of injuries and is characterized by the expansion of the fibroblast population followed by the phenotypic transition to myofi-

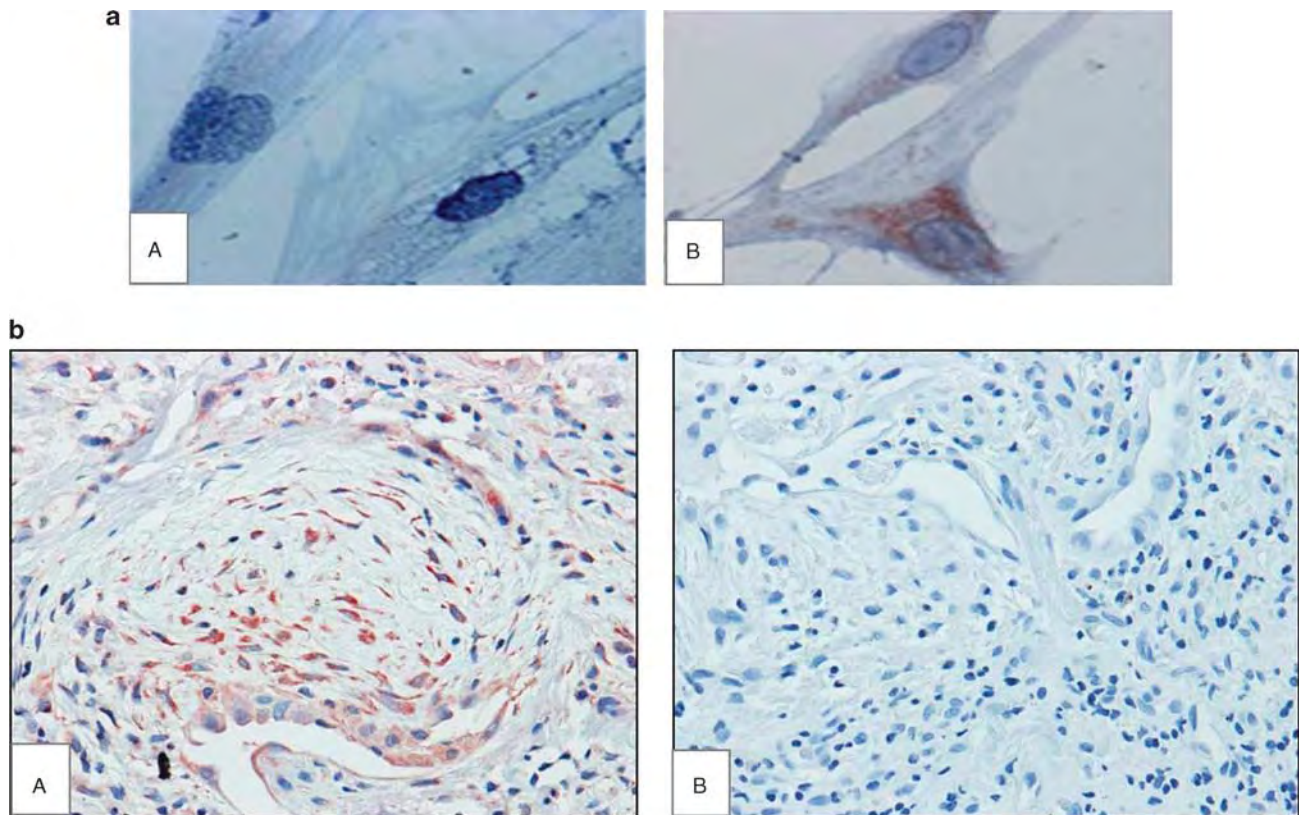
broblasts, accumulation of extracellular matrix, and loss of the normal architecture. IPF represents the most aggressive form of pulmonary fibrosis and is consequently the most studied fibrotic lung disorder. In this disease, it has been reported that fibroblasts obtained from the fibrotic areas display unique features that differentiate them from normal lung fibroblasts.<sup>5-8</sup> One of them is the lack of expression by the fibroblasts/myofibroblasts in the fibroblastic foci of the receptor Thy-1, a glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-linked cell surface glycoprotein, likely due to hypermethylation of cytosine-guanine islands in the gene promoter.<sup>9,10</sup> The Thy-1 (-) fibroblast subset seems to characterize a fibrogenic phenotype, although much of our knowledge about the putative differences between Thy-1 (-) and Thy-1 (+)



**Figure 7** Gelatin zymography of lung fibroblasts stimulated with TGF- $\beta$ . (a) Aliquots of conditioned media derived from lung fibroblasts with serum-free Ham's F-12 medium or stimulated for 24 h with TGF- $\beta$  (5 ng/ml) were subjected to 10% SDS-PAGE-containing gelatin. (b)  $\beta$ -glycan (a generous gift of Dr Lopez-Casillas; UNAM) blocked MMP-9 induction by TGF- $\beta$ .

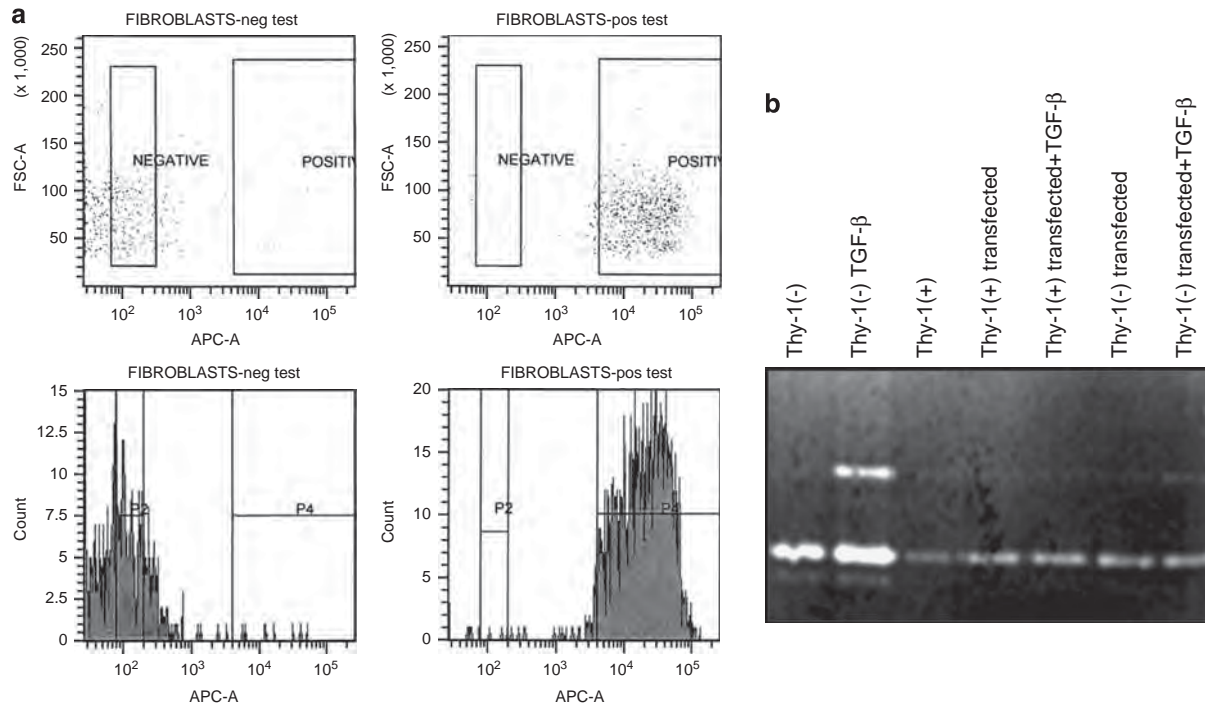
fibroblasts is based on studies of rodent lungs. Rat-lung Thy-1 (-) fibroblasts respond to different stimuli by increasing TGF- $\beta$  activity, Smad3 phosphorylation, and expression of  $\alpha$ -SMA and fibronectin, whereas Thy-1 (+) fibroblasts resist stimulation.<sup>22,23</sup> Likewise, Thy-1-deficient mice displayed more severe lung fibrosis and increased TGF- $\beta$  activation than their wild-type littermates.<sup>9</sup> However, the functional consequences of the absence of this receptor in the fibroblasts are not fully understood, and furthermore, studies in human lung fibroblasts have been limited.

In this study, we analyzed the expression of Thy-1 in several primary fibroblast cultures derived from normal, HP and IPF lungs. In general, a high proportion of most of them independently of their origin (normal or pathologic lungs) expressed Thy-1 *in vitro*. As fibroblasts from fibroblastic foci are Thy-1 (-) in IPF tissues,<sup>9</sup> this finding may be counterintuitive; however, there are a number of potential explanations. Thy-1 silencing in IPF is specific to fibroblastic foci. Fibroblasts in unaffected areas in IPF lungs, as well as in areas of dense collagenous fibrosis where myofibroblasts are less abundant express Thy-1 normally.<sup>9,10</sup> Because IPF histopathology is heterogeneous, it is possible that isolated fibroblasts are obtained from areas with few or no fibroblastic foci. It is also possible that Thy-1 expression in primary cells



**Figure 8** Cell and tissue localization of MMP9. (a) Representative immunocytochemistry of MMP9 expression in HP-1 Thy-1 (+) cells (A) and HP-2 Thy-1 (-) cells (B) stimulated with TGF- $\beta$  (5 ng/ml) for 24 h. (b) Immunohistochemistry of MMP9 in IPF lung tissue showing immunoreactive MMP9 in fibroblastic foci (A). Negative-control section from IPF lung, in which the primary antibody was omitted (B). Magnification 40  $\times$ .





