

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

La tetraspanina CD9 regula la función de la metaloproteasa ADAM-17 y de su sustrato ALCAM

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Álvaro Gilsanz Cáceres

Director

Carlos Cabañas Gutiérrez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I

TESIS DOCTORAL

**La tetraspanina CD9 regula la función
de la metaloproteasa ADAM-17 y de su
sustrato ALCAM**

Álvaro Gilsanz Cáceres

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I

TESIS DOCTORAL

La tetraspanina CD9 regula la función de la metaloproteasa ADAM-17 y de su sustrato ALCAM

Este trabajo ha sido realizado por Álvaro Gilsanz Cáceres para optar al grado de Doctor, en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" del CSIC, bajo la dirección del Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez.

Fdo.: Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez

Fdo.: Álvaro Gilsanz Cáceres

A Belén

A mi familia

“Si he visto más lejos, es porque estaba subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton. 1676

Agradecimientos

Este trabajo no podría haber sido acabado sin la ayuda de muchas personas:

Primero, gracias a Carlos, no sólo por confiar en mi contra viento y marea, sino también por su ayuda para solucionar las cosas que no salían, enseñarme a hacer buena ciencia y compartir todos sus conocimientos. La informática ya la tenía cuando entre al laboratorio, pero el inglés lo he mejorado mucho y me he casado, no esta mal para una tesis...

A mis predecesoras en la pérdida TACE: Lola, que me enseñó todo lo que se de los misterios de los experimentos y de la ciencia, guiándome en los primeros (y segundos, y terceros) pasos. Por todos sus trucos y consejos, no solo de ciencia. Susi, por dejarme marearla con mis dudas y problemas, por enseñarme vida y milagros de CD9 y compañía, y por iniciar el camino de la verdad de ALCAM. ¡Muchas gracias! Sin vosotras no se donde estaría, probablemente haciendo fusiones de TACE.

A mis compañeras de los tiempos de la "Complu", como Alicia, por enseñarme que la ciencia puede ser, y lo es, divertida. Fito siempre me recordará a los viernes. Sandra, por su ayuda técnica en general y especialmente por su ayuda en las fusiones de TACE y sus citómetros. Al resto del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la "Complu", gracias por los buenos ratos pasados en las comidas, los intercambios de reactivos y aparatos y por hacerme sentir tan cómodo allí.

A Esther, por todas sus sugerencias e ideas para superar problemas metodológicos y conceptuales. A Iria, por sufrir juntos el camino de la tesis, por haber pasado muchos momentos de pánico juntos, y por demostrar que hay vida más allá de la tesis. También gracias a las dos por ser mi unión con el Departamento de Inmunología para el laberinto que es la presentación de la tesis.

Ya en el CBM, a mis patitos Yesenia y Graciela, diréis lo contrario, pero yo he aprendido más de vosotras que al revés. ¡Hasta aprendí a parpadear! Un verdadero placer haber compartido el laboratorio y mis conocimientos con vosotras.

A Raquel, gracias por toda la ayuda al llegar al nuevo edificio, por haberte mudado con nosotros, por tu apoyo, por cultivos, por los cafés en la azotea cuando necesitaba desconectar, por los paseos al animalario y, en definitiva, por estar ahí y ser como eres.

ALorena por toda su experiencia, ideas y sugerencias, así como por hacer posibles los experimentos de migración. También a Cesar, por traer más testosterona al laboratorio y ayudar a defenderme. Gracias también a Irene, por su ayuda y por hacer tanto trabajo y siempre pedir más, así da gusto trabajar en un laboratorio.

A Javi y Ruth, por hacer el día a día más llevadero, por las risas dentro y fuera del CBM. Y también por darme aliento en esta fase final de escritura que hemos hecho casi a la vez, ¡ánimo que os queda poco!

A Juan Serrador y Almudena, por todos sus comentarios en los seminarios. Sin sus comentarios y sugerencias el paper de ALCAM no iría tan completo. Muchas gracias.

Al grupo de M. López-Cabrera: Pilar, María-Luisa, Ángy, Vicente y Jesús, no solo por su buena compañía, sino también por permitirnos colaborar en un aspecto más clínico de la ciencia que me parece muy interesante y, por qué no, por las cañas que nos hemos tomado, aunque no hayan sido muchas.

Al resto de la gente que conozco del CBM, a la gente de cultivos, por las risas entre células. Jorge, al final no he hecho las frases "frikis", pero me he quedado con las ganas. A los "Toribios" y "Balbinos", por el intercambio de ideas en los seminarios y la ayuda con los reactivos, células, etc. Y en general a todos los que saludan por los pasillos, un pequeño gesto que se agradece.

Una mención especial se merece la gente de los servicios centrales del CBM: Paco Gutiérrez y el resto de su equipo de Instrumentación, siempre que algo se rompía aparecían raudos a ayudarte. Berta, Yolanda y Silvia de citometría, no solo por la ayuda con los citómetros, sino también por hacer de la primera una planta mejor. Al servicio de Microscopía Óptica y Confocal, Ángeles, Verónica y Teresa. Sin vuestra ayuda, toda la cuantificación de agrupamientos hubiese sido imposible, gracias por todas las sugerencias y por llevarlas a cabo.

A la gente del Hospital de la Princesa: a los de la novena porque sin conocerme me ayudaron con el citómetro en las primeras crisis, y a los de la primera por permitirnos colaborar con un gran grupo como ese, por todos sus reactivos, ideas y sugerencias, especialmente a Hortensia, Ursa, María Yáñez-Mó y Paco Sánchez-Madrid. No me puedo olvidar de Mariano Vitón, por el tiempo que dedicó a explicarme los entresijos de la citometría, a partir de ese momento me pude fiar de lo que hacía.

Gracias también al grupo de Carmelo Bernabeu del CIB, Blanco, Eva, Carmén, Elisa, etc., he tenido la suerte de mantener una colaboración muy enriquecedora con ellos. También al grupo de Mario Mellado del CNB (Gema y Graciela) por el mundo de los linfocitos naïve. José Miguel Rodríguez Frade, por pasar un buen rato en los experimentos de *rolling*, resultados negativos, pero experiencia muy enriquecedora.

A mis amigos: Mario, Roma y Alicia, por los ratos compartidos y por sacarme de cañas cuando ya no podía más y apoyarme en esta locura llamada tesis. Sara, no solo por los libros, sino también por ayudarme a desconectar. Javi, compañero de sufrimiento, por entender de lo que hablaba y comprender este extraño mundo.

A mis padres y mi familia, por sentirte orgullos de tener un científico, y porque, aún sin entender el mundo científico no dudaron en apoyarme. Sin su apoyo no hubiese acabado. A mi hermano, por quitarme todos los dolores producidos al trabajar y al escribir.

A mi mujer Belén. Por estar a mi lado, por su apoyo en toda esta locura de trabajo, por confiar en mi y hacerme acabar la tesis, por aguantar mi mal humor cuando las cosas iban mal, por compartir tantas cosas, por acompañarme al laboratorio en días festivos, por corregir los trabajos sin entender nada de lo que pone, por su ayuda con el Photoshop y por maquetar esta tesis. Esperemos que todo vaya bien.

Y también gracias a ti, por leerme este trabajo. Espero que al menos te sea útil.

Índice

Agradecimientos	7
Índice	11
Introducción	15
Tetraspaninas	17
Introducción	17
Estructura	18
Interacciones de las tetraspaninas. Tetraspanin web	22
La tetraspanina CD9	24
ADAM-17	26
Introducción	26
Estructura	26
Sustratos	27
Regulación	28
Funciones	30
ALCAM	32
Introducción	32
Estructura	33
Interacciones	34
Funciones	35
Presentación de Antígeno	38
Objetivos	41
Materiales y Métodos	45
Cultivos celulares	47
Anticuerpos y reactivos	47
Purificación de proteínas quiméricas	48
Citometría de Flujo	48

Plásmidos y transfecciones	49
Inmunofluorescencia y microscopía confocal	49
Ensayos de hibridación por proximidad	50
Co-inmunoprecipitación y ensayos de <i>cross-linking</i>	51
Ensayos de interacción directa entre proteínas	52
Western-blot	53
Estimulación de THP-1, Jurkat y Raji para la liberación de TNF- α	53
Detección de TNF- α e ICAM-1 soluble	53
Cuantificación de la liberación de ICAM-1 en células Colo320 y transfectantes estables de Colo320	54
RT-PCR cuantitativa de TNF- α	54
Ensayos de adhesión a ALCAM-Fc	54
Ensayos de migración	55
Activación de células T	55
Resultados	57
La tetraspanina CD9 y la metaloproteinasa ADAM-17 interaccionan en la superficie de células endoteliales (HMEC-1) y monocíticas (THP-1)	59
Anticuerpos anti-CD9 inhiben la actividad metaloproteinasa de ADAM-17	66
La sobreexpresión de CD9, o su interferencia estable mediante ARNhp, regulan la actividad de ADAM-17	71
Regulación dinámica de la asociación entre CD9 y ADAM-17 tras la estimulación con ésteres de forbol	77
CD9 y ALCAM interaccionan en la membrana de linfocitos T y B	77
La tetraspanina CD9 aumenta la capacidad de adhesión homofílica de ALCAM	81
La tetraspanina CD9 aumenta la avidéz de ALCAM y no su afinidad	86
La tetraspanina CD9 regula la función de ADAM-17 y de su sustrato ALCAM	88
La tetraspanina CD9 regula la activación de células T a través de la interacción heterofílica de ALCAM	89

Discusión	91
La tetraspanina CD9 se asocia con ADAM-17 y regula su función	93
CD9 se asocia con ALCAM y regula su función, con la participación de ADAM-17 ..	96
Conclusiones	101
Bibliografía	105
Anexos	125
Abreviaturas	127
Publicaciones durante la Tesis	129
Publicaciones	131



INTRODUCCIÓN

Tetraspaninas

Introducción.

Las tetraspaninas son una familia de proteínas de membrana atravesándola cuatro veces. Están expresadas en casi todos los dominios naturales (Huang et al., 2005). En plantas hay una familia de proteínas similares a las tetraspaninas, con unos 17 miembros en *Arabidopsis thaliana*, pero también están presentes en arroz, maíz, lirios e incluso musgos, que son consideradas las tetraspaninas de las plantas, aunque no tienen todos los motivos estructurales presentes en las tetraspaninas de animales superiores. En hongos pluricelulares (en hongos unicelulares han desaparecido) ha sido descrita la tetraspanina Pls1, necesaria para la infección de las hojas de arroz por parte de *Magnaporthe grisea* (Clergeot et al., 2001). En protozoos, la ameba *Entamoeba histolytica*, que es capaz de infectar humanos, presenta proteínas similares a las tetraspaninas, aunque sólo comparten un 22% de identidad con las tetraspaninas de metazoos, sí que son estructuralmente similares a los motivos y estructuras típicas de esta familia de proteínas (Wilihoeft et al., 2001). También se han encontrado tetraspaninas en *Dictyostelium discoideum*, pero no en otros protozoos como *Leishmania major* o *Plasmodium falciparum*. En gusanos se han descrito 20 tetraspaninas para *Caenorhabditis elegans* y 25 para el parásito humano *Schistosoma*. *Drosophila melanogaster* tiene 36 miembros de esta familia de proteínas, lo que es un número excepcionalmente alto respecto al resto de los insectos que suelen tener 15 miembros. En vertebrados, han sido encontradas 32 tetraspaninas en ratón, 27 en pollo, 31 en rana, 47 en pez cebra y 33 tetraspaninas en humano, incluyendo los antígenos de diferenciación leucocitarios CD9, CD37, CD53, CD63, CD81/TAPA-1, CD82/Kai1, CD151/PETA-3 y CD231/TALLA1 (Hemler, 2001; Hemler, 2003; Inui et al., 1997; Iwamoto et al., 1994; Schmidt et al., 1996; Tarrant et al., 2003; Yanez-Mo et al., 2001), las tetraspaninas identificadas por primera vez en tumores TALLA-1, CO-029 y SAS (Jankowski et al., 1994; Szala et al., 1990; Takagi et al., 1995), las uroplaquinas UP1a y UP 1b componentes del urotelio (Sun et al., 1996) y las proteínas del aro exterior del fotoreceptor de la retina RDS/periferina y Rom1 (Goldberg, 2006). La conservación de la estructura, sino de todos los dominios si de la forma general de la proteína, sugiere que provienen de un antecesor común, como se muestra en la **figura 1**.

Todas las células de mamífero, exceptuando eritrocitos, expresan alguna tetraspanina. Hay algunos miembros, como CD9, CD81 y CD151 que tienen una expresión muy amplia en diferentes tejidos y tipos celulares, aunque no son ubicuas. Existen también tetraspaninas más especializadas que sólo se expresan en ciertos tipos celulares, como las uroplaquinas del urotelio, o RDS/periferina y Rom1 en la retina. CD53 está expresada casi exclusivamente en leucocitos y CD37 en linfocitos T y B. Las tetraspaninas se encuentran principalmente en la membrana plasmática, con la excepción de CD63, cuya expresión está limitada a lisosomas (Azorsa et al., 1991; Metzelaar et al., 1991). CD151, además de en la membrana plasmática, también se expresa en endosomas de células endoteliales (Sincock et al., 1997). CD37, CD53, CD63, CD81 y CD82 se encuentran en los compartimentos citoplasmáticos ricos en MHC de clase II de linfocitos B (Escola et al., 1998). Los exosomas también están enriquecidos en tetraspaninas (Escola et al., 1998; van Niel et al., 2006). Estas vesículas, implicadas en comunicación intercelular, pueden servir para intercambio de moléculas de MHC de clase II y así poder estimular linfocitos T a larga

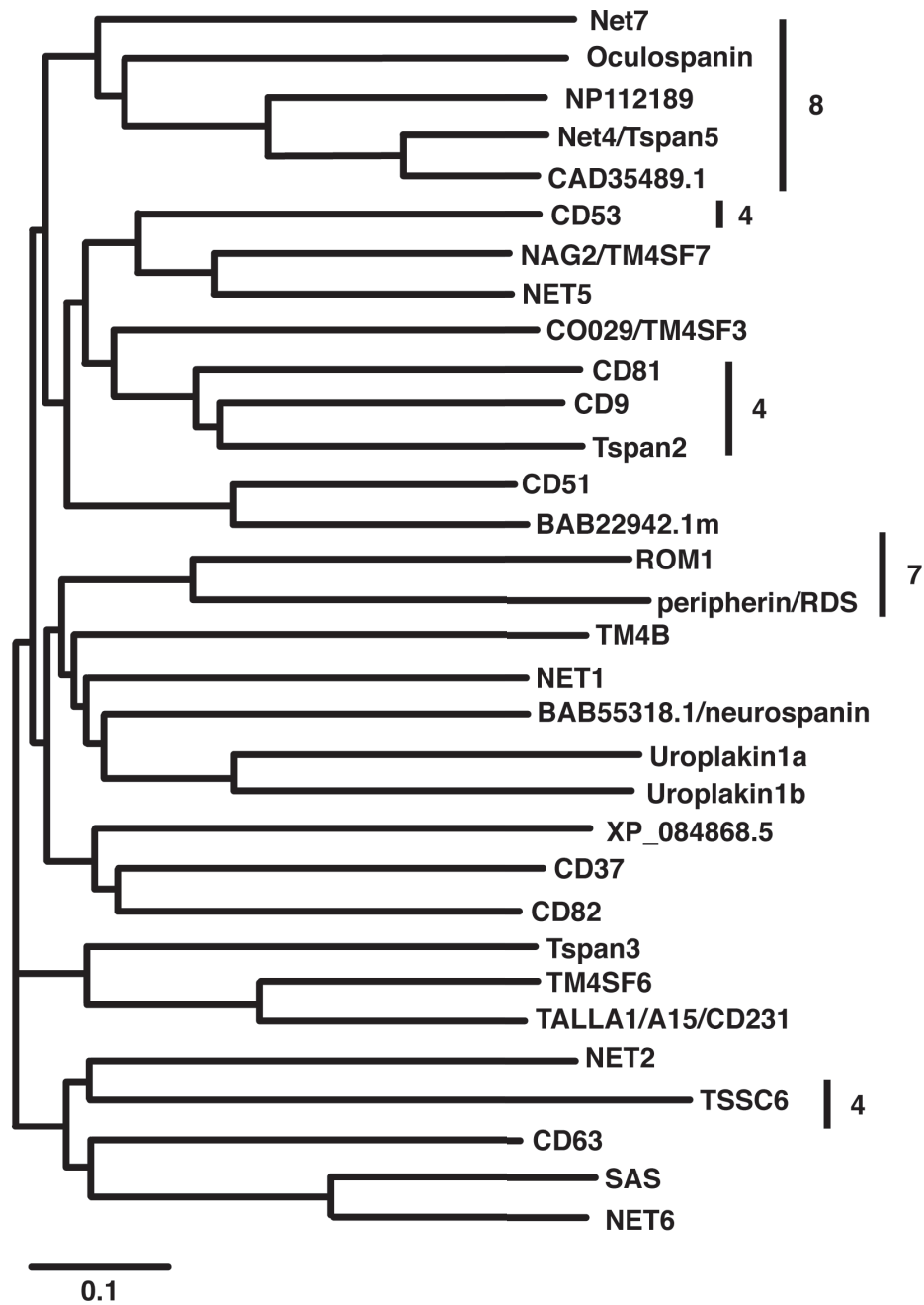


Figura 1: Árbol de distancias genéticas de las tetraspaninas humanas. Las longitudes de los brazos indican la distancia genética entre las tetraspaninas (0,1 = 10% de diferencia en la secuencia de aminoácidos). Todas las secuencias son de humano, salvo BAB22942.1m que es de ratón. Los números de la derecha indican el número de cisteínas en el LEL. Las que están sin especificar presentan 6 residuos de cisteínas. Modificado de (Hemler, 2003).

distancia (Wolfers et al., 2001). Puesto que las tetraspaninas están muy implicadas en procesos de fusión celular pueden facilitar la formación de estos exosomas.

Estructura.

El nombre de tetraspanina proviene de que atraviesan (*span*) cuatro (*tetra*) veces la membrana plasmática. Son proteínas pequeñas, compuestas por entre los 204 (Tspan-13/NET-6) y los 335 (Tspan-10/oculospanina) aminoácidos. Sus cuatro dominios transmembrana delimitan dos dominios extracelulares (**figura 2**) (Charrin et al., 2009; Hemler, 2003; Hemler, 2005). El primer dominio, y más pequeño, llamado dominio extracelular corto, SEL (*Short Extracelular*

Loop) o EC1 (*Extracellular domain 1*), presenta unos 25 aminoácidos, y una estructura en forma de lámina β hidrofóbica que se pliega hacia el dominio extracelular grande. El segundo dominio llamado dominio extracelular grande, LEL (*Large Extracellular Loop*) o EC2 (*Extracellular domain 2*) es mayor, posee entre 73 y 131 aminoácidos. Este dominio sobresale de la membrana plasmática apenas unos 3,5 nm en el caso de CD81, que comparado con otras moléculas es bastante poco (Kitadokoro et al., 2001). Para que una proteína forme parte de la familia de las tetraspaninas es necesario que la proteína presente los 4 dominios transmembrana con residuos

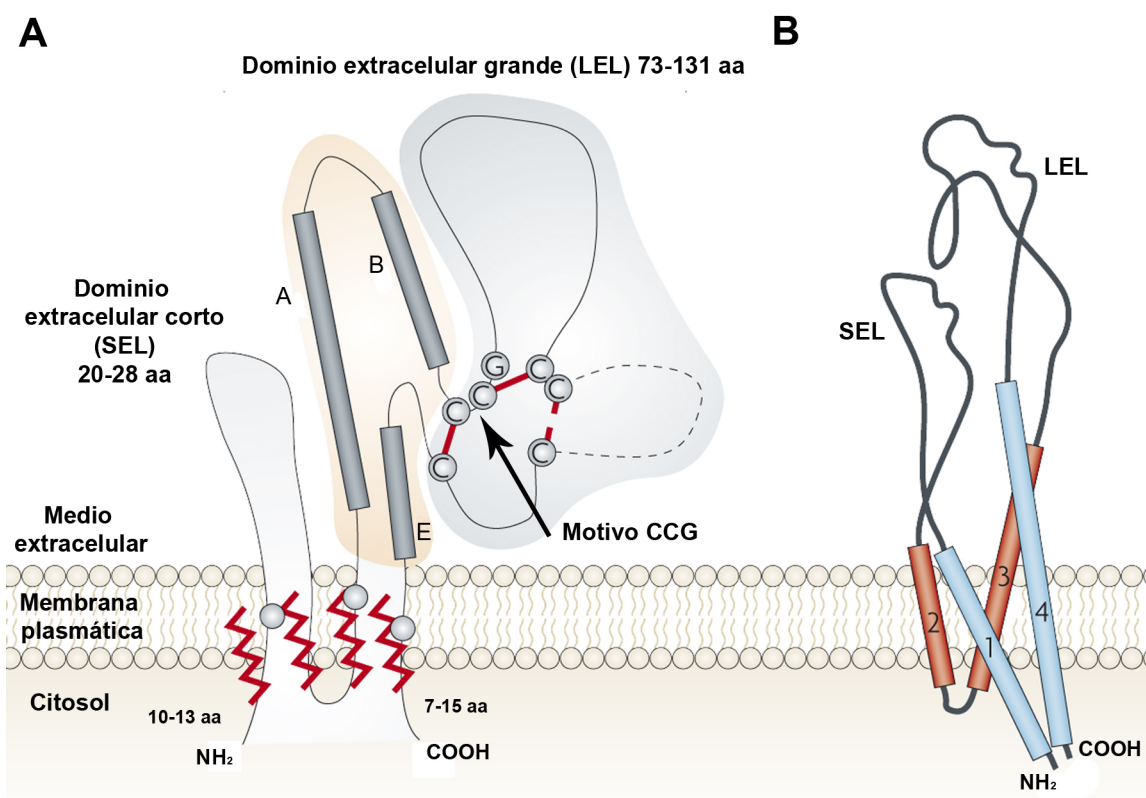


Figura 2: Estructura de las tetraspaninas. A) Estructura desplegada de las tetraspaninas. Presentan un dominio extracelular corto (SEL) y un dominio extracelular grande (LEL). Este último dominio tiene una región constante (sombreado en rosa) con tres hélices A, B y E, y una región variable (sombreada en azul) con el motivo CCG. Tienen dos puentes disulfuro conservados (línea roja) y un tercero que solo está presente en ciertas tetraspaninas (punteado). En la región transmembrana presentan residuos hidrofílicos (esferas grises) y residuos de cisteína para la unión de estructuras de palmítico (líneas en zigzag rojas). B) Estructura de una tetraspanina plegada en la membrana plasmática, con los cuatro dominios transmembrana muy próximos, así como el LEL y el SEL. Esta estructura confiere a las tetraspaninas una forma similar a la de una barra. (Modificado de Hemler, 2008)

polares conservados, así como también es necesaria la presencia de cuatro o seis cisteínas, incluyendo un motivo CCG en el dominio extracelular grande, que formen dos o tres puentes disulfuro intracatenarios.

La estructura del LEL de CD81 ha sido resuelta por cristalografía, y la tomaremos de ejemplo para describir la estructura de ese dominio (Kitadokoro et al., 2001). Justo después del tercer dominio transmembrana e inmediatamente antes del cuarto se encuentran dos segmentos con estructura secundaria en hélice α con orientación antiparalelas (hélices A y E, respectivamente). A continuación de la hélice α A se encuentra otro segmento en hélice α denominada hélice B.

Estas tres hélices están muy conservadas en todas las tetraspaninas, al menos en cuanto a su estructura, y no tanto en su secuencia de aminoácidos. Por esta razón a esta región del LEL se la denomina región constante. Hay una región entre las hélices B y E, llamada variable, que no está tan conservada como la anterior. En esta región variable algunas tetraspaninas presentan hélices α , dos en el caso de CD81, pero también hay otras estructuras como láminas β y lazos. Lo único que está conservado en esta región del dominio extracelular largo son determinados residuos de cisteína y el motivo CCG, que forman puentes disulfuro que mantienen la estructura tridimensional del LEL. La mayoría de las tetraspaninas tienen 6 residuos conservados de cisteína en su LEL (incluyendo las dos en el motivo CCG), pero hay algunas con 4 (como CD9) y otras con 8 residuos de cisteína (**figura 1**), o 7 en el caso de RDS/periferina y Rom1, donde la séptima cisteína se encarga de formar heteropolímeros (Goldberg, 2006). La región constante del LEL se ha implicado en interacciones homo y heterofílicas, mientras que la región variable del LEL está implicada en la interacción con las proteínas específicas para cada tetraspanina (Seigneuret et al., 2001). De hecho Higginbottom et al. (Higginbottom et al., 2000) han mapeado el sitio de unión para el virus de la hepatitis C en la parte final de la región variable del LEL de CD81. En la interacción entre CD151 y $\alpha 3\beta 1$ participan la subunidad α de la integrina (residuos 569-705) y la región variable del LEL de CD151 (residuos 149-213). Los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína presentes en el motivo CCG, son necesarios para esta interacción. La región espaciadora del dominio extracelular de la subunidad $\alpha 3$ también es necesaria para que ambas moléculas se asocien (Berditchevski et al., 2001; Yauch et al., 1998). La mayor parte de las tetraspaninas tienen residuos glicosilados en el dominio LEL, excepto CD9 que se encuentra glicosilada únicamente en el dominio SEL, mientras que CD81 y NET-2 no están glicosiladas. En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se describió un anticuerpo que reconoce un epítipo en el LEL de CD9 cuya expresión depende de la asociación de esta tetraspanina con conformaciones activadas de las integrinas β_1 , y particularmente la integrina $\alpha_6\beta_1$. El anticuerpo, llamado PAINS-13, sólo inmunoprecipita CD9 cuando se mantienen las condiciones de interacción con la integrina. Este anticuerpo ejerce efectos funcionales cuando se une a CD9, afectando procesos dependientes de integrinas como la cicatrización de heridas y la adhesión (Gutierrez-Lopez et al., 2003). La estructura terciaria de las tetraspaninas se asemeja más a una pequeña barra, con el LEL y el SEL muy próximos entre sí (**figura 2B**), más que al tradicional esquema que siempre se ha mostrado (**figura 2A**). Esta forma tan discreta le permitiría incluirse más fácilmente entre las diferentes proteínas a las que se asocia con menor impedimento estérico.

Los dominios transmembrana tienen residuos polares conservados. Estos residuos están implicados en la asociación con otras proteínas, como la interacción entre CD9 y su compañero EWI-2, en la que el LEL y los dominios transmembrana 2 y 3 de la tetraspanina son los responsables de la interacción. También están implicados en la formación de puentes de hidrógeno entre ellos que permiten la estabilización de la tetraspanina (Charrin et al., 2003a; Kovalenko et al., 2005; Seigneuret, 2006).

Las colas citoplasmáticas tienen menos de veinte aminoácidos de longitud y tienen sitios de palmitoilación, implicados en la interacción tetraspanina-tetraspanina y tetraspanina-proteína (Charrin et al., 2003b). Todas las tetraspaninas estudiadas tienen algún residuo de palmítico unido a cisteínas situadas en el límite entre la membrana y el citosol. Las tetraspaninas presentan varias

MOLÉCULA ASOCIADA	TETRASPANINAS	REFERENCIAS PARA CD9
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN		
Integrinas		
$\alpha 1\beta 1$	CD9	(Lozahic et al., 2000)
$\alpha 2\beta 1$	CD9 y, CD151	(Jones et al., 1996; Scherberich et al., 1998)
$\alpha 3\beta 1$	CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151	(Berdichevski et al., 1996; Jones et al., 1996; Scherberich et al., 1998)
$\alpha 4\beta 1$	NAG-2 y Co-029	
$\alpha 5\beta 1$	CD9, CD53, CD81, CD82 y CD151	(Rubinstein et al., 1994; Rubinstein et al., 1996)
$\alpha 6\beta 1$	CD9 y CD151	(Rubinstein et al., 1994)
$\alpha 6\beta 1$	CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151	(Berdichevski et al., 1996; Miyake et al., 1995; Miyake et al., 1996; Rubinstein et al., 1996)
$\alpha L\beta 2$	NAG-2 y Co-029	
$\alpha IIb\beta 3$	CD63 y CD82	
$\alpha 6\beta 4$	CD9 y CD151	(Indig et al., 1997; Longhurst et al., 1999; Slupsky et al., 1997; Slupsky et al., 1989)
Familia de las inmunoglobulinas		
ICAM-1	CD9	(Barreiro et al., 2005)
VCAM-1	CD151	
EpCAM	CD9	(Schmidt et al., 2004)
Otros receptores de adhesión		
CD44	CD9	(Jones et al., 1996; Le Naour et al., 2004; Tarrant et al., 2003)
Claudina-1	CD9	(Kovalenko et al., 2007)
Syndecan	CD9	(Jones et al., 1996)
CD42	CD9	(Longhurst et al., 1999; Slupsky et al., 1997)
CD47	CD9	(Longhurst et al., 1999)
MOLÉCULAS DEL SISTEMA INMUNE		
HLA-DR	CD9, CD53, CD81, CD82, CD63 y CD37	(Escola et al., 1998; Rubinstein et al., 1996)
HLA-DM	CD82 y CD63	
HLA-DQ	CD53, CD81 y CD82	
HLA-DO	CD82 y CD63	
MHC I	CD82, CD53 y CD81	
CD4	CD9, CD81 y CD82	(Toyo-oka et al., 1999)
CD8	CD81 y CD82	
CD3	CD9 y CD81	(Toyo-oka et al., 1999)
CD19	CD9, CD81 y CD82	(Horvath et al., 1998)
CD21	CD81	
Leu-13	CD81	
CD46	CD9, CD81, CD82 y CD151	(Lozahic et al., 2000)
CD5	CD9	(Toyo-oka et al., 1999)
CD2	CD53	
FACTORES DE CRECIMIENTO		
EGF-R	CD82	
Pro-TGF- α	CD9	(Shi et al., 2000)
Pro-HB-EGF	CD9, CD81, CD82 y CD63	(Iwamoto et al., 1994; Nakamura et al., 1995; Nakamura et al., 2000)
MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN		
PKC	CD9, CD53, CD81, CD82 y CD151	(Zhang et al., 2001)
PI4-K	CD9, CD81, CD151 y CD63	(Yauch and Hemler, 2000)
Proteínas G	CD9 y CD81	(Andre et al., 2006; Le Naour et al., 2006)
OTRAS PROTEÍNAS		
EWI-F (FPRP, CD9P-1)	CD9 y CD81	(Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001b)
EWI-2 (PGRL)	CD9 CD63, CD81, CD82 y CD151	(Stipp et al., 2001a)
CD20	CD53, CD81 y CD82	
CD36	CD9	(Miao et al., 2001)
g- glutamil-transferasa	CD37, CD81, CD53 y CD82	
UPII, UPIII	UP1a y UP1b	
ADAM-10	CD9, CD81 y CD82	(Arduise et al., 2008)
ADAM-2	CD9 y CD81	(Kaji et al., 2000)
ERM	CD9 y CD81	(Sala-Valdes et al., 2006)
MT1-MMP	CD151	

Tabla I: Moléculas asociadas a las tetraspaninas.

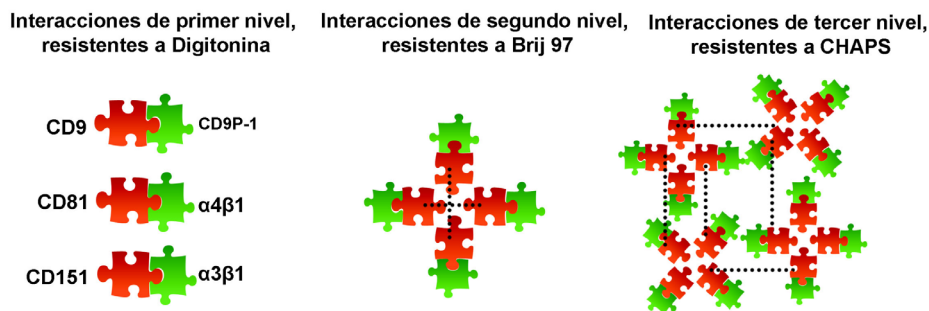


Figura 3: Interacciones de la *tetraspanin web*. Las interacciones de primer nivel son resistentes a la solubilización en Digitonina y contienen una tetraspanina (verde) unida a su proteína directamente asociada (naranja) o “partner”. Las interacciones de segundo nivel son resistentes a la solubilización en Brij 97 e incluyen los complejos anteriores de primer orden asociados entre sí a través de interacciones tetraspanina-tetraspanina. Las interacciones de tercer nivel son resistentes a la solubilización con detergentes muy suaves como CHAPS y comprenden complejos de segundo nivel unidas entre sí. (Modificado de Boucheix et al., 2001)

cisteínas en sus colas citoplasmáticas, como por ejemplo seis en CD9, CD81 y CD151, y cinco en CD82 (Yang et al., 2002; Zhou et al., 2004). Recientemente ha sido descrito que algunas tetraspaninas también sufren ubiquitinación, lo que conlleva su degradación y la reducción de su expresión en membrana (Lineberry et al., 2008; Tsai et al., 2007). También pueden presentar dominios de unión con proteínas del citoesqueleto y señalizadoras como PKC (Zhang et al., 2001) o PI4-K (Berditchevski et al., 1997; Yauch et al., 1998; Yauch and Hemler, 2000).

Interacciones de las tetraspaninas. *Tetraspanin web*.

La capacidad de las tetraspaninas de interactuar entre ellas y con otras proteínas ya se conoce desde su descubrimiento. Co-inmunoprecipitados de diferentes tetraspaninas dan lugar a patrones de proteínas co-inmunoprecipitadas bastante similares, pero con diferentes eficiencias de precipitación para cada una de las proteínas (Angelisova et al., 1994; Berditchevski et al., 1996; Rubinstein et al., 1996). A partir de estos resultados se propuso que las tetraspaninas son facilitadores o adaptadores de la función de las proteínas a las que se asocian. En la membrana plasmática forman una red de interacciones conocida como la *tetraspanin web* (red de tetraspaninas). También son llamados TEMs (*tetraspanin-enriched microdomains*, microdominios enriquecidos en tetraspaninas). El número de proteínas que interactúan con la familia de las tetraspaninas no ha dejado de crecer en los últimos años, especialmente con la realización de estudios de proteómica (Le Naour et al., 2006b) (**tabla I**). Las proteínas asociadas a tetraspaninas se dividen generalmente en cinco grupos: I) integrinas y otras moléculas de adhesión (EPCAM, VCAM-1, ICAM-1 y varios miembros de las subfamilias de integrinas β_1 , β_2 y β_3), II) proteínas con dominios inmunoglobulina (EWI-F, EWI-2, CD4, CD8 y MHC de clase I y II), III) ectoenzimas (MT1-MMP, ADAM-10 y γ -secretasas), IV) moléculas de señalización (proteínas G heterotriméricas, PI4-K y PKC) y V) otras moléculas como pro-HB-EGF. Por su interacción con todas estas proteínas las tetraspaninas están implicadas en funciones como la adhesión, migración, fusión, proliferación y diferenciación celular y en la transducción de señales (Andre et al., 2006; Arduise et al., 2008; Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2003; Hemler, 2005; Lafleur et al., 2009; Levy and Shoham, 2005; Maecker et al., 1997; Wakabayashi et al., 2009; Yan et al., 2002; Yanez-Mo et

al., 2008; Yanez-Mo et al., 2001).

Teniendo en cuenta la estequiometría y la fortaleza de las interacciones entre tetraspaninas y proteínas asociadas (determinada por su capacidad de permanecer intactas al lisar las células en presencia de diferentes detergentes), las interacciones se pueden dividir en tres niveles (**figura 3**). El primer nivel son las interacciones directas y específicas, resistentes a detergentes fuertes como digitonina o Tritón-X100, que ocurren entre tetraspaninas y determinadas proteínas asociadas denominadas “*tetraspanin partners*”, o compañeros de tetraspaninas. Este tipo de interacciones son fuertes y tienen una elevada estequiometría. En un segundo nivel tenemos las interacciones entre las diferentes tetraspaninas, cada una de las cuales a su vez interaccionando con sus proteínas asociadas. Estas interacciones son más numerosas pero también más débiles, ya que solo se mantienen con detergentes como Brij 97 suplementado con cationes divalentes para mantener las interacciones entre tetraspaninas. El tercer nivel está representado por las interacciones indirectas de las proteínas asociadas con otras tetraspaninas y otras proteínas. Estas interacciones son muy débiles y sólo se mantienen si la célula es lisada en presencia de detergentes suaves como el Brij 99 o CHAPS (Hemler, 2003; Hemler, 2005).

Los diferentes abordajes que se han realizado por microscopía confocal han permitido analizar la dinámica de CD9 y de la red de tetraspaninas en la superficie celular. La mayoría de las moléculas de CD9 presenta un movimiento Browniano (aleatorio) y hay evidencias de interacciones entre tetraspaninas fuera de los TEMs, ya que las interacciones entre tetraspaninas ocurren continuamente de forma transitoria. La hipótesis es que CD9 difunde por la membrana junto a un pequeño grupo de moléculas asociadas, incluyendo otras tetraspaninas, y que puede haber intercambio de moléculas entre estos pequeños grupos de diferentes tetraspaninas. Estos grupos pueden pasar a formar parte de zonas enriquecidas en tetraspaninas, en las que las interacciones entre ellas se hacen más numerosas y se forman los TEMs. No se conoce a ciencia cierta porque se forman estos TEMs, pero en la publicación de Barreiro *et al.* proponen que la unión de ICAM-1 (ligando de la integrina leucocitaria $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1)) y VCAM-1 (ligando de la integrina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)) a sus receptores de adhesión durante el proceso de extravasación de leucocitos atrae a las tetraspaninas, formando un microdominio enriquecido en tetraspaninas (Barreiro et al., 2008; Espenel et al., 2008; Gambin et al., 2006).

Los TEMs, formados por tetraspaninas, y los *lipid rafts* o balsas lipídicas, formados por lípidos, son entidades diferentes pero que comparten algunas características comunes, como su riqueza en colesterol y glicoesfingolípidos. En la lisis mediante Brij 97 a 37°C los *lipid rafts* se solubilizan y no así los dominios ricos en tetraspaninas. Los TEMs también son más resistentes a agentes que secuestran colesterol (Claas et al., 2001; Charrin et al., 2003b). Hay varios estudios publicados que remarcan la falta de interacción entre tetraspaninas con caveolina y con proteínas ancladas mediante GPI, marcadores típicos de *lipid rafts* (Claas et al., 1998; Charrin et al., 2003a). Asimismo, análisis por proteómica de las balsas lipídicas no han identificado ninguna tetraspanina en su composición, ni ninguna proteína anclada mediante GPI asociada a CD9 (Andre et al., 2006; Le Naour et al., 2006a; Le Naour et al., 2006b). Las proteínas incluidas en los *lipid rafts* tienen un mayor coeficiente de difusión que las proteínas incluidas en los dominios ricos en tetraspaninas (Barreiro et al., 2008). Todos estos datos apuntan a que ambas estructuras son entidades

componentes de la membrana plasmática diferentes, con proteínas y funciones diferentes.

La tetraspanina CD9.

La tetraspanina CD9 tiene un peso molecular de 24-26 kDa y fue descrita inicialmente como un marcador linfohematopoyético (Boucheix and Benoit, 1988). Su estructura se diferencia de la típica de una tetraspanina en que está N-glicosilada en el dominio SEL, a diferencia de la mayoría de las tetraspaninas que están glicosiladas en el dominio LEL, o en ambos. Además se encuentra acilada (Seehafer et al., 1988) y palmitoilada (Charrin et al., 2002).

Los *partners* de CD9 descritos hasta ahora son EWI-F (Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001b), EWI-2 (Charrin et al., 2003a; Stipp et al., 2001a), EpCAM (Schmidt et al., 2004), Pro-HB-EGF (Iwamoto et al., 1994) y claudina-1 (Kovalenko et al., 2007). Como ya describieron Rubinstein y sus colaboradores (Rubinstein et al., 1996), CD9 se asocia a otras tetraspaninas como CD81 y CD151 (Barreiro et al., 2008; Kovalenko et al., 2004), y también indirectamente a otras proteínas entre las que se encuentran miembros de la familia de las integrinas, moléculas del sistema inmune, factores de crecimiento, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y moléculas señalizadoras (Yanez-Mo et al., 2009).

CD9 fue inicialmente designada *Motility Related Protein 1* (MRP-1 o proteína 1 relacionada con la motilidad), ya que anticuerpos monoclonales específicos para la molécula eran capaces de inhibir la capacidad migratoria y la motilidad de células tumorales (Miyake et al., 1991). La implicación de CD9 en metástasis ya se conoce desde hace tiempo, puesto que la transfección de CD9 en células de melanoma reduce su potencial metastásico y se ha descrito una correlación inversa entre la expresión de CD9 y la aparición de metástasis en melanomas (Si y Hersey, 1993), cáncer de mama (Miyake et al., 1995; Miyake et al., 1996), cáncer de pulmón (Higashiyama et al., 1995a) y colocal carcinoma (Mori et al., 1998). Más recientemente nuestro grupo ha implicado a CD9 en la inhibición de la tumorigénesis en cáncer de colon (Ovalle et al., 2007). CD9 afecta a la avidéz de las integrinas para la adhesión a laminina y fibronectina, componentes de la matriz extracelular. La sobreexpresión de CD9 reduce la capacidad proliferativa de las células de carcinoma, y anticuerpos con efecto agonista sobre CD9 reducen la capacidad tumorigénica de células de carcinoma de colon *in vivo* en ratones desnudos.

En el proceso de diseminación de células de un tumor primario y formación de sus metástasis en otros órganos, la célula tumoral debe primero atravesar el endotelio de los capilares. La tetraspanina CD9 (junto con CD81 y CD151) está expresada en la unión entre la célula tumorigénica y la célula endotelial, implicando a la tetraspanina en este proceso. Anticuerpos específicos para CD9 reducen la trans migración de las células tumorales a través del endotelio, probablemente debido a un aumento en la capacidad de unión entre las células, lo que produce una reducción de su migración (Longo et al., 2001). En relación a lo anterior, CD9 también ha sido implicada (junto a CD151) en el proceso de extravasación de leucocitos. Las tetraspaninas, presentes en la membrana del endotelio en TEMs especializados que los autores llaman *endothelial adhesive platforms* (EAPs o plataformas adhesivas del endotelio), agrupan las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 cuando se unen a sus receptores en la membrana de los leucocitos formando una estructura de amarre (*docking structure*) que otros autores han denominado también copa de

transmigración (*transmigratory cup*) (Carman y Springer, 2004) que facilita la unión del leucocito al endotelio y el proceso de diapédesis (Barreiro et al., 2008). Concretamente, CD9 se asocia preferentemente a ICAM-1 y CD151 a VCAM-1.

CD9 y CD81, pero no CD151, co-inmunoprecipitan proteínas de la familia de las ERM (ezrina-radixina-moesina) (Charrin and Alcover, 2006). Estas proteínas interactúan con actina a través de su dominio C-terminal y con proteínas de membrana a través de su dominio N-terminal. El dominio C-terminal de la tetraspanina CD81 (para CD9 aún no se ha conseguido determinar) co-precipita ezrina y moesina, lo que sugiere una interacción directa (Sala-Valdes et al., 2006). Esta familia de proteínas puede ser el vínculo entre las tetraspaninas y sus efectos sobre el citoesqueleto, como que anticuerpos específicos para CD82 inmovilizados inducen la formación de extensiones de membrana y la reorganización de filamentos de actina en células Jurkat (Lagaudriere-Gesbert et al., 1998). También ha sido propuesto que a través de la regulación del citoesqueleto en células T y NK, las tetraspaninas pueden regular el nivel de estimulación necesario para activar a la célula lo que explicaría las diferencias funcionales (activación e inhibición respectivamente) de las tetraspaninas en ambos tipos celulares (Crotta et al., 2006).

CD9 participa en diversas funciones que requieren fusión celular, como la unión óvulo-espermatozoide. Se ha descrito que los ratones *knock-out* de CD9 producen óvulos que no son capaces de fusionarse con los espermatozoides (Kaji et al., 2000). CD9 se expresa en los *microvilli* del óvulo y en ratones CD9^{-/-} los óvulos no presentan esos *microvilli*, y es un posible mecanismo del efecto en fertilización de CD9. También se propuso que CD9 afectaba a la función de la integrina $\alpha_6\beta_1$ en su unión a fertilina β (ADAM-2) del espermatozoide (Rubinstein et al., 2006), pero se ha descartado esa posibilidad, ya que óvulos que no expresan la integrina son fértiles. Aún no se conoce cuál es el mecanismo exacto por el que CD9 afecta la unión óvulo-espermatozoide (Miller et al., 2000). Otro mecanismo de fusión celular en el que está implicado CD9 es la formación de miotubos multinucleados por fusión de mioblastos independientes. Anticuerpos anti-CD9 y anti-CD81 retrasan la formación de estos tubos en ratón, mientras que la sobreexpresión de CD9 en células de rhabdomyosarcoma incrementa su fusión para la formación de miotubos (Tachibana and Hemler, 1999).

CD9 interactúa con la forma de membrana de los agonistas del receptor de EGF pro-HB-EGF, pro-TGF α y pro-anfiregulina (Higashiyama et al., 1995b; Inui et al., 1997; Nakamura et al., 2000; Shi et al., 2000). La tetraspanina regula la función de estos factores de crecimiento mediante dos posibles mecanismos, aumento de la avidéz del factor y/o protección frente a la proteólisis. En el caso de HB-EGF, se ha descrito la interacción de este factor de crecimiento con ADAM-10 y que su procesamiento proteolítico está regulado por CD9 (Yan et al., 2002).

CD9 y CD82 han sido implicadas en la regulación de la actividad metaloproteínasa de ADAM-10 para el corte de los sustratos EGF y TNF- α (Arduise et al., 2008). La interacción de ADAM-10 con las tetraspaninas ocurre después de que se haya eliminado el prodominio de la enzima, por lo tanto ocurre en un compartimento posterior al aparato de Golgi. Tratamientos con anticuerpos específicos para CD9 y CD82 en células sin estimular resulta en un incremento de la liberación

de TNF- α soluble dependiente de ADAM-10, mientras que al estimular con ésteres de forbol el proceso pasa a ser dependiente de ADAM-17. En células Raji-CD9, anticuerpos específicos para la tetraspanina activan a ADAM-10 en células sin estimular, mientras que tras el tratamiento con ésteres de forbol, los anticuerpos específicos para CD9 inhiben la actividad de ADAM-17 (Arduise et al., 2008).

ADAM-17

Introducción.

La familia de las ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*, desintegrina y metaloproteasa) esta compuesta por enzimas proteolíticas dependientes de zinc. Están muy relacionadas con otras metaloproteasas como las ADAMs con dominio trombospondina (ADAM-TS, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), metaloproteasas de matriz (MMP, *matrix metalloproteinases*) y las metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMP, *snake venom metalloproteinases*). Se han identificado 21 miembros en humanos, pero sólo 13 son activos catalíticamente (Edwards et al., 2008). Las ADAMs sin capacidad proteolítica tienen funciones de comunicación celular gracias a sus funciones adhesivas, mientras que las ADAMs catalíticamente activas participan en el proceso de corte y liberación (*shedding*) de proteínas de membrana a su forma soluble. La familia de las ADAMs está implicada en varias funciones celulares como adhesión, invasión, angiogénesis, metástasis, inflamación, aterosclerosis, espermatogénesis y fertilización (Chang y Werb, 2001; DeClerck, 2000; Moss et al., 2001; Primakoff y Myles, 2000; Schlondorff y Blobel, 1999). La importancia de esta familia es resaltada por el hecho de que se han encontrado ortólogos de ADAM-10 y ADAM-17 en *Schizosaccharomyces pombe* (Nakamura et al., 2004), *Drosophila melanogaster*, y en cordados primitivos como el tunicado *Ciona intestinalis* o el pez *Dario renio* (Huxley-Jones et al., 2007). ADAM-17 fue descrita en 1997 simultáneamente por dos grupos que buscaban la metaloenzima responsable de cortar y liberar TNF- α , de donde procede su primer nombre TACE (*TNF- α converting enzyme*, enzima convertidora de TNF- α) (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Fue el primer miembro de la familia ADAM al que se le reportó actividad catalítica, pues los anteriores no tenían dominio catalítico activo y solo participaban en adhesión celular. La expresión de ADAM-17/TACE es prácticamente ubicua, aunque su expresión varía durante el desarrollo embrionario y la edad adulta (Black et al., 1997).

Estructura.

El gen de ADAM-17/TACE está codificado en región 2p25 del cromosoma 2 humano. Es una proteína multidominio que atraviesa la membrana plasmática una vez (**figura 4**). Tiene un péptido señal (aminoácidos 1 al 17), seguido de un prodominio (aminoácidos 18 al 214), un dominio metaloproteasa o catalítico (aminoácidos 215 al 473), con el motivo de unión a zinc (HEXXHXXGXXH) con tres histidinas para coordinar el átomo metálico, seguido de un dominio desintegrina (aminoácidos 474 al 572), un dominio rico en cisteínas (aminoácidos 603 al 671), un dominio transmembrana (aminoácidos 672 al 694) y una cola citoplasmática (aminoácidos 695 al 824). El miembro con más homología de secuencia con TACE es ADAM-10, o Kuzbanian por su ortólogo (*Kuz*) en *Drosophila*, con un 30% de homología. ADAM-17 es una glicoproteína que contiene seis sitios putativos de N-glicosilación, tres de ellos localizados en el dominio



Figura 4: Estructura de ADAM-17/TACE. Se muestran los dominios de la enzima. Los números indican la posición de los aminoácidos. Dom. Rico en Cis: Dominio rico en cisteínas. TM: Dominio transmembrana

catalítico, dos en el dominio desintegrina y otro en el dominio rico en cisteínas (Clarke et al., 1998). Inicialmente se describió que el prodominio contiene un residuo de cisteína que actúa como un inhibidor de su actividad proteasa gracias a que se coordina con el zinc del sitio activo de forma que impide su actividad enzimática antes de su maduración (Milla et al., 1999). Sin embargo, se ha demostrado que prodominios mutantes para esa cisteína son capaces de inhibir la actividad metaloproteasa igualmente (Gonzales et al., 2004; Leonard et al., 2005). Recientemente la secuencia autoinhibidora ha sido descrita en la Phe72 y el motivo Asp-Asp-Val-Ile137 (Gonzales et al., 2008). Las convertasas de proproteínas del tipo furina liberan el prodominio en el aparato de Golgi, gracias al sitio de corte de estas enzimas localizado entre el prodominio y el dominio catalítico. Aunque la eliminación del prodominio no es necesaria para su transporte a la membrana plasmática (Peiretti et al., 2003), la mayor parte de la enzima presente en la membrana plasmática es activa (Schlondorff et al., 2000). Del dominio desintegrina (llamado así por su similitud con las desintegrinas de los venenos de serpiente) no se conoce bien su función, aunque parece estar implicado en adhesión celular, ya que contiene el motivo RGD y otras secuencias análogas que son reconocidas por las integrinas en sus sustratos, y de hecho ADAM-17 interacciona con estas moléculas de adhesión (Bax et al., 2004; Schlondorff and Blobel, 1999). El dominio rico en cisteínas parece estar implicado en el reconocimiento del sustrato y en la maduración de la proteína (Milla et al., 1999; Reddy et al., 2000). La cola citoplasmática de ADAM-17 presenta potenciales sitios de unión con dominios de homología Src de tipo 3 (SH3), un potencial sitio de fosforilación en tirosina, (Moss et al., 1997) además de un sitio de fosforilación por MAPK (Diaz-Rodriguez et al., 2002).

Sustratos.

El número de proteínas que son susceptibles de ser procesadas por ADAM-17 ha estado creciendo en los últimos años, y es muy probable que seguirá haciéndolo (**tabla II**). Para la obtención del degradoma de ADAM-17 se han llevado a cabo estudios con células derivadas de ratones genéticamente deficientes para la actividad de ADAM-17 (fibroblastos TACE Δ Zn/ Δ Zn) y estudios *in vitro* con proteínas recombinantes y péptidos modelo para ver si son procesados por ADAM-17. Como se muestra en la **tabla II**, los sitios de corte de ADAM-17 en los diferentes sustratos no presentan ninguna característica común, pero teniendo en cuenta que solo el 2-3% de las proteínas de membrana sufren procesos de corte y liberación (Arribas et al., 1996), tiene que haber algún método para el reconocimiento del sustrato. Aparentemente, ADAM-17 debe estar anclada a la membrana plasmática para realizar correctamente su función (Reddy et al., 2000), y sustrato y enzima deben estar en la misma célula (Itai et al., 2001). Mutagénesis dirigida a los residuos que rodean el sitio de corte de diferentes sustratos, incluyendo los aminoácidos

que forman el enlace peptídico del punto de corte, no han protegido al sustrato de ser procesado, indicando que no hay una secuencia específica de corte (Brakebusch et al., 1994; Mullberg et al., 2000). Algunos autores han propuesto la región yuxtamembrana como la zona esencial que confiere susceptibilidad al procesamiento por ADAM-17. La construcción de proteínas quiméricas para esta región de los sustratos de ADAM-17/TACE induce el corte y liberación constitutivo de las proteínas de fusión, cuando normalmente no lo sufren (Althoff et al., 2000; Arribas et al., 1997). El análisis mediante mutagénesis dirigida de esta región, sugiere que más que una selección por secuencia es una selección por estructura secundaria (Hinkle et al., 2004). Otros dominios de ADAM-17 pueden estar implicados en el reconocimiento del sustrato, como el caso del dominio rico en cisteínas, que es esencial para el corte del receptor de la interleuquina 1 de tipo II (IL-1R-II), aunque no lo es para el corte de TNF- α o el receptor de TNF- α p75 TNFR (Reddy et al., 2000). Se necesitan más datos para poder establecer de forma más definida cómo se lleva a cabo el reconocimiento de sus sustratos por parte de ADAM-17.

Regulación.

A pesar de la importancia biológica de ADAM17/TACE, el mecanismo de regulación de su actividad metaloproteínasa permanece desconocido. En la mayoría de los estudios realizados para describir el mecanismo de activación de ADAM-17 se ha utilizado PMA, un éster de forbol que actúa como un activador muy potente y no fisiológico de esta metaloproteínasa a través de la activación de PKC (*protein kinase C*, proteína quinasa C). Pero también hay una actividad constitutiva de corte, sin que sea necesario activar a la enzima, y que puede estar mediada por otras ADAMs. De hecho para algunas proteínas, como fractalquina, el corte constitutivo está mediado por ADAM-10, mientras que al estimular las células con PMA el corte está mediado por ADAM-17 (Ludwig et al., 2005). La implicación de una enzima en el corte constitutivo y otra en el corte estimulado también ha sido recientemente descrita para TNF- α y EGF en células linfoides y está regulado por tetraspaninas (Arduise et al., 2008).

Sobre la regulación de ADAM-17 en el contexto celular, ha sido descrita la activación de ADAM-17 por factores de crecimiento, como el ejemplo del aumento de producción de TNF- α y TGF- α tras el tratamiento con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) (Fan and Derynck, 1999). Los autores también implican a Erk (*extracellular signal-regulated kinase*, quinasa activada por señal extracelular), perteneciente a las MAPK, en el corte y liberación estimulado por factores de crecimiento o por PMA. Estos estudios han sido posteriormente confirmados porque Erk actúa como el intermediario en el corte estimulado por PMA del receptor Trk2 (Diaz-Rodriguez et al., 2002). La fosforilación de TACE en su cola citoplasmática ha sido demostrada para la treonina735 y un residuo de serina. Otro estudio, sin embargo, ha descrito la actividad de ADAM-17 estimulada por PMA sin la implicación de Erk, eliminando a esta quinasa como un factor indispensable en la activación de la metaloproteasa (Montero et al., 2002). Así mismo, una construcción truncada de ADAM-17 que no presenta la cola citoplasmática es activada por PMA de igual forma, eliminando la fosforilación de la región intracelular como un mecanismo indispensable de regulación (Reddy et al., 2000).

El control del tráfico intracelular y el transporte a la membrana plasmática de ADAM-17

SUSTRATO	SITIO DE CORTE	REFERENCIA
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN		
L-selectina	QKLDK↓SFSMI	(Mezyk et al., 2003)
Colágeno XVII	No establecido	(Franzke et al., 2002)
VCAM-1	No establecido	(Garton et al., 2003)
ALCAM	No establecido	(Bech-Serra et al., 2006)
ICAM-1	No establecido	(Tsakadze et al., 2006)
CD44	No establecido	(Nagano and Saya, 2004)
CITOQUINAS		
ProTNF- α	SPLAQA↓VRSSSR	(Mezyk et al., 2003)
Fractalquina	Secuencia yuxtamembrana	(Garton et al., 2001)
TRANCE	IVGPQR↓FSGAPA	(Lum et al., 1999; Mohan et al., 2002)
LIGANDOS DE LA FAMILIA DEL EGF		
ProTGF- α	HADLLA↓VVAASQ	(Althoff et al., 2001; Sahin et al., 2004)
ProNRG α -2C	No establecido	(Montero et al., 2000)
proHB-EGF	CHGLTP↓VENPLYTYDH	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
proAmfíregulina	CGEK↓SMSTHEDDKLSK	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
Betacelulina	CERVDFY↓LQQDRGQ	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
Epiregulina	CEHFFL↓TVHQPLSKEY	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
RECEPTORES		
p 75 TNF- α RII	APGAV↓HLPQP	(Mezyk et al., 2003)
p 55 TNF- α R	PQIEN↓VKGTE	(Mezyk et al., 2003)
CD30	Dominios ricos en cisteína 2 y 5	(Hansen et al., 2000; Hansen et al., 2004)
IL-6R α	TSLPVQ↓DSSSVP	(Mullberg et al., 1994)
IL-1R II	No establecido	(Reddy et al., 2000)
GHR	MSP↓FTCEEDFR	(Wang et al., 2002)
Human Epidermal Growth Receptor-4	No establecido	(Mohan et al., 2002)
Notch	PYKIEA↓VKSEPV	(Mohan et al., 2002)
CD40	No establecido	(Contin et al., 2003)
P75 ^{NTR}	MGSSQP↓VVTRGT	(Weskamp et al., 2004)
IL-15R α	No establecido	(Budagian et al., 2004)
Receptor híbrido SorLA	No establecido	(Guo et al., 2002)
Receptor de LDL (low density lipoproteins)	No establecido	(Guo et al., 2002)
Receptor AXL Tirosina kinasa	No establecido	(Guo et al., 2002)
GPIIb α (glioproteína Iba)	No establecido	(Bergmeier et al., 2004)
OTROS		
MUC-1 (Mucina-1)	QYKTEA↓ASRYNL	(Thathiah et al., 2003; Thathiah et al., 2004)
β -APP	VHHQK↓LVFFA	(Mezyk et al., 2003)
Proteína celular priónica	No establecido	(Vincent et al., 2001)
GP del virus del ébola	VDKTLPD↓QGDNDNWW	(Dolnik et al., 2004)

Tabla II: Sustratos y sitio de corte (↓) de ADAM-17.

también es una posible vía de regulación. Tinciones mediante inmunofluorescencia han revelado que mientras una parte de ADAM-17 madura se expresa en la membrana, la mayoría está en la región perinuclear. Tratamientos de 30 minutos con PMA no cambian la distribución de ADAM-17 de manera significativa (Schlondorff et al., 2000), aunque ha sido demostrado que tratamientos más largos con PMA producen una disminución de la expresión de ADAM-17 en membrana, debido a internalización y degradación de la misma, pero este proceso es más lento que el aumento en la liberación del sustrato (Doedens and Black, 2000). La eliminación del prodominio también es una condición para la actividad de ADAM-17. De hecho mutantes o células deficientes en furinas presentan una reducción del corte y liberación de los sustratos, tal y como era de esperar (Peiretti et al., 2003).

Debido a su implicación en la activación de diferentes proteínas de membrana y su relevancia en diferentes patologías (como se discutirá más adelante), la búsqueda de inhibidores de ADAM-17 es objeto de intensa investigación. TIMP-3 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 3*, inhibidor de metaloproteasas de tejido 3) es el único inhibidor fisiológico de ADAM-17 que se conoce (Amour et

al., 1998). Hay cuatro miembros de esta familia, todos ellos inhiben a la familia de las MMP, pero solo dos, TIMP-1 y TIMP-3 inhiben a miembros de la familia de las ADAM. ADAM-10, el miembro más homólogo a ADAM-17, es inhibido tanto por TIMP-1 como por TIMP-3, lo que es muy útil para diferenciar entre el corte mediado por MMPs, ADAM-10 o ADAM-17. Se han desarrollado tres generaciones de fármacos para inhibir a estas metaloproteasas. La primera falló porque tenía efectos secundarios graves como toxicidad en el músculo esquelético, entre otras razones. La segunda generación también fracasó por sus efectos secundarios y no llegó al mercado. La tercera generación de fármacos, de mayor vida media, menor masa, muy específicos y que se pueden tomar por vía oral están siendo probados ahora, pero aún tienen que demostrar su eficacia y seguridad (Murumkar et al., 2010).

Funciones.

- Desarrollo:

Los ratones *knock-out* para ADAM-17/TACE no son viables y mueren antes de nacer con anomalías graves en su piel (Peschon et al., 1998). El siguiente abordaje para conocer el papel de ADAM-17 en el desarrollo fue la generación de ratones transgénicos con el dominio catalítico de ADAM-17 inactivo (ADAM-17^{ΔZn/ΔZn}). Las crías morían en fechas próximas al nacimiento, debido a fallos en el desarrollo de la placenta y del pulmón. Estos ratones han permitido investigar el papel de ADAM-17 en el desarrollo de pulmón (Zhao et al., 2001) y desarrollo cardíaco (Shi et al., 2003). Estos defectos de los ratones *knock-out* son similares a los defectos encontrados en los ratones *knock-out* para EGFR (*epidermal growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento epitelial), TGF- α , HB-EGF y anfiregulina, todos ellos sustratos de ADAM-17 (Blobel, 2005). Por otro lado, ADAM-17 también está implicada en desarrollo de células T y B (Li et al., 2007).

- Inflamación:

ADAM-17 fue inicialmente descrita como la enzima responsable de cortar TNF- α , así que su implicación en inflamación era previsible. La actividad de ADAM-17 está aumentada en pacientes de artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades que cursan con niveles altos de TNF- α soluble (Ohta et al., 2001; Papadakis y Targan, 2000). También se ha descrito un aumento de la actividad de ADAM-17 en cartílago y condrocitos de pacientes con osteoartritis (Amin, 1999; Patel et al., 1998). En las fases activas de la enfermedad de Crohn se ha descrito un aumento de ADAM-17 en la superficie de células epiteliales (Cesaro et al., 2009). En psoriasis está aumentada la expresión de la metaloproteasa en capilares y queratinocitos, entre otros tipos celulares (Kawaguchi et al., 2005). Pero la implicación de ADAM-17 en inflamación va más allá de su efecto sobre TNF- α . Ha sido descrito que L-selectina es sustrato de ADAM-17 en macrófagos, lo que reduce su extravasación porque la metaloproteasa corta esta molécula (Wang et al., 2009). VCAM-1, implicado en la adhesión de leucocitos al endotelio activado en focos de inflamación, también es sustrato de ADAM-17, así como ICAM-1, otra molécula de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas implicada en trans migración de leucocitos a focos de inflamación (Garton et al., 2003; Tsakadze et al., 2006). ALCAM, que participa en la extravasación de monocitos a través de la barrera hematoencefálica (Cayrol et al., 2008), también es sustrato de TACE (Bech-Serra et al., 2006; Rosso et al., 2007). Todos estos datos indican que ADAM-17 está implicada en inflamación,

no solo por su efecto en la liberación de TNF- α soluble, sino también porque procesa muchos sustratos implicados en la extravasación de células leucocitarias a los focos de inflamación.

- Patologías del Sistema Nervioso Central:

ADAM-17 junto con ADAM-10 actúan como las α -secretasas que cortan el precursor amiloide y liberan un fragmento soluble no patogénico (Allinson et al., 2003). Sin embargo si el precursor es cortado por una actividad β -secretasa se libera el péptido amilogénico que genera las placas amiloides características de la enfermedad de Alzheimer (Sastre et al., 2008). Para poner freno a esta terrible enfermedad se están buscando y testando reguladores de ADAM-17 (y ADAM-10) para aumentar su actividad y/o inhibir la actividad de las β -secretasas (Bandyopadhyay et al., 2007; Tachida et al., 2008). En pacientes de esclerosis múltiple, la expresión de ADAM-17 se encuentra incrementada en células mononucleares de sangre periférica (Seifert et al., 2002), y en linfocitos T que han invadido el sistema nervioso central (Kieseier et al., 2003).

- Cáncer:

ADAM-17 está implicada en cáncer debido a que tiene varios factores de crecimiento en su repertorio de sustratos, además de estar implicada en inflamación, característica de varios tipos de tumores. El aumento de la producción de EGF soluble promueve el desarrollo de un fenotipo tumoral (Katakowski et al., 2009) y la sobreexpresión de ADAM-17, y otras ADAMs, por parte del tumor se considera un marcador de mal pronóstico (consultar la revisión Duffy et al., 2009)). En cáncer de mama, el papel de esta metaloproteasa está muy estudiado. La expresión de ADAM-17 está aumentada, y se relaciona con mayor expresión de TGF- α (Borrell-Pages et al., 2003) y con la metástasis (McGowan et al., 2007). La nectina-4 es un marcador de cáncer de mama que es sustrato de TACE, y se detecta en su forma soluble en pacientes con cáncer de mama en los que se ha producido metástasis (Fabre-Lafay et al., 2005). Células de cáncer de mama transfectadas con ARNpi específico para ADAM-17, reduciendo así su expresión en membrana, revierten su fenotipo maligno a fenotipo normal, lo que definitivamente implica a esta molécula en esta patología (Kenny and Bissell, 2007).

En otros tipos de tumores, como cáncer de ovario, se ha encontrado aumentada la expresión de HB-EGF y ADAM-17 (Tanaka et al., 2005). En carcinoma de células escamosas del esófago ADAM-17 está implicada en migración tumoral debido a la activación de NF κ B a través de TNF- α soluble (Takamune et al., 2008). El silenciamiento de ADAM-17 en células de carcinoma hepático en ratones desnudos resulta en un descenso de la tumorigénesis, invasión y angiogénesis, implicando definitivamente a esta metaloproteasa en el desarrollo tumoral (Tsai et al., 2009). La expresión de ADAM-17 esta incrementada en cáncer de piel, especialmente en las células invasivas (Oh et al., 2009), así como en las muestras de cáncer de próstata analizadas (Karan et al., 2003). La sobreexpresión de ADAM-17 en astrocitos de corteza cerebral induce el fenotipo no adherente e invasivo, con aumento de la capacidad de proliferación y producción de factores pro-angiogénicos (Katakowski et al., 2009). Por todos estos motivos ADAM-17 es una diana farmacológica muy prometedora para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, y se deben buscar inhibidores selectivos de esta metaloproteasa con menos efectos secundarios.

ALCAM

Introducción.

ALCAM/CD166 (*activated leukocyte cell adhesion molecule*), o molécula de adhesión de leucocitos activados, es una molécula de adhesión perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Fue inicialmente descrita como ligando de CD6, miembro de la superfamilia de proteínas de receptores de tipo basurero ricos en cisteínas (*“Scavenger receptor cysteine-rich protein superfamily”*) (Resnick et al., 1994), que presenta tres dominios de tipo basurero, un espaciador de treinta y tres aminoácidos, una región transmembrana y una cola citoplasmática de cuarenta y cuatro aminoácidos con dos residuos de serina susceptibles de fosforilación (Aruffo et al., 1991). Células epiteliales de timo y de cáncer de mama eran capaces de unir una proteína recombinante de CD6 (CD6-Rg). Probando una batería de anticuerpos procedente del HLDA-V (*5th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens*, quinto congreso internacional en antígenos de diferenciación en leucocitos humanos), observaron que uno de ellos bloqueaba esa unión de CD6-Rg a la superficie de las células. Usando este anticuerpo y la proteína recombinante lograron inmunoprecipitar una proteína de 100 kDa que llamaron CD6L-100 (Patel et al., 1995). A continuación se centraron en identificar y caracterizar la proteína CD6L-100, purificando la proteína mediante una columna de afinidad con el anticuerpo del HLDA-V partiendo de lisados totales de células de cáncer de mama. Describieron una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas, con cinco dominios inmunoglobulina. El peso molecular esperado por la secuencia de aminoácidos es de unos 65kDa, pero es glicosilada hasta los 100-105kDa. Mediante *Northern Blot* observaron que se expresa en leucocitos activados y no en leucocitos sin activar, y por este motivo la llamaron molécula de adhesión de linfocitos activados o ALCAM (Bowen et al., 1995). ALCAM también ha sido conocida con otros nombres como HCA (*hematopoietic cell antigen*, antígeno de células hematopoyéticas) implicado en desarrollo hematopoyético (Uchida et al., 1997) y MEMD, descrita como marcador de capacidad metastásica en melanomas e implicada en las interacciones célula-célula, que ya se describe como idéntica a ALCAM (Degen et al., 1998).

Previamente ya habían sido descritas proteínas ortólogas de ALCAM en otras especies. En pollo se describió a la vez con dos nombres diferentes, DM-GRASP y SC1. Está implicada en crecimiento y orientación de axones y se expresa desde las primeras fases del desarrollo (Burns et al., 1991; Tanaka et al., 1991). Un año más tarde se describió BEN, también en pollo, y fue implicada en axonogénesis (Pourquie et al., 1992b) y en diferenciación de células hematopoyéticas, como marcador específico de estado de diferenciación (Corbel et al., 1992). Posteriormente se demostró que estas tres moléculas eran la misma (Pourquie et al., 1992a). En peces también fue descrita una molécula implicada en desarrollo de axones, llamada Neurolina, con muchas similitudes con DM-GRASP (Laessing et al., 1994; Paschke et al., 1992). En rata fue descrita por primera vez en 1992, destacando ya sus similitudes con DM-GRASP/BEN/SC1 y su implicación en desarrollo cerebral (Prince et al., 1992) e interviniendo en el mantenimiento de la estructura del cerebro adulto en rata (Peduzzi et al., 1994). Así mismo, también ha sido descrito un ortólogo de ALCAM en ratón bajo el nombre de MuSC, por su similitud con SC1, y también está implicado en desarrollo y guía de axones (Sekine-Aizawa et al., 1998). La estructura de ALCAM está muy conservada en vertebrados superiores (de hecho hay reactividad cruzada de unión

Interacciones.

Como ya se ha mencionado antes, ALCAM fue descrito inicialmente como ligando de CD6, y posteriormente también se describió la interacción homofílica ALCAM-ALCAM. La interacción heterofílica tiene un afinidad dos órdenes de magnitud superior y una tasa de disociación más lenta ($K_D = 0.4-1.0 \mu\text{M}$ y una $k_{\text{off}} \geq 0.4-0.63 \text{ s}^{-1}$) que la interacción homofílica ($K_D = 29-48 \mu\text{M}$; $k_{\text{off}} \geq 5.3 \text{ s}^{-1}$) (Bowen et al., 1995; Hassan et al., 2004). Para conocer los dominios implicados en la interacción heterofílica, se desarrollaron construcciones truncadas de los diferentes dominios de CD6 y se cuantificó su capacidad de unión a ALCAM recombinante (ALCAM-Rg). Esta interacción está mediada por el tercer dominio tipo basurero (“*scavenger*”) de CD6, el más cercano a la membrana plasmática, puesto que únicamente las construcciones con este dominio son capaces de interactuar con ALCAM-Rg. La región espaciadora entre el tercer dominio y la región transmembrana de CD6 también juega un papel importante en la unión de ALCAM, puesto que la construcción recombinante que contiene el tercer dominio de CD6 y la región espaciadora, interactúa con ALCAM-Rg en mayor medida que la construcción de CD6 que únicamente contiene el tercer dominio (Whitney et al., 1995). La interacción de ALCAM con CD6 tiene una estequiometría de una molécula de CD6 por una de ALCAM. Por parte de ALCAM, el dominio responsable de la unión heterofílica está en el dominio inmunoglobulina 1 de tipo V (Bowen et al., 1996; Skonier et al., 1996a; Skonier et al., 1996b).

La interacción homofílica de ALCAM fue observada también en su descripción original, pero fue poco estudiada inicialmente. En uno de los primeros estudios (Nelissen et al., 2000) se observó que la citocalasina D, que actúa como inhibidor de la polimerización de microfilamentos de actina, y no otras drogas que actúan sobre filamentos intermedios o microtúbulos, aumentaba la adhesión celular sobre ALCAM-Fc inmovilizado. Por ello, el citoesqueleto de actina y no los filamentos intermedios ni los microtúbulos, está implicado en la regulación de la interacción homofílica, por aumento del agrupamiento de las moléculas de ALCAM. Un mutante de ALCAM que no presenta región transmembrana ni cola citoplasmática, y por ello no puede estar asociado al citoesqueleto, pero anclado a la membrana mediante un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI-ALCAM), no ve modificada su capacidad de adhesión por el tratamiento con citocalasina D, lo que reafirma la hipótesis de la asociación de ALCAM con el citoesqueleto. En estudios posteriores del mismo grupo realizados con anticuerpos, observaron que un anticuerpo específico para el dominio 1 activa la interacción homofílica, y otro específico para los dominios 4 o 5 la inhibe. De esta forma generaron formas truncadas de ALCAM, pudieron observar que la eliminación del dominio 1 de la molécula reducía la capacidad de agregación celular, la unión de ALCAM-Fc soluble y la adhesión a ALCAM-Fc inmovilizado a niveles basales concluyendo que el dominio 1 (tipo V) es esencial para las interacciones homofílicas. Asimismo los dominios 3, 4 y 5 (tipo C2) están implicados en el agrupamiento de moléculas para aumentar la avidéz, ya que al transfectar formas truncadas de ALCAM que solo expresan los dominios 3 al 5, no se afecta la capacidad de unión de ALCAM-Fc soluble (medida de afinidad), pero si la capacidad de agregación (medida de avidéz). Conviene aclarar que estas formas truncadas se pueden agregar pero sin participar en la interacción directa con ALCAM porque carecen del dominio 1 de unión, y por ello reducen la avidéz de la molécula de adhesión. La interacción homofílica de ALCAM está regulada tanto por afinidad (dominio 1) como por avidéz (dominios 3, 4 y 5) como ya apuntaban los resultados con

citocalasina D (van Kempen et al., 2001). La interacción entre ALCAM y β -actina fue hallada más tarde, y demostraron que la citocalasina D solo modifica la avidéz de ALCAM y no su afinidad (Te Riet et al., 2007). Se ha descrito una colocalización entre ALCAM y α -catenina. Esta molécula está implicada en la localización de ALCAM en la membrana, por lo que el anclaje de ALCAM al citoesqueleto podría estar mediado por esta proteína, aunque aún quedan muchas cuestiones pendientes (Tomita et al., 2000). La interacción homofílica (y también la heterofílica) de ALCAM no está regulada por GTPasas de la familia de Rho, como cabría pensar por su relación con el citoesqueleto sino que es dependiente de PKC α , que regula la avidéz de la molécula mediante un mecanismo independiente de la fosforilación de la cola citoplasmática de ALCAM (Zimmerman et al., 2004).

Funciones.

- Presentación de antígeno:

En la sinapsis inmunológica, el complejo TCR/CD3 del linfocito T se une a la molécula MHC con el péptido antigénico de clase II de la célula presentadora de antígeno. Esta interacción necesita señales coestimuladoras de otras moléculas para que sea lo suficientemente estable como para que active al linfocito. En este sentido, CD6 está implicado en maduración de linfocitos, como señal coestimuladora (Gangemi et al., 1989; Osorio et al., 1998). El grupo de Francisco Lozano ya describió que CD6 colocaliza e interacciona con el TCR/CD3 en la parte central del SMAC en la sinapsis inmunológica y ALCAM/CD166 en la célula presentadora de antígeno también colocaliza con TCR/CD3 en la parte central del SMAC. Funcionalmente, una proteína soluble recombinante de CD6 (CD6-Rg) inhibe la maduración de la sinapsis inmunológica y la proliferación de los linfocitos T. Todos estos resultados apuntan a que la interacción heterofílica entre CD6 y ALCAM está implicada en presentación de antígeno y activación del linfocito T, funcionando como señal coestimuladora, que estabiliza la sinapsis inmunológica, dando tiempo a la activación del linfocito T. El modelo de interacción entre el dominio 3 de CD6 y el dominio 1 de ALCAM es compatible con la implicación de la interacción heterofílica en la sinapsis inmunológica porque la distancia de la interacción entre el TCR/CD3 y la molécula de MHC de clase II es similar a la distancia de la interacción heterofílica, por lo que no habría impedimento estérico (Gimferrer et al., 2004; Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006).