**Figure 9** Thy-1-transfection. (a) Thy-1 (–) cells were transfected with Thy-1 and then sorted and retested for Thy-1 expression by FACS. Thy-1 (+) and (–) sorted cells were plated and stimulated with TGF- $\beta$  for 24 h. (b) Gel zymography showing lack of MMP9 band activity in the cells, in which Thy-1 is re-expressed. The non-transfected cells show MMP-9 activity under TGF- $\beta$  stimulation.

changes with time in culture, as the microenvironment differs greatly from that *in vivo*. Interestingly, both HP and IPF fibroblasts demonstrated significantly decreased Thy-1 mRNA, suggesting that perhaps mechanisms of Thy-1 silencing *in vivo* may still be present, although to a lesser degree, *in vitro*. We have demonstrated alterations in methylation of the Thy-1 promoter leading to silencing of Thy-1 within fibroblastic foci in IPF.<sup>10</sup> More recently we have demonstrated regulation of Thy-1 expression by chromatin modifications such as alterations in histone acetylation and methylation,<sup>24</sup> as well as interactions between chromatin modifications and DNA methylation, which could result in intermediate levels of Thy-1 mRNA expression, and alter the susceptibility to complete silencing within the microenvironment of fibrotic lesions. Fibroblast Thy-1 expression in HP has not been previously described.

Unexpectedly, we identified a primary culture of fibroblasts derived from a patient with HP, who died from lung fibrosis 5 years after diagnosis, which did not express the receptor Thy-1. Therefore, we were able to explore and compare several functional aspects between Thy-1 (–) and (+) human lung fibroblasts. This finding represented an opportunity to explore the biology of a human Thy-1-negative fibroblast cell line to better understand the role of this receptor in fibrotic lung disorders.

Thy-1 (–) fibroblasts were smaller and showed increased proliferative capacity and enhanced PDGF-induced transmigration through collagen I compared with the Thy-1 (+)

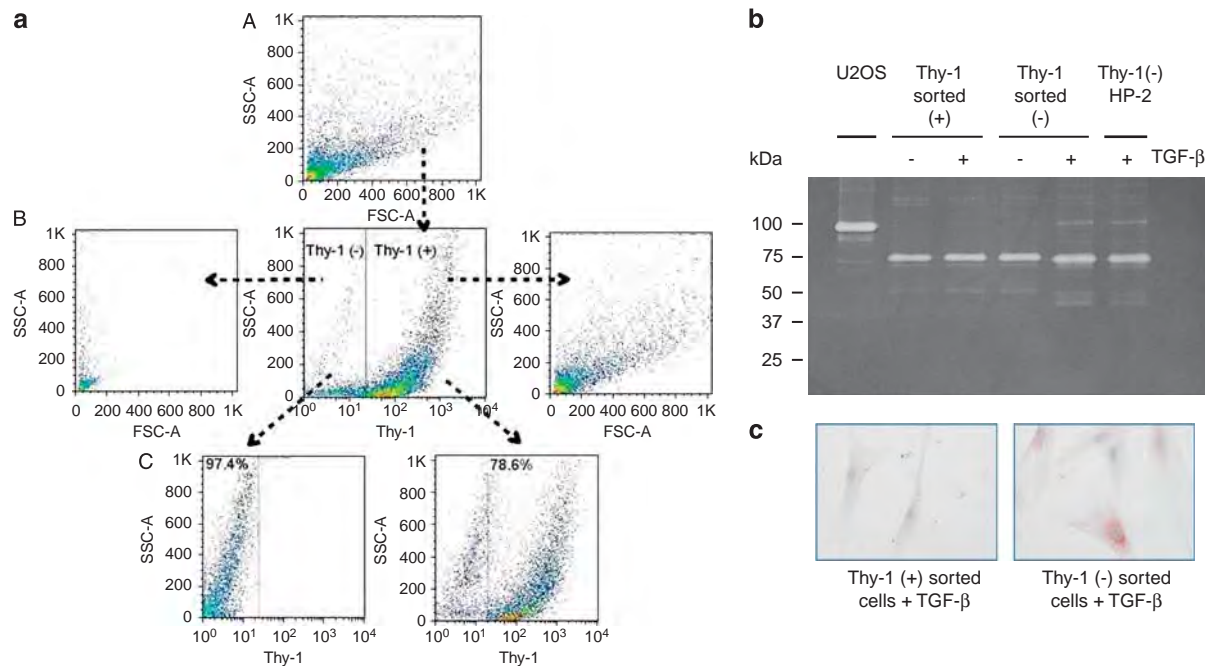
fibroblasts, two effects that are critical to wound healing and scar formation. Our results in the *in vitro* wound healing assay, which measures the average and directional migration of a cell population, and partially reflects also the growth rate was consistent with these findings, and with previous findings in rodent lung fibroblasts.<sup>25</sup> Interestingly, Thy-1(–) fibroblast migration was further increased after TGF- $\beta$ 1 stimulation, which may at least partially related to the expression of MMP-9.

We also found that Thy-1 (–) fibroblasts either spontaneously or after TGF- $\beta$  stimulation demonstrated a stronger contraction of collagen matrices, also consistent with findings in rodent cells.<sup>11</sup> In this context, it has been recently demonstrated that Thy-1 interacts with integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5 through an RGD-like motif, likely interfering with the binding of the latent TGF- $\beta$ 1 complex.<sup>22</sup> This interaction inhibits latent TGF- $\beta$ 1 activation and TGF- $\beta$ 1-dependent fibroblast to myofibroblast differentiation.

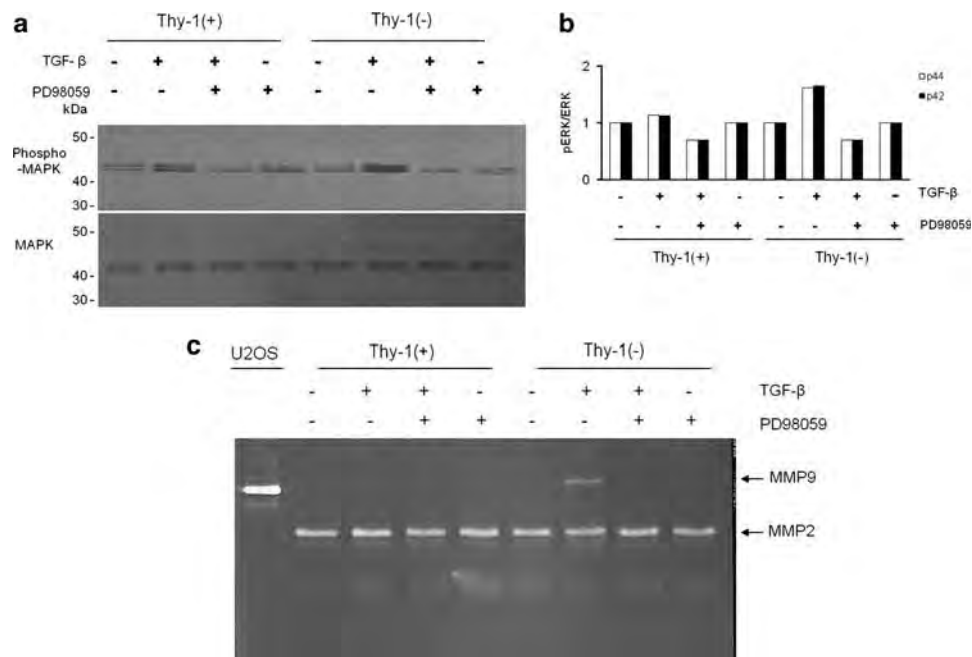
The increased proliferative and migratory capacity and the strong induction of collagen matrix contraction support the notion that the absence of Thy-1 (–) induces a fibrogenic phenotype in fibroblasts, and indicate that the mesenchymal cells in the fibroblastic foci, which are Thy-1 (–), have a higher fibrogenic potential.

Thy-1 (–) fibroblasts stimulated with TGF- $\beta$ 1 express MMP-9, whereas Thy-1 (+) lung fibroblasts under the same stimulus do not. Moreover, treatment of Thy-1 (–) fibroblasts with  $\beta$ -glycan, which is believed to sequester TGF- $\beta$ ,





**Figure 10** MMP-9 expression in Thy-1 (+) and Thy-1 (-) sorted fibroblasts derived from normal human lungs. **(a)** Flow-cytometry dot plots of cells stained and sorted on the basis of Thy-1 expression. The pseudo-color plot in (A) show the forward- and side-scatter characteristics of whole population; (B) sorted fibroblasts (center panel); Thy-1 (-) sorted cells (backgating left panel) and Thy-1 (+) sorted cells (backgating right panel); (C) fibroblasts retested on Thy-1 expression after sorting and growth in culture. Numbers in each gate indicate percentage of Thy-1 expression by each sub-population from a representative experiment. **(b)** Gelatin zymography of Thy-1 (+) and (-) fibroblasts stimulated with TGF β. Osteosarcoma-derived U2OS cell line was used as positive control for MMP-9. **(c)** Immunoreactive MMP-9 in Thy-1 (+) and (-) sorted fibroblasts.



**Figure 11** TGF-β induces MMP-9 expression in Thy-1 (-) cells through ERK pathway. **(a)** and **(b)** Thy-1 (-) cells exhibited higher p42 and p44 MAPK phosphorylation in response to TGF-β stimulation, which was inhibited by PD98059 a specific inhibitor of ERK pathway. **(c)** Gelatin zymography demonstrating absence of MMP9 induction by TGF-β when ERK phosphorylation is inhibited.

thereby functioning as a receptor antagonist,<sup>20</sup> abolished MMP-9 induction. Importantly, we also found that fibroblasts from IPF fibroblastic foci, which do not express Thy-1 exhibit strong staining for the immunoreactive MMP-9 protein *in vivo*. These data suggest that in the fibroblastic foci *in vivo*, fibroblasts have lost Thy-1 expression,<sup>9</sup> likely allowing the activation of the latent TGF- $\beta$ 1, which in turn, among a variety of profibrotic effects may induce the expression of MMP-9 as demonstrated in this study.

To further prove that the lack of expression of Thy-1 was related to the expression of MMP-9, we transfected the Thy-1 (-) fibroblasts with full-length Thy-1, and then sorted the cells. After sorting, the Thy-1-transfected fibroblasts lost the capacity to respond to TGF- $\beta$ 1 with induction of MMP-9.

Transcriptional regulation is the rate-limiting step in MMP-9 synthesis and the cis-acting elements found in the human MMP-9 promoter include AP-1, NF- $\kappa$ B, Sp1, and Ets-1 binding sites.<sup>14,26</sup> In addition, the coordination of cell signaling including the ERK pathway as found in this work, as well as chromatin remodeling, histone modifications, and the stepwise recruitment of transcription regulators has been shown to be critical to the regulation of *MMP-9* gene expression.<sup>27</sup>

It was previously demonstrated that the co-stimulation of HK-2 cells, an immortalized human proximal tubular epithelial cell line, with EGF and TGF- $\beta$ 1 increases cell migration, which is associated with a synergistic increase of MMP-9 activity.<sup>21</sup> The use of EGF and TGF- $\beta$ 1 in this epithelial cell line led to an early and pronounced activation of ERK indicating that the downstream pathways of both growth factors converged on the ERK signaling pathway to influence MMP-9 expression and cell migration. Other reports also indicate that the *MMP9* gene promoter is partially regulated through activation of the ERK1/2 pathway. Thus, it was demonstrated that interfering ERK1 signaling, either with PD 098059 or with a dominant negative expression construct, reduces 92 kDa gelatinolysis and MMP-9 promoter activity, respectively.<sup>28</sup> Likewise, it has been shown that the activation of FAK in A549 lung epithelial cells activates ERK1/2/MMP9 pathway to promote cell migration and invasion.<sup>29</sup>

In this study, we demonstrated that the mechanism by which TGF- $\beta$ 1-induced MMP-9 in lung Thy-1 (-) fibroblasts also depends on the activation of ERK1/2 signaling pathway. Phosphorylation of ERK occurred in response to TGF- $\beta$ 1 in both Thy-1 (-) and Thy-1 (+) fibroblasts but was stronger in the former, and importantly, PD98059, a specific pharmacological inhibitor of ERK, reduced ERK phosphorylation and abolished the expression of MMP-9. Interestingly, Thy-1 (-) mouse embryonic fibroblasts show increased TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression, which is mediated by Src-family kinase activation.<sup>30</sup>

MMP-9 (gelatinase B), has been proposed to have an important role in the pathogenesis of IPF. Increased synthesis and activation has been found in this disease associated with the degradation of collagen IV, a main component of the

basement membrane.<sup>14</sup> However, MMPs, in addition to their ability to cleave extracellular matrix proteins, also regulate the availability and function of cytokines and growth factors through sequence-specific cleavage.<sup>26</sup> Importantly, MMP-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  contributing to enhance the pool of active TGF- $\beta$  in the microenvironment.<sup>31</sup> Thus, TGF- $\beta$  induction of MMP-9 in Thy-1 (-) fibroblasts could be part of a fibrogenic positive feedback loop.

In summary, our results show that a lung fibroblast cell line lacking Thy-1 exhibits a high proliferative and migratory capacity, stronger contraction of collagen matrices, and importantly TGF- $\beta$ -induced MMP-9 expression, reversible upon re-expression of Thy-1. Further studies are needed to understand the molecular mechanisms by which Thy-1 modulates responsiveness to TGF  $\beta$  and MMP-9 expression in lung fibroblasts.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Partially supported by Grants: PAPIIT, IN203709, UNAM, and NIH HL082818 (to JSH).

#### DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

- Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001;134:136-151.
- Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 2009;175:3-16.
- Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001;345:517-525.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;170:1807-1816.
- Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, et al Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:591-598.
- Moodley YP, Scaffidi AK, Misso NL, et al Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol* 2003;163:345-354.
- Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:334-337.
- Larsson O, Diebold D, Fan D, et al Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control. *PLoS One* 2008;3:e3220.
- Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, et al Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol* 2005;167:365-379.
- Sanders YY, Pardo A, Selman M, et al Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:610-618.
- Sanders YY, Kumbla P, Hagood JS. Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(-) lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:226-325.
- Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors* 2009;35:258-265.
- Rege TA, Hagood JS. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:991-999.
- Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:383-388.
- Selman M, Pardo A, Barrera L, et al Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:188-198.

16. Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, *et al* Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- $\beta$  neutralizing agent. *Biochem J* 2001;355:215–222.
17. Ramos C, Montaña M, Becerril C, *et al* Acidic fibroblast growth factor decreases alpha-smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L871–L879.
18. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, *et al* TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung micro-environment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L562–L574.
19. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, *et al* Upregulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 2005;2:e251.
20. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, *et al* Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 1991;67:785–795.
21. Tian YC, Chen YC, Chang CT, *et al* Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2007;313:2367–2377.
22. Zhou Y, Hagood JS, Murphy-Ullrich JE. Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am J Pathol* 2004;165:659–669.
23. Zhou Y, Hagood JS, Lu B, *et al* Thy-1-integrin alphavbeta5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent TGF-beta1 activation and myofibroblast differentiation. *J Biol Chem* 2010;285:22382–22393.
24. Sanders YY, Tollefsbol TO, Varisco BM, *et al* Epigenetic Regulation of Thy-1 by Histone Deacetylase Inhibitor in Rat Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 19 August 2010 (e-pub ahead of print).
25. Barker TH, Grenett HE, MacEwen MW, *et al* Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Exp Cell Res* 2004;295:488–496.
26. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, *et al* Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:3–19.
27. Ma Z, Shah RC, Chang MJ, *et al* Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol Cell Biol* 2004;24:5496–5509.
28. Gum R, Wang H, Lengyel E, *et al* Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene* 1997;14:1481–1493.
29. Meng XN, Jin Y, Yu Y, *et al* Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2009;101:327–334.
30. Shan B, Hagood JS, Zhuo Y, *et al* Thy-1 attenuates TNF-alpha-activated gene expression in mouse embryonic fibroblasts via Src family kinase. *PLoS One* 2010;5:e11662.
31. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-b and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14:163–176.

# Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype

John E. Bradley,<sup>1</sup> Gustavo Ramirez,<sup>2,3</sup> and James S. Hagood<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Departments of Pediatrics, Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama–Birmingham, AL, USA

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Department of Immunobiology and Genetics, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Translational Research in Normal and Disordered Development (TReNDD) Program, University of Alabama, Birmingham, AL, USA

## Abstract.

Thy-1 or CD90 is a glycoposphatidylinositol-linked glycoprotein expressed on the surface of neurons, thymocytes, subsets of fibroblasts, endothelial cells, mesangial cells and some hematopoietic cells. Thy-1 is evolutionarily conserved, developmentally regulated, and often has dramatic effects on cell phenotype; however, the effects vary between and in some cases within cell types and tissues, and between similar tissues in different

species, indicating that the biological role of Thy-1 is context-dependent. Thy-1 exists in soluble form in some body fluids; however, the mechanisms of its shedding are unknown. In addition, Thy-1 expression can be regulated by epigenetic silencing. Because Thy-1 modulates many basic cellular processes and is involved in the pathogenesis of a number of diseases, it is important to better understand its regulation.

© 2009 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 35, Number 3, May/June 2009, Pages 258–265 • E-mail: jhagood@uab.edu

**Keywords:** Thy-1, glycoposphatidylinositol, shedding, epigenetics

## 1. Introduction

Thy-1 (Thymocyte differentiation antigen 1), also known as CD90 (Cluster of Differentiation 90), is a highly conserved but somewhat enigmatic molecule that can exist in membrane-bound and soluble forms. Although it is most often used as a marker of certain cell types or of “stem-ness,” its presence or absence has significant effects on cellular biology, and its dysregulation is associated with malignancy and fibrotic diseases. Previous reviews have focused on its immunologic and nonimmunologic roles, and mechanisms and consequences of Thy-1-associated signaling [1–4]. Here, we will consider the regulation of Thy-1 in the context of its pathogenic alterations.