- Desarrollo y diferenciación:

La implicación de ALCAM en desarrollo como marcador específico de estadio de diferenciación está muy estudiada para sus ortólogos en otras especies, como se ha comentado anteriormente, sin embargo, en humanos no hay muchos datos. ALCAM está implicada en desarrollo hematopoyético, ya que es expresada por una subpoblación de células precursoras de la médula ósea CD34⁺ y las células estromales colindantes (Uchida et al., 1997). La expresión de ALCAM es inhibida en precursores eritromegacariocíticos, y esa desaparición es necesaria para una correcta diferenciación a megacariocitos (Tan et al., 2010). También ha sido implicada en desarrollo endotelial, enviando señales de supervivencia y proliferación a los precursores endoteliales (Ohneda et al., 2001). En los últimos años ALCAM está siendo muy estudiada como marcador de células pluripotenciales mesenquimales. La primera vez que fue descrito fue en

1998 (Bruder et al., 1998) como marcador en osteogénesis a partir de células mesenquimales pluripotenciales. Más tarde ha sido seleccionado como marcador de células pluripotenciales en poblaciones de células mesenquimales (Alsalameh et al., 2004; Arai et al., 2002; Buhning et al., 2009; in 't Anker et al., 2003; Kilic et al., 2007; Lee et al., 2004; Oswald et al., 2004; Pretzel et al., 2011; Sammons et al., 2004; Seshi et al., 2000; Stewart et al., 2003; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2004). Los orígenes de estas células pluripotenciales mesenquimales incluyen cordón umbilical, placenta, médula ósea, cartílago y varios tejidos fetales. La batería de marcadores de células pluripotenciales mesenquimales además de ALCAM suelen incluir como marcadores CD29, CD44 y CD105, mientras que no expresan CD34 ni CD45. Con las condiciones de cultivo adecuadas, estas células pueden diferenciarse a células hematopoyéticas, endoteliales, adipocitos, osteocitos o condrocitos.

- Transmigración:

ALCAM ha sido implicado en la transmigración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica (Cayrol et al., 2008). En este trabajo demuestran que ALCAM es expresado por las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y que su expresión aumenta con el tratamiento de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α o el IFN- γ , así como en muestras de cerebro de pacientes con esclerosis múltiple y en un modelo animal de encefalomiелitis autoinmune. El tratamiento con anticuerpos específicos para ALCAM reduce la capacidad transmigratoria de linfocitos T CD4⁺, linfocitos B CD19⁺ y monocitos CD14⁺, pero no de los linfocitos T CD8⁺ a través de la barrera hematoencefálica. El bloqueo de la adhesión mediada por ALCAM mediante proteína recombinante soluble, inhibe en un 30% la transmigración de linfocitos T CD4⁺. El resto de la transmigración es en parte dependiente de ICAM-1, ya que anticuerpos específicos para esta molécula reducen en un 30% la transmigración de linfocitos T CD4⁺. Si se añaden anticuerpos específicos para ambas moléculas simultáneamente, la transmigración se reduce en un 60%. Por todo ello se puede decir que ALCAM es clave para la transmigración de leucocitos CD4⁺, CD19⁺ o CD14⁺ a través de la barrera hematoencefálica. También se ha asociado el abuso de cocaína con un aumento de ALCAM en la barrera hematoencefálica, lo que produce un aumento de la adhesión y transmigración de monocitos al sistema nervioso central, implicando a esta molécula con neuropatías asociadas al abuso de drogas (Yao et al., 2011). Otro estudio anterior también implica a ALCAM en la transmigración y no en la adhesión de monocitos, puesto que tanto un anticuerpo que inhibe las interacciones de ALCAM como la proteína recombinante ALCAM-Fc (que ya está descrito que inhibe la adhesión mediada por ALCAM (Arai et al., 2002)) bloquean la transmigración de monocitos a través del endotelio. Asimismo, en este trabajo se describe que ALCAM se expresa en las uniones intercelulares del endotelio en su parte basolateral, lo que apoya su papel en diapédesis (Masedunskas et al., 2006).

- Cáncer y metástasis:

Los primeros estudios que implicaban a ALCAM en cáncer fueron realizados en melanoma, aunque ahora ya se conoce su implicación en otros muchos tipos de tumores. Se observó que ALCAM formaba parte de las uniones intercelulares y que por ello estaba implicada en agregación de células tumorales. Esta molécula de adhesión se expresa en varias líneas celulares de melanoma y es un marcador de capacidad metastásica (Degen et al., 1998). Se a implicado a ALCAM en la

progresión e invasión del melanoma (van Kempen et al., 2000), y los autores plantean que ALCAM sea la llave que controla la progresión del tumor a su fase invasiva (van Kempen et al., 2004). Por estos resultados, ALCAM participa activamente en la capacidad invasiva de melanomas, y es un marcador de mal pronóstico de esta patología.

En estudios de la expresión de ALCAM en muestras de tejido humano de cáncer de mama, se observó que bajos niveles de expresión de la molécula se correlacionan con un fenotipo más agresivo y con peor pronóstico (King et al., 2004), así como con una mayor incidencia de metástasis óseas (Davies et al., 2008). Niveles altos de expresión de ALCAM correlacionan con un tamaño reducido del tumor y con la presencia de receptores de progesterona y de estrógeno, todos ellos marcadores de buen pronóstico (Jezierska et al., 2006b). Como se ha mencionado anteriormente, ALCAM es sustrato de ADAM-17 y se ha postulado que la forma soluble de ALCAM es un buen marcador de cáncer de mama, ya que sus niveles están aumentados en pacientes con esta patología (Kulasingham et al., 2009). Pese a algunas excepciones, una baja expresión de ALCAM en tumores de mama está siendo considerada como un marcador de mal pronóstico.

La expresión de ALCAM suele estar aumentada en la mayoría de los tumores de próstata respecto a la expresión en tejido normal, y que junto con CD24, pueden ser usados como marcadores de pronóstico en cáncer de próstata (Kristiansen et al., 2005). Un estudio realizado con 2390 muestras también relaciona una mayor expresión de ALCAM en el tumor con un mejor pronóstico para la supervivencia del paciente (Minner et al., 2011). Podemos concluir que la expresión de ALCAM esta aumentada en este tipo de tumor.

En cáncer de colón, la expresión de ALCAM normalmente está aumentada. Lo que sí que parece significativo es que su expresión en la membrana plasmática de las células del tumor está relacionada con una menor supervivencia del paciente (Weichert et al., 2004).

En carcinoma de células escamosas del esófago la expresión de ALCAM esta aumentada y está asociada a un mal pronóstico para el paciente (Verma et al., 2005). Así mismo, otro estudio ha observado que la presencia de ALCAM, tanto en el tumor como soluble en muestras de sangre, esta aumentada en cáncer de esófago y constituye un mal pronóstico para el paciente (Tachezy et al., 2011).

En cáncer de endometrio ALCAM también está aumentado, siendo mayor su expresión cuanto más avanzado está el tumor (Liang et al., 2011). En tumores de tiroides, ALCAM se encuentra aumentado respecto al tejido normal, y también es cortado por ADAM-17 (Micciche et al., 2011). En un análisis de 109 muestras de carcinoma de ovario, observaron que la ausencia, o una baja expresión, de ALCAM es un marcador de mal pronóstico (Mezzanzanica et al., 2008). De hecho, el corte y liberación de ALCAM por parte de ADAM-17 en células de carcinoma de ovario, induce su motilidad. La inhibición de ADAM-17 aumenta la expresión de ALCAM en la membrana, reduciendo la motilidad celular y por ello la capacidad de invasión del tumor (Rosso et al., 2007). En cáncer de páncreas, sin embargo, el análisis de muestras mediante inmunohistoquímica ha demostrado que un aumento en la expresión de ALCAM es un marcador de reaparición del tumor y baja supervivencia (Kahlert et al., 2009).

Concluyendo, la expresión de ALCAM en los diferentes tumores es muy variada, tanto en el nivel de expresión como en el tipo de estadio en el que se expresa. No se puede decir a ciencia cierta que bajos niveles de ALCAM sea un marcador de buen pronóstico ni lo contrario. Es necesario llevar a cabo más estudios para tratar de elucidar mejor el papel de ALCAM en cáncer.

Presentación de antígeno

Hay muchos tipos de sinapsis inmunológica, tanto entre linfocitos con células presentadoras de antígeno como entre células NK o linfocitos T citotóxicos con sus dianas y presentan diferencias entre sí (Brossard et al., 2005; Tseng et al., 2008). Nosotros nos centraremos en la sinapsis inmunológica entre una CPA y un linfocito T, puesto que es donde está descrito que participa ALCAM. La sinapsis inmunológica entre estas células se produce cuando las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (o de clase I en la sinapsis con linfocitos T CD8⁺) (MHCII, *major histocompatibility complex class I or class II*) cargadas con el antígeno de una CPA se une con el receptor de la célula T (TCR, *T cell receptor*). Esta sinapsis inmunológica fue descrita por primera vez en 1998 (Monks et al., 1998). Los autores describieron la formación de dos anillos concéntricos, llamados *central supramolecular activation cluster* (cSMAC, parte central del agrupamiento supramolecular de activación) y *peripheral supramolecular activation cluster* (pSMAC, parte periférica del SMAC). El TCR, moléculas coestimuladoras como CD4 o CD8, CD2, CD6, CD28 y las moléculas de señalización como la proteína quinasa C θ y Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*, proteína tirosina quinasa específica de leucocitos) están en el cSMAC, mientras que el pSMAC se encuentra la molécula de adhesión LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*, antígeno asociado a la función del leucocito 1) y talina, una molécula de unión al citoesqueleto (Grakoui et al., 1999). Para la formación de la sinapsis, primero se produce una unión entre la integrina LFA-1 del linfocito T con el ICAM-1 expresado en la CPA. A partir de ahí se produce una reorganización del citoesqueleto que permite la unión de las membranas y la relocalización de los receptores para la formación de la sinapsis. La señal enviada a través del TCR debe ir acompañada de otras señales coestimuladoras, como la enviada por CD28, señal coestimuladora típica, o por CD6. (Bromley et al., 2001; Dustin et al., 2010). Estos procesos desencadenan la señalización celular mediante fosforilación de tirosinas y apertura de canales de calcio que activan factores de transcripción como el factor nuclear de células T activas (NFAT, *nuclear factor of activated T cells*) que inicia la transcripción de genes como el CD25 (cadena α del receptor de IL-2 de alta afinidad) o CD69 (de función desconocida) y la activación de la proliferación y producción de IL-2, todos ellos marcadores de activación de linfocitos T (Zimmerman et al., 2006).

Una técnica muy frecuente para estudiar la activación de los linfocitos T es el uso de superantígenos. Algunas toxinas microbianas reciben el nombre de superantígenos porque son capaces de activar a un gran número de linfocitos. Las enterotoxinas estafilocócicas son exotoxinas producidas por la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus* y hay cinco tipos (SEA; SEB; SEC, SED y SEE). Otro superantígeno es la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST). Estos superantígenos son capaces de activar varios clones de linfocitos por dos mecanismos: i) se unen a la región V β del TCR codificada por un solo gen, o una familia de genes, y es independiente de otros genes que dan polimorfismo al receptor como V α , J o D. ii) los superantígenos se unen

al MHC de clase II en un lugar diferente a la hendidura de unión al péptido, sin ser afectado por el poliformismo de la hendidura del péptido de la molécula de MHC de clase II. De esta forma no hay especificidad de reconocimiento, sino que los superantígenos son capaces de activar inespecíficamente diferentes clones de linfocitos.

A decorative graphic consisting of several grey hexagons of varying sizes and orientations, arranged in a cluster around the central text. The hexagons are semi-transparent and overlap each other.

OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis son:

1. Estudiar la interacción entre CD9 y la metaloproteína ADAM-17 en diferentes células leucocitarias y endoteliales.
2. Analizar los efectos reguladores de CD9 sobre la actividad metaloproteasa de ADAM-17 en diferentes tipos celulares.
3. Estudiar la interacción entre CD9 y la molécula de adhesión ALCAM en linfocitos T y B.
4. Investigar el efecto de la presencia de CD9 sobre la adhesión homofílica de ALCAM y los mecanismos implicados.
5. Analizar el efecto de CD9 sobre funciones dependientes de ALCAM como la migración y la activación de linfocitos T.



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares.

La línea endotelial de microvasculatura humana HMEC-1 se cultivó en medio MCDB-131 (Gibco) suplementado con 20% FBS (Gibco), 10 ng/ml rhEGF (Promega) y 1 ug/ml de Hidrocortisona (Sigma) sobre placas recubiertas con 0,5% de gelatina.

Las células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) se obtuvieron y cultivaron como había sido descrito previamente (Jaffe et al., 1973).

Las líneas celulares COS-1, EAhy-926 y CHO establemente transfectada con ALCAM-Fc se cultivaron en medio DMEN (Gibco) suplementado con 10% FBS. La construcción ALCAM-Fc está compuesta por los 5 dominios extracelulares de ALCAM unidos a la región constante de la inmunoglobulina humana IgG2 (Nelissen et al., 2000).

Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Histopaque-1077 (Sigma), eliminando los monocitos por unión a placas de cultivo de plástico durante 1 hora (Gonzalez-Alvaro et al., 2006).

Las líneas celulares de linfocitos T humanos (Jurkat y HUT78), linfocitos B humanos (Raji), la línea monocítica THP-1, melanoma BLM, carcinoma de colon humano Colo320 y la línea eritroleucémica K562 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco) 10% FBS.

Todos los medios citados se suplementaron con 2 mM glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina.

Anticuerpos y reactivos.

Los anticuerpos TS2/16 (Arroyo et al., 1992) y Lia1/2 (Campanero et al., 1992) son un activador y un inhibidor de integrinas β_1 respectivamente. El anticuerpo Lia3/2 es un inhibidor de integrinas β_2 (Sanchez-Martin et al., 2004). Los anticuerpos anti-CD9 usados fueron VJ1/20, VJ1/10 (Yanez-Mo et al., 1998), PAINS-10 y PAINS-13 (obtenidos en nuestro laboratorio (Gutierrez-Lopez et al., 2003)). Todos los anteriores reconocen la primera mitad del LEL de CD9, mientras que el anticuerpo 10B1 reconoce un epítipo en la segunda mitad del LEL de CD9 (proporcionado por el Dr. E. Rubinstein. Université de Paris-Sud. Institut André. Villejuif. Francia). Frente a la tetraspanina CD82 se usó el anticuerpo TS82b, también proporcionado por el Dr. E. Rubinstein. Para la tetraspanina CD151 se usaron el anticuerpo monoclonal Lia1/1 (Yanez-Mo et al., 1998) o el policlonal de conejo H80 (Santa Cruz Biotechnology) para *western-blot*. Para la tetraspanina CD81 se utilizó el anticuerpo 5A6 proporcionado por el Dr. S. Levy (Oncology, Stanford University School of Medicine. Stanford. CA. EE.UU.). Los anticuerpos usados para ADAM-17 fueron: anticuerpos monoclonales 2A10 y 5C2 obtenidos en nuestro laboratorio, los clones 111633 y 111623 de R&D Systems, y los anticuerpos policlonales de conejo H-170 y H-300 de Santa Cruz Biotechnology. PAINS-15 es un anticuerpo monoclonal específico de ALCAM obtenido en nuestro laboratorio. Otros anticuerpos usados fueron anti-CD59 (PAINS-19), anti-HASP8 (PAINS-18), ambos también obtenidos en el laboratorio. Los anticuerpos específicos para ICAM-1 fueron Mem 111 y Hu5/3 (proporcionado por el Dr. F. W. Luscinskas (Brigham and Women's Hospital. Boston. MA. EE.UU.). Anti-CD147 (VJ1/9) (Yanez-Mo et al., 1998), anti-CD6 (MAE1-C10 (Cardenas et al., 1990)), anti-

GST (Amersham Biosciences), anti-TNF- α Infliximab (Remicade[®], Schering Plough). Este último anticuerpo, así como VJ1/20 y PAINS-15, fueron biotinilados como se describe previamente (Luque et al., 1996). Los anticuerpos monoclonales fueron purificados a partir de líquido ascítico mediante columna de proteína A-agarosa (Biovision).

El TNF- α humano recombinante fue comprado a Peprotech Ec. El inhibidor de ADAM-17 TAPI-2 es de Peptides International. La sonda fluorescente BSECF-AM, la BSA, la poli-L-lisina y el éster de forbol PMA son de Sigma.

Purificación de proteínas quiméricas.

Para la purificación de las proteínas ADAM-17-Fc, ICAM-1-Fc y ALCAM-Fc se siguió un protocolo descrito previamente (Bax et al., 2004). El ADNc para la proteína ADAM-17-Fc tenía que ser transfectado transitoriamente en células COS-1 por electroporación a 250 V durante 30 ms en un electroporador ElectroSquarePorator ECM830 (BTX) con 20 μ g de ADNc, de tal forma que se expresase y fuese excretada al medio de cultivo. Las proteínas de fusión ALCAM-Fc e ICAM-1-Fc se expresan establemente en la línea celular CHO (Nelissen et al., 2000; Sanchez-Martin et al., 2004). Para obtener las proteínas se recogió el medio de cultivo de las células transfectadas, hasta llegar a un volumen de unos 500 ml. Se centrifuga el medio a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C para eliminar restos celulares y se precipitan las proteínas del sobrenadante con 31,3 g de sulfato amónico en polvo por cada 100 ml de sobrenadante de partida durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifuga a 12.000 rpm, 20 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. El precipitado que contiene la proteína quimérica, entre otras, se resuspende en 1 ml de Tris 0,1 M pH 7,8 por cada 100ml de sobrenadante de partida, y se dializa frente a Tris 0,1 M pH 7,8, 150 mM NaCl y 0,5 mM PMSF durante toda la noche a 4°C con 3 cambios. A la mañana siguiente se recoge el sobrenadante y se filtra para eliminar todos los agregados. Se prepara una columna con 1,5 ml de proteína-A y se equilibra con fosfato sódico 100 mM, 1 mM EDTA pH 7,8. A continuación se carga el sobrenadante dos veces en la columna, que unirá específicamente el Fc de la proteína, y se lava con buffer de equilibrado, de tal forma que se eliminan todas las impurezas del sobrenadante. A continuación se eluyó con citrato sódico 0,1 M pH 3 y se recogen alícuotas de 900 μ l sobre 350 μ l de Tris pH 9 para neutralizar el pH ácido y no desnaturalizar las proteínas. Se cuantificó la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm y se realizó una electroforesis PAGE-SDS y *western-blot* con anticuerpos específicos para comprobar su integridad.

Citometría de flujo.

En los marcajes simples, las células se lavaron dos veces con PBS y se usaron 2×10^5 células por punto. Se incubaron 30 minutos a 4°C con el anticuerpo primario (10 μ g/ml) en RPMI-1640. Se lavaron dos veces con RPMI-1640 y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con el anticuerpo secundario específico anti-IgG de ratón (Sigma), anti-IgG de conejo (Sigma) o streptavidina (Sigma) en todos los casos acoplado a FITC. Se volvieron a lavar las células dos veces y se fijaron con 2% de formaldehído en PBS durante 5 minutos a 4°C. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur[™] (BD Biosciences), y los datos procesados con el programa FlowJo (Tree Star Inc.).

En los análisis de unión de ALCAM-Fc soluble, las células se lavaron dos veces en PBS y se usaron 2×10^5 células por punto. Se incubaron con $10 \mu\text{g/ml}$ de ALCAM-Fc durante 30 minutos a 37°C en RPMI-1640, en presencia o ausencia de los anticuerpos especificados a una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$. Se lavó una vez con RPMI-1640 a 37°C y se incubó con anti-IgG humano acoplado a FITC durante 15 minutos a 37°C . Luego se lavaron, fijaron y se analizaron como se expone anteriormente.

Plásmidos y transfecciones.

Las siguientes construcciones de ARNhp (OriGene Technologies) fueron introducidas establemente mediante infección por retrovirus, en células THP-1, Jurkat y Raji: 1) TR20003 (TR2) que es el vector vacío control que no tiene inserto ARNhp. 2) T364190 (#90) y T364192 (#92) tienen un inserto específico para ADAM-17. 3) TI356235 (#35) es un ARNhp específico para CD9. 4) TI359388 (#88) tiene un inserto específico para ALCAM. Los clones se seleccionaron con $1 \mu\text{g/ml}$ de puromicina (Sigma) y fueron analizados por citometría de flujo. Se mantuvieron en cultivo en RPMI-1640 suplementado con $0,8 \mu\text{g/ml}$ de puromicina.

La línea celular de linfocitos B Raji, negativa para CD9, fue transfectada establemente con el ADNc de CD9 insertado en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen) mediante electroporación a 300 V durante 22 ms en un electroporador ElectroSquarePorator ECM830 (BTX) con $20 \mu\text{g}$ del plásmido y las células transfectadas se seleccionaron con G418 (Gibco) a $0,8 \text{ mg/ml}$. Los clones fueron analizados por citometría de flujo y se mantuvieron en RPMI-1640 suplementado con $0,2 \text{ mg/ml}$ de G418.

La línea eritroleucémica K562, negativa para ALCAM, fue transfectada establemente por electroporación ($960 \mu\text{F}$ y 230 V) con el ADNc de ALCAM (proporcionado por el Dr. G. Swart, Departamento de Bioquímica, Centro Médico Universitario, Nijmegen, Holanda), incluido en el plásmido pRc/CMV. Los transfectantes fueron seleccionados con $0,4 \text{ mg/ml}$ de G418.

La línea de carcinoma de colon humano Colo320, negativa para CD9, se transfectó por electroporación a 165 V durante 70 ms en un electroporador ElectroSquarePorator ECM830 (BTX) con $20 \mu\text{g}$ de diferentes cDNAs codificantes para ICAM-1-GFP, CD9, CD82, diferentes quimeras de CD9 y CD82 (CD9x82, CD82x9, CD82LEL9, CD82CCG9) o el vector vacío pcDNA3 como control. Los clones positivos se seleccionaron con G418 a $0,8 \text{ mg/ml}$ y se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con $0,2 \text{ mg/ml}$ de G418 (Barreiro et al., 2005).

La transfección de ARNpi en la línea celular HUVEC se realizó mediante oligofectamina (Invitrogen) como estaba descrito anteriormente (Barreiro et al., 2005).

Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Para analizar la colocalización de CD9 y ADAM-17 usamos la técnica de microscopía confocal. Se sembraron células HMEC-1 sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm recubiertos con 1% de gelatina. Las células THP-1 se sembraron sobre los mismos cristales recubiertos con PLL ($50 \mu\text{g/ml}$) y se trataron con 50 ng/ml de PMA durante 24 horas. Para los ensayos de colocalización de CD9 y ALCAM, las líneas celulares BLM, Jurkat y Raji-CD9, se sembraron en

cubreobjetos de cristal sobre PLL (50 µg/ml). En todos los casos se fijaron con 4% formaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con PBS 1% BSA, 0,1% Triton X-100 (Chemika) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se incubaron con el anticuerpo primario frente a ADAM-17 (clon 11633, R&D Systems) o frente a ALCAM (PAINS-15) a 5 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo rojo Alexa 594 (Molecular Probes) 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquearon con suero de ratón 1/500 durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se incubaron con el anticuerpo VJ1/20 biotinilado (5 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de avidina acoplada al fluorocromo verde ALEXA 488 (Molecular Probes) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos con el medio de montaje Mowiol (Calbiochem) y se adquirieron las imágenes con el microscopio confocal LSM510 Invertido con rayo láser de Argón y Helio/Neón (Zeiss). Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ (Institutos Nacionales de la Salud).

Para los ensayos de cuantificación de agrupamientos o *clustering* de ALCAM, se sembraron células Jurkat TR2, Jurkat #35, Raji-vector y RAJI-CD9, en presencia o ausencia de 2,5 µg/ml de citocalasina D durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se fijaron y se bloquearon como se ha mencionado anteriormente. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario PAINS-15 (5 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas, e incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 594, 30 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron series de cortes en el eje z de varios campos de cada tipo celular para tener un número estadísticamente significativo de imágenes para realizar el conteo de los agrupamientos. Para el análisis del número y tamaño de agrupamientos, las series de cortes fueron deconvolucionados con el programa Huygens 3.2 para eliminar ruido y fondo en las imágenes. Mediante el programa ImageJ se analizaron y cuantificaron las imágenes, poniendo un límite mínimo de intensidad, de tal forma que se seleccionaron los agrupamientos por tamaño e intensidad. Sólo los agrupamientos más grandes e intensos se contabilizaron. El tamaño total de los agrupamientos es relativo al área total de la célula en la proyección en el eje z.

Ensayos de hibridación por proximidad.

Duolink IQ PLAs (*in situ proximity ligation assay*) (Olink Bioscience) es un nuevo método validado para detectar interacciones proteicas en la superficie celular mediante microscopía. Células THP-1 tratadas con 50 ng/ml PMA y HMEC-1 fueron sembradas en cubreobjetos de cristal con PLL y fijadas con 4% formaldehído en PBS 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se bloquearon las interacciones inespecíficas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos primarios usados fueron: anti-ADAM-17, 11633 (R&D Systems), anti-CD147 (VJ1/9), como control negativo, o anti-CD81 (5A6), como control positivo, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas con el tampón de lavado y luego incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG acoplado al oligonucleótido (sonda más) durante 30 minutos a 37°C. Tras dos lavados con el tampón de lavado se bloqueó con suero de ratón y las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-CD9 VJ1/20 biotinilado, 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó y a continuación se añadió el anticuerpo secundario anti-biotina acoplado a

la sonda menos durante 30 minutos a 37°C. Después de lavar se añadió la ligasa durante 30 minutos a 37°C. La amplificación se llevó a cabo durante 10 minutos a 37°C. Después de lavar, las preparaciones se montaron y se analizaron en el microscopio como se ha descrito anteriormente. Si las dos proteínas marcadas están suficientemente próximas, alrededor de 50nm, las sondas acopladas a los anticuerpos secundarios podrán hibridar y después de la amplificación en círculo y detección mediante otro oligonucleótido fluorescente, se podrá observar emisión de fluorescencia roja, lo que es indicativo de una interacción entre las dos moléculas.

Co-inmunoprecipitación y ensayos de *cross-linking*.

Los ensayos de co-inmunoprecipitación se llevaron a cabo para confirmar bioquímicamente la asociación entre ADAM-17 y ALCAM con CD9. Para ello se cultivó un número suficiente de células del tipo especificado y se lisaron con el tampón de lisis (1% Brij 97 en TBS suplementado con 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0,2 U/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina y 1 µg/ml pepstatina A) durante 15 minutos a 4°C con agitación. Después los restos celulares fueron precipitados por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. En el caso de las co-inmunoprecipitaciones de CD9 y ADAM-17, la proteína A-agarosa (20 µl/punto) fue unida a los anticuerpos correspondientes (20 µl/ml) durante 3 horas en agitación a 4°C. Después se lavó el exceso de anticuerpo y la proteína A-agarosa con el anticuerpo unido fue incubada con el lisado total de las células toda la noche a 4°C en agitación. En el caso de las co-inmunoprecipitaciones de CD9 y ALCAM el orden de las incubaciones fue cambiado para mejorar la detección. Los anticuerpos se incubaron con el lisado total de las células durante 7 horas a 4°C en agitación y después incubados durante toda la noche con la proteína A-agarosa a 4°C en agitación. En ambos casos los complejos fueron lavados con el tampón de lisis diluido en TBS 1/10 y el material inmunoprecipitado se eluyó con tampón de carga Laemmli no reductor. Los complejos se resolvieron mediante SDS-PAGE y posterior *western-blot* con los anticuerpos biotinilados VJ1/20 para CD9 y PAINS-15 para ALCAM, y con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ADAM-17 H-300 de Santa Cruz Biotechnology

Los ensayos de *cross-linking* se realizaron con el reactivo DTSSP (Pierce-Thermo Scientific). Este reactivo es soluble en agua e impermeable a la membrana celular, de tal forma que solo puede unirse a proteínas extracelulares. Contiene un brazo espaciador de 8 átomos con un puente disulfuro central que puede ser roto por agentes reductores. Las células fueron tratadas con 1 mM de DTSSP en PBS durante 30 minutos y posteriormente bloqueado con TBS. La co-inmunoprecipitación fue llevada a cabo como se describe en el párrafo anterior con dos cambios, la lisis se llevó a cabo en presencia de 1% de Triton X-100 y no de Brij 97 1% y la elución del material inmunoprecipitado se llevó a cabo con tampón de carga Laemmli reductor, para romper el puente disulfuro del reactivo de *cross-linking* y separar las proteínas. La detección mediante *western-blot* solo fue posible para ADAM-17, puesto que ningún anticuerpo frente a la tetraspanina CD9 es capaz de reconocerla en condiciones reductoras. En paralelo se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones con los mismos anticuerpos pero las muestras fueron eluidas tras el lavado con tampón de carga Laemmli no reductor, de tal forma que los anticuerpos específicos para cada proteína sí que fuesen capaces de reconocerla mediante la técnica de *western-blot*, y así asegurarnos de que las proteínas eran correctamente inmunoprecipitadas, y que la ausencia

de interacción no se debiese a que no estaban siendo inmunoprecipitadas.

Ensayos de interacción directa entre proteínas.

Tanto la proteína de fusión CD9-LEL-GST como sus formas mutadas en las que las cisteínas 152, 153, 167 ó 181 han sido sustituidas por alaninas, se produjeron y purificaron como se describió anteriormente (Barreiro et al., 2005; Higginbottom et al., 2003), al igual que las proteínas de fusión de otras tetraspaninas: CD81-LEL-GST, CD63-LEL-GST y CD151-LEL-GST. La proteína PAK-CRIB-GST, una donación de Dr. J. G. Collard (The Netherlands Cancer Institute. Amsterdam. Holanda) fue usada como control negativo.

En los ensayos de interacción directa, la forma salvaje y los mutantes de CD9-LEL-GST, las formas salvajes de CD81-LEL-GST, CD63-LEL-GST, CD151-LEL-GST y la proteína PAK-CRIB-GST (20 µg/ml), fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con 20 µg/ml de ADAM-17-Fc en el tampón de unión (50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1% Brij 97, suplementado con inhibidores de proteasas). A continuación los complejos se unieron a GSH-agarosa durante 3 horas a 4°C en agitación. Las muestras fueron lavadas tres veces con tampón de unión diluido 1/10 en TBS. Los complejos fueron fraccionados por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Detectamos la presencia de las proteínas por *western-blot* mediante el anticuerpo policlonal de conejo H-300 para ADAM-17-Fc y anti-GST para el resto de proteínas de fusión. En el caso de los experimentos de interacción directa entre CD9-LEL-GST y ALCAM-Fc el experimento se llevó a cabo igual salvo que en vez de unir los complejos a GSH-agarosa, fueron unidos a proteína A-agarosa. De esta forma ALCAM-Fc fue arrastrado por la proteína A-agarosa y pudo arrastrar con él los LEL de las tetraspaninas asociadas. ALCAM-Fc fue detectado mediante *western-blot* con el anticuerpo PAINS-15 y un anticuerpo anti-GST para el resto de proteínas de fusión.

Para estudiar la interacción del CD9 endógeno celular con ADAM-17 en un entorno más similar al fisiológico, inmovilizamos 20 µg/ml del anticuerpo monoclonal anti-ADAM-17 5C2 (producido en nuestro laboratorio) en placas de 96 pocillos de alta capacidad de unión durante toda la noche a 4°C en PBS. A la mañana siguiente se bloqueó con 1% BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego añadimos ADAM-17-Fc (20 µg/ml en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Lavamos la proteína no unida con PBS y añadimos los lisados de células Colo320-pcDNA3 y Colo320-CD9 obtenidos como se ha descrito anteriormente con el tampón de lisis (50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1% Brij 97) e incubamos durante 2 horas a temperatura ambiente. También se realizaron en el sentido inverso, inmovilizando el anticuerpo anti-CD9 VJ1/20 en la placa de fondo plano a 20 µg/ml, añadiendo primero los lisados de Colo320-pcDNA3 y Colo320-CD9 y por último incubando con ADAM-17-Fc a 20µg/ml en tampón de lisis. En ambos casos se lavaron los pocillos con tampón de lisis diluido 1/10 en TBS y a continuación se eluyeron los complejos añadiendo tampón de carga Laemmli no reductor a una temperatura de 90°C a los pocillos de la placa. Las muestras se fraccionaron mediante SDS-PAGE y se detectó la presencia de ADAM-17 o de CD9 mediante *western-blot* con el anticuerpo anti-ADAM-17 H-300 o anti-CD9 VJ1/20.

Western-blot.

Para la detección de proteínas mediante *western-blot*, las membranas de nitrocelulosa (Palm) resultantes de transferir los geles de poliacrilamida de las electroforesis, fueron bloqueadas con TBS 3% BSA para anticuerpos biotinilados, o TBS 5% de leche para el resto de anticuerpos, durante toda la noche a 4°C en agitación. A continuación se incubaron los anticuerpos primarios específicos durante 2 horas en TBS 0,1% Tween (Sigma) a la dilución optimizada previamente. Tras lavar con TBS 0,1% Tween se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón (Sigma), anti-IgG de conejo (Sigma) o streptavidina (Thermo Scientific) en todos los casos acoplados a peroxidasa. Después de varios lavados con TBS 0,1% Tween se revelaron con ECL (Amersham) y su quimioluminiscencia se analizó con el lector IMAGEQUANT LAS 4000 mini (GE).

La concentración de proteína total fue cuantificada con el kit DC *protein assay* (Bio-Rad Laboratories). Donde está indicado, las bandas fueron cuantificadas con la ayuda del programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

Estimulación de THP-1, Jurkat y Raji para la liberación de TNF- α .

Para la estimulación de la producción de TNF- α por parte de las células THP-1, Raji y Jurkat, estas se sembraron en presencia o ausencia de 20 ng/ml de PMA para las líneas Jurkat y THP-1 y 40 ng/ml para Raji durante 24 horas. Para estudiar la implicación de CD9 en el corte y liberación de TNF- α al medio de cultivo por parte de ADAM-17 se añadió a los cultivos, en paralelo al tratamiento con PMA, 20 μ g/ml de anticuerpos anti-CD9 (VJ1/20, VJ1/10 o PAINS-13), o la misma cantidad de anticuerpos control, anti-CD59 (PAINS-19), anti-HASP8 (PAINS-18), anti-CD151 (Lia1/1), anti-CD81 (5A6) y anti-CD82 (TS82b). También se utilizó el inhibidor de ADAM-17 TAPI-2 (20 ó 50 μ M). En el caso de la línea celular THP-1, se usaron dos protocolos más para confirmar los efectos observados. El primero es el modelo de contacto celular THP-1-HUT78 (Isler et al., 1993). Para ello se estimularon las células HUT78 con PHA (1 μ g/ml) durante 24 horas. A continuación las células fueron lavadas y fijadas con formaldehído al 4%. Después de lavar con PBS el exceso de formaldehído, las células fueron mezcladas y cultivadas con THP-1 en una relación 1:8. Para estudiar el efecto de los anticuerpos anti-CD9 (VJ1/20 y VJ1/10) se añadieron a los cultivos de THP-1 y HUT78 a una concentración de 20 μ g/ml. Por otro lado se co-cultivó la línea celular THP-1 con PBLs (Gonzalez-Alvaro et al., 2006). Los linfocitos de sangre periférica se aislaron de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Histopaque-1077 y se eliminaron los monocitos por adhesión a placas de plástico durante 1 hora. Los PBLs obtenidos fueron cultivados en presencia de IL-15 (50 ng/ml) y posteriormente co-cultivados con THP-1 a una proporción 10:1. Como control se usó el co-cultivo de las dos poblaciones pero separadas físicamente por una estructura *transwell* con una membrana con tamaño de poro de 0,4 μ m.

Detección de TNF- α e ICAM-1 soluble

En todos los casos la cantidad de TNF- α soluble en el medio se cuantificó mediante ELISA de sándwich (Inmunotools GmbH), considerando el 100% la cantidad liberada por las células control tratadas únicamente con PMA. La cuantificación del TNF- α liberado fue realizada con la ayuda de una recta patrón con concentraciones conocidas de TNF- α .

La cantidad de ICAM-1 cortado y liberado al medio de cultivo por las líneas celulares THP-1 y Jurkat fue cuantificado por ELISA de sándwich de Diaclone (Tepnel Life Sciences), en todos los casos se consideró el 100% la cantidad liberada por las células control tratadas solo con PMA.

Cuantificación de la liberación de ICAM-1 en células Colo320 y transfectantes estables de Colo320.

Las células Colo-320 y los transfectantes estables de Colo-320 con las diferentes tetraspaninas y sus quimeras (Higginbottom et al., 2003), fueron transfectadas transitoriamente con el ADNc de ICAM-1-GFP como se describe anteriormente. Después de 24 horas, las células fueron tratadas o no con 20 ng/ml de PMA. Posteriormente se realizó una citometría de flujo para cuantificar la cantidad de ICAM-1 en la membrana celular, con el anticuerpo anti-ICAM-1 Hu5/3, que reconoce un epítipo extracelular de ICAM-1, por lo que reconoce la proteína intacta, seguido de un secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo rojo APC. Para todos los transfectantes la cantidad de ICAM-1 intacto en la membrana después del tratamiento con PMA fue relativizado frente a la cantidad de ICAM-1 en membrana en las células sin tratamiento para dar una idea de la actividad de ADAM-17. En todos los casos se normalizó respecto a los niveles de fluorescencia en el canal verde, que siempre fueron muy similares.

RT-PCR cuantitativa de TNF- α .

En primer lugar se cultivaron las células THP-1 en tres condiciones: sin tratamiento, en presencia de 15 ng/ml de PMA y con PMA más 20 μ g/ml de anticuerpo anti-CD9 VJ1/20. Después de 24 horas de tratamiento las células fueron lavadas y lisadas para purificar su RNA usando el sistema RNAqueous (Ambion). El DNA complementario se preparó a una concentración de 10 ng/ml usando el kit *High Capacity Archive* (Applied Biosystems) y 0,5 ng fueron amplificados en triplicado para valorar la expresión de TNF- α y GAPD (gen de referencia), usando para ello sondas específicas Taqman (Hs00174128-m1 para TNF- α y Hs99999905 para GAPD) y un aparato ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados con el programa SDS 2.2.2 y la cantidad relativa se calculó con el método deltaCt.

Ensayos de adhesión a ALCAM-Fc.