Thy-1 was initially discovered in an attempt to raise antiserum against leukemia-specific antigens from the CH3 strain of mouse in the AKR strain and vice versa [5]. It was originally designated theta ( $\theta$ ), but later renamed Thy-1 [6]. In addition to thymocytes and T-cells, a number of other cell

types are known to express Thy-1, specifically neurons, retinal ganglion cells, subsets of fibroblasts, vascular pericytes, activated endothelial cells, mesangial cells, and hematopoietic and mesenchymal stem cells. There are important species-specific differences in expression. For instance, Thy-1 is expressed on both peripheral T cells and thymocytes of mice, whereas in humans, Thy-1 is absent in the former and developmentally regulated in the latter [7]. Thy-1 modulates the phenotypes of cells implicated in several disease states, including neuronal injury [8–10], pulmonary fibrosis [4,11,12], certain cancers [13–15], Graves' disease, Graves' ophthalmopathy (GO) [16], and glomerulonephritis [17].

## 2. Pathogenic alterations in Thy-1

Several observations associate Thy-1 with the resolution of neuronal injury. Thy-1 is either not expressed on [18] or restricted to the somatodendritic membranes of growing rodent neurons [18], yet accounts for 2.5–7.5% of total protein on axon membranes of mature rat neurons [19]. Thy-1 expression in the nervous system is predominantly neuronal, but some human glial cells also express Thy-1, especially at later stages of their differentiation [20]. Neurite outgrowth is inhibited in Thy-1 (–) neurons made to express either human Thy-1 or mouse Thy-1.2 when grown on a monolayer

\*Address for correspondence: James S. Hagood, M.D., 1918 University Boulevard, 648 A VH, Birmingham, Alabama 35294-0019, USA. Tel.: 205-975-5224; Fax: +205-996-2333; E-mail: jhagood@uab.edu.

Received 23 December 2008; accepted 24 March 2009

DOI: 10.1002/biof.41

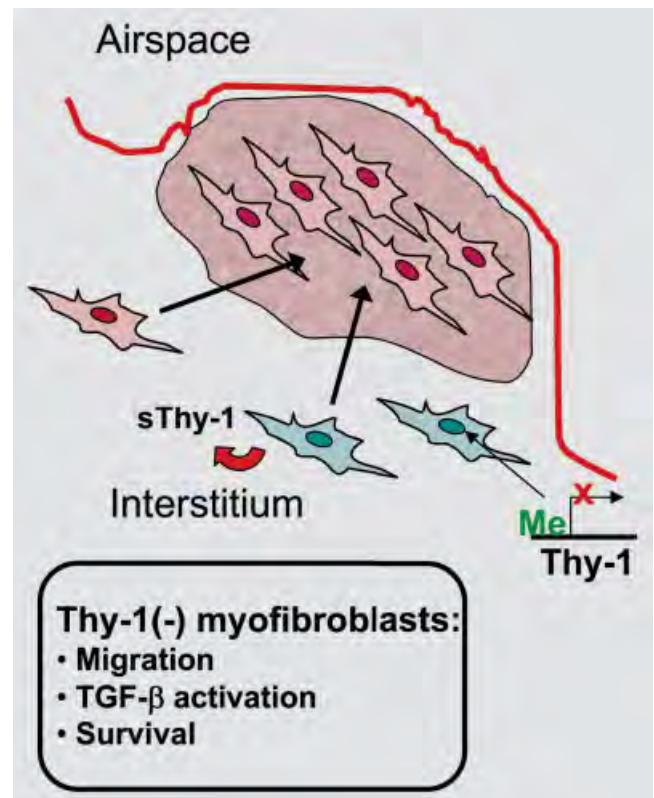
Published online 6 May 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

of astrocytes [21]. In similar conditions, antibodies against Thy-1 or soluble Thy-1 allow neurite outgrowth to occur, presumably by blocking the interaction of Thy-1 with a ligand on astrocytes [21]. Injury to the sciatic nerve in young adult rats causes an initial decline of Thy-1 expression followed by an increase on dorsal root ganglion neurons that coincides with recovery of sensory function [22].

However, presence of Thy-1 on neuron membranes is not sufficient in itself to inhibit neurite outgrowth, but requires correct localization of Thy-1 to its native membrane micro domain to exert an inhibitory effect [23]. Taking these all into account, the prevailing thought is that Thy-1 expressed in neurons, when localized to its native membrane microdomain, inhibits neurite outgrowth and its continued expression in mature neurons likely plays a role in stabilizing them and their junctions. The phenotype of Thy-1 deficient mice is remarkably devoid of major abnormalities involving the nervous system. However, thorough examination revealed subtle phenotypes, including inhibition of hippocampal long-term potentiation in the dentate gyrus, failure to transmit social cues regarding food selection, and an impaired cutaneous immune response [24,25,59].

Pulmonary fibrosis is characterized by the development in the lung of fibrotic tissue, which is characterized by excessive and abnormal extracellular matrix [26]. The cell type often implicated in pulmonary fibrosis is the fibroblast, specifically its differentiated phenotype, the myofibroblast [26]. Individual fibroblasts can have vastly differing phenotypes, especially when they originate from different tissues [27–31]. Even within a particular tissue, fibroblasts are still heterogeneous [4]. For pulmonary fibroblasts, differential expression of Thy-1 is a well-characterized paradigm for distinguishing polar phenotypes with respect to potential for differentiation into myofibroblasts, response to profibrotic cytokines, and localization in areas of active fibrosis [4]. Specifically, rat Thy-1 (–) pulmonary fibroblasts at baseline as well as in response to fibrogenic mediators have greater myofibroblastic differentiation as evaluated by myogenic gene expression and enhanced contractility. Furthermore, they are resistant to apoptosis in a contracting collagen matrix [11]. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and PDGF-AA all elicit a unique or greater fibrotic response in Thy-1 (–) fibroblasts, in particular with regard to activation of latent TGF- $\beta$  [4]. The hallmark feature of IPF (idiopathic pulmonary fibrosis) is aggregates of proliferating fibroblasts and myofibroblasts called fibroblastic foci [26], increased numbers of which are associated with poor prognosis [32]. Within these foci are predominantly Thy-1 (–) myofibroblasts, whereas the majority of normal lung fibroblasts express Thy-1. Intra-tracheal bleomycin induces more severe lung fibrosis in Thy-1 knockout mice as evidenced by greater accumulation of myofibroblasts, collagen and increased activation of TGF- $\beta$  [33]. The relationship of Thy-1 expression to pathogenic alterations in lung fibroblasts in pulmonary fibrosis is depicted in Fig. 1.

Thy-1 is thought to act as a tumor suppressor in several types of cancer, including nasopharyngeal and ovarian cancer [15]. In ovarian cancer, loss of heterozygosity at

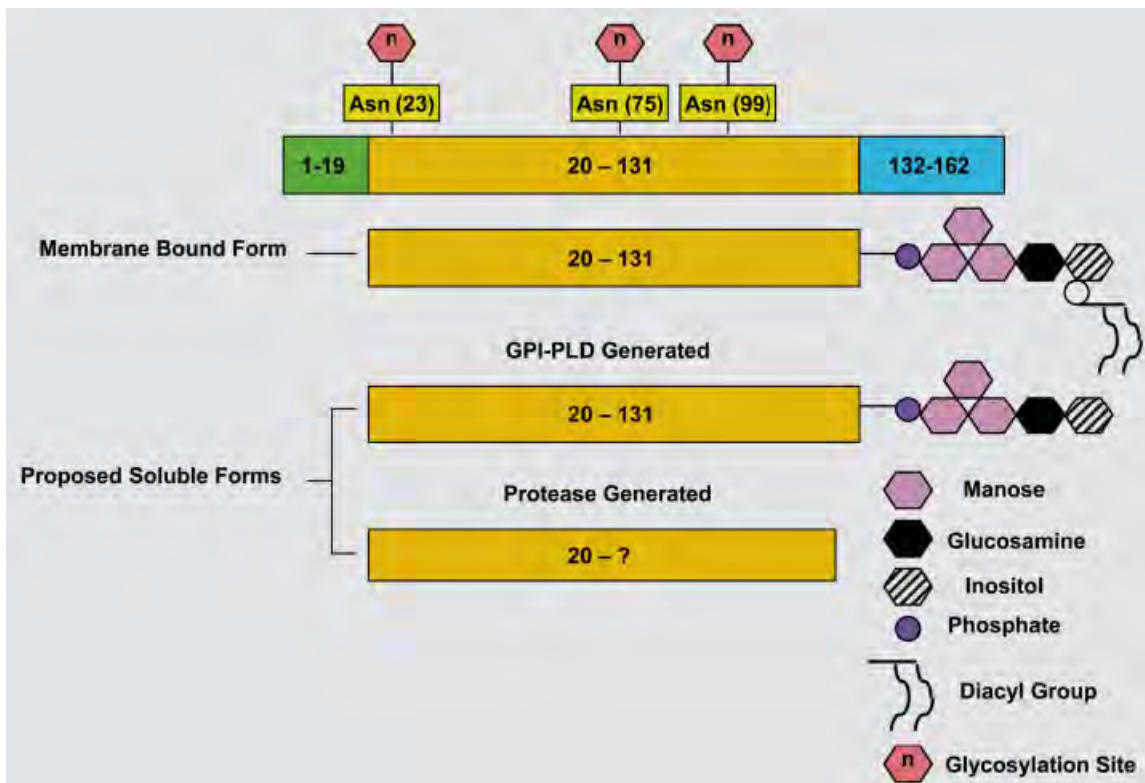


**Fig. 1. Thy-1 and fibroblast phenotype in pulmonary fibrosis. Fibroblasts in fibroblastic foci, the hallmark lesion of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), lack Thy-1 expression. Evidence exists for shedding of soluble Thy-1 (sThy-1) and epigenetic silencing of Thy-1 expression. Thy-1 (–) lung fibroblasts demonstrate increased migration, myofibroblastic differentiation, activation of latent TGF- $\beta$ , and resistance to apoptosis. The absence of Thy-1 expression in pulmonary fibroblasts thus promotes a fibrogenic phenotype.**