Placas de 96 pocillos de fondo plano fueron recubiertas con 10 μ g/ml de ALCAM-Fc en PBS durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente fueron bloqueadas con 1% BSA (hervida 1 minuto) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron marcadas con la sonda fluorescente verde BCECF-AM siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación fueron resuspendidas en RPMI-1640 a 1×10^5 células por pocillo en un volumen final de 350 μ l por pocillo, llenándolo prácticamente hasta el borde, en presencia o ausencia de 20 μ g/ml de los siguientes anticuerpos: anti-CD9 (VJ1/20, PAINS-10 y PAINS-13) anti-CD151 (Lia1/1) o activador de integrinas β 1 (TS2/16). Tras 15 minutos a 4°C para permitir que las células se depositen en el fondo y los anticuerpos se unan a sus antígenos, se incubó

40 minutos a 37°C para permitir la adhesión. Antes del lavado se cuantifico la fluorescencia en un lector de placas (Tecan GENios) para saber el número inicial de células en cada pocillo, que será nuestro 100% de adhesión. El lavado se llevó a cabo de forma suave, sumergiendo la placa en un recipiente con PBS a 37°C y luego dando la vuelta al recipiente tapado para dejar la placa boca abajo y permitir que las células se separen por gravedad. Después de 20 minutos a 37°C se recuperó la placa y se cuantificaron las células que quedaban adheridas.

Ensayos de migración.

La membrana de cámaras modificadas de Boyden (*transwells*) con un tamaño de poro de 5 µm se recubrió con 75 µg/ml de ALCAM-Fc en PBS a 4°C durante toda la noche. En la cámara superior se añadieron 6×10^5 células Jurkat transducidas con el plásmido control TR2, con el ARNhp específico para CD9 (#35) o para ALCAM (#88) en RPMI-1640 sin suero. En la cámara inferior se añadió RPMI-1640 con 6,25 mM de SDF-1α (CXCL12) para realizar la migración dirigida a esta quimiocina. Las células se incubaron durante una hora a 37°C para que migrasen y el número de células en la cámara inferior se cuantifico mediante citometría de flujo. Se realizaron controles de migración sin SDF-1α para cuantificar la migración basal y el valor obtenido se restó del número de células que habían migrado.

Activación de células T.

Para la activación de linfocitos T se realizaron conjugados de células T Jurkat con células B Raji, transfectadas con el vector vacío (Raji-vector) o con el ADNc de CD9 como esta descrito (Gimferrer et al., 2004). En resumen, 2×10^5 células Raji fueron cargadas con 2,5 µg/ml de superantígeno SEE (se une a las cadenas Vβ 8, presente en las células Jurkat) durante 30 minutos a 37°C. Después de lavar el exceso de superantígeno, se añadieron 4×10^5 Jurkat y se cultivaron durante 72 horas a 37°C para la formación de conjugados y la activación de las células T. La expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en las células Jurkat fue medida por citometría de flujo como se ha indicado anteriormente.



RESULTADOS

La tetraspanina CD9 y la metaloproteínasa ADAM-17 interaccionan en la superficie de células endoteliales (HMEC-1) y monocíticas (THP-1).

Una de las principales metaloproteasas que intervienen en el corte de TNF- α es ADAM-17. Resultados anteriores obtenidos en nuestro laboratorio han relacionado el efecto de CD9 en la morfología y proliferación de células de carcinoma de colon con un aumento del TNF- α de membrana (Ovalle et al., 2007). Por ello, nuestra hipótesis de partida de este trabajo fue que la tetraspanina CD9 podría estar inhibiendo a ADAM-17, cuyo principal sustrato es el TNF- α , lo que explicaría su mayor expresión en membrana.

Para evaluar esta hipótesis lo primero que analizamos fue si CD9 interacciona con ADAM-17. Para ello realizamos dobles tinciones de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para ambas proteínas, en células endoteliales HMEC-1 y monocíticas THP-1 tratadas con el ester de forbol PMA, y las analizamos por microscopía confocal. Pudimos observar una colocalización parcial de las dos proteínas en la membrana plasmática de ambos tipos de células (**figura 6**), principalmente en las áreas de contacto celular pero también en zonas apicales de las células endoteliales.

Como la colocalización en la membrana celular sugiere que ocurre una interacción entre las dos proteínas pero no es determinante, realizamos ensayos de PLAs (*Proximity ligation assays*, ensayos de hibridación por proximidad) como otra aproximación para demostrar esta interacción entre CD9 y ADAM-17. En estos ensayos solo se detecta señal de fluorescencia roja en el microscopio si las sondas de los anticuerpos secundarios están suficientemente próximas como para ser compatible con una interacción de tipo directo entre dos moléculas diferentes. Como se observa en la **figura 7**, la señal de hibridación entre sondas se observa claramente en la tinción para CD9 y ADAM-17 en células THP-1 tratadas con PMA, o en las células endoteliales EAhy-926, lo que indica una interacción entre las dos proteínas. Al

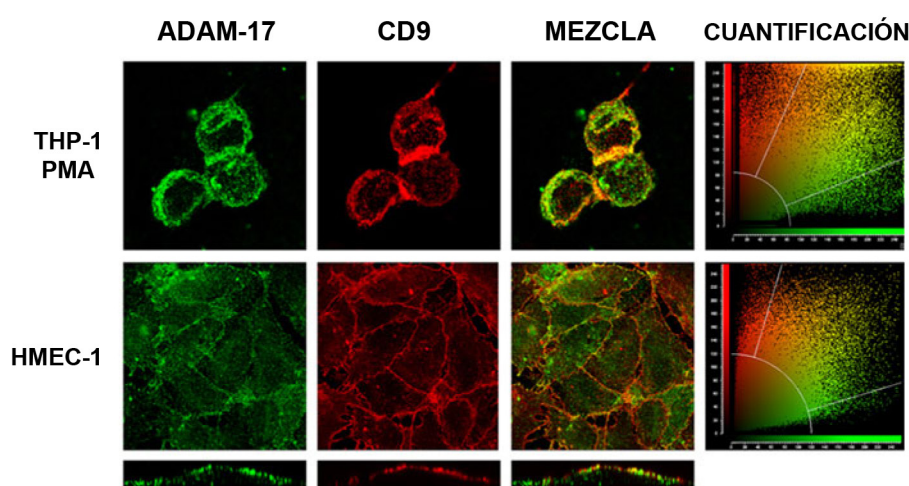


Figura 6: Análisis de la colocalización de CD9 y ADAM-17 por microscopía confocal. Las células THP-1 tratadas con 50 ng/ml de PMA durante 24 horas, y las células HMEC-1 se tiñeron con anticuerpos específicos para ADAM-17 (clon 111633 de R&D) y CD9 (VJ1/20 biotinilado) seguidos por anticuerpos secundarios específicos acoplados a un fluorocromo. Se muestran las proyecciones de máxima intensidad en el eje z junto con las imágenes de superposición de canales (mezcla) y la cuantificación de intensidad para cada pixel de cada canal. En el caso de las células endoteliales HMEC-1 se muestran cortes verticales en el eje z para mostrar la colocalización en la zona apical de la célula.

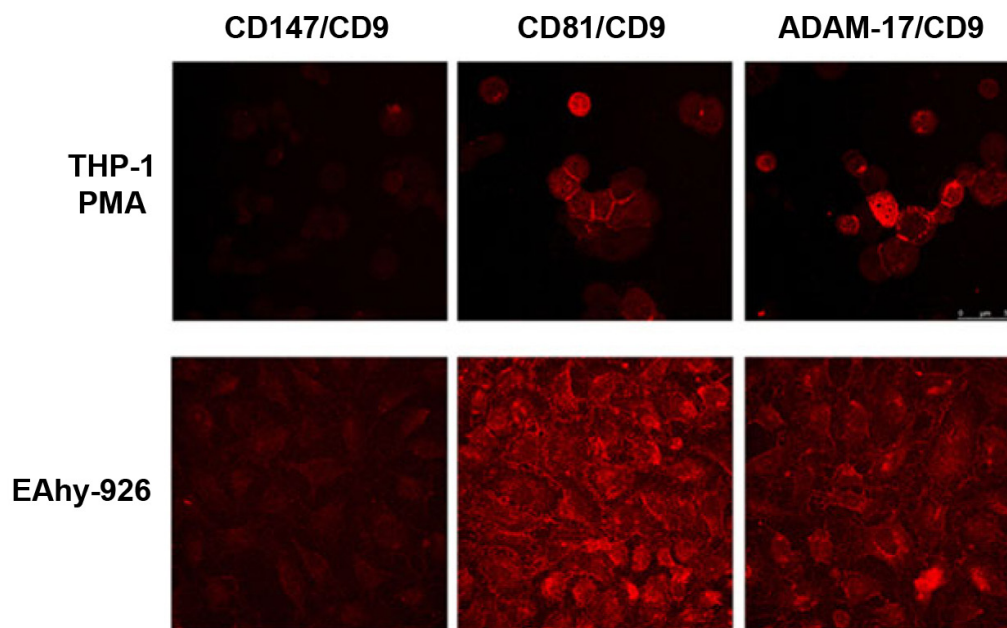


Figura 7: Ensayos de hibridación por proximidad. Las líneas celulares THP-1 tratadas con 50 ng/ml de PMA y endoteliales EAhy-926 fueron teñidas con los anticuerpos específicos para CD9 (VJ1/20 biotinilado), CD147 (VJ1/9), CD81 (5A6), y ADAM-17 (2A10), seguidos de los anticuerpos secundarios acoplados a las sondas de oligonucleótidos, tal y como se describe en materiales y métodos. La presencia de fluorescencia roja indica interacción entre las moléculas. Se muestra la proyección de máxima intensidad en el eje z de cada serie de planos.

igual que ocurre en la **figura 6**, la interacción se observa principalmente en la zona de contacto entre células de ambos tipos celulares y en la parte apical de las células endoteliales EAhy-926. Como control negativo se realizó la tinción de CD9 junto con otra molécula muy expresada en la membrana de estas células, CD147/EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*, inductor de metaloproteasas de la matriz extracelular), y no se detecta señal apreciable ni en THP-1 ni en EAhy-926. Como control positivo usamos la tinción simultánea de CD9 y CD81, ya que está descrito que estas tetraspaninas forman heterodímeros en la membrana celular (Kovalenko et al., 2004) y se observa una señal positiva en ambas líneas celulares.

Para confirmar la interacción entre CD9 y ADAM-17 que indican los ensayos de colocalización y de hibridación por proximidad e investigar si estas proteínas forman parte de los mismo complejos proteicos, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación. La expresión de CD9 en células THP-1 se incrementa con el tratamiento con PMA, como ya había sido descrito (Ouchi et al., 1997) y como se muestra en la **figura 8**, paneles superiores. La expresión de CD9 en las células endoteliales EAhy-926 también es abundante (**figura 9**, paneles superiores). La expresión de ADAM-17 es moderada en THP-1 y baja en EAhy-926 (**figura 8 y 9** respectivamente).

Tanto en los paneles cetrales de la **figura 8** como en la **figura 9** se observan dos bandas específicas de ADAM-17; una de 130 kDa y otra de 95 kDa, que corresponden a la forma no procesada y procesada (sin el prodominio) respectivamente. Estas dos bandas de ADAM-17 coinmunoprecipitan con CD9 y también con integrinas de la subfamilia β_1 , como había sido descrito (Bax et al., 2004), pero no con otras tetraspaninas como CD81 o CD151, o la molécula usada como control negativo CD147. Así mismo, CD9 es co-inmunoprecipitado junto con ADAM-17, por integrinas β_1 (Rubinstein et al., 1994), y por CD81, que forma heterodímeros con CD9 (Kovalenko et al., 2004).

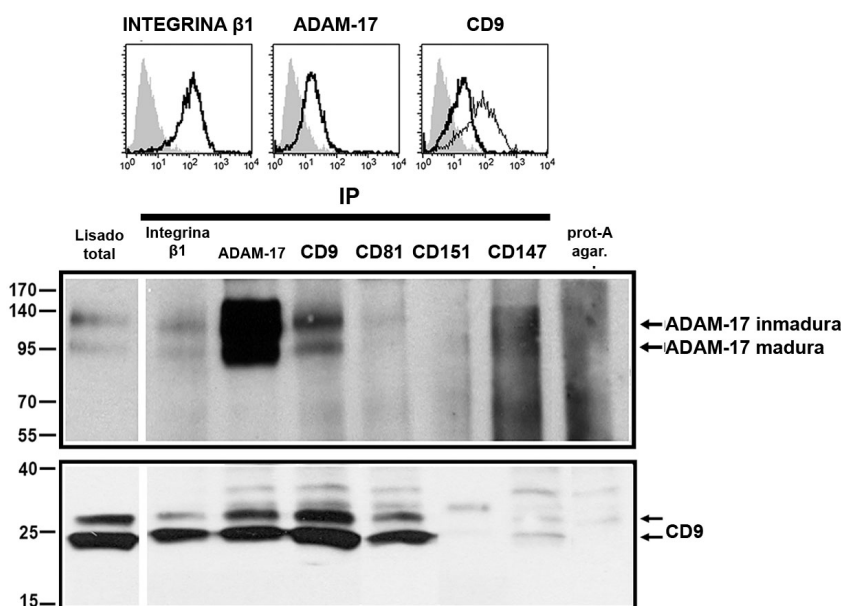


Figura 8: Co-inmunoprecipitación de CD9 y ADAM-17 en células monocíticas THP-1. Paneles superiores. La expresión de la integrina $\beta 1$, ADAM-17 y CD9 fue analizada por citometría de flujo. El histograma gris es el control negativo y el trazado negro grueso la expresión de la molécula. En el caso de CD9, el trazado negro fino es la expresión de la molécula tras en tratamiento con 20 ng/ml de PMA durante 24 horas. Los lisados celulares fueron obtenidos en Brij-97 1%, como se describe en materiales y métodos, e inmunoprecipitados con los siguientes anticuerpos: anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16), anti-ADAM-17 (2A10), anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD81 (5A6), anti-CD151 (Lia1/1) y anti-CD147 (VJ1/9). Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y detectadas por western-blot con los anticuerpos H-300 para ADAM-17 (panel central) y VJ1/20 biotinilado para CD9 (panel inferior). La figura es representativa de 3 experimentos. Los pesos moleculares en kilodaltons se indican a la izquierda.

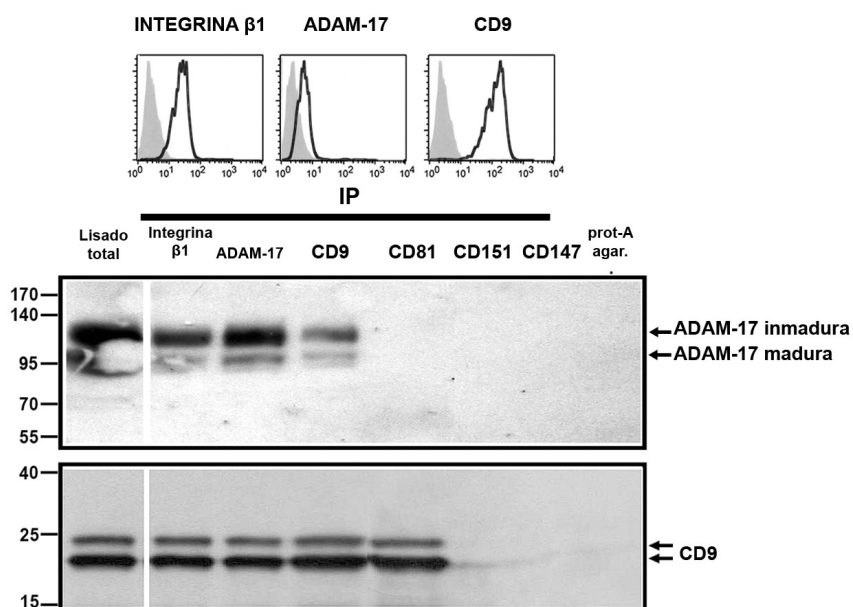


Figura 9: Co-inmunoprecipitación de CD9 y ADAM-17 en células endoteliales EAhy-926. Paneles superiores: La expresión de integrina $\beta 1$, ADAM-17 y CD9 fue analizada por citometría de flujo. El histograma gris representa el control negativo y el trazado negro grueso la expresión de la molécula. Los lisados celulares fueron obtenidos en Brij-97 1%, como se describe en materiales y métodos e inmunoprecipitados con los siguientes anticuerpos específicos: anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16), anti-ADAM-17 (2A10), anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD81 (5A6), anti-CD151 (Lia1/1) y anti-CD147 (VJ1/9). Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE no reductora, y detectadas por western-blot con el anticuerpo H-300 específico para ADAM-17 (panel central) y VJ1/20 biotinilado para CD9 (panel inferior). La figura mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Los pesos moleculares en kilodaltons se indican a la izquierda.

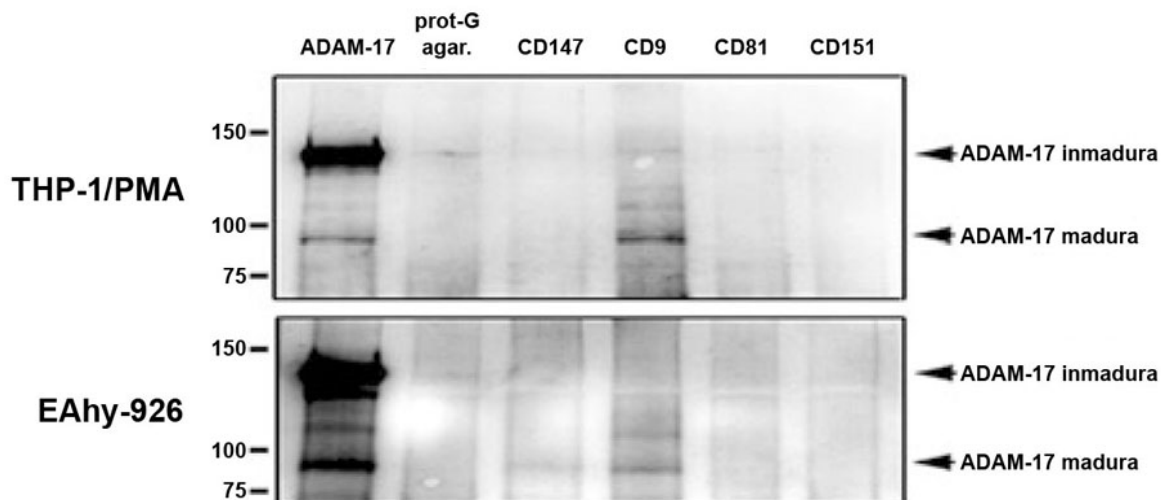


Figura 10: Ensayos de entrecruzamiento (cross-linking) de proteínas. Células monocíticas THP-1 tratadas con 20 ng/ml de PMA durante 24 horas, y células endoteliales EAhy-926 fueron incubadas con el reactivo DTSSP. Posteriormente fueron lisadas con 1% Triton X-100 y las siguiente moléculas inmunoprecipitadas con los correspondientes anticuerpos monoclonales: anti-ADAM-17 (2A10), anti-CD147 (VJ1/9), anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD81 (5A6) y anti-CD151 (Lia1/1). Los complejos inmunoprecipitados fueron resueltos por SDS-PAGE en condiciones reductoras para romper el puente disulfuro del reactivo DTSSP y detectados por *western-blot* con el anticuerpo anti-ADAM-17 H-300, que reconoce las formas madura e inmadura de la proteína en condiciones reductoras. Los pesos moleculares en kilodaltons se indican a la izquierda.

El siguiente paso fue realizar experimentos de entrecruzamiento químico (*cross-linking*) de las proteínas de membrana con el reactivo impermeable a la membrana plasmática DTSSP, que se une covalentemente a las proteínas, de tal forma que al inmunoprecipitar las proteínas, solo se conservarían interacciones que ocurren en la parte extracelular de la membrana, y no en el medio intracelular. El reactivo DTSSP presenta un puente disulfuro que se puede romper bajo condiciones reductoras, de tal forma que las proteínas se separan y migran según su peso molecular. Estos experimentos se llevaron a cabo en células THP-1 tratadas con 20 ng/ml de PMA durante 24 horas y células endoteliales EAhy-926. La lisis se llevó a cabo en presencia de Triton X-100 para eliminar la mayoría de las interacciones entre moléculas, salvo las interacciones directas y las que se mantienen unidas por el reactivo DTSSP. Como se muestra en la **figura 10**, la banda correspondiente a la forma madura de ADAM-17 es coinmunoprecipitada junto con CD9 en ambos tipos celulares, y no con otras proteínas como CD81, CD151 o CD147, pese a que estas proteínas son inmunoprecipitadas correctamente en ambos tipos celulares, como se muestra en la **figura 11**. Este resultado confirma que esta interacción se desarrolla en la membrana plasmática de la célula.

La interacción que hemos observado entre CD9 y ADAM-17/TACE puede ser directa o a través de moléculas intermediarias, ya que la lisis en Brij 97 1% no es suficientemente fuerte como para eliminar las interacciones indirectas, como se ha explicado en la introducción. Aunque los experimentos de hibridación por proximidad y entrecruzamiento sugieren una interacción directa, para confirmar si la interacción es directa, se llevaron a cabo experimentos de interacción proteína-proteína. Como se ha mencionado en introducción, la mayoría de las interacciones entre las tetraspaninas, incluyendo CD9, y otras moléculas se lleva a cabo a través de su dominio LEL. De este modo, se incubaron con TACE-Fc (región extracelular de ADAM-17 unida al Fc de una IgG humana) las moléculas de fusión de la forma salvaje del LEL de CD9 unido a GST (CD9-LEL-

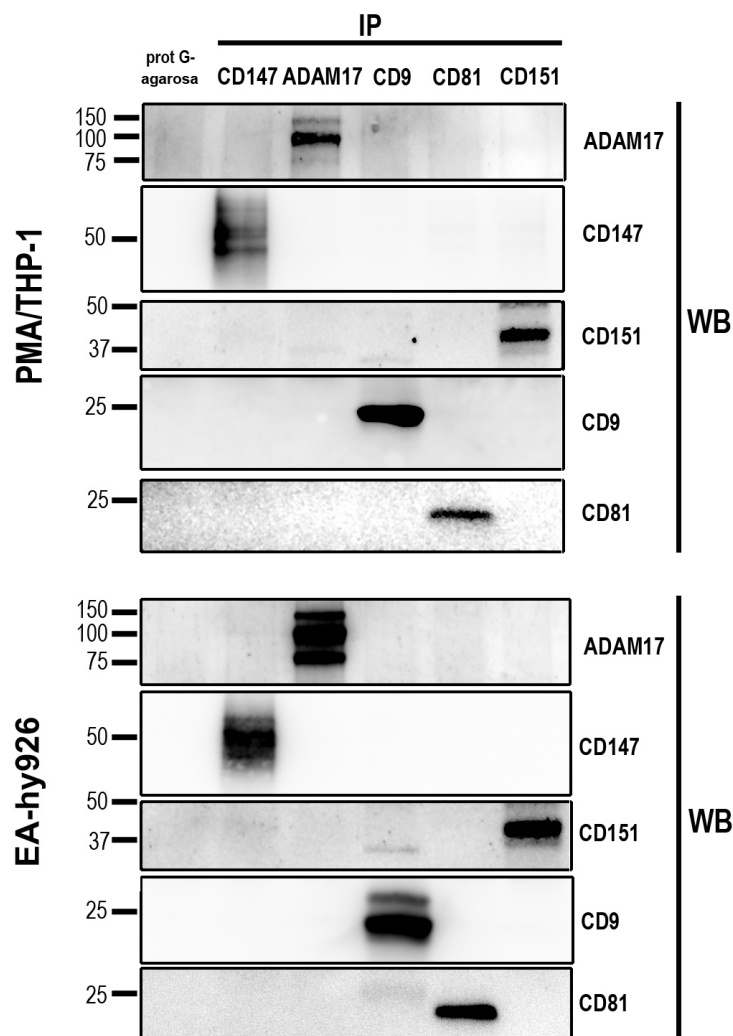


Figura 11: Las proteínas son inmunoprecipitadas correctamente en los experimentos de *cross-linking*.

Paralelamente a los experimentos de *cross-linking* se realizaron inmunoprecipitaciones de células THP-1, tratadas con 20 ng/ml de PMA durante 24 horas, y en células EAhy-926. Las células fueron lisadas en tampón de lisis con Triton X-100 1%, igual que en la **figura 10**. Se inmunoprecipitó con los anticuerpos específicos para las proteínas indicadas. Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, al contrario que en el experimento de la **figura 10**, porque los anticuerpos anti-tetraspaninas disponibles no funcionan en condiciones reductoras. La detección se realizó mediante *western-blot* con anticuerpos específicos frente a cada proteína. Los pesos moleculares en kilodaltons se indican a la izquierda.

GST) y mutantes en los que las 4 cisteínas del LEL han sido sustituidas por alaninas (C152A-CD9-LEL-GST, C153A-CD9-LEL-GST, C167A-CD9-LEL-GST y C181A-CD9-LEL-GST), los dominios extracelulares largos de CD63, CD81 y CD151 (CD63-LEL-GST, CD81-LEL-GST y CD151-LEL-GST) y la proteína PAK-CRIB-GST, todos ellos unidos a GST, para comprobar si se daba una interacción directa, como se describe en materiales y métodos. En la **figura 12** se muestra el resultado de estos experimentos tras la detección por *western blot*. Se puede observar que la forma normal (wt) del LEL de CD9 (wt-CD9-LEL-GST) es capaz de interactuar con TACE-Fc ya que se precipitan conjuntamente, así como las formas mutadas en cisteínas del LEL-CD9-GST, aunque en menor medida para la pareja de mutantes de las cisteínas C153 y C167, implicadas en la formación del mismo puente disulfuro. Estos resultados indican que la interacción entre CD9 y ADAM-17 es directa, y que ocurre a través del LEL de CD9. Además, los resultados con las formas mutadas indican que el mantenimiento de la estructura terciaria del dominio LEL parece

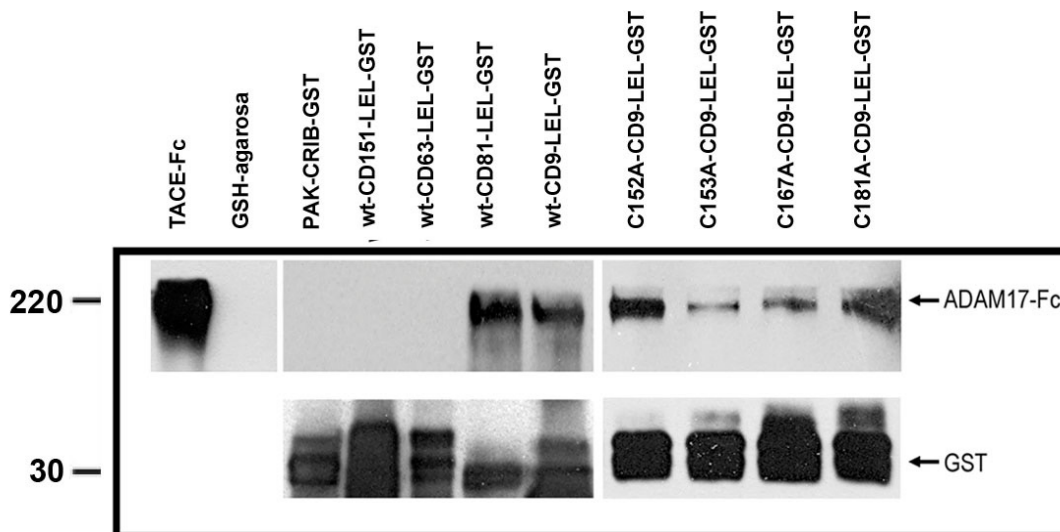


Figura 12: Ensayos de arrastre molecular (“pull-down”). Los LELs de la forma normal (wt) de CD9 y mutadas en cisteínas (CD9-LEL-GST, C152A-CD9-LEL-GST, C153A-CD9-LEL-GST, C167A-CD9-LEL-GST y C181A-CD9-LEL-GST), los LEL de CD81 (CD81-LEL-GST), CD63 (CD63-LEL-GST), CD151 (CD151-LEL-GST) y la proteína de fusión PAK-CRIB, todos unidos a la proteína GST, fueron incubadas con la proteína recombinante TACE-Fc en tampón de unión como se describe en materiales y métodos. Los paneles superiores muestran la detección por western-blot con el anticuerpo anti-ADAM-17 H-300 y los paneles inferiores muestran el control de GST revelado con un anticuerpo comercial específico. La imagen es representativa de 4 experimentos independientes. Los pesos moleculares en kilodaltons se indican a la izquierda.

ser importante en esta interacción. Curiosamente TACE-Fc también es capaz de interactuar con CD81-LEL-GST, mientras que en el resto de ensayos de co-inmunoprecipitación no se había observado ninguna interacción entre ellas. La especificidad del experimento se demuestra con la nula interacción con el resto de proteínas, PAK-CRIB-GST, CD151-LEL-GST o CD63-LEL-GST.

Para confirmar que esta interacción se produce también con el CD9 endógeno de las células y no solamente con la proteína de fusión CD9-LEL-GST, se llevaron a cabo experimentos en los que se analiza la interacción entre CD9 procedente de lisados celulares con la proteína purificada TACE-Fc. Se inmovilizó el anticuerpo anti-ADAM-17 5C2 en placas de 96 pocillos, y luego se añadió TACE-Fc para ser capturada por el anticuerpo. A continuación se añadieron los lisados de las líneas celulares Colo320 (que no expresa CD9 en su membrana plasmática) y Colo320-CD9 (establemente transfectada con CD9) y se incubaron a temperatura ambiente. Tras lavar, las muestras se eluyeron con tampón de carga, se resolvieron por SDS-PAGE y las proteínas fueron detectadas por *western-blot*. Como se puede observar en la **figura 13A**, CD9 sólo es detectado cuando sobre TACE-Fc se ha añadido el lisado total de Colo320-CD9, y no de Colo320. Como controles negativos de la especificidad del experimento se usaron otras moléculas como CD147 o la tetraspanina CD151, presentes en los lisados de las células en gran cantidad (**figura 13B**), y se puede observar que no se asocian a TACE-Fc. Asimismo, CD9 de los lisados totales sólo se asocia a TACE-Fc y no a otras moléculas que también contienen el dominio Fc como CD59-Fc o la IgG3 humana completa (**figura 13A**), indicando que CD9 no se une a la porción Fc de TACE-Fc, y que la interacción entre CD9 y TACE es específica.

La interacción entre TACE-Fc y CD9 endógeno también fue comprobada en el experimento inverso, en el que las tetraspaninas CD9 o CD151 procedentes de lisados celulares totales son inmunocapturadas sobre los pocillos de plástico y posteriormente, tras lavar, se añade TACE-Fc sobre los lisados totales. TACE-Fc únicamente es detectada en los pocillos en los que se añadió

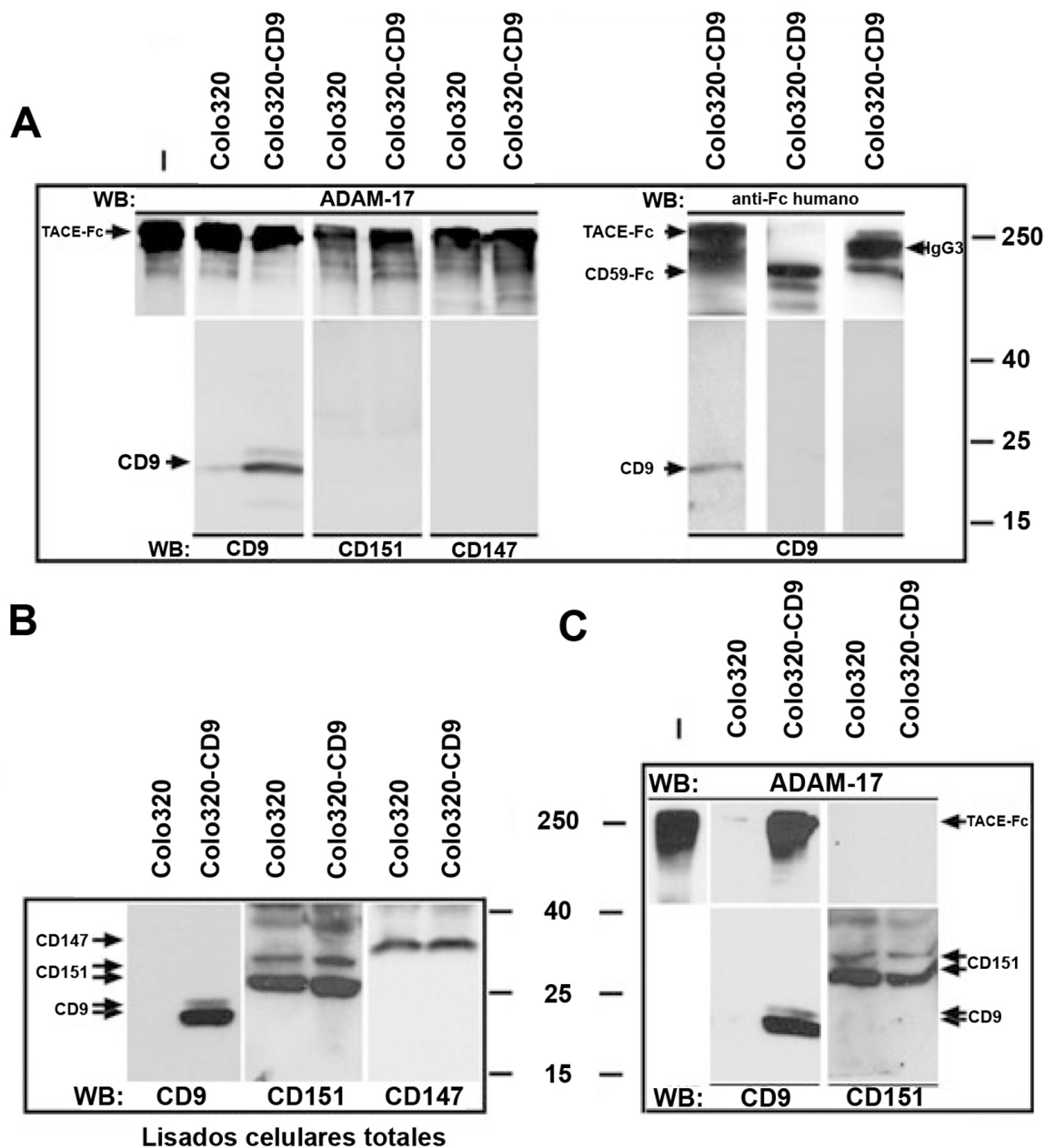


Figura 13: Interacción de CD9 endógeno con TACE-Fc. En todos los casos, los anticuerpos usados para la detección de las proteínas por western-blot fueron: H-300 para TACE-Fc, H-80 para CD151, VJ1/9 para CD147 y anti-Fc humano para CD59-Fc y la IgG3 completa. **A)** Anticuerpos anti-ADAM-17 (5C2) o anti-Fc humano fueron inmovilizados, y a continuación TACE-Fc, CD59-Fc o IgG3 humana completa fueron añadidas a los pocillos respectivamente. Después de lavar el exceso de proteína, se añadieron lisados totales de Colo320 o Colo320-CD9. Tras lavar los pocillos se eluyó con tampón de carga Laemmli no reductor, como se describe en materiales y métodos. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y las proteínas se detectaron por western-blot. **B)** Expresión analizada mediante western-blot de las proteínas CD9, CD147 y CD151 en lisados totales de Colo230 y Colo320-CD9. **C)** Los anticuerpos VJ1/20 para CD9 o Lia1/1 para CD151 fueron inmovilizados al plástico, seguido de lisados totales de Colo320 o Colo320-CD9 y por último la proteína TACE-Fc. Las muestras se eluyeron mediante SDS-PAGE no reductora y las proteínas fueron detectadas mediante *western-blot*. La figura es representativa de 3 experimentos independientes. Los pesos moleculares en kilodaltons se indican mediante líneas.

lisados totales de células Colo320-CD9 (**figura 13C**), pero no en los que se añadió lisados de Colo320. Asimismo TACE-Fc no se une a CD151 en ninguno de los tipos celulares, lo que nos vuelve a indicar la especificidad de la interacción entre TACE-Fc y CD9.

Tomados en conjunto, los datos de microscopía confocal, co-inmunoprecipitación e interacción directa proteína-proteína, demuestran que existe una interacción directa y específica de ADAM-17 y CD9 en la membrana plasmática de células monocíticas y endoteliales que se establece a través del dominio extracelular largo de la tetraspanina y de la región extracelular de la metaloproteasa.

Anticuerpos anti-CD9 inhiben la actividad metaloproteínasa de ADAM-17.

Nuestro siguiente paso fue investigar si la actividad de corte y liberación de sustratos (*shedding*) de ADAM-17 era modificada por su interacción con CD9. Uno de los sustratos típicos de ADAM-17 es el TNF- α , y su estudio era de nuestro interés por los antecedentes del laboratorio como se ha mencionado anteriormente, por lo que lo tomamos como modelo inicial para cuantificar la actividad de ADAM-17. Utilizamos la línea celular monocítica THP-1 porque el tratamiento con PMA en esta línea celular activa la actividad metaloproteasa de ADAM-17 para el corte de TNF- α y otros sustratos (Doedens et al., 2003). Como se muestra en la **figura 14A**, la producción de TNF- α en esta línea celular sin tratamiento con PMA está en el límite de detección del ELISA usado para

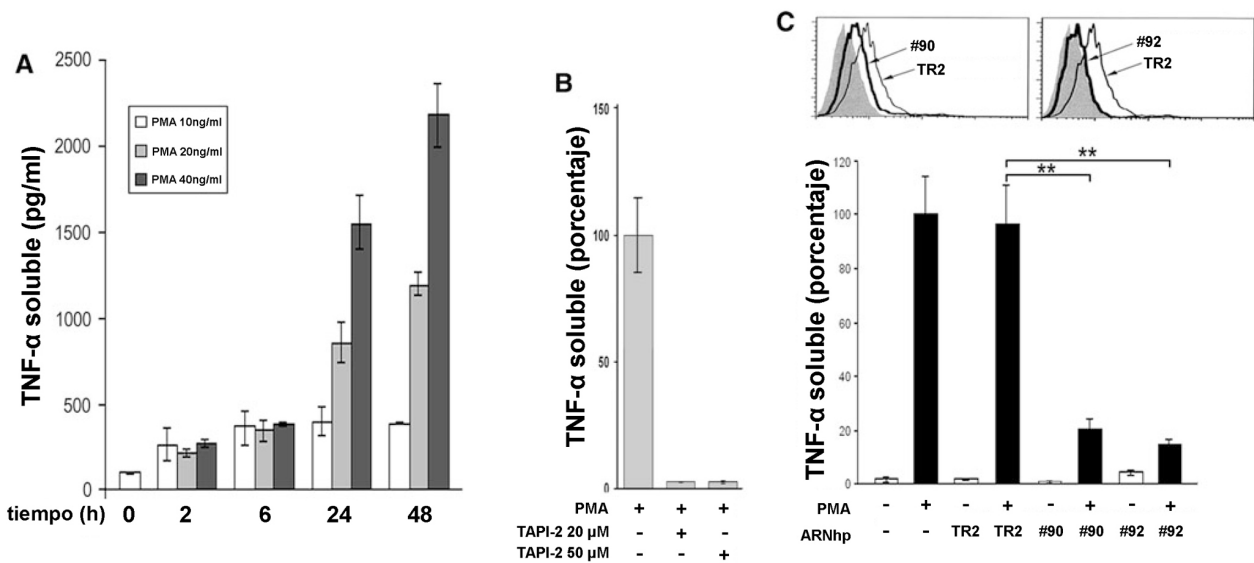


Figura 14: Producción de TNF- α soluble en células THP-1. **A)** Cuantificación de la producción de TNF- α soluble en células tratadas con diferentes concentraciones de PMA durante los diferentes tiempos que se indican. La cantidad de TNF- α se calculó usando una recta patrón de cantidades de citoquina conocidas. **B)** Análisis de especificidad de ADAM-17 en el corte de TNF- α mediante el tratamiento con el inhibidor TAPI-2, a las concentraciones indicadas, en presencia de PMA. La cantidad de citoquina producida por las células sin inhibidor es considerada el 100%. El experimento mostrado es representativo de 5 experimentos. **C)** La interferencia de ADAM-17 reduce la producción de TNF- α soluble. Paneles superiores: análisis de expresión de ADAM-17 por citometría de flujo en células interferidas. El histograma gris es el control negativo, la expresión de ADAM-17 en células control (TR2) es la línea negra fina y la línea negra gruesa indica la expresión de ADAM-17 en las líneas transducidas mediante retrovirus con los ARNhp específicos para ADAM-17 (#90 y #92). Las células se tiñeron con el anticuerpo H-170. Paneles inferiores: Producción de TNF- α soluble en células THP-1 salvajes, transducidas con el plásmido control TR2 o con los plásmidos ARNhp específicos para ADAM-17 (#90 y #92), tratadas o no con PMA. La cantidad de TNF- α soluble liberado por las células sin transducir fue considerada el 100%. El experimento es representativo de 4 experimentos independientes. ** indica una $p < 0,001$, lo que denota que las diferencias en la producción de TNF- α son estadísticamente significativas.

la cuantificación del TNF- α soluble. Se puede observar un incremento en el *shedding* de TNF- α a las 2 y 6 horas de tratamiento con 20 ng/ml de PMA, pero es mucho más evidente a las 24 horas de tratamiento con PMA. Tratamientos más largos y con más dosis de PMA resultan en una mayor producción de TNF- α soluble, pero también en mayor muerte celular. Por ello elegimos esta dosis y este tiempo como tratamiento estándar para nuestros ensayos. A la producción de TNF- α soluble por parte de las células control tratadas con 20 ng/ml de PMA durante 24 horas se consideró el 100% de producción de TNF- α en el resto de experimentos, a no ser que se indique lo contrario. Con este protocolo, el inhibidor relativamente específico de ADAM-17 TAPI-2 (Becker et al., 2002) bloquea toda la liberación de TNF- α al medio como se muestra en la **figura 14B**. Lo que sugiere que ADAM-17 es la principal metaloproteínasa implicada en el corte de TNF- α . Para demostrarlo, produjimos células THP-1 sin expresión de ADAM-17, transduciendo dos construcciones de ARNhp específicos para TACE (#90) y (#92). Como se observa en los peneles superiores de la **figura 14C**, la expresión de esta enzima es reducida en gran medida con ambas

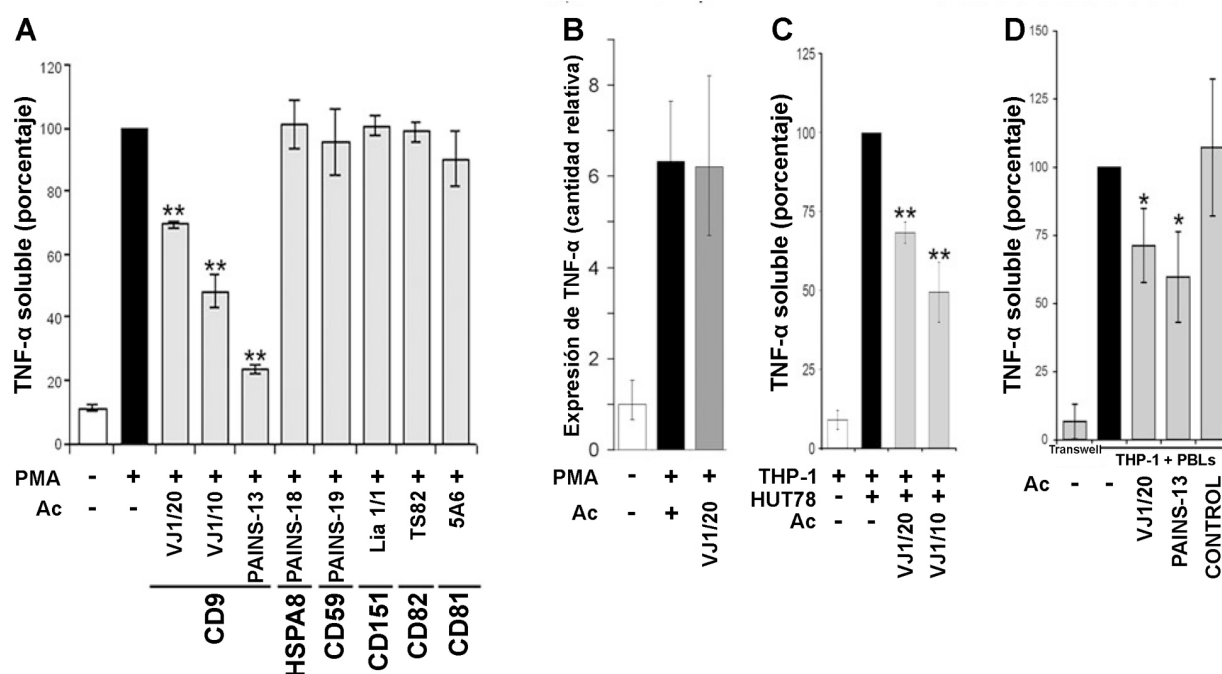


Figura 15: Efecto de anticuerpos anti-CD9 en la liberación de TNF- α soluble en THP-1. **A)** Producción de TNF- α en células THP-1 sin tratar o estimuladas con PMA en presencia de diferentes anticuerpos anti-CD9 y frente a otras moléculas control como se indica. El 100% de liberación fue considerado el de las células tratadas con PMA pero no con anticuerpo. Los experimentos se hicieron por triplicado, y los datos mostrados son la media más y menos la desviación estándar de cinco experimentos. **B)** La expresión de TNF- α fue cuantificada por RT-PCR a tiempo real. Los datos indican la cantidad relativa de TNF- α en células THP-1 tratadas o no con PMA y con PMA más el anticuerpo anti-CD9 VJ1/20. Las barras de error indican el intervalo de confianza de cada valor RQ, con el nivel de confianza marcado en 95%. **C)** Liberación de TNF- α soluble por células THP-1 estimuladas por contacto con linfocitos T HUT78. Las células THP-1 fueron cultivadas solas o en conjunto con células HUT78 fijadas durante 24 horas en presencia de 20 μ g/ml de los anticuerpos anti-CD9 VJ1/20 o VJ1/10. La cantidad de TNF- α soluble producida fue medida por ELISA y todos los porcentajes fueron referidos a la cantidad liberada por las células THP-1 co-cultivadas con HUT78 en ausencia de anticuerpo. Los datos son la media más menos desviación estándar de un experimento representativo de cuatro. **D)** Liberación de TNF- α por parte de células THP-1 activadas por contacto con PBLs. Los PBLs fueron cultivados en presencia de IL-15 durante 24 horas y luego co-cultivados con THP-1 en presencia de anticuerpos control o anti-CD9 VJ1/20 o PAINS-13. Como control negativo se usó una membrana que separa físicamente ambas poblaciones y evita el contacto entre ellas. El 100% de liberación fue considerado el de las THP-1 co-cultivadas con PBLs. Los experimentos fueron llevados a cabo en triplicado, y los datos mostrados son la media más o menos la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. En todos los casos ** indica una $p < 0,001$ y * $p < 0,01$, lo que denota que las diferencias en la producción de TNF- α son estadísticamente significativas.

construcciones. La producción de la citoquina soluble al medio de las células transducidas es prácticamente eliminada (**figura 14C**) comparada con la producción de las células control TR2, principalmente con la construcción #92 que es el que menor expresión de ADAM-17 presenta.

Una vez demostrado que el sistema de producción de TNF- α es dependiente de ADAM-17, lo siguiente que estudiamos fue si anticuerpos anti-CD9 tienen algún efecto en la liberación de TNF- α . Como se muestra en la **figura 15A**, la producción de TNF- α se ve reducida significativamente en células tratadas con PMA en presencia de anticuerpos específicos para CD9 como VJ1/20, VJ1/10 o PAINS-13. Otros anticuerpos frente a otras tetraspaninas como Lia1/1 (CD151), 5A6 (CD81) o TS82b (CD82), o frente a otras proteínas no relacionadas como HASP8 (PAINS-18) o CD59 (PAINS-19), no tienen ningún efecto sobre el *shedding* de TNF- α . La expresión de estas proteínas en la superficie de THP-1 es igual de abundante que CD9, salvo para CD151 que es inferior. La reducción del corte de TNF- α por parte de los anticuerpos anti-CD9 no está relacionado con una bajada en el nivel de traducción de la citoquina, como se comprobó por la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (**figura 15B**).

A continuación, con objeto de usar un modelo más fisiológico para la estimulación de las células THP-1 que el PMA, usamos dos sistemas ya descritos en materiales y métodos: co-cultivo con linfocitos T HUT78 fijados (**figura 15C**) y co-cultivo con linfocitos de sangre periférica (PBLs) tratados con IL-15 (**figura 15D**). En ambos casos se observa un efecto inhibitor en la liberación de TNF- α soluble cuando están presentes anticuerpos anti-CD9 (VJ1/20, VJ1/10 o PAINS-13) y no con anticuerpos control, lo que indica que el efecto inhibitor de los anticuerpos anti-CD9 sobre ADAM-17 para la liberación de TNF- α también se da en un entorno más fisiológico y no es un artefacto de la activación por PMA. El tratamiento con los anticuerpos anti-CD9 puede producir una internalización de ADAM-17, y por ello una inhibición del corte de TNF- α . En la **figura 16** se muestra que el tratamiento con los anticuerpos no tiene efecto sobre la expresión de ADAM-17 lo que descarta esa posibilidad.

Arduise y colaboradores describen que en la línea celular Raji, el corte y liberación de TNF- α es dependiente de ADAM-10 en condiciones sin estimular y dependiente de ADAM-17 cuando se

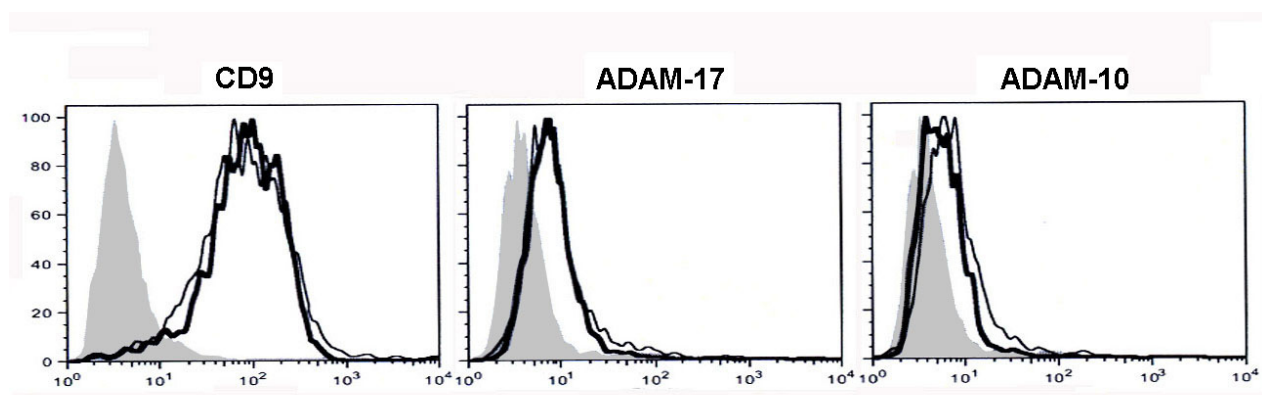


Figura 16: La expresión de CD9, ADAM-17 y ADAM-10 no se ve afectada por el tratamiento con anticuerpos anti-CD9. La expresión de CD9, ADAM-17 y ADAM-10 fue analizada por citometría de flujo, usando los anticuerpos primarios VJ1/10 biotinilado, H-170 y H-300 respectivamente en células THP-1 tratadas con PMA, en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD9 VJ1/20 (20 μ g/ml). El histograma gris representa el control negativo, la línea negra fina la expresión de la molécula indicada en ausencia de anticuerpo y la línea negra gruesa la expresión de la molécula tras el tratamiento con VJ1/20.

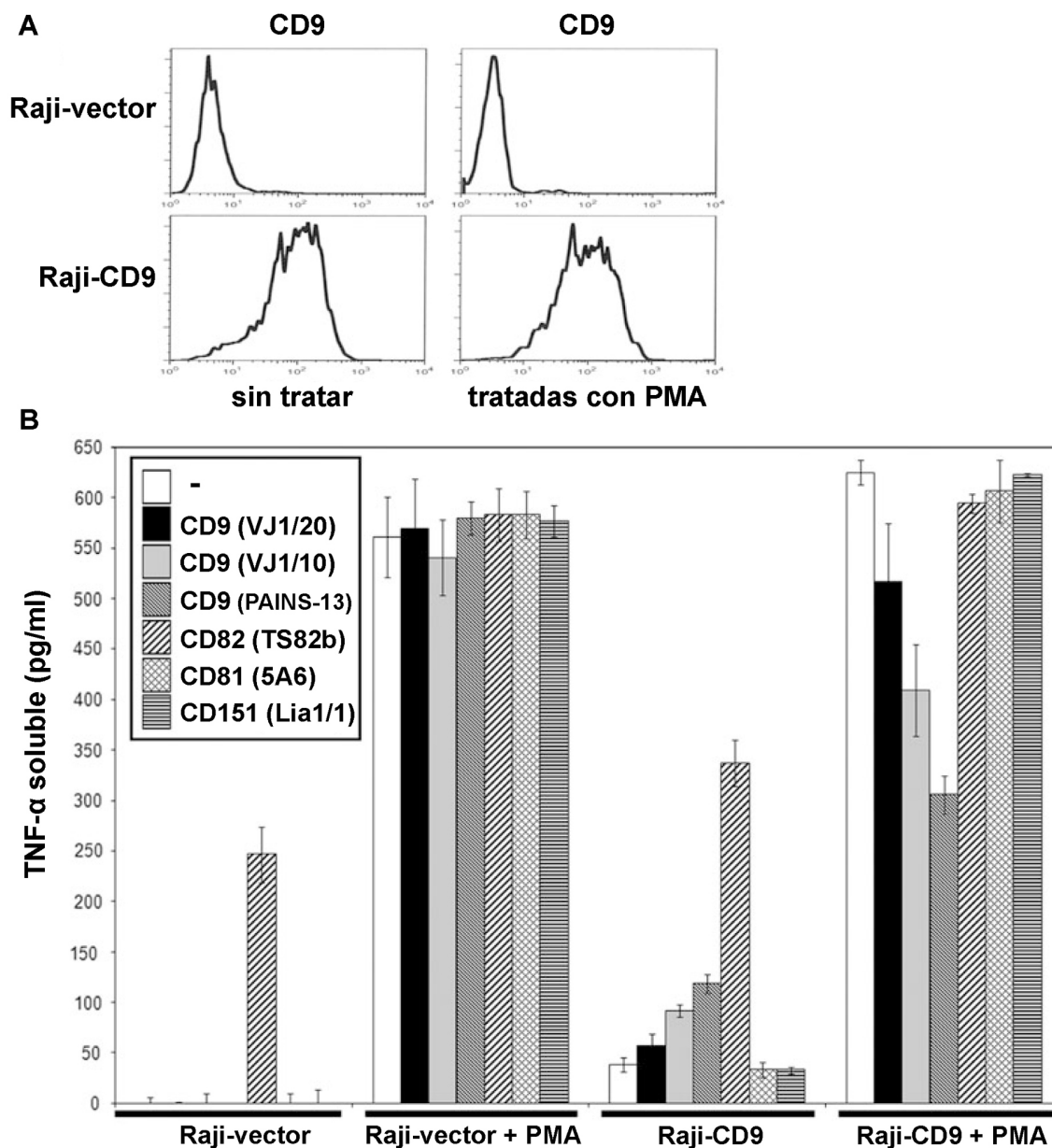


Figura 17: Efecto de los anticuerpos anti-CD9 en el shedding de TNF- α mediado por ADAM-10 y ADAM-17 en células Raji. A) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CD9 en células Raji transfectadas con el vector vacío (Raji-vector) o con el ADNc de CD9 (Raji-CD9), sin tratar o tratadas con 40 ng/ml de PMA durante 24 horas. **B)** Cuantificación de la producción de TNF- α soluble por células Raji-vector o Raji-CD9, sin tratar o tratadas con 40 ng/ml de PMA durante 24 horas, en presencia o ausencia de los anticuerpos anti-tetraspanina indicados en la leyenda a una concentración de 20 μ g/ml. La cantidad de TNF- α soluble liberado por las células se cuantificó mediante ELISA con una recta patrón de cantidades conocidas de la citoquina. Los experimentos se hicieron por triplicados y las barras indican la media más o menos la desviación estándar. El resultado mostrado es representativo de 3 experimentos independientes.

estimula con PMA. Así mismo describen que en las células Raji-CD9 (transfectada establemente con un plásmido portador del ADNc de CD9) los anticuerpos anti-CD9 (SYB-1, ALB-6 y TS9) aumentan la producción de TNF- α , lo que contrasta con el efecto inhibitorio en la liberación de TNF- α que nosotros observamos (Arduise et al., 2008). Para esclarecer el efecto, generamos la línea Raji-vector y Raji-CD9 que sobreexpresa CD9 (figura 17A). Como se muestra en la figura 17B, nuestros tres anticuerpos inhiben la producción de TNF- α soluble en células Raji establemente transfectadas con CD9 (Raji-CD9) tratadas con PMA (que sí que es dependiente de ADAM-17, según el trabajo de Arduise y colaboradores). Y esos mismos anticuerpos, VJ1/20, VJ1/10 y

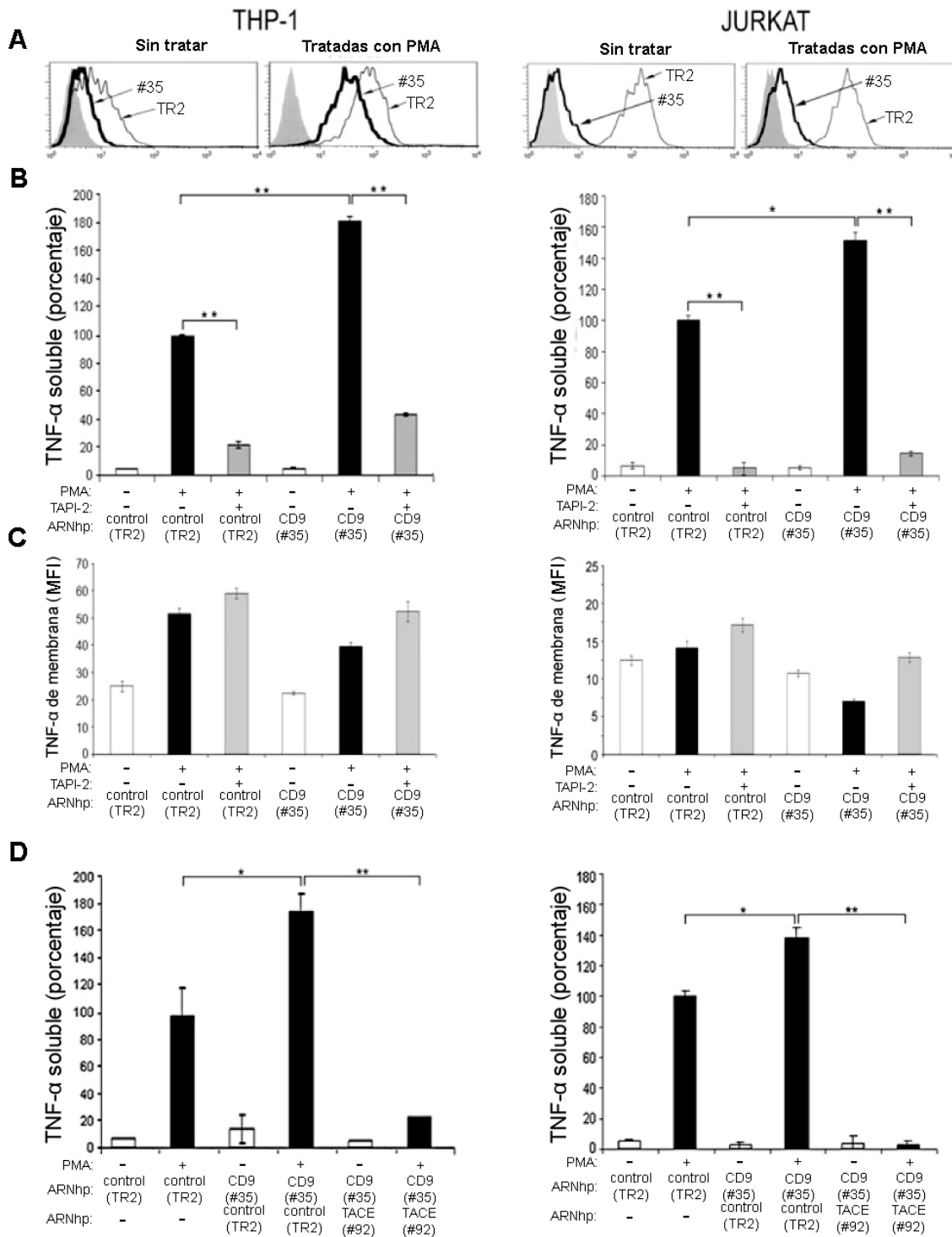


Figura 18: Efecto de la interferencia de CD9 en el corte y liberación de TNF-α. **A)** Expresión de CD9, en células THP-1 (izquierda) y Jurkat (derecha), sin tratar o tratadas con PMA. El histograma gris representa el control negativo, el trazo negro fino la expresión de CD9 en células transducidas con el plásmido control (TR2) y el trazo negro grueso la expresión de CD9 en células transducidas con el ARNhp específico para CD9 (#35). **B)** Cantidad de TNF-α soluble en células THP-1 y Jurkat, transducidas establemente con el plásmido control (TR2) o con el plásmido que contiene el ARNhp específico para CD9 (#35). Las células fueron tratadas, o no, con 20 ng/ml de PMA para THP-1 y 50 ng/ml para Jurkat durante 24 horas, en presencia o ausencia del inhibidor TAPI-2 (50μM). La cantidad de TNF-α soluble liberado por las células control estimuladas con PMA fue considerado el 100%. Los datos corresponden con la media más o menos la desviación estándar. El resultado mostrado es representativo de ocho experimentos. **C)** El nivel de TNF-α, expresado en media de intensidad media de fluorescencia (MFI), en células THP-1 y Jurkat, fue analizado por citometría de flujo. **D)** Células THP-1 y Jurkat establemente transducidas con los plásmidos indicados anteriormente, fueron transitoriamente transducidas con el plásmido control (TR2) o el ARNhp específico para ADAM-17 (#92). Las células fueron tratadas con 20 ng/ml de PMA para THP-1 y 50 ng/ml PMA para Jurkat. El experimento mostrado es representativo de tres experimentos independientes. En todos los casos ** indica una $p < 0,001$ y * $p < 0,01$, lo que denota que las diferencias en la producción de TNF-α are estadísticamente significativa.

PAINS-13 en células Raji-CD9 sin estimular con PMA (que es dependiente de ADAM-10 según describen los autores), estimulan la producción de TNF- α soluble, al igual que los tres anticuerpos anti-CD9 que presentan Arduise y colaboradores. En células Raji-vector, que no expresan CD9 (**figura 17A**), nuestros anticuerpos anti-CD9 no tienen ningún efecto, como era de esperar porque no hay expresión CD9. Mientras que el anticuerpo anti-CD82 (TS82b) estimula la producción de TNF- α , tal y como describen también Arduise *et al.* Estos resultados, junto con los presentados por los franceses, indican que CD9 regula inversamente a ADAM-17 y ADAM-10, inhibiendo a la primera y activando a la segunda.

La sobreexpresión de CD9, o su interferencia estable mediante ARNhp, regula la actividad de ADAM-17.

Nuestro laboratorio ya describió que los anticuerpos usados en este trabajo tienen un efecto agonista sobre la función de CD9, es decir, aumentan el efecto de CD9 sobre adhesión y proliferación celular (Ovalle *et al.*, 2007). Por ello, los resultados con anticuerpos de este estudio indican que CD9 está inhibiendo la función catalítica de ADAM-17. Para confirmar esta hipótesis, realizamos experimentos de liberación de TNF- α en células THP-1 y Jurkat (que ya están descritas como un modelo de liberación de TNF- α (Condon *et al.*, 2001)) estimuladas con PMA y a las que se les ha eliminado la expresión de CD9 mediante la transducción mediante retrovirus de un plásmido con el ARNhp específico para esta tetraspanina (#35) como se describe en materiales y métodos. Como se muestra en la **figura 18A**, los niveles de CD9 se redujeron en las células transducidas con el plásmido específico para CD9 (#35), llegando a ser casi del 100% de reducción de expresión de la tetraspanina en el caso de Jurkat (**figura 18A**, paneles derechos). La cantidad de TNF- α cortado y liberado en las células con menor expresión de CD9 (#35) es significativamente superior que en las células transducidas con el plásmido control (TR2) (**figura 18B**). Este aumento en la liberación de TNF- α soluble se corresponde con una bajada en los niveles de TNF- α de membrana, cuantificada por citometría de flujo (**figura 18C**), lo que se corresponde con un mecanismo de corte y liberación mediado por ADAM-17. El inhibidor relativamente específico para ADAM-17 TAPI-2 reduce la liberación de TNF- α soluble al medio, así como aumenta la expresión en membrana de la citoquina, apuntado a ADAM-17 como responsable del corte de TNF- α .

Para profundizar en esta hipótesis se realizaron dobles interferentes para CD9 y ADAM-17 y se midió la cantidad de TNF- α liberada por cada uno de ellos (**figura 18D**). Los resultados demuestran la especificidad del efecto funcional de CD9 sobre ADAM-17 en ambas células, puesto que el aumento de la producción de TNF- α soluble por parte de las células transducidas con el plásmido específico para CD9 es completamente inhibido cuando interferimos ADAM-17.

A continuación investigamos si la inhibición de la actividad de ADAM-17 por parte de CD9 también se producía para otro sustrato de ADAM-17 como es ICAM-1 (Tsakadze *et al.*, 2006). Para ello cuantificamos la liberación de ICAM-1 soluble mediante un ELISA comercial como se describe en materiales y métodos. Los interferentes estables para CD9 (#35) en THP-1 (**figura 19A**) y Jurkat (**figura 19B**) liberan una mayor cantidad de ICAM-1 soluble que sus correspondientes células control, transducidas con el plásmido (TR2). Este *shedding* de ICAM-1 estimulado por PMA

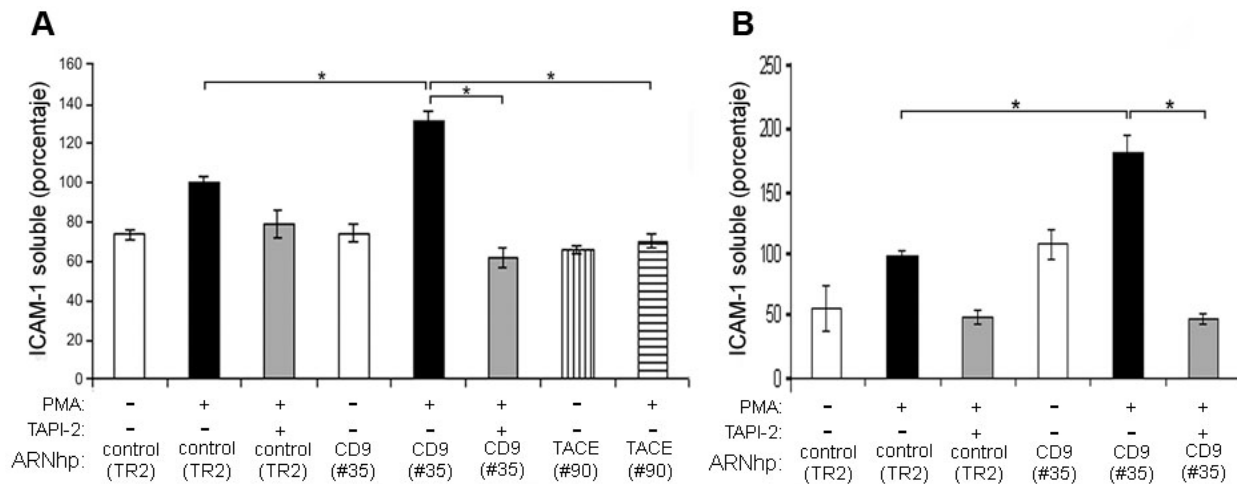


Figura 19: Corte y liberación de ICAM-1 en células THP-1 y Jurkat. Células THP-1 (A) y Jurkat (B) fueron establemente transducidas con el plásmido control (TR2) o el ARNhp específico para CD9 (#35). En el caso de THP-1, también fueron transducidas con el ARNhp para ADAM-17 (#90). La cantidad de ICAM-1 soluble liberado por células THP-1 tratadas con 20 ng/ml de PMA y Jurkat estimuladas con 50 ng/ml de PMA durante 24 horas fue cuantificada por ELISA. La cantidad de ICAM-1 soluble liberado por las células control (TR2) tras el tratamiento con PMA fue considerada el 100%. Los datos mostrados son las medias más o menos la desviación estándar. El experimento mostrado es representativo de cinco experimentos independientes. * indica una p<0,01, lo que denota que las diferencias en la liberación de ICAM-1 soluble es estadísticamente significativa.

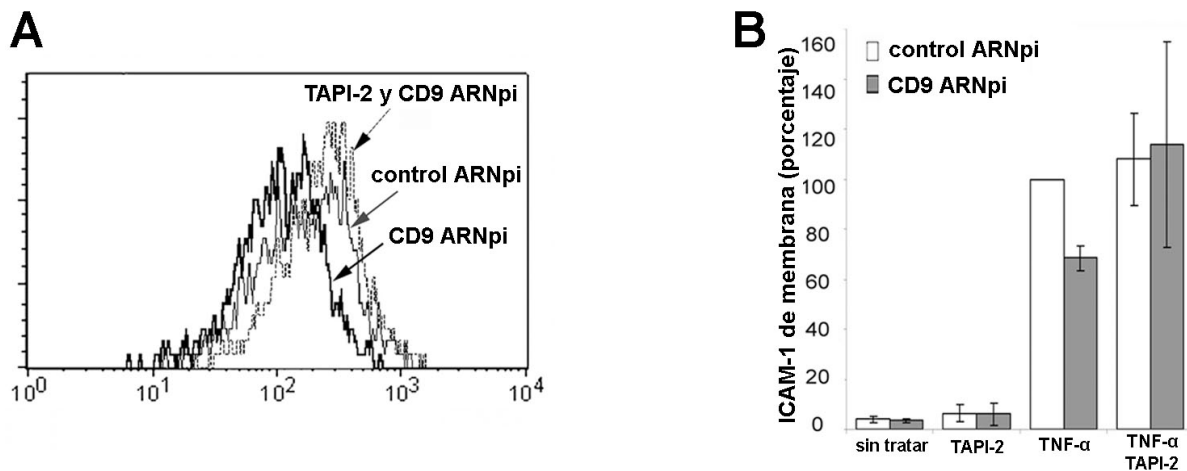


Figura 20: Expresión de ICAM-1 en células HUVEC interferidas para CD9. La interferencia transitoria de CD9 en las células HUVEC se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. Las células se cultivaron sobre fibronectina hasta confluencia en presencia o ausencia de TNF-α durante 20 horas. El inhibidor de ADAM-17 TAPI-2 (50 μM) se añadió para ver la especificidad del corte. **A)** La expresión de ICAM-1 en membrana se cuantificó por citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal Hu5/3. La línea negra fina representa la expresión de ICAM-1 en la membrana de células transfectadas con el vector control, la línea negra gruesa en células interferidas para CD9 y la línea negra punteada las células interferidas para CD9 pero en presencia de TAPI-2. **B)** Los porcentajes relativos de la expresión de ICAM-1 en la membrana de células HUVEC se calcularon usando la intensidad media de fluorescencia. Se ha considerado la expresión de la molécula en las células tratadas con TNF-α y transfectadas con el ARNpi control como el 100% de expresión. Los datos mostrados son la media más o menos la desviación estándar. El experimento mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

es dependiente de ADAM-17, como demuestra que la liberación de ICAM-1 al medio se reduce a niveles basales en presencia del inhibidor relativamente específico para ADAM-17 TAPI-2. Y más específicamente, los interferentes estables para ADAM-17 (#90) en THP-1 también reducen su liberación a niveles basales. Por lo tanto CD9 también es capaz de inhibir la actividad catalítica de ADAM-17 para el corte de ICAM-1.

Ya había sido descrito que la expresión de ICAM-1 de membrana en células HUVEC

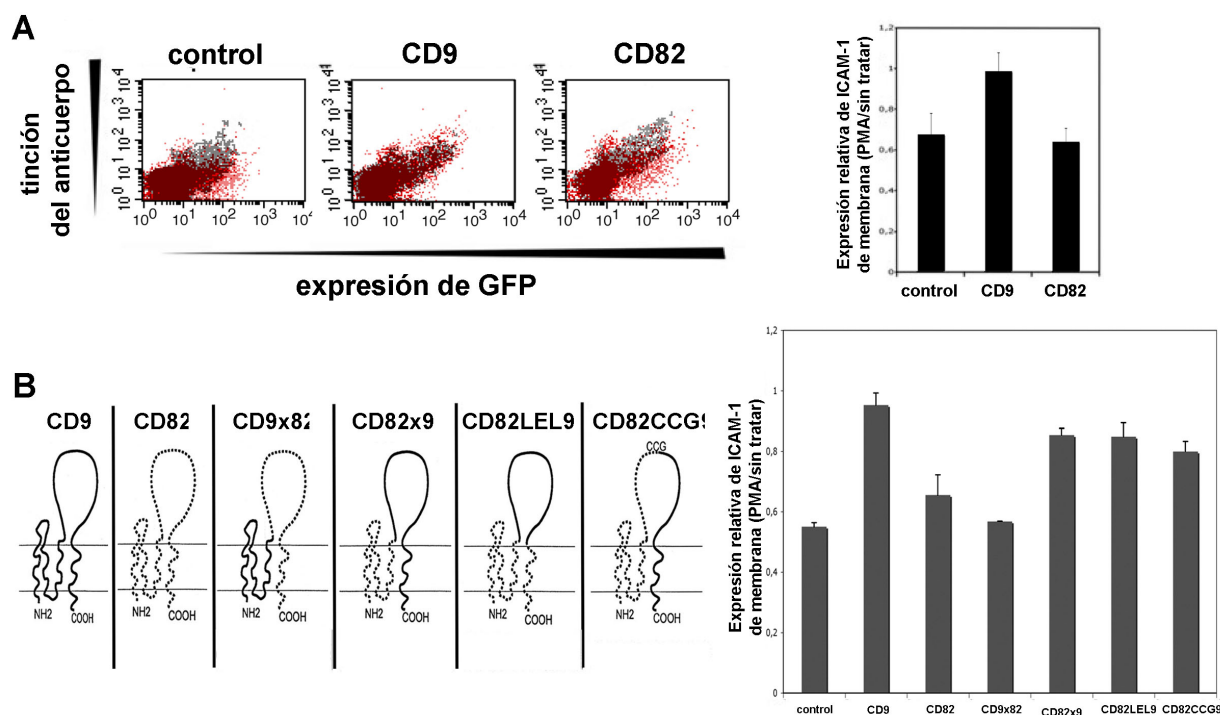


Figura 21: La expresión de novo de CD9 en células Colo320 aumenta la expresión de ICAM-1 en la membrana plasmática. A) Las células Colo320 fueron establemente transfectadas con el vector vacío pcDNA3 o el ADNc para CD9 o para CD82. Además, se transfectó de forma transitoria el ADNc de ICAM-1-GFP en estas células. Los gráficos muestran la expresión de ICAM-1 no cortado, detectado con el anticuerpo anti-ICAM-1 Hu5/3 (eje y), y la expresión de GFP (eje x), que muestra la cantidad de ICAM-1-GFP total transfectado, antes del tratamiento con 20ng/ml de PMA durante 1 hora (puntos grises) o después (puntos rojos). El desplazamiento de la diagonal hacia más expresión de GFP y menos ICAM-1 intacto indica shedding de la molécula. Las barras muestran la expresión relativa de ICAM-1 de transmembrana (en intensidad media de fluorescencia) entre las células tratadas y sin tratar con PMA. Los datos representan la media de tres experimentos más o menos su desviación estándar. **B)** Las células Colo320 fueron establemente transfectadas con el vector vacío pcDNA3 o con el ADNc de CD9, CD82 y de las quimeras de CD9 y CD82 (CD9x82, CD82x9, CD82LEL9 o CD82CCG9) mostradas a la izquierda. Además, estas células fueron transfectadas transitoriamente con ICAM-1-GFP y tratadas o no durante 1 hora con 20ng/ml de PMA, teñidas con el anticuerpo Hu5/3 y analizadas por citometría de flujo. Las barras indican el nivel de expresión relativa de ICAM-1 de transmembrana entre células tratadas o no con PMA. Los datos mostrados son la media más o menos la desviación estándar de cuatro experimentos independientes.

tratadas con TNF- α se reducía tras la interferencia de CD9, y esto tiene un efecto funcional en la capacidad de adherencia y extravasación de los leucocitos (Barreiro et al., 2005). Por ello, decidimos investigar si esa reducción del ICAM-1 de membrana por la desaparición de CD9 en membrana estaba mediada por ADAM-17. Con este fin se transfectaron células HUVEC con ARNpi para CD9 y se trataron, o no, con TNF- α durante 20 horas para aumentar la expresión de ICAM-1 en su membrana. Como se muestra en la **figura 20**, la eliminación de CD9 en las células HUVEC produce un descenso en la expresión de ICAM-1, y esta reducción se revierte con el tratamiento con el inhibidor de ADAM-17 TAPI-2, por lo que todo apunta a que el corte de ICAM-1 en células HUVEC también está mediado por ADAM-17 y CD9 también es capaz de inhibir su función catalítica en esta línea celular.