11q23.3-q24.3 is associated with poor prognosis [34] and Thy-1 is mapped to this region [35]. Inducing Thy-1 expression in the tumorigenic ovarian cancer cell line, SKOV-3, by either microcell mediated chromosome 11 transfer [34] or a Thy-1 expression inducible system [13] suppressed tumorigenicity. Concurrently, induced Thy-1 expression in SKOV-3 mediates upregulation in Thrombospondin-1 and Fibronectin. These genes are differentially expressed in tumorigenic and nontumorigenic hybrid clones as well as being associated with cell differentiation and angiogenesis inhibition [36]. In neuroblastoma tumors, lack of Thy-1 expression correlates with reduced patient survival [14].

Patients with GO display an increase in volume of the extraocular muscles and/or the intraorbital adipose tissues. As in IPF, fibroblasts are implicated in the pathology of this disease [37] and Thy-1 expression delineates differentiation potential. Unlike in IPF, only Thy-1 (+) orbital fibroblasts appear capable of differentiating into myofibroblasts, whereas Thy-1 (–) are incapable of doing so but are unique in their ability to differentiate into mature adipocytes [38].





**Fig. 2.** Thy-1 molecule and proposed soluble forms. Thy-1 is initially generated as a 161 a.a. pro form. The initial 19 a.a. signal peptide is removed, and the terminal 29 a.a. are replaced with a GPI anchor, generating the mature form, which is anchored to the outer leaflet of the cell membrane by the diacyl group of the GPI anchor. Post-translational modifications are not shown. Shed Thy-1 could be generated either by cleavage of the GPI anchor by GPI-PLD, or by undefined proteases acting at as-yet undetermined cleavage sites.

Intraorbital adipose tissue from patients with GO has a greater proportion of Thy-1 (+) fibroblasts relative to that taken from healthy patients [16]. This seemingly conflicting modulation of differentiation potential by Thy-1 and its involvement in GO is poorly understood and requires further study. Thy-1 fibroblast heterogeneity has also been noted in the human myometrium, in which the Thy-1 (+) subset also differentiates in to myofibroblasts, and in which there are differences in expression of cyclooxygenase isoforms and MCP-1 [27,38,39].

Psoriasis is a common chronic inflammatory skin disease in which the infiltration of neutrophils is an important feature of pathogenesis. Thy-1 is involved in the adhesion of neutrophils and monocytes to activated microvascular endothelial cells via interaction with the  $\beta_2$ -leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). The enhanced adhesion of psoriatic neutrophils to Thy-1-expressing endothelial cells, via Mac-1/Thy-1 interaction, suggests that this may be an important mechanism of attachment and migration into psoriatic lesions [40].

Given the possible role of Thy-1 in multiple pathogenic alterations, as well as the contrasting phenotypes and activities exhibited between Thy-1 (+) and (-) cells in different tissues, it is useful to consider carefully the mechanisms by which Thy-1 is regulated in evolution and development, and dysregulated in certain disease states.

### 3. Thy-1 structural evolution and species differences

Thy-1 belongs to the immunoglobulin superfamily [22] and is evolutionarily conserved; significant homology exists among multiple species including squid, chicken, frogs, mice, rats, and humans. Additionally, it has been proposed that the immune system is evolutionarily related to the nervous system, and Thy-1, which is an important molecule in both, possibly represents a primordial domain of the immunoglobulin superfamily ancestry [35]. As the mouse is the predominant *in vivo* mammalian biological model, there is considerably more information about genetic regulation and structure of murine Thy-1. The *thy1* locus is mapped to mouse chromosome 9, at which there are two alleles that encode the proteins designated Thy-1.1 and Thy-1.2. The two are distinguished by a single amino acid (a.a.) at position 89, arginine and glutamine, respectively. In humans, *THY1* is mapped to chromosome 11q22.3 and initially expressed in a 161 a.a. pro form but undergoes several post translational modifications [35]. The first 19 a.a. of Thy-1 act as a signal peptide that targets it to the cell membrane and is later removed (Fig. 2). Thy-1 is also *N*-glycosylated at two [41] to three sites [42,2]; carbohydrate content accounts for nearly 30% of its mass, which ranges from 25 to 37 kDa [42]. Between different tissues, the carbohydrate moiety composition may vary

dramatically [43,44]. Thy-1 is initially kept at the cell surface by a.a. 132–161, which embed into the membrane. However this C-terminal transmembrane domain is cleaved away and a GPI (glycophosphatidylinositol) moiety is added at residue 131. The GPI moiety is composed of two fatty-acyl groups that tether Thy-1 to the cell surface and participate in targeting to lipid rafts [41].

Thy-1 is differentially expressed and distributed among many species and among tissues of the same species. In mice, it is expressed on the surface of various cells including thymocytes, T-lymphocytes, bone marrow stem cells and in high levels in neurons and some fibroblasts. In the thymus, Thy-1 is the most abundant glycoprotein expressed on the surface, covering 10–20% of thymocyte surface area [45]. In humans, Thy-1 is absent from mature T cells, but expressed on a subset of CD34+ bone marrow cells, and umbilical cord blood- and fetal liver-derived hematopoietic cells. The highest expression of Thy-1 in humans is found on (primarily fetal) thymic stromal cells and in most fibroblasts. In bone marrow and in circulating leukocytes, Thy-1 is present in a small proportion of cells, primarily in a subset of CD34+ and CD3+ CD4+ lymphocytes. Thy-1 is also expressed in endothelial cells, smooth muscle cells, some leukemic and lymphoblastoid cells, such as THP-1 [46].

Thy-1 is one of the most highly glycosylated membrane proteins with a carbohydrate content up to 30% of its molecular mass [2]. The composition of Thy-1 carbohydrate moieties varies between different tissues or cells of the same lineage and among cells in different stages of differentiation. For example, in rats sialic acid in thymic Thy-1 far exceeds that found in brain Thy-1 and galactosamine is found only in brain Thy-1 [2]. In contrast to the Thy-1 antigen of most other species, guinea pig Thy-1 has a much higher molecular weight, which is due to a more extensive N-linked glycosylation, bringing the molecular radius up to 36 kDa [47].

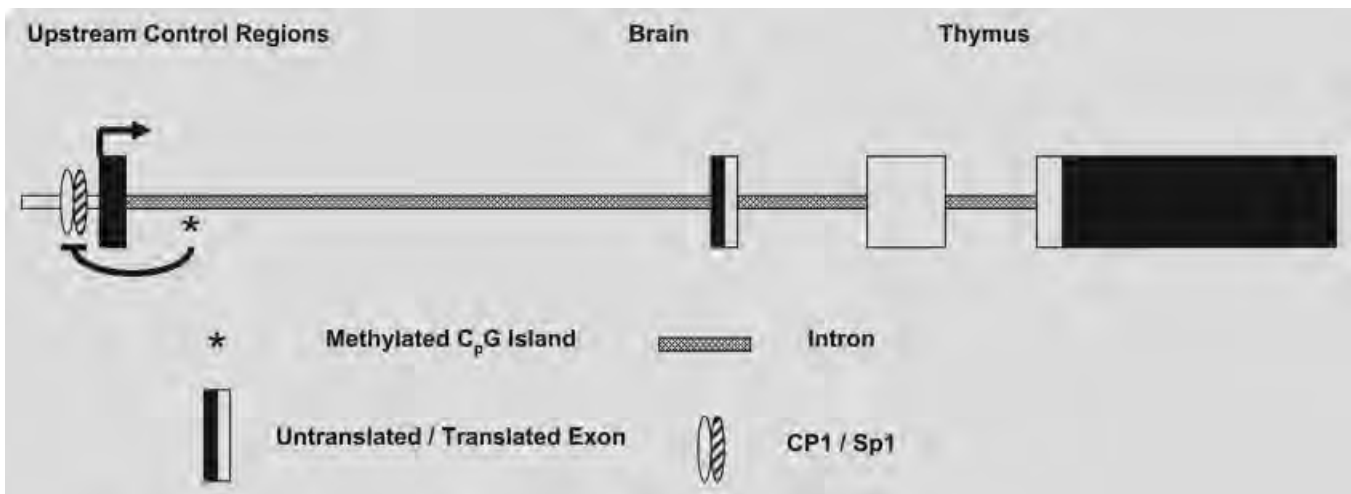
## 4. Soluble Thy-1

Thy-1 does not exist solely in a membrane bound form. A soluble form of Thy-1 has been detected in serum, cerebral spinal fluid (CSF), wound fluid from venous leg ulcers, and synovial fluid from joints in rheumatoid arthritis [42,48]. Speculated methods by which cells produce soluble Thy-1 include an alternative mRNA splice variant omitting addition of the GPI anchor, or an enzyme that cleaves Thy-1 away from the cell surface. Interestingly, the glycosylation pattern of soluble Thy-1 can differ from that of its presumptive source. For example, soluble Thy-1 detected in CSF has slightly higher MW than Thy-1 in cerebral cortex membranes. This differential size is attributed to unique glycosylation patterns; specifically, soluble Thy-1 is resistant to Endo H, which indicates low mannose content, whereas Thy-1 in cerebral cortex membranes is Endo H susceptible. However, both the soluble and membranous forms are identical in size when all the N-glycosylated groups are removed [42].