Ya hemos descrito que la ausencia de CD9 activa a ADAM-17, por lo que el siguiente paso era introducir CD9 en un sistema celular que no la expresase y ver si inhibía ADAM-17. Para ese fin la línea celular de carcinoma humano Colo320, que no expresan ni CD9 ni CD82, fueron transfectadas establemente con el plásmido vacío pcDNA3 o el ADNc para CD9 o CD82 fueron

transitoriamente transfectadas con el ADNc de ICAM-1-GFP. Esta construcción tiene la molécula de GFP en la parte intracelular de la membrana, de tal forma que nos indica el total de ICAM-1 transfectado. Pero si detectamos por citometría de flujo la expresión de ICAM-1 en la membrana con un anticuerpo que reconoce la región extracelular de ICAM-1 (como el Hu5/3) podemos saber si el ICAM-1 es cortado, ya que el nivel de GFP no varía pero si la expresión del anticuerpo Hu5/3, porque al ser cortado la región extracelular es eliminada al medio. De esta forma, en los paneles de citometría (**figura 21A**) con la expresión de GFP en el eje de abscisas y la expresión de Hu5/3 (o ICAM-1 intacto) en el de ordenadas, los datos en la diagonal indican igual expresión entre GFP e ICAM-1 intacto, lo que indicaría que no hay *shedding* de la molécula. El punteado gris indica la

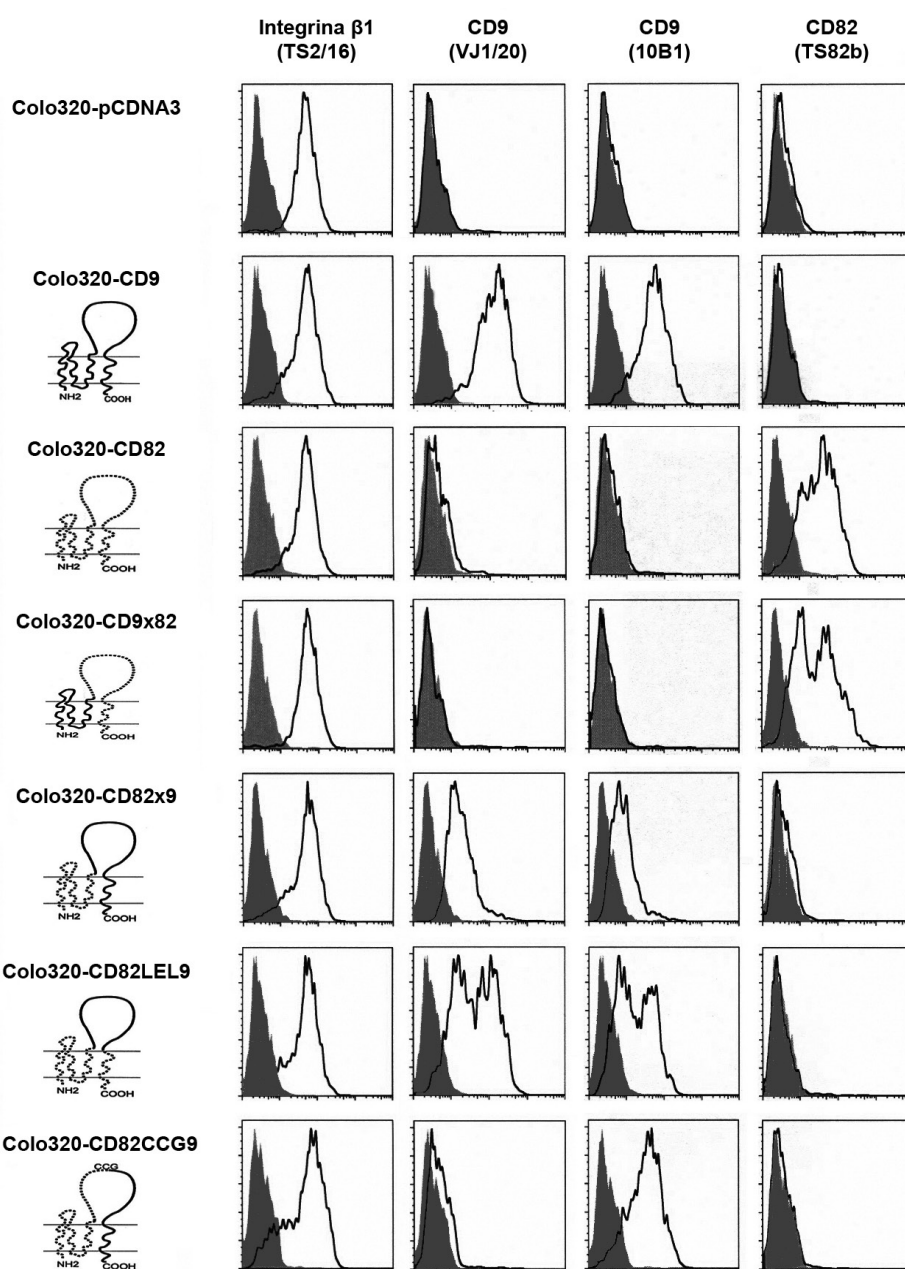


Figura 22: Expresión de las quimeras de CD9 y CD82 en células Colo320. La expresión de las diferentes quimeras fue analizada por citometría de flujo. El perfil negro es el control negativo, y la línea gruesa la expresión de la molécula. El anticuerpo VJ1/20 reconoce la primera parte del LEL de CD9, mientras que el anticuerpo 10B1 reconoce la segunda parte, la región variable, del LEL de CD9. El anticuerpo anti-CD82 usado fue TS82b y el anticuerpo TS2/16, específico para integrinas β_1 , fue usado como control. En el esquema de las quimeras presentado en la izquierda, la línea negra continua corresponde a la secuencia perteneciente a CD9 y la gris discontinua a las secuencias pertenecientes a CD82.

expresión de ambas en células sin tratar con PMA. El punteado rojo indica el tratamiento con PMA (20 ng/ml durante 1 hora), y tanto en las células control como en las transfectadas con CD82 se observa que hay un desplazamiento de la diagonal hacia menor expresión de ICAM-1 intacto, lo que indica que la molécula está siendo cortada en la superficie celular. Sin embargo, en el caso de las células transfectadas con el ADNc de CD9 este desplazamiento no existe, porque CD9 está inhibiendo el corte de ICAM-1 mediado por ADAM-17. En el gráfico de la derecha se puede observar que la cantidad de ICAM-1 intacto en membrana tras el tratamiento con PMA es mayor en el caso de las células transfectadas con CD9, como se observa en los perfiles de citometría.

Para conocer que región de CD9 es responsable de la inhibición de ADAM-17, realizamos un estudio de estructura/función mediante la transfección en la línea celular Colo320 de diferentes quimeras de CD9 y CD82 que presentan diferentes dominios de una u otra molécula (**figura 22**). La construcción CD9x82 tiene toda la secuencia de CD9 hasta el LEL y a partir de ahí es la secuencia de CD82 y CD82x9 al revés. La construcción CD82LEL9, solo tiene el LEL de CD9,

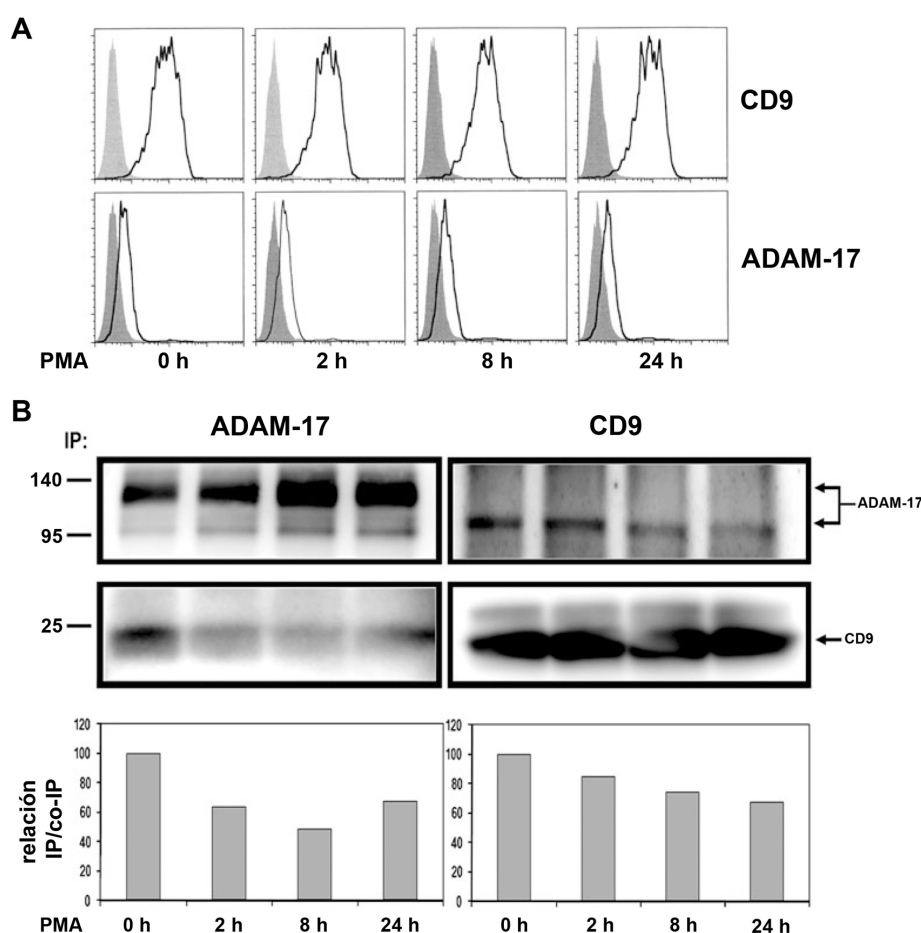


Figura 23: Regulación dinámica entre CD9 y ADAM-17 tras en tratamiento con PMA en células EAhy-926. A) La expresión de CD9 y ADAM-17 en membrana permanece constante tras el tratamiento con 50 ng/ml de PMA durante los tiempos indicados. Los análisis se llevaron a cabo por citometría de flujo con el anticuerpo anti-CD9 VJ1/20 y anti-ADAM-17 H-170. El histograma gris es el control negativo y la línea negra representa la expresión de la molécula. **B)** Células EAhy-926 fueron tratadas con 50 ng/ml durante los tiempos indicados y luego lisadas en 1% Brij 97. Las proteínas CD9 y ADAM-17 fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos VJ1/20 y 2A10 respectivamente. Las moléculas fueron detectadas mediante western blot con anticuerpos específicos para ADAM-17 (H-300, paneles superiores) y para CD9 (VJ1/20, paneles medios). Los pesos moleculares en kilodalton se indican a la izquierda. Paneles inferiores, los ratios entre la molécula inmunoprecipitada y la coimmunoprecipitada fueron calculados mediante densitometría de las bandas. El ratio de asociación en las células sin tratar con PMA fue considerado el 100%. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos..

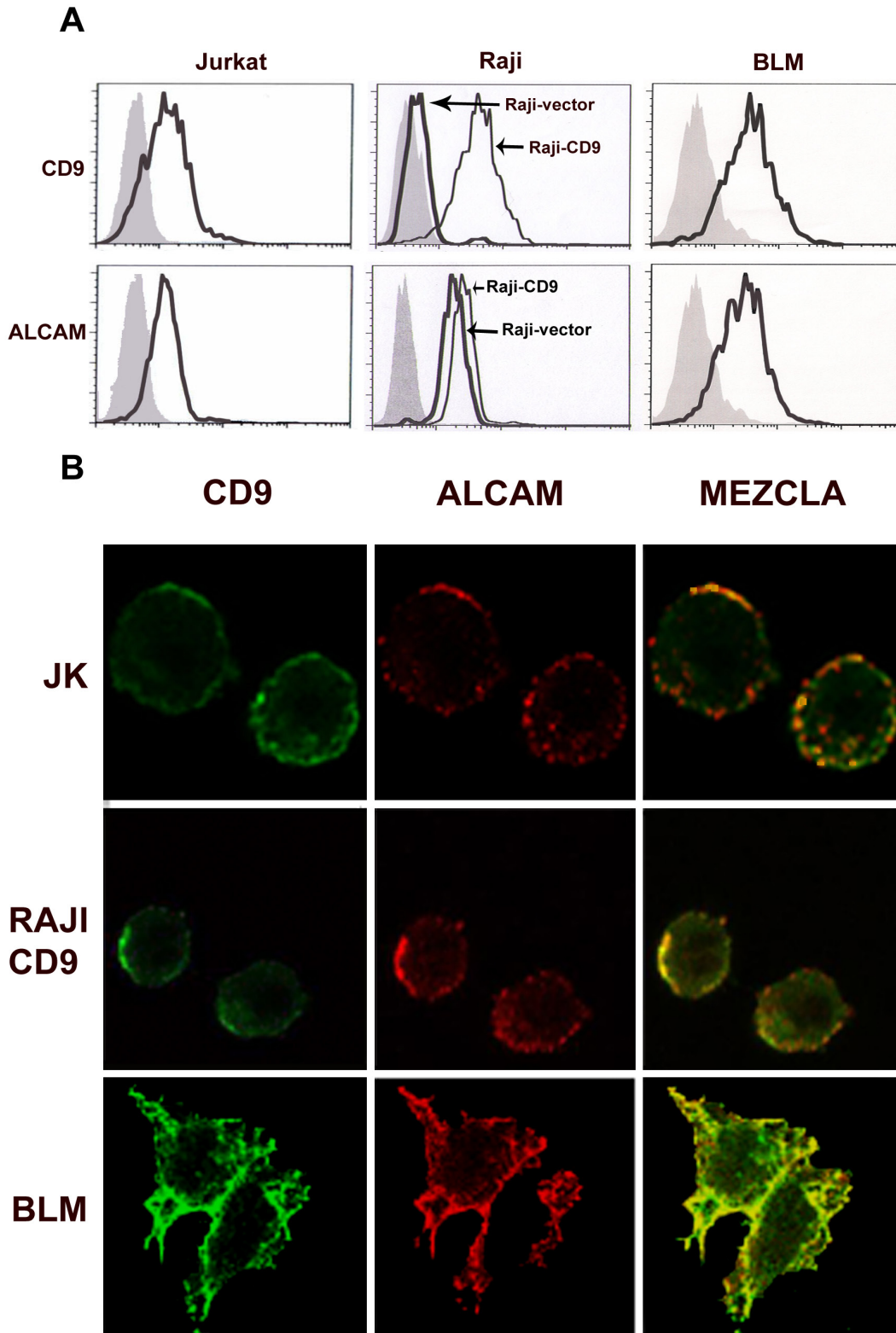


Figura 24: Estudios de colocalización de ALCAM y CD9 en células Jurkat, Raji-CD9 y BLM. A) Expresión de CD9 y ALCAM en células Jurkat, BLM y Raji. El histograma gris representa el control negativo, la línea negra gruesa representa la expresión de la molécula en la célula indicada. En el caso de Raji, la línea fina representa la expresión de la molécula en Raji-CD9, establemente transfectadas con el ADnc de CD9. **B)** Análisis de colocalización de CD9 y ALCAM por microscopía confocal. Las células Jurkat, Raji-CD9 y BLM fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal específico para ALCAM (PAINS-15) seguido de un secundario específico para ratón acoplado a ALEXA 594 (rojo). Para detectar CD9 se utilizó el anticuerpo biotinilado VJ1/20 y un secundario específico de biotina acoplado a ALEXA 488 (verde). Se muestran cortes representativos de 3 experimentos, junto con las imágenes de superposición de canales (mezcla).

y la construcción CD82CCG9 solo tiene la secuencia CD9 a partir de la segunda mitad del LEL, incluyendo el motivo CCG y la región transmembrana. Como se muestra en el gráfico de la **figura 21B**, solo las construcciones que tienen la región del LEL de CD9 (CD9 salvaje, CD9x82 y CD82LEL9) y más específicamente, la segunda parte del LEL hipervariable de CD9 (CD82CCG9), presentan una inhibición del corte y liberación del ICAM-1, como demuestra que la proporción del ICAM-1 intacto entre las células tratadas o no con PMA es próximo a 1, prácticamente no se produce corte y liberación de la molécula. Sin embargo, las construcciones con el LEL de CD82 (CD82 salvaje y CD9x82) sí que presentan *shedding*, como demuestra que su relación de ICAM-1 intacto después y antes del tratamiento con PMA es menor de 1. Por ello podemos concluir que la segunda mitad del LEL de CD9, la región hipervariable, es crucial en el efecto inhibitorio de esta tetraspanina sobre ADAM-17.

Tomando en conjunto los datos mostrados de corte y liberación de TNF- α e ICAM-1, podemos concluir que la asociación de ADAM-17 con la tetraspanina CD9 produce la inhibición de la actividad catalítica de la metaloproteasa para el corte y liberación de dos de sus sustratos (TNF- α e ICAM-1) en diferentes tipos celulares, como monocitos, linfocitos T, células endoteliales y células de colocalización.

Regulación dinámica de la asociación entre CD9 y ADAM-17 tras la estimulación con ésteres de forbol.

La inhibición de ADAM-17 por parte de CD9 debe de estar estrechamente regulada por la maquinaria celular de tal forma que la metaloproteasa pueda llevar a cabo su función fisiológica, y no estar permanentemente inhibida por la tetraspanina. Con el fin de comprobar esta teoría llevamos a cabo experimentos de regulación de la asociación entre las dos moléculas mediante co-inmunoprecipitación en células EAhy-926, tratadas con 50ng/ml PMA durante diferentes tiempos (0, 2, 8 y 24 horas). En la **figura 23A** mostramos que la expresión de estas moléculas no cambia con el tratamiento con PMA. Como se muestra en la **figura 23B**, la relación entre la proteína inmunoprecipitada y la proteína coimmunoprecipitada se reduce con el tratamiento con PMA, llegando hasta un 40% de reducción, lo que indica que la asociación entre CD9 y ADAM-17 es dinámica, reduciéndose la interacción entre las dos moléculas con el tratamiento con PMA.

CD9 y ALCAM interactúan en la membrana de linfocitos T y B.

La tetraspanina CD9 se asocia a las proteínas ICAM-1 y VCAM-1, moléculas de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas (Barreiro et al., 2005) al igual que ALCAM y, a su vez, ha sido descrito que ALCAM es sustrato de ADAM-17 (Bech-Serra et al., 2006). Por estos datos previos nuestra hipótesis de trabajo fue que CD9 y ALCAM se asocian en la membrana celular, que la tetraspanina puede modificar su función y que ADAM-17 también puede tener un papel en la regulación de la función de ALCAM. Como primer abordaje para comprobar la posible interacción entre las moléculas CD9 y ALCAM en la membrana de linfocitos T, linfocitos B y de células de melanoma, que expresan estas dos moléculas (**figura 24A**), se realizaron pruebas de colocalización mediante inmunofluorescencias con tinción de las dos moléculas. En células Jurkat (Jurkat, **figura 24B**), CD9 se distribuye por toda la membrana, con algún agrupamiento puntual, mientras que ALCAM forma agrupamientos en toda la membrana celular como había sido

observado previamente (Nelissen et al., 2000), observándose una colocalización parcial de las dos proteínas en la membrana plasmática. Las células Raji no expresan CD9 en su superficie, pero generamos la línea celular Raji-CD9, establemente transfectadas con el plásmido que contiene el ADNc de CD9 y analizamos si colocalizaban mediante inmunofluorescencia. Se observa un patrón de distribución similar al de Jurkat para CD9 en la membrana plasmática, (Raji-CD9, **figura 24B**) aunque en este caso ALCAM está aún más agrupada. En la línea celular de melanoma BLM (**figura 24B**) también se encuentra una distribución similar de las moléculas en la membrana plasmática, con una concentración de ALCAM en las zonas de unión intercelular, tal y como estaba descrito para células endoteliales (Masedunskas et al., 2006). También se observa la colocalización parcial de CD9 y ALCAM en la membrana plasmática de esta línea celular, principalmente en las zonas de unión intercelular. Estos datos sugieren que CD9 y ALCAM pueden estar interaccionando en la membrana celular de linfocitos T, linfocitos B y células de melanoma.

Para demostrar bioquímicamente la asociación de ALCAM y CD9, las proteínas fueron co-inmunoprecipitadas desde lisados celulares de Jurkat (**figura 25A**) y de Raji-CD9 (**figura 25B**) obtenidos con Brij 97 1%. En ambos casos, en los paneles superiores se observa que ALCAM

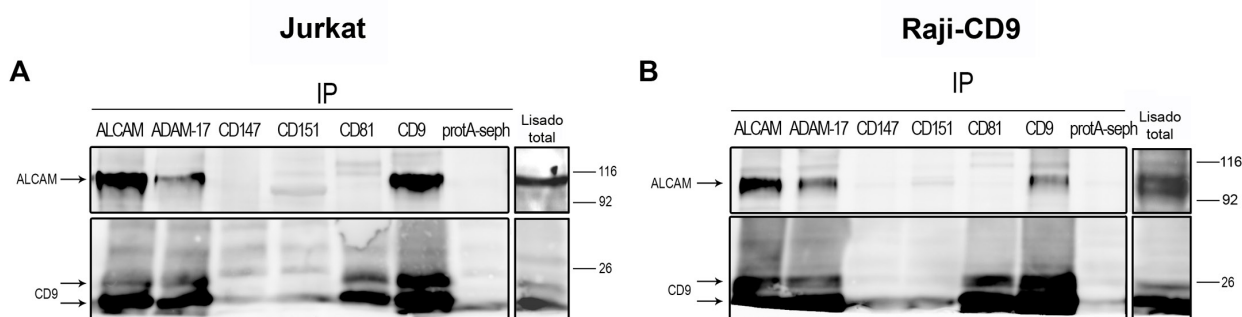


Figura 25: Co-inmunoprecipitación de CD9 y ALCAM. Células Jurkat (**A**) y Raji-CD9 (**B**) fueron lisadas con Brij 97 1%, como se describe en materiales y métodos e inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-ALCAM (PAINS-15), anti-ADAM-17 (2A10), anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD81 (5A6), anti-CD151 (Lia1/1) y anti-CD147 (VJ1/9). Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE no reductora, y detectadas por western-blot con los anticuerpos PAINS-15 biotinilado, que reconoce ALCAM, (paneles superiores) y VJ1/20 biotinilado que reconoce CD9 (paneles inferiores). Los pesos moleculares en kilodalton se indican a la derecha. La imagen es representativa de 5 experimentos independientes.

presenta una banda de unos 110 kDa, y que es coimmunoprecipitado con la tetraspanina CD9 y, como era previsible, con ADAM-17 pues es uno de sus sustratos (Bech-Serra et al., 2006; Rosso et al., 2007). En los paneles inferiores, CD9 se presenta como dos bandas, siendo la superior su forma palmitoilada. Se observa que CD9 es coimmunoprecipitada junto con ADAM-17, como ya hemos descrito, y junto con ALCAM. Como controles de la especificidad de la interacción, se realizaron co-inmunoprecipitaciones con otras proteínas abundantes de la membrana plasmática como CD147/EMMPRIN y la tetraspanina CD151 y no se detecta ninguna interacción de estas proteínas ni con CD9 ni con ALCAM. Así mismo, la tetraspanina CD81, que es muy similar a CD9, no coimmunoprecipita ALCAM, pero si a CD9, puesto que esta descrito que forman heterodímeros entre sí (Kovalenko et al., 2004). Estos datos indican que CD9 y ALCAM se asocian bioquímicamente.

Para analizar si la interacción se daba en la superficie celular, y no en un compartimento intracelular, se realizaron co-inmunoprecipitaciones incubando los anticuerpos con las células vivas, de tal forma que los anticuerpos sólo se unen a las proteínas de la membrana plasmática y no a las moléculas que están en compartimentos intracelulares. Tanto en células Jurkat (**figura 26A**) como en células Raji-CD9 (**figura 26B**) se observa que ALCAM (paneles superiores) es co-inmunoprecipitado con CD9 y con ADAM-17, como en los experimentos anteriores. La tetraspanina CD9 (paneles inferiores) es co-inmunoprecipitada junto con CD81, ADAM-17 y ALCAM. Tanto las co-inmunoprecipitaciones a partir de lisados totales como los experimentos con las células vivas dan un resultado muy similar. Todos estos datos indican claramente que CD9 y ALCAM interactúan, y que esta asociación se produce principalmente en la membrana plasmática, y no en un compartimento intracelular.

Los resultados presentados de colocalización y co-inmunoprecipitación de CD9 y ALCAM sugieren que ambas moléculas pueden ser componentes de los mismos microdominios enriquecidos en tetraspaninas presentes en la superficie de la membrana plasmática. La interacción entre CD9 y ALCAM puede ser directa o a través de moléculas intermediarias, ya que la lisis con Brij 97 1% no es suficientemente fuerte como para eliminar las interacciones débiles, como se ha explicado en la introducción. Con el fin de estudiar más específicamente la interacción entre ambas proteínas decidimos analizar la posible asociación directa entre ALCAM y CD9 mediante experimentos de interacción de proteínas. Como ya se ha comentado en introducción, la mayoría de las interacciones de las tetraspaninas con otras proteínas se realizan a través de su dominio extracelular largo, y por ello usamos esta región de CD9 para estos estudios. La proteína de fusión CD9-LEL-GST (dominio extracelular grande de CD9 unido a GST) y la proteína recombinante ALCAM-Fc (dominio extracelular de ALCAM unido al dominio Fc de la IgG humana) fueron incubadas como se indica en materiales y métodos. En la **figura 27**, se observa que CD9-LEL-GST fue precipitado y pudo ser detectado mediante *western blot* junto con ALCAM-Fc. Curiosamente, ALCAM-Fc también fue capaz de precipitar a los mutantes de CD9-LEL-GST en los que se sustituyeron las cisteínas conservadas C152, C153, C167 y C181, que están implicadas en la formación de puentes disulfuro intracatenarios, por alaninas (C152A, C153A, C167A y C181A-CD9-LEL-GST). Se debe resaltar que en el caso de las construcciones C153A-CD9-LEL-GST y C167A-CD9-LEL-GST, que forman el segundo de los dos puentes disulfuro del LEL de CD9, la co-precipitación fue menos efectiva. A igual cantidad de ALCAM-Fc precipitado hay menos LEL-GST arrastrado, como se muestra en la relación de la proteína precipitada (ALCAM-Fc) frente a la proteína co-precipitada (proteína GST) (**figura 27**, gráfico). Gracias a estos resultados podemos pensar que la estructura del LEL de CD9 sí que está implicada en la interacción de CD9 con ALCAM, al menos en parte, ya que si no está intacta la eficacia de la interacción, y por ello de la precipitación, es menor. Como control negativo se usó la proteína de fusión PAK-CRIB-GST que no interactuó con ALCAM-Fc, así como tampoco lo hicieron otros LEL de otras tetraspaninas como CD151-LEL-GST, CD63-LEL-GST ni CD81-LEL-GST. En resumen, estos resultados indican que CD9 puede asociarse directamente a través de su dominio extracelular largo con el dominio extracelular de ALCAM.

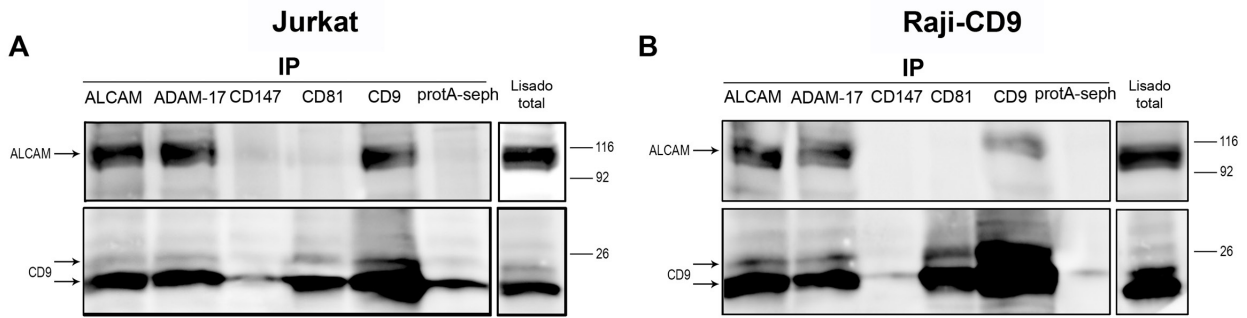


Figura 26: Co-inmunoprecipitación de CD9 y ALCAM realizada en células vivas. Células Jurkat (A) y Raji-CD9 (B) fueron incubadas con los siguientes anticuerpos antes de ser lisadas: anti-ALCAM (PAINS-15), anti-ADAM-17 (2A10), anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD81 (5A6), y anti-CD147 (VJ1/9). Después de lavar el exceso de anticuerpo con PBS, las células fueron lisadas con Brij 97 1%, como se describe en materiales y métodos. Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE no reductora, y detectadas por western-blot con los anticuerpos PAINS-15 biotinilado, que reconoce ALCAM, (paneles superiores) y VJ1/20 biotinilado que reconoce CD9 (paneles inferiores). Los pesos moleculares en kilodalton se indican a la derecha. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

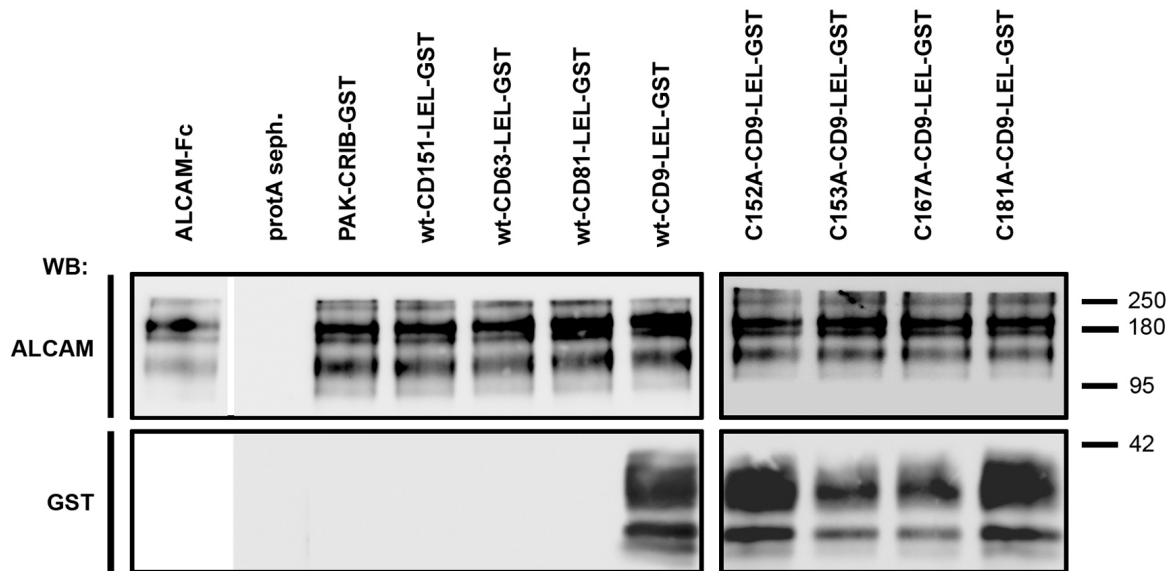
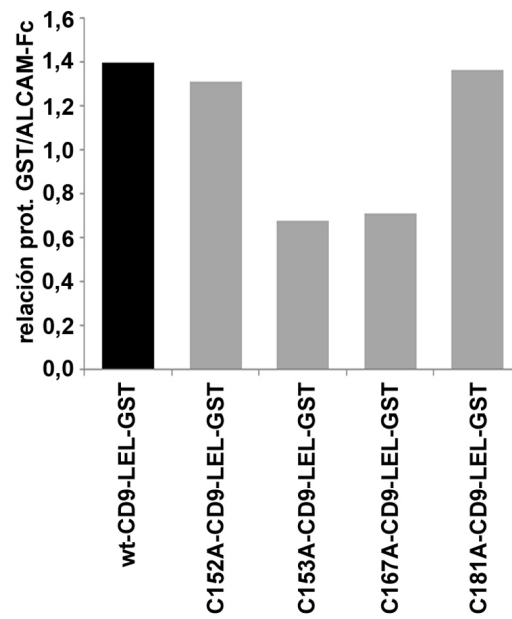


Figura 27: Ensayos de interacción directa entre proteínas. Las proteínas de fusión del LEL de CD9 y sus mutantes de cisteínas por alaninas (CD9-LEL-GST, C152A-CD9-LEL-GST, C153A-CD9-LEL-GST, C167A-CD9-LEL-GST y C181A-CD9-LEL-GST), los LEL de CD81 (CD81-LEL-GST), CD63 (CD63-LEL-GST), CD151 (CD151-LEL-GST) y la proteína de fusión PAK-CRIB-GST, todos unidos a la proteína GST, fueron incubadas con ALCAM-Fc en tampón de unión durante toda la noche como se describe en materiales y métodos. Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE no reductora. En el panel superior se muestra la detección por western-blot con el anticuerpo anti-ALCAM PAINS-15 y el panel inferior la detección con un anticuerpo comercial específico para GST. Los pesos moleculares en kilodalton se indican a la derecha. La imagen es representativa de 4 experimentos. El gráfico indica la relación entre la proteína precipitada (ALCAM-Fc) con la proteína co-precipitada (proteína GST) cuantificada por densitometría.



La tetraspanina CD9 aumenta la capacidad de adhesión homofílica de ALCAM.

Ya está descrito que CD9 modifica la capacidad adhesiva de moléculas de adhesión como integrinas (Berditchevski, 2001; Ovalle et al., 2007), ICAM-1 y VCAM-1 (Barreiro et al., 2005). De esta forma pensamos que la tetraspanina CD9 podría modificar la capacidad de adhesión homofílica de ALCAM. Con este objetivo se llevaron a cabo ensayos de adhesión sobre ALCAM-Fc inmovilizado, como se describe en materiales y métodos. Las células Jurkat transducidas mediante retrovirus con el plásmido control (TR2), son capaces de adherirse a ALCAM-Fc inmovilizado, llegando a valores de adhesión de hasta el 19% (**figura 29** panel izquierdo) de las células iniciales. Sin embargo, las células Jurkat transducidas establemente con un ARNhp específico para CD9 (#35), en el que se ve que la expresión de CD9 es reducida hasta niveles indetectables (**figura 28**), no son capaces de interactuar con ALCAM-Fc inmovilizado. Para corroborar que el efecto observado en la adhesión a ALCAM-Fc no era exclusivo de Jurkat, también se realizaron los ensayos con la línea celular de linfocitos B Raji. Esta línea no expresa CD9 en su membrana y por ello generamos un transfectante estable, Raji-CD9, que sobreexpresa esta tetraspanina (**figura 24A**). Las células Raji-vector transfectadas con el plásmido control pcDNA3 no se adhieren a ALCAM-Fc (**figura 29** panel derecho), mientras que las células Raji-CD9 sí que son capaces de adherirse, con valores de adhesión de hasta el 50% de las células iniciales. Por todos los datos anteriores, podemos decir que CD9 está implicada en la regulación de la adhesión homofílica de ALCAM. Los anticuerpos anti-CD9 (VJ1/20, PAINS10 y PAINS13), que ya está descrito que son agonistas de la función de CD9 (Ovalle et al., 2007), potencian la adhesión de Jurkat TR2 y Raji-CD9 a ALCAM-Fc de manera significativa, mientras que un anticuerpo activador específico de integrinas $\beta 1$ (TS2/16) o frente a la tetraspanina CD151 (Lia1/1) no presentan ningún efecto en la adhesión. Estos datos nos indican que la tetraspanina CD9 está afectando específicamente la capacidad de adhesión homofílica de ALCAM.

Como otro abordaje para demostrar la implicación de CD9 en el aumento de la adhesión homofílica de ALCAM, empleamos el LEL de CD9 soluble (CD9-LEL-GST) para interferir la función de CD9. Esta proteína soluble ya había sido usada anteriormente para interferir la función de CD9 sobre las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 (Barreiro et al., 2005), así como para otras funciones de CD9 como la fusión del óvulo con el espermatozoide (Zhu et al., 2002). En el panel izquierdo de la **figura 30** se observa que el LEL de CD9 inhibe totalmente la adhesión a ALCAM-Fc de las células Jurkat TR2 porque interfiere con CD9 y su efecto sobre ALCAM. En el panel derecho de la **figura 30** se observa que CD9-LEL-GST también inhibe la adhesión de Raji-CD9 a ALCAM-Fc. Como primer paso para demostrar la especificidad del experimento como medida de la adhesión de ALCAM, usamos ALCAM-Fc soluble, que está descrito que inhibe la adhesión mediada por ALCAM (Arai et al., 2002). Realizamos adhesiones de Jurkat transducidas con el plásmido control TR2 en presencia o ausencia de ALCAM-Fc soluble (**figura 30** panel izquierdo) y pudimos comprobar que inhibe la adhesión hasta un 80%, apuntando a que la adhesión esta mediada específicamente por ALCAM. Resultados similares se obtuvieron para las células Raji-CD9 (**figura 30** panel derecho).

La interacción homofílica de ALCAM es de menor afinidad que la interacción heterofílica CD6-

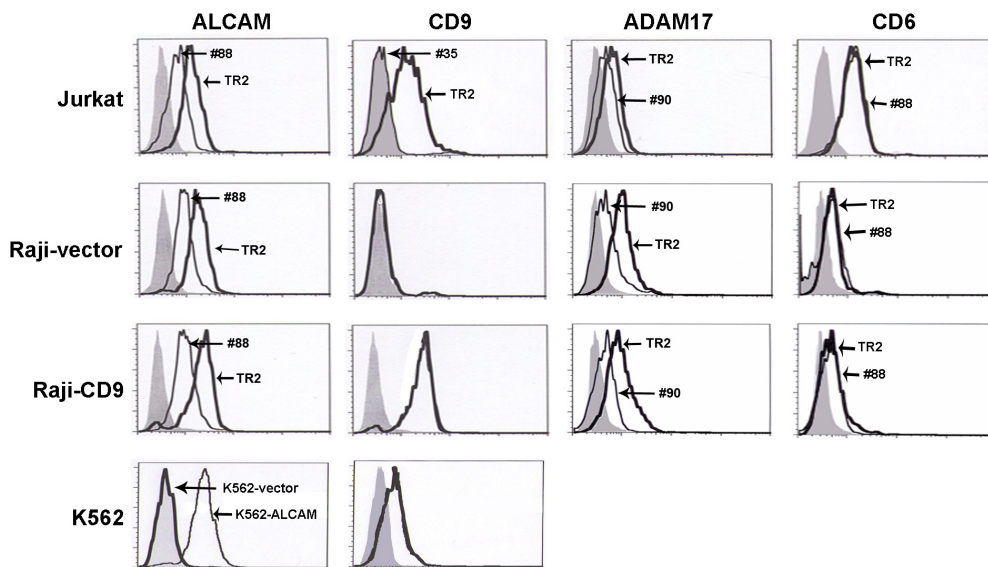


Figura 28: Expresión de moléculas de membrana en los diferentes transfectantes. Las líneas celulares Jurkat, Raji-vector, Raji-CD9 y K562 fueron transfectadas con los plásmidos indicados. La expresión de las moléculas indicadas en la parte superior fue medida por citometría de flujo. El histograma gris es el control negativo, la línea gruesa muestra la expresión de la molécula indicada en la célula transfectada con el plásmido control y la línea negra fina la expresión de la molécula en la célula transfectada con el plásmido indicado.

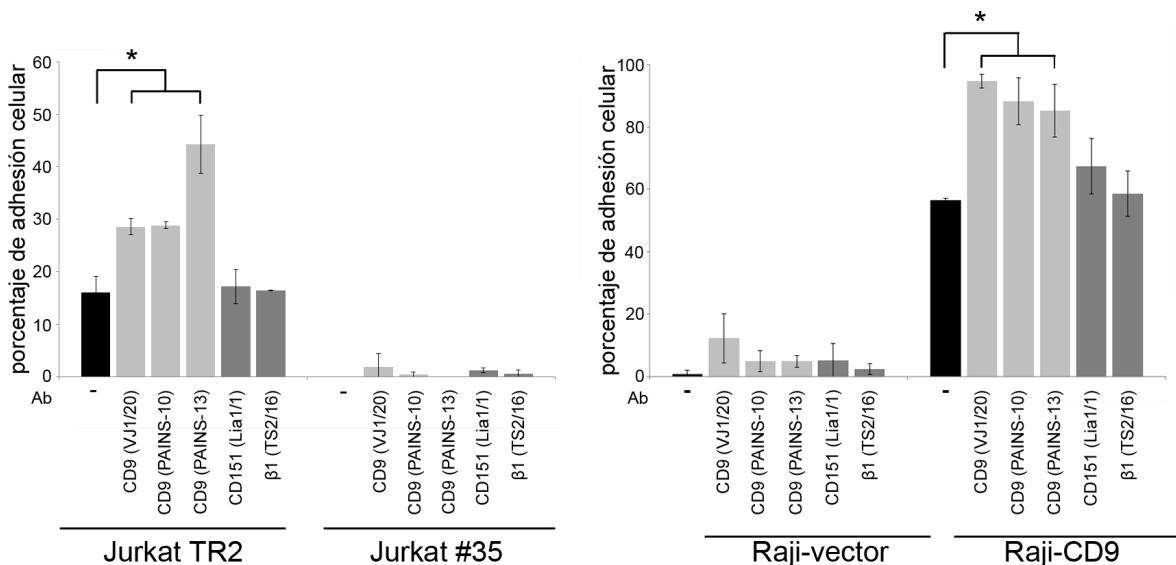


Figura 29: Adhesión a ALCAM-Fc inmovilizado. Adhesión de células Jurkat (panel izquierdo) y Raji (panel derecho) a ALCAM-Fc inmovilizado. Las células Jurkat TR2, Jurkat #35, Raji-vector y Raji-CD9 fueron marcadas con la sonda fluorescente BCECF-AM y posteriormente añadidas sobre 10 µg/ml de ALCAM-Fc inmovilizado, en presencia o ausencia de los anticuerpos indicados a 20 µg/ml, como se describe en materiales y métodos. El número de células presentes antes de lavar fue considerado el 100% de adhesión. Los datos representan la media más menos desviación estándar. El experimento mostrado es representativo de 5 experimentos independientes. * indica una $p < 0,01$, lo que denota que las diferencias en los datos son significativas.

ALCAM, por lo que estas adhesiones podrían estar mediadas por la interacción heterofílica y no por la interacción homofílica. Para eliminar la posibilidad de la interacción heterofílica, realizamos una interferencia de ALCAM en las células Jurkat con el ARNhp específico para CD166 (#88), reduciendo su expresión en membrana un 50% (figura 28). Las células Jurkat #88 no son capaces de adherirse a ALCAM (figura 31 panel izquierdo), de tal forma que cambios en la expresión de

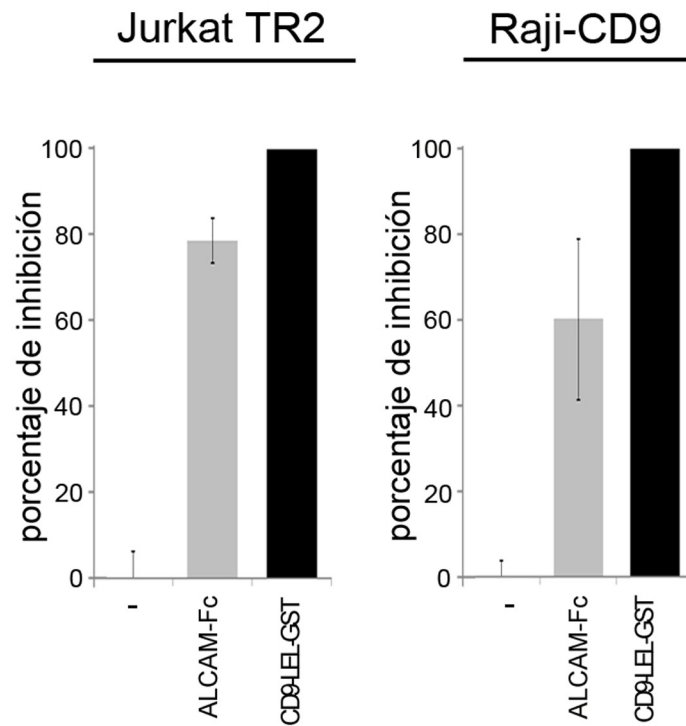


Figura 30: Efecto de ALCAM-Fc y CD9-LEL-GST en la adhesión a ALCAM-Fc. Adhesión de células Jurkat TR2 (panel izquierdo) y Raji-CD9 (panel derecho) a ALCAM inmovilizado (10 µg/ml) en presencia o ausencia de 20 µg/ml de ALCAM-Fc o CD9-LEL-GST. El porcentaje de inhibición fue calculado tomando la adhesión de las células Jurkat TR2 o Raji-CD9 sin tratamiento como 0% de inhibición. Los datos mostrados son la media más y menos desviación estándar. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes.

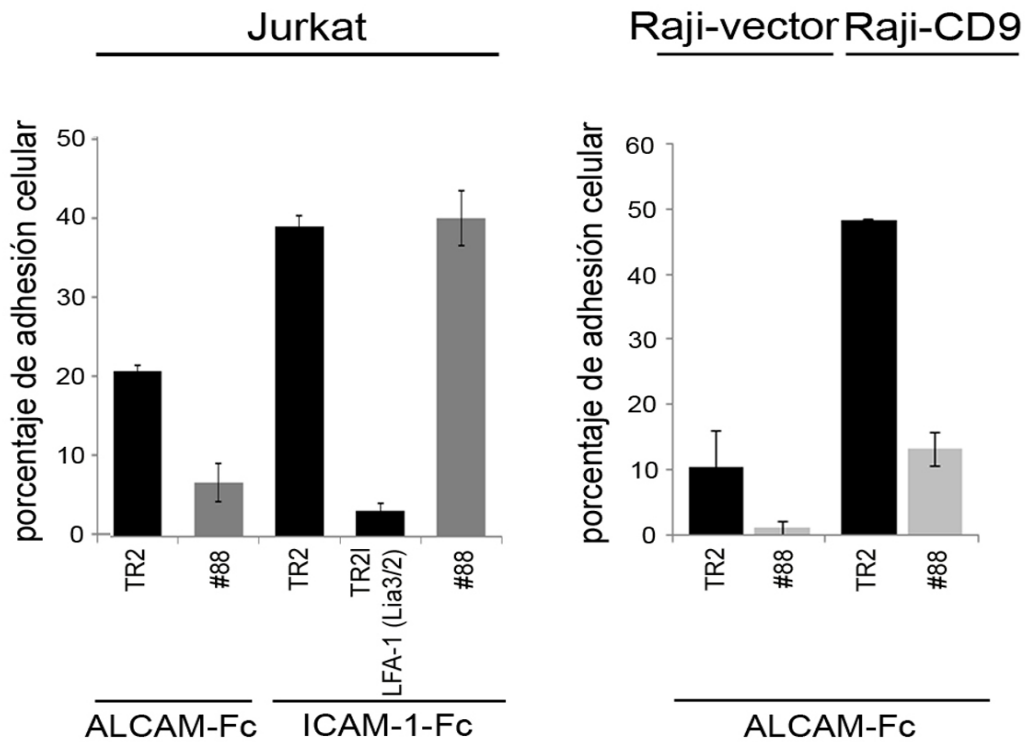


Figura 31: Adhesión a ALCAM-Fc o ICAM-1-Fc inmovilizado de células Jurkat (panel izquierdo) y Raji (panel derecho) silenciadas para la molécula ALCAM. La expresión de ALCAM fue silenciada mediante la transfección del plásmido ARNhp específico para ALCAM (#88). Los datos mostrados se corresponden con la media, más menos la desviación estándar, del porcentaje de adhesión. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes.

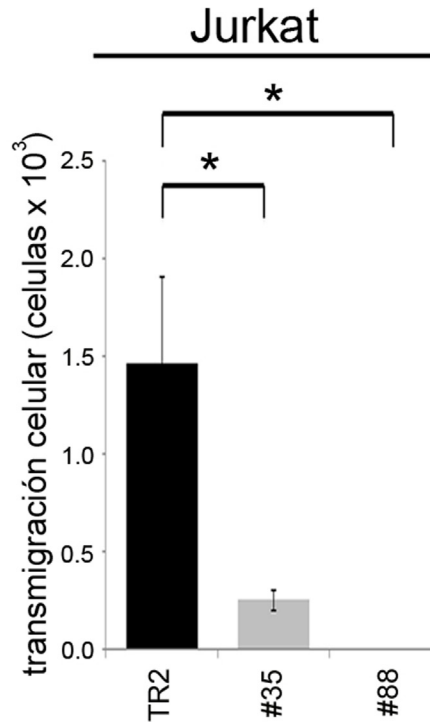


Figura 32: Efecto de CD9 sobre la migración mediada por ALCAM de células Jurkat. Jurkat transducidas con el plásmido control (TR2), el ARNhp específico para CD9 (#35) o el plásmido con el inserto específico para ALCAM (#88), se pusieron en la cámara superior de la cámara modificada de Boyden y se llevó a cabo la migración dirigida a SDF-1 α (6,25 mM) durante 1 hora a 37°C. El recuento de las células que habían migrado a la cámara inferior se llevó a cabo mediante citometría de flujo. En el gráfico se muestra el número de células que han migrado. Los datos mostrados son la media más menos error estándar de la media de 4 experimentos independientes. * ($p < 0,01$), lo que denota que las diferencias en los datos son significativas.

ALCAM, en este caso de tan solo un 50% de reducción, puede disminuir en gran medida la adhesión de estas células a ALCAM inmobilizado. Esto elimina la posibilidad de que la adhesión que estamos observando sea mediada por CD6, ya que la expresión de CD6 no se modifica en estas células (**figura 28**) y si su capacidad de adhesión (**figura 31**). Para demostrar que la capacidad de adhesión de las células Jurkat #88 estaba intacta, realizamos adhesiones sobre otra molécula de adhesión recombinante, en este caso ICAM-1-Fc. Como se muestra en la **figura 31** panel izquierdo, la adhesión de Jurkat a ICAM-1-Fc inmobilizado no se ve afectada por la interferencia de ALCAM, pero si que es inhibida por un anticuerpo monoclonal bloqueante de la adhesión

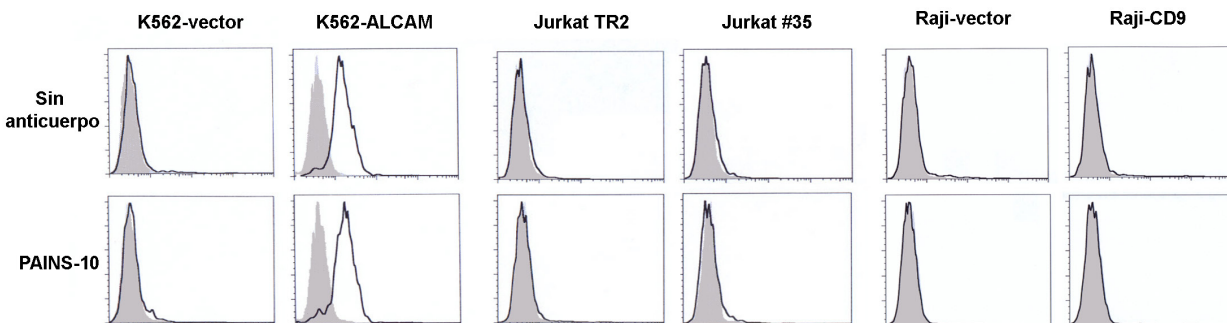


Figura 33: Efecto de CD9 sobre la afinidad de ALCAM. Las siguientes líneas celulares fueron incubadas con ALCAM-Fc soluble como se describe en materiales y métodos: Jurkat TR2 y Jurkat #35, Raji-vector y Raji-CD9 y K562-vector y K562-ALCAM (que expresa ALCAM en su membrana). A continuación se detectó mediante citometría de flujo el ALCAM-Fc unido a las células con un secundario anti-Fc humano acoplado a FITC. Se muestran perfiles de citometría de cada célula, sin tratar o tratado con el anticuerpo monoclonal específico para CD9 PAINS-10 (20 $\mu\text{g/ml}$). El perfil gris es el control negativo y la línea negra es la detección de ALCAM-Fc soluble unido a la célula.

mediada por integrinas β_2 como Lia3/2. Para la interferencia de ALCAM en Raji, realizamos dobles transfectantes, Raji-vector y Raji-CD9 transfectadas con el ARNhp para ALCAM #88 o el plásmido control TR2. De esta forma tenemos el interferente de ALCAM para los dos tipos de transfectantes, con una reducción en la expresión en membrana de ALCAM del 50% (**figura 28**). En el caso de Jurkat no se pueden hacer los dobles interferentes porque todas las construcciones tienen el mismo gen de resistencia y no se puede diferenciar uno de otro plásmido mediante selección con antibióticos. Las células Raji-vector transfectadas con el plásmido que contiene el ARNhp control (TR2) siguen sin tener capacidad de unirse a ALCAM-Fc (**figura 31** panel derecho), así como las células Raji-vector ARNhp específico de ALCAM (#88). En el caso de las células Raji-CD9 control (TR2) sí que se son capaces de unirse a ALCAM-Fc, pero las células Raji-CD9 ARNhp específico de ALCAM (#88) se adhieren mucho menos al sustrato (**figura 31** panel derecho). Estos datos demuestran que los ensayos de adhesión en estos sistemas celulares también están específicamente mediados por la interacción homofílica entre ALCAM de la célula con el sustrato ALCAM-Fc, y no por la interacción heterofílica de CD6 de la célula con ALCAM-Fc inmovilizado.

ALCAM ha sido implicado en procesos de trans migración de monocitos y linfocitos a través de la barrera hematoencefálica, como se ha comentado en introducción. De esta manera pensamos que la presencia de CD9 puede modificar la capacidad de migración de células Jurkat a través de cámaras modificadas de Boyden (*transwell*) recubiertas con ALCAM-Fc. Se realizaron ensayos de migración dirigida hacia la quimiocina SDF-1 α (CXCL12) con los clones de Jurkat TR2 y transducidas con el plásmido con el ARNhp para CD9 #35 (**figura 28**). Como se puede observar

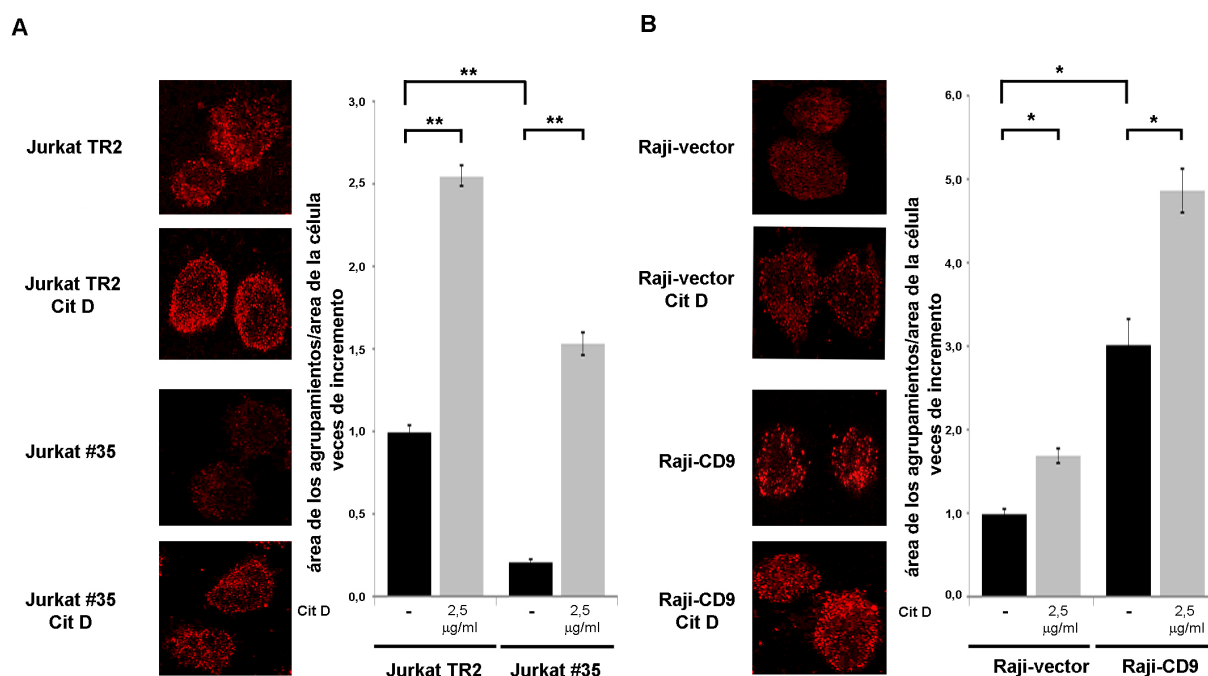


Figura 34: Efecto de CD9 sobre la avididad de ALCAM. A) Jurkat TR2 y Jurkat #35 y B) Raji-vector y Raji CD9, fueron tratadas o no con 2,5 µg/ml de citocalasina D. Se incubaron con el anticuerpo anti-ALCAM PAINS-15 y a continuación con un secundario específico acoplado a ALEXA 594. En las imágenes se muestran proyecciones máximas de intensidad del eje z representativas de 3 experimentos. La cuantificación de los agrupamientos se llevó a cabo con el programa ImageJ. Se representa las veces de incremento entre el área de los agrupamientos dividido entre el área total de la célula, calculadas a partir de Jurkat TR2 o Raji-CD9 sin tratamiento. Los datos son las medias de 3 experimentos independientes más y menos error estándar de la media. * y ** indican una ($p < 0,01$) y ($p < 0,01$) respectivamente, lo que denota que las diferencias en los datos son significativas.

en la **figura 32**, las células que no expresan CD9 migran menos que las células control TR2 de manera significativa. Este experimento es dependiente de ALCAM porque el clon que expresa en su membrana un 50% menos de ALCAM (#88) (**figura 28**), no es capaz de migrar a través del *transwell* recubierto con ALCAM-Fc.

La tetraspanina CD9 aumenta la avidéz de ALCAM y no su afinidad.

La tetraspanina CD9 puede estar regulando la afinidad o la avidéz de ALCAM para producir el aumento en la interacción homofílica de esta molécula. Para conocer si el efecto de CD9 se debe a un aumento de afinidad, se llevaron a cabo ensayos de unión de ALCAM-Fc soluble, como se describe en materiales y métodos. En este experimento, como el sustrato es soluble no hay posibilidad de aumento de avidéz debido a agrupamiento de moléculas, sino que solo está implicada la asociación de una molécula con otra, midiendo específicamente la afinidad de la unión homofílica. Como se muestra en la **figura 28**, la línea celular K562 no expresa ALCAM y no es capaz de unir ALCAM-Fc soluble (**figura 33**). Estas células fueron transfectadas con en ADNc de ALCAM y generamos la línea celular K562-ALCAM que expresa la molécula establemente en su membrana plasmática (**figura 28**) y son capaces de unir ALCAM-Fc soluble (**figura 33**), como ya estaba descrito (van Kempen et al., 2001). Sin embargo, no hay diferencias de unión de ALCAM-Fc soluble entre células Jurkat expresando o no CD9, ni entre células Raji-vector y células Raji-CD9, ya que ninguna de las líneas celulares es capaz de unir la molécula soluble. El tratamiento con anticuerpos específicos para CD9 tampoco modifica la capacidad de unión de ALCAM-Fc soluble. Únicamente esta mostrado el anticuerpo PAINS-10 por resumir, pero ningún otro modifica la afinidad de ALCAM. Estos resultados indican que la regulación de la adhesión de ALCAM por parte de CD9 no es a través de la modificación de la afinidad de ALCAM, sino que parece estar debida a un aumento de avidéz, y no de afinidad.

Ya ha sido descrito que las tetraspaninas regulan la avidéz y el agrupamiento de integrinas y otras moléculas de adhesión (Kinashi, 2005; Sanchez-Mateos et al., 1996; Yanez-Mo et al., 2009). Para demostrar que el efecto de la tetraspanina CD9 en el aumento de la capacidad de adhesión homofílica es debido a un incremento de la avidéz por agrupamiento de ALCAM se llevaron a cabo inmunofluorescencias en células Jurkat y Raji que expresan o no la molécula CD9 para comparar el estado de agrupamiento de las moléculas de ALCAM. Como control, los experimentos se desarrollaron en presencia de citocalasina D (2,5 µg/ml), que despolimeriza los filamentos de actina y aumenta el agrupamiento de ALCAM (Nelissen et al., 2000). En las imágenes (**figura 34A**) se puede observar que las células Jurkat control presentan más agrupamientos de ALCAM que las células Jurkat #35 que no expresan CD9. Se cuantificó el número de macro-agrupamientos en las diferentes líneas celulares, aplicando un umbral de intensidad mínima, de tal forma que solo se seleccionan los agrupamientos más intensos, cuantificando por número e intensidad. De esta forma se observa que las células que expresan CD9 tienen hasta 3 veces y media más número de macro-agrupamientos que las células que no expresan esta tetraspanina. El experimento sí que cuantifica los agrupamientos de ALCAM porque el tratamiento con citocalasina D aumenta el número de agrupamientos en ambos tipos celulares. Para la línea celular Raji (**figura 34B**), en las imágenes también se observan más agrupamientos en las células Raji-CD9 que expresan CD9 comparado con las células control Raji-vector que no expresan esta tetraspanina. En la cuantificación

de macro-agrupamientos para esta línea celular también se comprueba que la presencia de CD9 en la superficie celular aumenta tres veces el número de macro-agrupamientos. Así mismo, la citocalasina D aumenta el número de agrupamientos de ALCAM también en esta línea celular. Todos estos resultados indican que la presencia de CD9 está modificando la avidéz de ALCAM, agrupándolo en la membrana celular de tal forma que es capaz de interactuar homofílicamente,

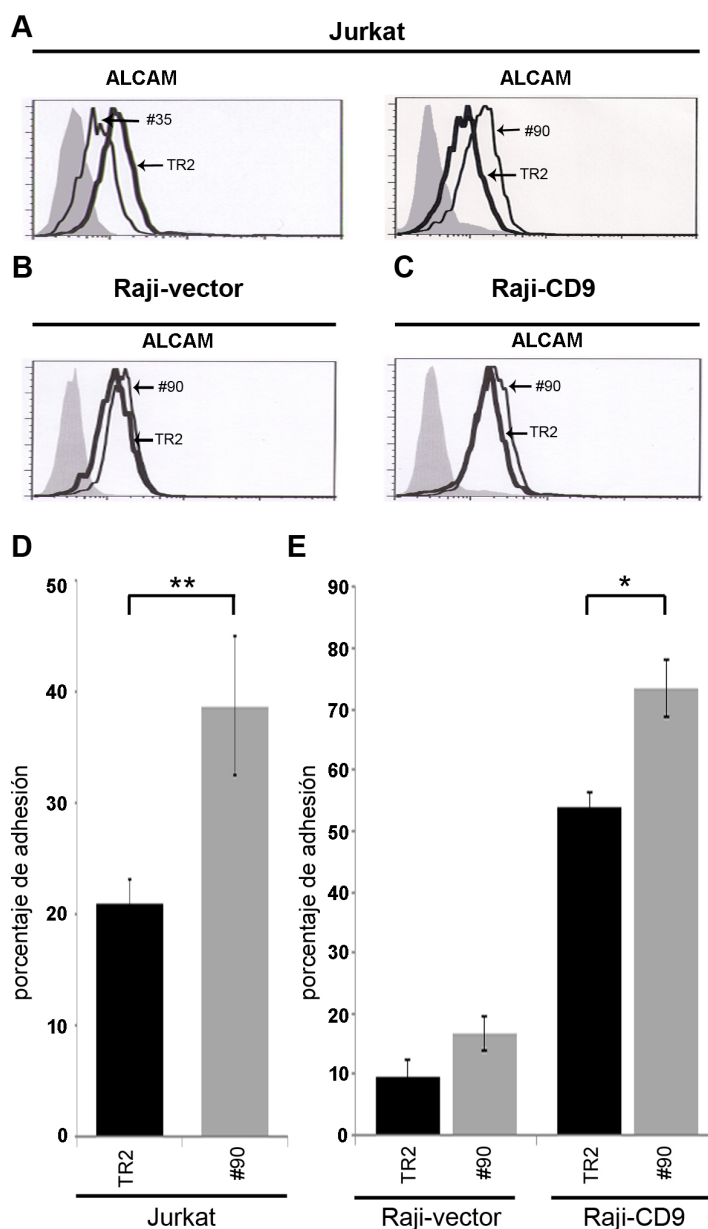


Figura 35: Inhibición de CD9 sobre ADAM-17 y su efecto en la interacción homofílica de ALCAM. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de ALCAM en células Jurkat **(A)**, Raji-vector **(B)** y Raji-CD9 **(C)** transfectadas con los plásmidos indicados. El histograma gris muestra el control negativo, el perfil de línea gruesa representa la expresión de la molécula indicada en la célula transfectada con el plásmido control y la línea negra fina la expresión en el clon transfectado con el plásmido indicado. **D)** Adhesión a ALCAM-Fc inmobilizado de células Jurkat control (TR2), interferidas para ADAM-17 (#90). Se representa el porcentaje de adhesión. Los datos son la media más menos desviación estándar de los porcentajes de adhesión. Se muestra un experimento representativo de 3 pruebas independientes. **E)** Adhesión a ALCAM-Fc inmobilizado de células Raji-vector control (TR2) e interferidas para ADAM-17 (#90) y Raji-CD9 control (TR2) e interferidas para ADAM-17 (#90). Se representa la media más menos desviación estándar del porcentaje de adhesión. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. * y ** indican una ($p < 0,01$) y ($p < 0,01$) respectivamente, lo que denota que las diferencias en los datos son significativas.

mientras que si esta tetraspanina no está presente, ese agrupamiento desaparece parcialmente y ALCAM ya no es capaz de interactuar consigo mismo de manera efectiva.

La tetraspanina CD9 regula la función de ADAM-17 y de su sustrato ALCAM.

Ya hemos descrito que ADAM-17/TACE interacciona con CD9 y que esta asociación inhibe su actividad catalítica. Así mismo está publicado que ALCAM/CD166 es sustrato de ADAM-17 (Bech-Serra et al., 2006). Para determinar el papel de ADAM-17 como intermediaría entre CD9 y ALCAM, se realizaron interferentes de ADAM-17, mediante la transducción de ARNhp específico para TACE (#90) en las células Jurkat, Raji-vector y Raji-CD9. La función de ADAM-17 es cortar los sustratos de membrana y liberarlos al medio, y ya hemos descrito que CD9 inhibe a esta molécula y su presencia aumenta los niveles de TNF- α de membrana en la superficie de células Jurkat y THP-1 (**figura 18**). De esta forma pensamos que la expresión de ALCAM en la membrana también podría estar aumentada en células Jurkat TR2 respecto a Jurkat #35 que no expresan CD9 (**figura 35A**), y en células Raji-CD9 respecto a las Raji-vector que tampoco expresan CD9 en su membrana plasmática (**figura 24A**), y en efecto, la presencia de CD9 produce una mayor expresión de ALCAM. La eliminación de tan solo el 50% de la expresión de ALCAM en la membrana plasmática gracias al ARNhp específico para ALCAM reduce en gran medida la adhesión a ALCAM-Fc inmovilizado en placa (**figura 31**).

De esta forma, los cambios en la expresión de ALCAM debido a la presencia de CD9 y su inhibición de ADAM-17 pueden aumentar la adhesión a ALCAM-Fc inmovilizado por la mayor expresión de la molécula. Estos datos nos sugirieron que debíamos realizar adhesiones con los clones interferentes para ADAM-17 sobre ALCAM-Fc inmovilizado para ver el efecto de esa subida de ALCAM de membrana en la adhesión. En efecto, el clon #90 de Jurkat que expresa un 50% menos de ADAM-17 en su membrana (**figura 28**) y más ALCAM en su membrana plasmática que el control TR2 (**figura 35A**), también presenta mayor capacidad de adhesión a ALCAM-Fc que el control Jurkat TR2 (**figura 35D**). En las células Raji, volvimos a hacer los dobles interferentes, de tal forma que generamos Raji-vector #90, interferida para ADAM-17 en un 50% y con el plásmido control TR2, y Raji-CD9 Tr2 y Raji-CD9 #90, también con una bajada de ADAM-17 en su membrana del 50% (**figura 28**). En ambos interferentes para ADAM-17 hay una mayor expresión de ALCAM en la membrana (**figura 35B y C**). En la **figura 35E** se puede observar que ni Raji-vector TR2 ni Raji-vector #90 se unen a ALCAM-Fc (aunque en este último sí que se observa un ligero aumento), mientras que Raji-CD9 #90 es capaz de unirse a ALCAM-Fc con mayor eficacia que Raji-CD9 TR2. Estos datos, junto con los de la regulación de avidéz por CD9, apuntan a que CD9 regula la interacción homofílica de ALCAM mediante dos mecanismos: por un lado aumenta su avidéz mediante su agrupamiento en la membrana plasmática; y por otro lado, como CD9 inhibe a ADAM-17, la expresión de ALCAM esta aumentada en membrana plasmática, lo que favorece la adhesión por aumento de moléculas disponibles.

La tetraspanina CD9 regula la activación de células T a través de la interacción heterofílica de ALCAM.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, ALCAM es una molécula co-estimuladora para la activación de linfocitos T a través de su interacción heterofílica con CD6. Ambas moléculas son reclutadas hacia el cSMAC y participan en la sipnasis inmunológica (Gimferrer et al., 2004; Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006). Los experimentos de activación de células T fueron llevados a cabo para estudiar la implicación de CD9 en la regulación de la interacción heterofílica de ALCAM en la CPA con CD6 en la membrana del linfocito T. Para ello estudiamos la expresión de CD69 y CD25, dos marcadores típicos de activación de linfocitos, en las células T Jurkat después de ser activadas por la formación de conjugados con células Raji, expresando CD9 (Raji-CD9) o transfectadas con el vector vacío (Raji-vector) y cargadas, o no, con el superantígeno SEE. Las células Raji con expresión de CD9 son más eficientes en activar a las células Jurkat, puesto que la expresión de CD69 (**figura 36A**) y CD25 (**figura 36B**) es superior de manera significativa que en las células sin expresión de CD9. La dependencia de ALCAM en el lado de la CPA fue demostrada por el silenciamiento de esta molécula en las células Raji que expresan CD9 (**figura 28** Raji-CD9 #88). Estas células son menos eficientes que las células Raji-CD9-TR2 en activar al linfocito T. Este sistema es dependiente de la interacción heterofílica de ALCAM porque el silenciamiento de esta molécula en células Jurkat (**figura 28** Jurkat #88) no afecta a su activación, por lo que CD6 es la molécula implicada en el lado del linfocito T. Estos datos sugieren que CD9 también regula la interacción heterofílica de ALCAM con CD6, con repercusión funcional en la activación de linfocitos T.

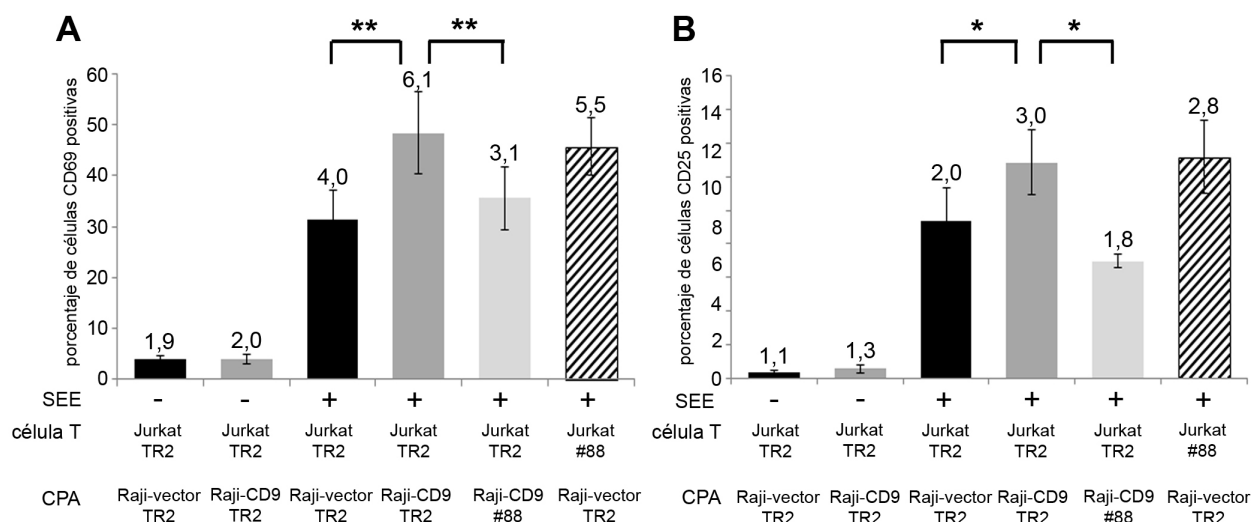


Figura 36: La activación de células T mediada por ALCAM esta regulada por CD9. Células Raji-vector-TR2, Raji-CD9-TR2 o los interferentes para ALCAM Raji-CD9-#88 fueron cargadas o no con 2,5 µg/ml de SEE y posteriormente co-cultivadas con células Jurkat (transducidas con el plásmido control TR2 o con el plásmido que contiene el ARNhp específico para ALCAM (#88)) durante 72 horas a 37°C como se indica en cada columna. La expresión de CD69 (**A**) y CD25 (**B**) fue cuantificada por citometría de flujo. Los datos mostrados en las barras son los porcentajes de células activas que expresan la molécula. Los datos son la media más o menos el error estándar de la media de 4 experimentos independientes. Los números en la parte superior de las barras representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la molécula relativa a su control de isotipo, mostrado como otro parámetro para cuantificar la expresión de la molécula. * y ** indican una ($p < 0,01$) y ($p < 0,01$) respectivamente, lo que denota que las diferencias en los datos son significativas.



DISCUSIÓN

La tetraspanina CD9 se asocia con la metaloproteasa ADAM-17 y regula su función.

El fenotipo de los ratones TACE^{ΔZn/ΔZn} (con una mutación en el dominio catalítico que genera una proteína inactiva) y las células que derivan de ellos, muestran que ADAM-17 es esencial en el desarrollo y es responsable del *shedding* de un gran número de proteínas de transmembrana con diferentes funciones (Black, 2002; Edwards et al., 2008; Mezyk et al., 2003). Con esta amplia variedad de sustratos, la actividad de ADAM-17 debe de estar muy regulada por la maquinaria celular. Sin embargo, los mecanismos implicados en esta regulación permanecen poco conocidos.

En esta tesis describimos que la tetraspanina CD9 interacciona directamente con la metaloproteasa ADAM-17 y que esta asociación resulta en una regulación de la actividad catalítica de la enzima para el corte de dos de sus sustratos (TNF- α e ICAM-1). Los estudios de co-localización, PLAs y co-inmunoprecipitación indican que las dos proteínas se asocian en células monocíticas y endoteliales. Los ensayos de *pull-down* y *cross-linking* demuestran que esta interacción es directa y en la superficie celular, con la implicación del LEL de CD9 y la región extracelular de ADAM-17. Las integrinas de la subfamilia β_1 también forman parte de estos complejos como se demuestra en los ensayos de co-inmunoprecipitación. Estos resultados concuerdan con la interacción entre ADAM-17 y la integrina $\alpha_5\beta_1$ descrita previamente (Bax et al., 2004).

El prodominio de ADAM-17 debe ser eliminado para obtener la forma catalíticamente activa, o madura de ADAM-17. Este proceso se produce en el aparato de Golgi, y la mayoría de la proteína presente en la membrana plasmática es la forma madura. En los ensayos de co-inmunoprecipitación se observa que ambas formas, madura e inmadura, de ADAM-17 son co-inmunoprecipitadas con CD9 e integrinas β_1 . Sin embargo, cuando se lleva a cabo el *cross-linking* de proteínas de la superficie celular, sólo la forma madura de ADAM-17 es co-inmunoprecipitada con CD9, demostrando que es la forma madura de ADAM-17 la que principalmente se asocia con la tetraspanina, aunque no se descarta que parte de la asociación entre estas proteínas se da también en algún compartimento intracelular, puesto que CD9 también se asocia a la forma inmadura, como se observa en los experimentos de co-inmunoprecipitación.