Soluble Thy-1 in CSF could possibly originate from a region of the brain other than the cerebral cortex. In rats,

the carbohydrate moiety of brain Thy-1 has considerably less sialic acid content than that of thymocytes [43], though variation between regions of the brain is not well characterized. These findings suggest that the GPI anchor is severed in close proximity to the protein moiety, for example, within the GPI moiety itself or at a protease target just up stream. As for targeting within the GPI moiety, both GPI-specific phospholipase D (GPI-PLD) and phospholipase C (PLC) can do so. The former is produced in mammals whereas the latter is of bacterial origin. These enzymes have distinct enzymatic requirements to cleave Thy-1 from the cell surface. Detergents or saponins are needed by exogenous GPI-PLD to cleave Thy-1, whereas PLC does not have such a requirement [49]. Although detergents are not required by PLC, the susceptibility of Thy-1 to cleavage varies from one cell type to another [49]. This is relevant given that serum contains GPI-PLD and as a consequence Thy-1 positive endothelial cells as well as circulating T-cells are susceptible, yet the concentration of serum Thy-1 is only  $251 \pm 105$  ng/mL [48]. Localization of Thy-1 to cholesterol rich lipid rafts is thought to protect it from GPI-PLD present in serum [50]. Release of Thy-1 could also result from proteolysis, which may be an important mechanism in fibroblasts given the large number of proteolytic enzymes produced by fibroblasts [51,52] and the aforementioned protection from GPI-PLD activity afforded by its location within its native membrane microdomain. Shedding of cell surface receptors is a common means of modulating their activity. For example, the ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) are known to release a plethora of surface proteins including those tethered by GPI anchors [53]. The exact mechanism(s) of Thy-1 shedding and possible roles of shedding in normal biology and in disease have yet to be determined. Regardless of the means, shedding of Thy-1 could very likely play an important role in facilitating its complete removal from the cell surface, given its unusually slow turnover rate [54].

Cultured lung fibroblasts shed Thy-1 into the media when treated with various profibrotic cytokines, such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  [33], yet the soluble and membrane bound Thy-1 have indistinguishable migration speeds through an acrylamide gel (unpublished observation). In contrast to fibroblasts, ECs (endothelial cells) increase their expression of Thy-1 when stimulated with profibrotic cytokines [55,56]. The leukocyte integrin Mac-1 interacts specifically with Thy-1 expressed on activated ECs, which suggests a role for Thy-1 in recruiting leukocytes into areas of inflammation [57]. Additionally,  $\alpha_v\beta_3$  integrin expressed on melanoma cells interacts specifically with Thy-1 expressed on activated ECs. This is of particular relevance given that  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression by melanoma cells is closely associated with tumor progression and metastases formation in melanoma [58]. Thy-1<sup>-/-</sup> mice have an impaired cutaneous immune response. Because wild type thymocytes express high levels of Thy-1 and Thy-1<sup>-/-</sup> thymocytes do not properly mature, it was suggested that the impaired cutaneous immune response was a consequence of defective fine-tuning of T cell effector functions [59]. Alternatively, or in conjunction with this postulated mechanism, absence of Thy-1 on activated endothelial cells



**Fig. 3. Murine Thy-1 gene structure and control elements. There are four exons and three introns. There are Sp1 and CP1 binding sites in the promoter region. Methylation of a CpG island in the first intron (\*) can result in transcriptional silencing in rat and human fibroblasts. There are sequences conferring tissue specificity for brain and thymus in the first and third introns, respectively.**

may account for the impaired cutaneous immune response. Regardless, it is evident that regulating Thy-1 expression at the sites of inflammation is of vital importance to resolving tissue injury. As of yet, it is unknown whether Thy-1 in itself has a role in its own regulation.

The biological functions of soluble Thy-1 remain unclear. It is important to note that Thy-1 lacking the GPI anchor very often becomes unrecognizable by antibodies against its membranous form [60]. Shedding of Thy-1 could potentially elicit a number of effects. Fewer Thy-1 molecules at the cell surface could directly affect the cell by limiting ligand binding and signal transduction. Soluble Thy-1 could also retain a comparable affinity with its ligand to that of its membranous form, making ligand unavailable to Thy-1 at the surface of the cell from which it was shed as well as on neighboring cells. In the human uterine cervix, Thy-1-expressing vascular pericytes appear to secrete Thy-1+ intercellular vesicles which communicate with basal epithelial cells as part of the “tissue control unit” of mesenchymal-epithelial interaction [61]. The biological significance of this intriguing phenomenon is uncertain.

## 5. Transcriptional regulation of Thy-1 mRNA

The unique expression profile of Thy-1 is reflective of unusual regulatory elements that govern it (Fig. 3). The Thy-1 promoter has two elements that are traditionally attributed to “housekeeping” genes; specifically it is located within an area of high G/C content and has no classical TATA box [62,63]. In addition, Thy-1 transcription initiates at multiple sites, and distribution of these sites differs in murine brain and thymus [64]. Transgenic mice with a hybrid or deletion construct of the Thy-1 transcriptional unit were found to have

tissue-specificity control elements exclusively downstream of the cap site. Thy-1 expression in the mouse thymus and brain requires sequences located in intron 3 and at the 3' end of intron 1, respectively. These downstream elements function independently of each other, as deletion of intron 3 eliminates expression in the thymus whereas levels in the brain are unaffected. Within the third intron of murine *thy1* is a 36 bp region that is capable of specifically binding an Ets-l-like nuclear factor expressed by both mouse thymocytes and splenocytes. Accordingly, Thy-1 is expressed in both mouse cell types. In the rat, however, the corresponding region differs by only three nucleotides and is incapable of binding a similar Ets-l-like nuclear factor in rat thymocytes. However, the region does recognize another nuclear factor expressed by rat thymocytes but not splenocytes. Unlike in mice, rat splenocytes do not express Thy-1. These data suggest that Thy-1 expression in rat thymocytes and not splenocytes is due to the conserved 36 bp recognizing a nuclear factor found in the former and not in the latter [7]. This differential tissue expression between species as closely related as rat and mouse exemplifies the unique context-dependency of Thy-1 regulation and the difficulty in making broad inferences regarding its biology as it relates to disease states.

Deletion of intron 1 eliminates expression in the brain whereas levels in the thymus are unaffected. Tissue-specific transcription of Thy-1 requires those cis-acting sequences within the introns to cooperate with at a minimum 300 bp (–270 to +36) of the promoter. However, replacement of the Thy-1 promoter with another heterologous promoter does not abolish the tissue-specific or developmental expression profile of Thy-1 [65]. A murine *thy1.2* genomic expression cassette has been designed to drive expression in the nervous system. The cassette is void of all Thy-1.2 coding sequences and the thymus enhancer in intron 3, but retains the neural enhancer element in the first intron [66].



The endogenous Thy-1 promoter in itself is not sufficient to elicit transcription or tissue specificity without the downstream elements [65]. This makes the promoter unique for the “monogamous” relationship with its endogenous gene. Two transcription factors, Sp1 and CP1, are known to bind the Thy-1 promoter and are indispensable to its transcription *in vivo*. Three additional proteins, distinct from Sp1 and CP1, bind the promoter and were given the designation R1, R2, and R3 [63]. As of yet, the identity of these proteins remains unknown.

## 6. Post-transcriptional regulation of Thy-1 mRNA

Though a far less examined mechanism, early evidence suggests that post-transcriptional regulation of Thy-1 mRNA determines the temporal expression of the Thy-1 protein in specific areas of the developing mouse nervous system. Expression of Thy-1 mRNA in these areas can precede detection of Thy-1 protein by several days. As mentioned previously, transcription of Thy-1 mRNA can occur at different initiation sites. However, the onset of protein expression does not coincide with any change to the size or transcription initiation site of Thy-1 mRNA, rather it appears to be the result of a yet to be elucidated post-transcriptional mechanism [67].

Heterokaryons generated from the fusion of mature Thy-1.1 expressing neurons with immature Thy-1.2 negative neurons became Thy-1 negative within 16 h of fusion. However, these heterokaryons behave in a similar manner as cultured immature Thy-1.2 negative neurons in that Thy-1.2 expression becomes evident within 3–4 days in culture and also coincides with the re-expression of the Thy-1.1. As the nuclei of the Thy-1.1 and Thy-1.2 neurons are distinct within the heterokaryon, the inhibition of Thy-1.1 expression was concluded to be the consequence of a developmentally regulated diffusible suppressor molecule [68]. This lends support to developmental regulation of Thy-1 in the nervous system being, at least in part, a post-transcriptional event. Therefore unlike fibroblast and endothelial cells for which there is evidence for cytokine involvement in Thy-1 regulation, Thy-1 regulation in developing neurons seems to be the consequence of intrinsic factors.

## 7. Genetic and epigenetic regulation of Thy-1

The field of epigenetics encompasses regulation of gene expression that is often heritable but does not involve changes to DNA sequences. Two mechanisms by which this occurs include post-transcriptional modifications to histones and methylation of DNA within CpG islands [69]. As stated previously, Thy-1 acts as a tumor suppressor in nasopharyngeal cancer and can be down regulated by methylation of its promoter [15].

In both rat and human primary lung fibroblasts, CpG (cytosine-guanine) islands in the Thy-1 gene promoter are hypermethylated in the Thy-1 negative fibroblast subpopulation but not in the positive. The absence of Thy-1 results in part from promoter hypermethylation. In keeping with this finding, AZA (5-aza-2'-deoxycytidine), a DNA methyltransferase inhibitor, induces Thy-1 expression in Thy-1 (–) cells. Moreover, methylation-specific PCR-in situ hybridization in lungs of patients with IPF demonstrated Thy-1 promoter hypermethylation within fibroblastic foci, which are populated with predominantly Thy-1 (–) myofibroblasts [12]. These findings suggest that epigenetic silencing of Thy-1 may be a pathogenic mechanism in IPF, as has been suggested for nasopharyngeal carcinoma.

## 8. Concluding remarks

Thy-1 as a biofactor is remarkable both in the number of cell types expressing it and the diversity of phenotypes associated with its expression. It is expressed in hematopoietic and stromal stem cells in a relatively undifferentiated state, whereas in neurons, Thy-1 is associated with maturation and cessation of neurite outgrowth. In fibroblasts, Thy-1 expression accompanies specific phenotypes which depend upon the tissue from which they originate. Absence of Thy-1 in lung and synovial fibroblasts indicates a more fibrotic myofibroblast phenotype, whereas the opposite may be the case for orbital and myometrial fibroblasts. As of yet, much is still unknown regarding the exact mechanisms by which Thy-1 modulates these phenotypes and by which Thy-1 itself is regulated. What is clear is that both the roles and regulation of Thy-1 are context-dependent. The regulation of Thy-1 is a promising area of research; increased understanding of the mechanisms of Thy-1 regulation may lead to the possibility of therapeutic manipulation of cellular phenotypes in such diverse fields as nerve injury, cancer and fibrosis.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Ms. Cassie Woodley for her expert assistance with manuscript preparation.

## References

- [1] Barker, T. H. and Hagood, J. S. Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- [2] Haeryfar, S. M. and Hoskin, D. W. (2004) Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J. Immunol.* **173**, 3581–3588.
- [3] Rege, T. A. and Hagood, J. S. (2006) Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J.* **20**, 1045–1054.
- [4] Rege, T. A. and Hagood, J. S. (2006) Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 991–999.
- [5] Reif, A. E. and Allen, J. M. (1964) The Akr thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J. Exp. Med.* **120**, 413–433.
- [6] Schlesinger, M. and Yron, I. (1969) Antigenic changes in lymph-node cells after administration of antiserum to thymus cells. *Science* **164**, 1412–1413.

- [7] Tokugawa, Y., Koyama, M., and Silver, J. (1997) A molecular basis for species differences in Thy-1 expression patterns. *Mol. Immunol.* **34**, 1263–1272.
- [8] Leyton, L., Schneider, P., Labra, C. V., Ruegg, C., Hetz, C. A., Quest, A. F., and Bron, C. (2001) Thy-1 binds to integrin beta(3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Curr. Biol.* **11**, 1028–1038.
- [9] Schlamp, C. L., Johnson, E. C., Li, Y., Morrison, J. C., and Nickells, R. W. (2001) Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* **7**, 192–201.
- [10] Yang, S. H., Chen, Y. J., Tung, P. Y., Lai, W. L., Chen, Y., Jeng, C. J., and Wang, S. M. (2008) Anti-Thy-1 antibody-induced neurite outgrowth in cultured dorsal root ganglionic neurons is mediated by the c-Src-MEK signaling pathway. *J. Cell Biochem.* **103**, 67–77.
- [11] Sanders, Y. Y., Kumbala, P., and Hagood, J. S. (2007) Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(-) lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **36**, 226–235.
- [12] Sanders, Y. Y., Pardo, A., Selman, M., Nuovo, G. J., Tollefsbol, T. O., Siegal, G. P., and Hagood, J. S. (2008) Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **39**, 610–618.
- [13] Abeyasinghe, H. R., Cao, Q., Xu, J., Pollock, S., Veyberman, Y., Guckert, N. L., Keng, P., and Wang, N. (2003) THY1 expression is associated with tumor suppression of human ovarian cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **143**, 125–132.
- [14] Fiegel, H. C., Kaifi, J. T., Quaa, A., Varol, E., Krickhahn, A., Metzger, R., Sauter, G., Till, H., Izbicki, J. R., Erttmann, R., and Kluth, D. (2008) Lack of Thy1 (CD90) expression in neuroblastomas is correlated with impaired survival. *Pediatr. Surg. Int.* **24**, 101–105.
- [15] Lung, H. L., Bangarusamy, D. K., Xie, D., Cheung, A. K., Cheng, Y., Kumar, M. K., Miller, L., Liu, E. T., Guan, X. Y., Sham, J. S., Fang, Y., Li, L., Wang, N., Protopopov, A. I., Zabarovsky, E. R., Tsao, S. W., Stanbridge, E. J., and Lung, M. L. (2005) THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* **24**, 6525–6532.
- [16] Khoo, T. K., Coenen, M. J., Schiefer, A. R., Kumar, S., and Bahn, R. S. (2008) Evidence for enhanced Thy-1 (CD90) expression in orbital fibroblasts of patients with Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* **18**, 1291–1296.
- [17] Minto, A. W., Erwig, L. P., and Rees, A. J. (2003) Heterogeneity of macrophage activation in anti-Thy-1.1 nephritis. *Am. J. Pathol.* **163**, 2033–2041.
- [18] Xue, G. P., Rivero, B. P., and Morris, R. J. (1991) The surface glycoprotein Thy-1 is excluded from growing axons during development: a study of the expression of Thy-1 during axogenesis in hippocampus and hindbrain. *Development* **112**, 161–176.
- [19] Beech, J. N., Morris, R. J., and Raisman, G. (1983) Density of Thy-1 on axonal membrane of different rat nerves. *J. Neurochem.* **41**, 411–417.
- [20] Kemshead, J. T., Ritter, M. A., Cotmore, S. F., and Greaves, M. F. (1982) Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells. *Brain Res.* **236**, 451–461.
- [21] Tiveron, M.-C., Barboni, E., Rivero, F. B. P., Gormley, A. M., Seeley, P. J., Grosveld, F., and Morris, R. (1992) Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* **355**, 745–748.
- [22] Chen, C. H., Wang, S. M., Yang, S. H., and Jeng, C. J. (2005) Role of Thy-1 in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons. *J. Cell Biochem.* **94**, 684–694.
- [23] Tiveron, M. C., Nosten-Bertrand, M., Jani, H., Garnett, D., Hirst, E. M., Grosveld, F., and Morris, R. J. (1994) The mode of anchorage to the cell surface determines both the function and the membrane location of Thy-1 glycoprotein. *J. Cell Sci.* **107**(Part 7), 1783–1796.
- [24] Mayeux-Portas, V., File, S. E., Stewart, C. L., and Morris, R. J. (2000) Mice lacking the cell adhesion molecule Thy-1 fail to use socially transmitted cues to direct their choice of food. *Curr. Biol.* **10**, 68–75.
- [25] Nosten-Bertrand, M., Errington, M. L., Murphy, K. P., Tokugawa, Y., Barboni, E., Kozlova, E., Michalovich, D., Morris, R. G., Silver, J., Stewart, C. L., Bliss, T. V., and Morris, R. J. (1996) Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature* **379**, 826–829.
- [26] Scotton, C. J. and Chambers, R. C. (2007) Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* **132**, 1311–1321.
- [27] Koumas, L., King, A. E., Critchley, H. O., Kelly, R. W., and Phipps, R. P. (2001) Fibroblast heterogeneity: existence of functionally distinct Thy 1(+) and Thy 1(-) human female reproductive tract fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **159**, 925–935.
- [28] Raghu, G., Chen, Y., Rusch, V., and Rabinovitch, P. S. (1988) Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 703–708.
- [29] Ragoowansi, R., Khan, U., Brown, R. A., and McGrouther, D. A. (2003) Differences in morphology, cytoskeletal architecture and protease production between zone II tendon and synovial fibroblasts in vitro. *J. Hand. Surg. [Br.]* **28**, 465–470.
- [30] Sorrell, J. M. and Caplan, A. I. (2004) Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* **117**(Part 5), 667–675.
- [31] Torry, D. J., Richards, C. D., Podor, T. J., and Gaudie, J. (1994) Anchorage-independent colony growth of pulmonary fibroblasts derived from fibrotic human lung tissue. *J. Clin. Invest.* **93**, 1525–1532.
- [32] King, T. E., Schwarz, M. L., Brown, K., Tooze, J. A., Colby, T. V., Waldron, J. A., Flint, A., Thurlbeck, W., and Cherniack, R. M. (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1025–1032.
- [33] Hagood, J. S., Prabhakaran, P., Kumbala, P., Salazar, L., MacEwen, M. W., Barker, T. H., Ortiz, L. A., Schoeb, T., Siegal, G. P., Alexander, C. B., Pardo, A., and Selman, M. (2005) Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* **167**, 365–379.
- [34] Cao, Q., Abeyasinghe, H., Chow, O., Xu, J., Kaung, H., Fong, C., Keng, P., Insel, R. A., Lee, W. M., Barrett, J. C., and Wang, N. (2001) Suppression of tumorigenicity in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3 by microcell-mediated transfer of chromosome 11. *Cancer Genet. Cytogenet.* **129**, 131–137.
- [35] Williams, A. F. and Gagnon, J. (1982) Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science* **216**, 696–703.
- [36] Abeyasinghe, H. R., Li, L. Q., Guckert, N. L., Reeder, J., and Wang, N. (2005) THY-1 induction is associated with upregulation of fibronectin and thrombospondin-1 in human ovarian cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **161**, 151–158.
- [37] Garrity, J. A. and Bahn, R. S. (2006) Pathogenesis of graves ophthalmopathy: implications for prediction, prevention, and treatment. *Am. J. Ophthalmol.* **142**, 147–153.
- [38] Koumas, L., Smith, T. J., Feldon, S., Blumberg, N., and Phipps, R. P. (2003) Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am. J. Pathol.* **163**, 1291–1300.
- [39] Koumas, L. and Phipps, R. P. (2002) Differential COX localization and PG release in Thy-1(+) and Thy-1(-) human female reproductive tract fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **283**, C599–C608.
- [40] Wetzel, A., Wetzig, T., Haustein, U. F., Sticherling, M., Anderegg, U., Simon, J. C., and Saalbach, A. (2006) Increased neutrophil adherence in psoriasis: role of the human endothelial cell receptor Thy-1 (CD90). *J. Invest. Dermatol.* **126**, 441–452.
- [41] Seki, T., Spurr, N., Obata, F., Goyert, S., Goodfellow, P., and Silver, J. (1985) The human Thy-1 gene: structure and chromosomal location. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6657–6661.
- [42] Almqvist, P. and Carlsson, S. R. (1988) Characterization of a hydrophilic form of Thy-1 purified from human cerebrospinal fluid. *J. Biol. Chem.* **263**, 12709–12715.
- [43] Barclay, A. N., Letarte-Muirhead, M., Williams, A. F., and Faulkes, R. A. (1976) Chemical characterisation of the Thy-1 glycoproteins from the membranes of rat thymocytes and brain. *Nature* **263**, 563–567.
- [44] Hoessli, D., Bron, C., and Pink, J. R. (1980) T-lymphocyte differentiation is accompanied by increase in sialic acid content of Thy-1 antigen. *Nature* **283**, 576–578.
- [45] Killeen, N. (1997) T-cell regulation: Thy-1—hiding in full view. *Curr. Biol.* **7**, R774–R777.
- [46] Zhang, F., Schmidt, W. G., Hou, Y., Williams, A. F., and Jacobson, K. (1992) Spontaneous incorporation of the glycosyl-phosphatidylinositol-linked protein Thy-1 into cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5231–5235.
- [47] Schafer, H., Bartels, T., Hahn, G., Otto, A., and Burger, R. (1999) T-cell-activating monoclonal antibodies, reacting with both leukocytes and erythrocytes, recognize the guinea pig Thy-1 differentiation antigen:

- characterization and cloning of guinea pig CD90. *Cell Immunol.* **197**, 116–128.
- [48] Saalbach, A., Wetzig, T., Hausteiner, U. F., and Anderegg, U. (1999) Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. *Cell Tissue Res.* **298**, 307–315.
- [49] Naquet, P., Barbet, J., Pont, S., Marchetto, S., Barad, M., Devaux, C., Rougon, G., and Pierres, M. (1989) Characterization of Thy-1 with monoclonal antibodies and evidence of Thy-3. *Immunol. Ser.* **45**, 99–117.
- [50] Bergman, A. S. and Carlsson, S. R. (1994) Saponin-induced release of cell-surface-anchored Thy-1 by serum glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D. *Biochem. J.* **298 Pt 3**, 661–668.
- [51] Fang, Q., Liu, X., Al-Mugotir, M., Kobayashi, T., Abe, S., Kohyama, T., and Rennard, S. I. (2006) Thrombin and TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  synergistically induce fibroblast-mediated collagen gel degradation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 714–721.
- [52] Park, J. E., Lenter, M. C., Zimmermann, R. N., Garin-Chesa, P., Old, L. J., and Rettig, W. J. (1999) Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **274**, 36505–36512.
- [53] Moss, M. L. and Lambert, M. H. (2002) Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem.* **38**, 141–153.
- [54] Lemansky, P., Fatemi, S. H., Gorican, B., Meyale, S., Rossero, R., and Tartakoff, A. M. (1990) Dynamics and longevity of the glycolipid-anchored membrane protein, Thy-1. *J. Cell Biol.* **110**, 1525–1531.
- [55] Ishizu, A., Ishikura, H., Nakamaru, Y., Kikuchi, K., Koike, T., and Yoshiki, T. (1997) Interleukin-1 $\alpha$  regulates Thy-1 expression on rat vascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* **53**, 73–78.
- [56] Mason, J. C., Yarwood, H., Tarnok, A., Sugars, K., Harrison, A. A., Robinson, P. J., and Haskard, D. O. (1996) Human Thy-1 is cytokine-inducible on vascular endothelial cells and is a signaling molecule regulated by protein kinase C. *J. Immunol.* **157**, 874–883.
- [57] Wetzl, A., Chavakis, T., Preissner, K. T., Sticherling, M., Hausteiner, U. F., Anderegg, U., and Saalbach, A. (2004) Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* **172**, 3850–3859.
- [58] Saalbach, A., Wetzl, A., Hausteiner, U. F., Sticherling, M., Simon, J. C., and Anderegg, U. (2005) Interaction of human Thy-1 (CD 90) with the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. *Oncogene* **24**, 4710–4720.
- [59] Beissert, S., He, H. T., Hueber, A. O., Lellouch, A. C., Metzke, D., Mehling, A., Luger, T. A., Schwarz, T., and Grabbe, S. (1998) Impaired cutaneous immune responses in Thy-1-deficient mice. *J. Immunol.* **161**, 5296–5302.
- [60] Kukulansky, T., Abramovitch, S., and Hollander, N. (1999) Cleavage of the glycosylphosphatidylinositol anchor affects the reactivity of thy-1 with antibodies. *J. Immunol.* **162**, 5993–5997.
- [61] Bukovsky, A., Caudle, M. R., Keenan, J. A., Upadhyaya, N. B., Van Meter, S. E., Wimalasena, J., and Elder, R. F. (2001) Association of mesenchymal cells and immunoglobulins with differentiating epithelial cells. *BMC Dev. Biol.* **1**, 11.
- [62] Giguere, V., Isobe, K., and Grosveld, F. (1985) Structure of the murine Thy-1 gene. *EMBO J.* **4**, 2017–2024.
- [63] Spanopoulou, E., Giguere, V., and Grosveld, F. (1991) The functional domains of the murine Thy-1 gene promoter. *Mol. Cell Biol.* **11**, 2216–2228.
- [64] Spanopoulou, E., Giguere, V., and Grosveld, F. (1988) Transcriptional unit of the murine Thy-1 gene: different distribution of transcription initiation sites in brain. *Mol. Cell Biol.* **8**, 3847–3856.
- [65] Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F., and Spanopoulou, E. (1990) Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J.* **9**, 833–840.
- [66] Campsall, K. D., Mazerolle, C. J., De Repentingy, Y., Kothary, R., and Wallace, V. A. (2002) Characterization of transgene expression and Cre recombinase activity in a panel of Thy-1 promoter-Cre transgenic mice. *Dev. Dyn.* **224**, 135–143.
- [67] Xue, G. P. and Morris, R. (1992) Expression of the neuronal surface glycoprotein Thy-1 does not follow appearance of its mRNA in developing mouse Purkinje cells. *J. Neurochem.* **58**, 430–440.
- [68] Saleh, M. and Bartlett, P. F. (1989) Evidence from neuronal heterokaryons for a trans-acting factor suppressing Thy-1 expression during neuronal development. *J. Neurosci. Res.* **23**, 406–415.
- [69] Wilson, A. G. (2008) Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J. Periodontol.* **79**(8 Suppl), 1514–1519.