Ya se ha comentado que la mayoría de las interacciones entre tetraspaninas y otras proteínas se produce a través del LEL de las tetraspaninas, cuya estructura es mantenida por puentes disulfuro (Hemler, 2003). De esta forma hemos observado que el LEL de CD9 es capaz de interactuar directamente con TACE-Fc, lo que demuestra que esta asociación es directa, y no mediada por proteínas intermediarias. Estudios de la interacción de ADAM-17 con mutantes del LEL de CD9 en el que los residuos de cisteínas implicados en la formación de los puentes disulfuro han sido sustituidos por alaninas, demuestran que, al menos en parte, se necesita una estructura intacta del LEL para la correcta interacción entre CD9 y ADAM-17. De esta forma, los mutantes de las cisteínas que forman el puente disulfuro entre el principio del LEL (N-terminal) hasta su región central (C153A y C167A), reducen la interacción entre CD9 y ADAM-17, indicando que se requiere una estructura terciaria intacta para la correcta asociación entre las dos proteínas. Sin embargo, mutantes para los otros dos residuos de cisteína (C152A y C181A) que forman el segundo puente disulfuro entre el principio (N-terminal) y el final (C-terminal) del LEL no modifican la interacción entre CD9 y ADAM-17. Estos resultados están de acuerdo con otros datos publicados previamente,

en el que los mutantes en C152/C153 tienen poco efecto en procesos mediados por CD9 como infección por VIH (Ho et al., 2006) o fusión del óvulo con el espermatozoide (Higginbottom et al., 2003). Estos datos parecen indicar que los diferentes procesos en los que CD9 está implicado pueden estar mediados por diferentes regiones del LEL de CD9, y que solo algunas son sensibles a la modificación de la estructura terciaria del LEL de CD9. La importancia del LEL de CD9 en la regulación de ADAM-17 ha sido comprobada también mediante la transfección en células Colo320 de quimeras que expresan parte de la estructura de CD9 y de CD82. De esta forma, solo las quimeras que presentan el LEL de CD9; y específicamente la región variable del mismo, y no otra región de CD9, son capaces de inhibir el corte de ICAM-1 en la superficie de las células Colo320 transfectadas. En los ensayos de interacción directa entre proteínas se observa que el LEL de CD81 es capaz de interactuar con ADAM-17, y no así en el resto de los ensayos bioquímicos. Esto puede ser debido a que como CD81 es la tetraspanina más homóloga a CD9, e incluso forman heterodímeros en la membrana plasmática, podría permitir una interacción cuando ambas proteínas están aisladas, pero en un contexto celular, con otras proteínas implicadas, no se produce esta interacción. El hecho de que anticuerpos específicos para esta tetraspanina no afecten la actividad de ADAM-17, indican que CD9 es la tetraspanina que regula a ADAM-17.

Hemos mostrado que la asociación entre CD9 y ADAM-17 tiene una repercusión funcional en la inhibición de la actividad metaloproteasa de ADAM-17 para sus sustratos TNF- α e ICAM-1. El tratamiento de células leucocitarias con anticuerpos anti-CD9 agonistas para su función reduce significativamente la liberación al medio de TNF- α , tanto en sistemas estimulados con PMA como en otros sistemas más fisiológicos para estimular la liberación de TNF- α soluble como el contacto con células T o PBLs tratados con IL-15. Así mismo, la sobreexpresión de CD9 inhibe la liberación de la citoquina soluble, así como su silenciamiento aumenta el *shedding* de TNF- α . De esta forma se puede concluir que CD9 inhibe la actividad catalítica de ADAM-17 para la liberación de TNF- α . Esto concuerda con nuestra hipótesis de que la inhibición de ADAM-17 por parte de CD9 podía ser el mecanismo responsable del aumento del TNF- α de membrana en células de colcanceroma y el consiguiente efecto en migración y tumorigénesis como ya ha descrito nuestro grupo previamente (Ovalle et al., 2007).

ICAM-1 es sustrato de ADAM-17 (Tsakadze et al., 2006), y hemos mostrado que CD9 también inhibe la actividad de ADAM-17 para este sustrato, tanto en células monocíticas THP-1, como linfocitos T Jurkat, células de carcinoma humano Colo320, o células endoteliales HUVEC. Previamente había sido descrito que CD9, junto con otras tetraspaninas, estaba implicada en la regulación de ICAM-1 y VCAM-1 para la trans migración de leucocitos. Se conoce que el silenciamiento de CD9 reducía los niveles de ICAM-1 en las células endoteliales pero se desconocía el mecanismo (Barreiro et al., 2005). Los resultados obtenidos para la expresión de ICAM-1 en células HUVEC en las que el silenciamiento de CD9 reduce la expresión de ICAM-1 y este es revertido por el inhibidor relativamente específico de ADAM-17 TAPI-2, apuntan a que la expresión de ICAM-1 en la superficie de estas células endoteliales está regulada por CD9 a través de la inhibición de ADAM-17, presentando efectos en la trans migración de leucocitos.

La función clave de las tetraspaninas es la de formar complejos de proteínas en la membrana plasmática para facilitar la función de sus integrantes, entre los que se encuentran

receptores, moléculas de adhesión y otras metaloproteinasas (Charrin et al., 2009; Yanez-Mo et al., 2009). La regulación de ADAM-17 por parte de CD9 presentada en este trabajo es otro ejemplo de modulación de la función de una proteína al ser incluida en microdominios ricos en tetraspaninas. Desconocemos el mecanismo específico por el cual CD9 inhibe a ADAM-17, aunque existen varias posibilidades. Puede ser que la asociación con el LEL de CD9 produzca cambios conformacionales en la estructura de ADAM-17 lo que inhiba su actividad metaloproteasa. Esto ya ha sido descrito para la integrina $\alpha_3\beta_1$, puesto que su asociación con la tetraspanina CD151 induce un cambio conformacional que produce una mayor afinidad por su ligando (Nishiuchi et al., 2005). Otro posible mecanismo es que CD9 regule la inclusión de ADAM-17 y de sus sustratos en TEMs, lo que podría reducir, o aumentar, la accesibilidad de los sustratos para la enzima. Un tercer mecanismo posible sería la regulación de la asociación entre CD9 y ADAM-17 mediante señales intracelulares. Los datos de la asociación dinámica entre CD9 y ADAM-17 tras el tratamiento con PMA pueden explicar como ADAM-17 está activa pese a la presencia de CD9, ya que se disocia temporalmente de la tetraspanina. Sin embargo, se necesitan más datos para poder elucidar el mecanismo por el cual CD9 inhibe a ADAM-17.

Arduise *et al.* (Arduise et al., 2008) han publicado que diferentes tetraspaninas se unen a ADAM-10/Kuzbanian, el miembro más homólogo a ADAM-17 en el contexto de los TEMs. En el estudio muestran que diferentes anticuerpos específicos para las tetraspaninas CD9, CD81 y CD82 estimulan la liberación dependiente de ADAM-10 de TNF- α y EGF, siendo este otro sistema de la regulación de la actividad catalítica de una ADAM por tetraspaninas. En su sistema celular (Raji-vector y Raji-CD9) los anticuerpos anti-CD9 estimulan la liberación de TNF- α soluble, lo que contrasta con el efecto inhibitor de los anticuerpos anti-CD9 de nuestro trabajo. Los autores describen que el corte y liberación constitutivo (sin estimular) de las moléculas es dependiente de ADAM-10, mientras que la actividad metaloproteasa inducible es dependiente de ADAM-17. Nosotros hemos utilizado el mismo sistema celular para ver el efecto de nuestros anticuerpos y hemos podido comprobar que nuestros anticuerpos anti-CD9 estimulan la liberación de TNF- α en células Raji-CD9 sin estimular, mientras que mantienen su efecto inhibitor cuando las células son estimuladas con PMA, que según Arduise *et al.* es un sistema dependiente de ADAM-17. En Raji-vector, que no expresan CD9 en su superficie celular, los anticuerpos lógicamente no presentan ningún efecto. Por lo tanto los dos trabajos demuestran que el *shedding* constitutivo de TNF- α es dependiente de ADAM-10 y es incrementado por CD9 mientras que el *shedding* estimulado con PMA es dependiente de ADAM-17 y es inhibido por CD9. Hay que resaltar que el efecto inhibitor de CD9 sobre ADAM-17 que hemos descrito no está restringido ni a un sistema celular (hemos utilizado células THP-1, Jurkat and Raji-CD9) ni a un solo sustrato (hemos cuantificado TNF- α e ICAM-1). De esta forma, aunque ADAM-10 y ADAM-17 comparten muchos sustratos (EGF, TNF- α , receptor de IL-6, etc.) el mecanismo de regulación de su accesibilidad y su procesamiento proteolítico por parte de una ADAM u otra es diferente.

En los últimos años se han publicado ejemplos de regulación de metaloproteasas por tetraspaninas, como la regulación de ADAM-10 por la tetraspanina TSPAN-12 en el corte del precursor amiloide. En este caso la tetraspanina aumenta la actividad de ADAM-10, con gran repercusión en enfermedad de Alzheimer (Xu et al., 2009). Otra metaloproteasa no perteneciente a las ADAMs como MT1-MMP también está regulada por la tetraspanina CD151 en células

endoteliales (Yanez-Mo et al., 2008) y por las tetraspaninas CD9, CD81 y TSPAN-12 en cáncer (Lafleur et al., 2009). La regulación de la actividad catalítica de las metaloproteasas por parte de las tetraspaninas esta emergiendo como un nuevo campo de investigación con una gran importancia por la diversidad de sustratos que procesan estas metaloproteasas con papeles claves en diferentes procesos fisiológicos y patológicos.

CD9 se asocia con ALCAM y regula su función, con la participación de ADAM-17.

ALCAM es una molécula de adhesión perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Puede interactuar con CD6 a través de interacciones heterofílicas (ALCAM-CD6), implicadas en presentación de antígeno, o mediante interacciones homofílicas (ALCAM-ALCAM), implicadas en migración, crecimiento tumoral y extravasación de leucocitos, como se ha comentado en introducción. Pese a que sus interacciones y funciones son muy conocidas, la regulación de estos procesos aún se desconoce.

Basándonos en los estudios de co-localización y co-inmunoprecipitación podemos concluir que la tetraspanina CD9 interactúa directamente con ALCAM en la superficie celular de leucocitos y células de melanoma. Así mismo observamos que ADAM-17 forma parte de esos complejos como se observa en las co-inmunoprecipitaciones. Este resultado era previsible ya que hemos descrito que ADAM-17 se asocia con CD9 y ha sido descrito por otros grupos que ALCAM es sustrato de esta metaloproteasa (Bech-Serra et al., 2006; Rosso et al., 2007). Los experimentos de interacción proteína-proteína han revelado que la interacción entre las dos moléculas es directa, mediada por el LEL de CD9 y la región extracelular de ALCAM. Como ya se ha mencionado para el caso de CD9 y ADAM-17, la mayoría de las interacciones entre las proteínas y las tetraspaninas son a través del LEL (Hemler, 2003). La interacción de ALCAM con CD9 también es parcialmente sensible a la estructura terciaria del LEL, ya que mutantes para las cisteínas que forman el puente disulfuro entre el principio del LEL (N-terminal) hasta su región central (C153A y C167A) reducen la interacción entre las moléculas, y no así los mutantes para las dos cisteínas que forman el segundo puente disulfuro entre el principio (N-terminal) y el final (C-terminal) del LEL (C152A y C181A), como en el caso de la interacción entre CD9 y ADAM-17. Una estructura intacta de LEL de CD9 es necesaria para la correcta interacción entre las dos moléculas, y como parece que ADAM-17 también esta en estos complejos, que los requerimientos estructurales sean similares para la correcta interacción con CD9 de ambas moléculas puede reforzar esta hipótesis.

Los experimentos de adhesión a ALCAM-Fc inmovilizado sobre plástico han demostrado que CD9 esta implicada en la regulación de la adhesión homofílica de ALCAM, ya que el silenciamiento de esta molécula en células Jurkat revierte su capacidad de adhesión a la molécula inmovilizada, mientras que la sobreexpresión de CD9 en las células Raji permite su adhesión a ALCAM-Fc inmovilizado. Al estar asociado a CD9, ALCAM tiene mayor capacidad de adhesión.

Un mecanismo para la regulación de la capacidad de adhesión de ALCAM por parte de CD9 puede ser un aumento de la afinidad o de la avidéz de las moléculas, como ya esta demostrado para otras moléculas de adhesión como las integrinas (Sanchez-Mateos et al., 1996; Stewart et al., 1996). Para ALCAM no se ha descrito ninguna modificación en la afinidad de moléculas independientes (van Kempen et al., 2001; Zimmerman et al., 2006), sin embargo, la formación

de agregados de ALCAM mediada por el citoesqueleto de actina ha sido descrita como clave en la regulación de la interacción homofílica de ALCAM (Nelissen et al., 2000; Zimmerman et al., 2004). Nuestros resultados describen por primera vez que la tetraspanina CD9 regula la capacidad adhesiva de ALCAM mediante la formación de agregados en la membrana plasmática y no por cambios en la afinidad de moléculas independientes. Uno de los papeles fundamentales de las tetraspaninas es el de incluir proteínas en su red de interacciones proteicas, facilitando su función como puede ser el agrupamiento de moléculas de ALCAM para permitir la adhesión. Esta regulación de moléculas de adhesión por parte de CD9 ya ha sido descrita para integrinas β_1 (Ovalle et al., 2007) y para otras moléculas de la familia de las inmunoglobulinas como ICAM-1 y VCAM-1 (Barreiro et al., 2005; Barreiro et al., 2008). La regulación por parte del citoesqueleto de actina de la adhesión mediada por ALCAM está muy descrita, pero la naturaleza de las proteínas que unen ALCAM al citoesqueleto permanece desconocida. Aunque α -catenina y las proteínas ezrina/radixina/moesina (ERM) han sido propuestas como posibles candidatos no se ha demostrado totalmente (Uhlenbrock et al., 2004; Weidle et al., 2010). CD9 podría ser el vínculo entre ALCAM y el citoesqueleto de actina, ya que esta tetraspanina está asociada directamente a moléculas que interactúan con las proteínas ERM como EWI-2, EWI-F o CD81 (Sala-Valdes et al., 2006).

Otro mecanismo por el cual CD9 puede estar modificando el comportamiento de ALCAM es a través de la regulación de ADAM-17. Ya hemos descrito que CD9 se asocia e inhibe a ADAM-17 y se ha comentado varias veces que ALCAM es sustrato de ADAM-17. De esta forma, puesto que CD9 inhibe a la enzima responsable de cortar a ALCAM, puede que el mecanismo por el cual CD9 aumenta la capacidad adhesiva de ALCAM se deba a un aumento de su expresión en la membrana plasmática. Hemos mostrado este aumento de ALCAM en la membrana de las células que expresan CD9 respecto a las que no lo expresan. De hecho, interferentes estables para ADAM-17 mediante ARNhp expresan más ALCAM en su membrana y presentan mayor adhesión a ALCAM inmovilizado. De esta forma, ADAM-17 también está implicada en la regulación de la adhesión homofílica de ALCAM, por lo que la inhibición de ADAM-17 por parte de CD9 puede ser otro mecanismo por el cual la tetraspanina está afectando la adhesión homofílica de ALCAM.

La contribución de ambos mecanismos (agrupamiento de ALCAM e inhibición de ADAM-17) no ha sido cuantificada en detalle, pero con los datos mostrados se puede hacer una hipótesis. El hecho de que tras el silenciamiento de ADAM-17 en células Raji (**figura 35E**, Raji-vector-TR2 y Raji-vector-#90) sólo se produce un ligero aumento en la capacidad de adhesión a ALCAM de estas células comparado con el aumento en la adhesión a ALCAM debido a la presencia de CD9 (**figura 35E**, Raji-vector-TR2 y Raji-CD9-TR2) parece indicar que el mecanismo de agrupamiento de moléculas de ALCAM por parte de CD9 en las células Raji-CD9 es mayor que el mecanismo de inhibición de ADAM-17 por parte de CD9. Si ambos mecanismos tuviesen la misma contribución, al eliminar ADAM-17 en la membrana plasmática de células Raji que no expresan CD9, presentarían una adhesión a ALCAM comparable a las células que expresan CD9 (**figura 35E**, Raji-CD9) y no es así. Por ello, la presencia de CD9 sigue siendo un factor determinante en la regulación de la capacidad de adhesión de ALCAM, por lo que el agrupamiento de moléculas de ALCAM por parte de CD9 parece ser el mecanismo preponderante en la regulación de la adhesión.

La regulación de la interacción homofílica de ALCAM esta siendo objeto de muchos estudios puesto que esta muy implicada en cáncer. Por ejemplo, en cáncer de mama la interacción homofílica de ALCAM es muy importante para la supervivencia del tumor primario, y si no está presente esta interacción se produce la muerte de las células tumorales (Jeziarska et al., 2006a). En melanoma, la inhibición de la avidéz de la interacción homofílica, mediante la transfección de una forma truncada de ALCAM, produce un aumento de la motilidad y de la metástasis, aunque reduce el tamaño del tumor primario. Los autores plantean que ALCAM sea la llave que controla la progresión del tumor desde su fase de crecimiento radial a su fase invasiva de crecimiento vertical (van Kempen et al., 2004). El papel de CD9 en la regulación de esta interacción puede ser clave para el desarrollo del tumor. Ya ha sido descrito el papel de CD9 en metástasis de melanoma, entre otros tipos de cáncer, puesto que la transfección de CD9 reduce el potencial metastásico del melanoma (Si and Hersey, 1993). Este efecto podría ser a través de ALCAM, puesto que ambas moléculas están implicadas en metástasis de melanoma, pero se requieren más estudios.

En el presente trabajo también hemos implicado a CD9 en la regulación de una función fisiológica dependiente de ALCAM como es la transmigración de leucocitos (Cayrol et al., 2008; Masedunskas et al., 2006). El silenciamiento de CD9 inhibe la transmigración de células Jurkat a través de membranas recubiertas de ALCAM-Fc, porque CD9 no aumenta el agrupamiento de ALCAM y no por ello existe adhesión homofílica de ALCAM. CD9 ya ha sido implicada en este proceso de transmigración, regulando el agrupamiento de ICAM-1 y VCAM-1, ambas moléculas claves en la adhesión y transmigración de leucocitos, en las estructuras de amarre para permitir la adhesión y transmigración de leucocitos (Barreiro et al., 2005; Barreiro et al., 2002). Nuestros datos aportan pruebas de que ALCAM es otra molécula de adhesión cuya función adhesiva esta regulada por CD9.

ALCAM es una molécula coestimuladora de la sinapsis inmunológica mediante su interacción heterofílica con CD6, contribuyendo a la activación de células T (Gimferrer et al., 2004; Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006). El estudio de la activación de células T lo realizamos mediante la formación de conjugados entre células B Raji como presentadoras de antígeno, expresando o no CD9 para ver su efecto sobre el agrupamiento de ALCAM en la interacción heterofílica, y Jurkat como células T. Las células Raji que expresan CD9 en su superficie activan de manera más eficaz a las células T que las que no expresan CD9, de tal forma que la tetraspanina también esta regulando la interacción heterofílica de ALCAM con CD6 afectando así a la activación de linfocitos T. Puesto que CD9 está aumentando tanto la interacción homofílica de ALCAM; extravasación de leucocitos, como la interacción heterofílica, activación de células T, la tetraspanina puede estar implicada en enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide o esclerosis múltiple, permitiendo la activación de leucocitos y su extravasación a las articulaciones y al sistema nervioso central. Por supuesto, son necesarios más estudios al respecto, pero CD9 y ALCAM podrían ser candidatas como dianas farmacológicas para estas patologías.

En resumen, este trabajo demuestra que la molécula de adhesión ALCAM se asocia con la tetraspanina CD9 en complejos proteicos que también incluyen a la metaloproteasa ADAM-17. Esta interacción se traduce en un incremento de las interacciones homofílicas y heterofílicas de ALCAM, con efectos directos sobre las funciones de adhesión celular y transmigración y activación

de linfocitos T. Este aumento de las interacciones mediado por CD9 se produce a través de dos mecanismos: i) aumento del agrupamiento de las moléculas de ALCAM y su incremento de avidéz y ii) aumento de su expresión de membrana debido a la inhibición de ADAM-17.

En conclusión, esta tesis demuestra la interacción entre CD9, la metaloproteasa ADAM-17 y su sustrato ALCAM. Esta interacción se traduce en una inhibición de ADAM-17 que resulta en una reducción del *shedding* de TNF- α , ICAM-1 y probablemente ALCAM (aunque no hemos detectado ALCAM cortado) produciendo lógicamente un aumento de su expresión de membrana. Así mismo esta asociación entre CD9 y ALCAM promueve un incremento de sus interacciones homofílicas y heterofílicas con repercusión en funciones dependientes de ALCAM. Estos complejos proteicos entre, al menos, tres moléculas puede ser un ejemplo de como se regulan realmente los procesos en la célula. Ya no es únicamente la interacción entre dos moléculas y el efecto de una sobre la otra, sino que a su vez, esas moléculas pueden interactuar con otras afectando también su función. Ya no se puede estudiar una proteína sin tener en cuenta todas las demás que se haya descrito que se asocian con ella y la modifican de alguna forma. La célula es un complejo conjunto de interacciones, como un ovillo de lana. Debe ser estudiado y desenredado hilo por hilo, pero sin olvidar que estamos estudiando el ovillo entero.



CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados mostrados obtenemos las siguientes conclusiones:

1. La tetraspanina CD9 se asocia directamente, a través de su dominio LEL, con ADAM-17 en la membrana plasmática de líneas celulares humanas monocíticas y endoteliales.
2. Esta interacción resulta en la inhibición de la actividad catalítica de ADAM-17 para el corte de dos de sus sustratos, TNF- α e ICAM-1, en linfocitos T, células monocíticas, endoteliales y de carcinoma de colón.
3. La tetraspanina CD9 se asocia directamente, a través de su dominio LEL, con la molécula de adhesión ALCAM en la superficie de líneas celulares humanas de linfocitos T y B.
4. A través de esta asociación, CD9 regula la interacción homofílica de ALCAM, con repercusiones funcionales en la adhesión y en la migración de células linfoides.
5. Las interacciones de tipo heterofílico entre ALCAM y CD6 también son reguladas por CD9, con consecuencias en la activación de células T.
6. En la regulación de las interacciones homofílicas y heterofílicas de ALCAM por CD9 interviene un doble mecanismo. Por un lado CD9 aumenta el agrupamiento de las moléculas de ALCAM y por tanto probablemente su avidéz, y por otro lado CD9 inhibe a ADAM-17, que es la enzima responsable del corte de ALCAM, por lo que la expresión en la membrana plasmática de la molécula de adhesión se ve incrementada.



BIBLIOGRAFÍA

- Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50, 1522-1532.
- Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S., and Mullberg, J. (2000). Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 267, 2624-2631.
- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74, 342-352.
- Amin, A.R. (1999). Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 392-394.
- Amour, A., Slocombe, P.M., Webster, A., Butler, M., Knight, C.G., Smith, B.J., Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., et al. (1998). TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 435, 39-44.
- Andre, M., Le Caer, J.P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., Chamot-Rooke, J., and Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics* 6, 1437-1449.
- Angelisova, P., Hilgert, I., and Horejsi, V. (1994). Association of four antigens of the tetraspanin family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* 39, 249-256.
- Arai, F., Ohneda, O., Miyamoto, T., Zhang, X.Q., and Suda, T. (2002). Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med* 195, 1549-1563.
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Le Naour, F. (2008). Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol* 181, 7002-7013.
- Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T.K., Rose-John, S., and Massague, J. (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 271, 11376-11382.
- Arribas, J., Lopez-Casillas, F., and Massague, J. (1997). Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J Biol Chem* 272, 17160-17165.
- Arroyo, A.G., Sanchez-Mateos, P., Campanero, M.R., Martin-Padura, I., Dejana, E., and Sanchez-Madrid, F. (1992). Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit. *J Cell Biol* 117, 659-670.
- Arufo, A., Melnick, M.B., Linsley, P.S., and Seed, B. (1991). The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *J Exp Med* 174, 949-952.
- Azorsa, D.O., Hyman, J.A., and Hildreth, J.E. (1991). CD63/Pltgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491. *Blood* 78, 280-284.
- Bandyopadhyay, S., Goldstein, L.E., Lahiri, D.K., and Rogers, J.T. (2007). Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 14, 2848-2864.
- Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Sala-Valdes, M., Gutierrez-Lopez, M.D., Ovalle, S., Higginbottom, A., Monk, P.N., Cabanas, C., and Sanchez-Madrid, F. (2005). Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* 105, 2852-2861.
- Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Serrador, J.M., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Furthmayr, H., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *The Journal of cell biology* 157, 1233-1245.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yanez-Mo, M., Tejera, E., Lopez-Romero, P., Monk, P.N., Gratton, E., Caiolfa, V.R., and Sanchez-Madrid, F. (2008). Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J Cell Biol* 183, 527-542.

Bax, D.V., Messent, A.J., Tart, J., van Hoang, M., Kott, J., Maciewicz, R.A., and Humphries, M.J. (2004). Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem* 279, 22377-22386.

Becker, B.F., Gilles, S., Sommerhoff, C.P., and Zahler, S. (2002). Application of peptides containing the cleavage sequence of pro-TNFalpha in assessing TACE activity of whole cells. *Biol Chem* 383, 1821-1826.

Bech-Serra, J.J., Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Saftig, P., Baselga, J., Arribas, J., and Canals, F. (2006). Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Mol Cell Biol* 26, 5086-5095.

Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114, 4143-4151.

Berditchevski, F., Gilbert, E., Griffiths, M.R., Fitter, S., Ashman, L., and Jenner, S.J. (2001). Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem* 276, 41165-41174.

Berditchevski, F., Toliass, K.F., Wong, K., Carpenter, C.L., and Hemler, M.E. (1997). A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* 272, 2595-2598.

Berditchevski, F., Zutter, M.M., and Hemler, M.E. (1996). Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell* 7, 193-207.

Bergmeier, W., Piffath, C.L., Cheng, G., Dole, V.S., Zhang, Y., von Andrian, U.H., and Wagner, D.D. (2004). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/alpha shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res* 95, 677-683.

Black, R.A. (2002). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1-5.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.

Globel, C.P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.

Borrell-Pages, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J., and Arribas, J. (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *EMBO J* 22, 1114-1124.

Boucheix, C., and Benoit, P. (1988). CD9 antigen: will platelet physiology help to explain the function of a surface molecule during hemopoietic differentiation? *Nouv Rev Fr Hematol* 30, 201-202.

Boucheix, C., Duc, G.H., Jasmin, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med* 2001, 1-17.

Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58, 1189-1205.

Bowen, M.A., Bajorath, J., Siadak, A.W., Modrell, B., Malacko, A.R., Marquardt, H., Nadler, S.G., and Aruffo, A. (1996). The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry. *J Biol Chem* 271, 17390-17396.

Bowen, M.A., Patel, D.D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A.R., Wang, W.C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J.M., Francke, U., et al. (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 181, 2213-2220.

Brakebusch, C., Varfolomeev, E.E., Batkin, M., and Wallach, D. (1994). Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* 269, 32488-32496.

Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse. *Annu Rev*

Immunol 19, 375-396.

Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., and Trautmann, A. (2005). Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* 35, 1741-1753.

Bruder, S.P., Ricalton, N.S., Boynton, R.E., Connolly, T.J., Jaiswal, N., Zaia, J., and Barry, F.P. (1998). Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 13, 655-663.

Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Ludwig, A., Rose-John, S., Saftig, P., Borden, E.C., and Bulfone-Paus, S. (2004). Natural soluble interleukin-15 α is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 279, 40368-40375.

Buhring, H.J., Treml, S., Cerabona, F., de Zwart, P., Kanz, L., and Sobiesiak, M. (2009). Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci* 1176, 124-134.

Burns, F.R., von Kannen, S., Guy, L., Raper, J.A., Kamholz, J., and Chang, S. (1991). DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. *Neuron* 7, 209-220.

Campanero, M.R., Arroyo, A.G., Pulido, R., Ursa, A., de Matias, M.S., Sanchez-Mateos, P., Kassner, P.D., Chan, B.M., Hemler, M.E., Corbi, A.L., et al. (1992). Functional role of $\alpha 2/\beta 1$ and $\alpha 4/\beta 1$ integrins in leukocyte intercellular adhesion induced through the common $\beta 1$ subunit. *Eur J Immunol* 22, 3111-3119.

Cardenas, L., Carrera, A.C., Yague, E., Pulido, R., Sanchez-Madrid, F., and de Landazuri, M.O. (1990). Phosphorylation-dephosphorylation of the CD6 glycoprotein renders two isoforms of 130 and 105 kilodaltons. Effect of serum and protein kinase C activators. *J Immunol* 145, 1450-1455.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167, 377-388.

Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., et al. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 9, 137-145.

Cesaro, A., Abakar-Mahamat, A., Brest, P., Lassalle, S., Selva, E., Filippi, J., Hebuterne, X., Hugot, J.P., Doglio, A., Galland, F., et al. (2009). Differential expression and regulation of ADAM17 and TIMP3 in acute inflamed intestinal epithelia. *Am J Physiol*

Claas, C., Seiter, S., Claas, A., Savelyeva, L., Schwab, M., and Zoller, M. (1998). Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol* 141, 267-280.

Claas, C., Stipp, C.S., and Hemler, M.E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem* 276, 7974-7984.

Clarke, H.R., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Castner, B.J., Huang, C.P., Gerhart, M.J., Johnson, R.S., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., Price, V.L., et al. (1998). Expression and purification of correctly processed, active human TACE catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 13, 104-110.

Clergeot, P.H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.P., Pepin, R., Tharreau, D., Nottoghem, J.L., and Lebrun, M.H. (2001). PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6963-6968.

Condon, T.P., Flournoy, S., Sawyer, G.J., Baker, B.F., Kishimoto, T.K., and Bennett, C.F. (2001). ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor- α and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11, 107-116.

Contin, C., Pitard, V., Itai, T., Nagata, S., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2003). Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor- α -converting enzyme.

Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 278, 32801-32809.

Corbel, C., Cormier, F., Pourquie, O., and Bluestein, H.G. (1992). BEN, a novel surface molecule of the immunoglobulin superfamily on avian hemopoietic progenitor cells shared with neural cells. *Exp Cell Res* 203, 91-99.

Crotta, S., Ronconi, V., Olivieri, C., Baldari, C.T., Valiante, N.M., Abrignani, S., and Wack, A. (2006). Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. *Eur J Immunol* 36, 919-929.

Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11, S37-43.

Charrin, S., and Alcover, A. (2006). Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Front Biosci* 11, 1987-1997.

Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.P., Emile, J.F., Petit, M.A., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003a). EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* 373, 409-421.

Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S.M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* 276, 14329-14337.

Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.E., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* 420, 133-154.

Charrin, S., Manie, S., Billard, M., Ashman, L., Gerlier, D., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003b). Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 107-112.

Charrin, S., Manie, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett* 516, 139-144.

Davies, S.R., Dent, C., Watkins, G., King, J.A., Mokbel, K., and Jiang, W.G. (2008). Expression of the cell to cell adhesion molecule, ALCAM, in breast cancer patients and the potential link with skeletal metastasis. *Oncol Rep* 19, 555-561.

DeClerck, Y.A. (2000). Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer* 36, 1258-1268.

Degen, W.G., van Kempen, L.C., Gijzen, E.G., van Groningen, J.J., van Kooyk, Y., Bloemers, H.P., and Swart, G.W. (1998). MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am J Pathol* 152, 805-813.

Diaz-Rodriguez, E., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L., and Pandiella, A. (2002). Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell* 13, 2031-2044.

Doedens, J.R., and Black, R.A. (2000). Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275, 14598-14607.

Doedens, J.R., Mahimkar, R.M., and Black, R.A. (2003). TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 331-338.

Dolnik, O., Volchkova, V., Garten, W., Carbonnelle, C., Becker, S., Kahnt, J., Stroher, U., Klenk, H.D., and Volchkov, V. (2004). Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J* 23, 2175-2184.

Duffy, M.J., McKiernan, E., O'Donovan, N., and McGowan, P.M. (2009). Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin Cancer Res* 15, 1140-1144.

Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2010). Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002311.

Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases.

Mol Aspects Med 29, 258-289.

Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 20121-20127.

Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C.A., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Milhiet, P.E. (2008). Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J Cell Biol* 182, 765-776.

Fabre-Lafay, S., Garrido-Urbani, S., Reymond, N., Goncalves, A., Dubreuil, P., and Lopez, M. (2005). Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280, 19543-19550.

Fan, H., and Derynck, R. (1999). Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J* 18, 6962-6972.

Franzke, C.W., Tasanen, K., Schacke, H., Zhou, Z., Tryggvason, K., Mauch, C., Zigrino, P., Sunnarborg, S., Lee, D.C., Fahrenholz, F., et al. (2002). Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J* 21, 5026-5035.

Gambin, Y., Lopez-Esparza, R., Reffay, M., Sierecki, E., Gov, N.S., Genest, M., Hodges, R.S., and Urbach, W. (2006). Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2098-2102.

Gangemi, R.M., Swack, J.A., Gaviria, D.M., and Romain, P.L. (1989). Anti-T12, an anti-CD6 monoclonal antibody, can activate human T lymphocytes. *J Immunol* 143, 2439-2447.

Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276, 37993-38001.

Garton, K.J., Gough, P.J., Philalay, J., Wille, P.T., Blobel, C.P., Whitehead, R.H., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2003). Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem* 278, 37459-37464.

Gimferrer, I., Calvo, M., Mittelbrunn, M., Farnos, M., Sarrias, M.R., Enrich, C., Vives, J., Sanchez-Madrid, F., and Lozano, F. (2004). Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 173, 2262-2270.

Goldberg, A.F. (2006). Role of peripherin/rds in vertebrate photoreceptor architecture and inherited retinal degenerations. *Int Rev Cytol* 253, 131-175.

Gonzales, P.E., Galli, J.D., and Milla, M.E. (2008). Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry* 47, 9911-9919.

Gonzales, P.E., Solomon, A., Miller, A.B., Leesnitzer, M.A., Sagi, I., and Milla, M.E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem* 279, 31638-31645.

Gonzalez-Alvaro, I., Dominguez-Jimenez, C., Ortiz, A.M., Nunez-Gonzalez, V., Roda-Navarro, P., Fernandez-Ruiz, E., Sancho, D., and Sanchez-Madrid, F. (2006). Interleukin-15 and interferon-gamma participate in the cross-talk between natural killer and monocytic cells required for tumour necrosis factor production. *Arthritis Res Ther* 8, R88.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

Guo, L., Eisenman, J.R., Mahimkar, R.M., Peschon, J.J., Paxton, R.J., Black, R.A., and Johnson, R.S. (2002). A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases. *Mol Cell Proteomics* 1, 30-36.

Gutierrez-Lopez, M.D., Ovalle, S., Yanez-Mo, M., Sanchez-Sanchez, N., Rubinstein, E., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Sanchez-Madrid, F., and Cabanas, C. (2003). A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1

integrin. *J Biol Chem* 278, 208-218.

Hansen, H.P., Dietrich, S., Kisseleva, T., Mokros, T., Mentlein, R., Lange, H.H., Murphy, G., and Lemke, H. (2000). CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 165, 6703-6709.

Hansen, H.P., Recke, A., Reineke, U., Von Tresckow, B., Borchmann, P., Von Strandmann, E.P., Lange, H., Lemke, H., and Engert, A. (2004). The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J* 18, 893-895.

Hassan, N.J., Barclay, A.N., and Brown, M.H. (2004). Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 34, 930-940.

Hemler, M.E. (2001). Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 155, 1103-1107.

Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 397-422.

Hemler, M.E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 801-811.

Hemler, M.E. (2008). Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* 7, 747-758.

Higashiyama, M., Taki, T., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C.L., Koh, T., Kodama, K., Doi, O., and Miyake, M. (1995a). Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 55, 6040-6044.

Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1995b). The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol* 128, 929-938.

Higginbottom, A., Quinn, E.R., Kuo, C.C., Flint, M., Wilson, L.H., Bianchi, E., Nicosia, A., Monk, P.N., McKeating, J.A., and Levy, S. (2000). Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 74, 3642-3649.

Higginbottom, A., Takahashi, Y., Bolling, L., Coonrod, S.A., White, J.M., Partridge, L.J., and Monk, P.N. (2003). Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 208-214.

Hinkle, C.L., Sunnarborg, S.W., Loisele, D., Parker, C.E., Stevenson, M., Russell, W.E., and Lee, D.C. (2004). Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem* 279, 24179-24188.

Ho, S.H., Martin, F., Higginbottom, A., Partridge, L.J., Parthasarathy, V., Moseley, G.W., Lopez, P., Cheng-Mayer, C., and Monk, P.N. (2006). Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 80, 6487-6496.

Huang, S., Yuan, S., Dong, M., Su, J., Yu, C., Shen, Y., Xie, X., Yu, Y., Yu, X., Chen, S., et al. (2005). The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* 86, 674-684.

Huxley-Jones, J., Clarke, T.K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D.L., and Boot-Handford, R.P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol* 7, 63.

Ikeda, K., and Quertermous, T. (2004). Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule that modulates endothelial cell function. *J Biol Chem* 279, 55315-55323.

In 't Anker, P.S., Noort, W.A., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Kruisselbrink, A.B., van Bezooijen, R.L., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H.H., and Fibbe, W.E. (2003). Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 88, 845-852.

Indig, F.E., Diaz-Gonzalez, F., and Ginsberg, M.H. (1997). Analysis of the tetraspanin CD9-integrin alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) complex in platelet membranes and transfected cells. *Biochem J* 327, 291-298.

Inui, S., Higashiyama, S., Hashimoto, K., Higashiyama, M., Yoshikawa, K., and Taniguchi, N. (1997). Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *J Cell Physiol* 171, 291-298.

Isler, P., Vey, E., Zhang, J.H., and Dayer, J.M. (1993). Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur Cytokine Netw* 4, 15-23.

Itai, T., Tanaka, M., and Nagata, S. (2001). Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur J Biochem* 268, 2074-2082.

Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J* 13, 2322-2330.

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., and Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745-2756.

Jankowski, S.A., Mitchell, D.S., Smith, S.H., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1994). SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. *Oncogene* 9, 1205-1211.

Jeziarska, A., Matysiak, W., and Motyl, T. (2006a). ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. *Med Sci Monit* 12, BR263-273.

Jeziarska, A., Olszewski, W.P., Pietruszkiewicz, J., Olszewski, W., Matysiak, W., and Motyl, T. (2006b). Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion. *Med Sci Monit* 12, BR245-256.

Jones, P.H., Bishop, L.A., and Watt, F.M. (1996). Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun* 4, 297-305.

Kahlert, C., Weber, H., Mogler, C., Bergmann, F., Schirmacher, P., Kenngott, H.G., Matteredne, U., Mollberg, N., Rahbari, N.N., Hinz, U., et al. (2009). Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse. *Br J Cancer* 101, 457-464.

Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., and Kudo, A. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet* 24, 279-282.

Karan, D., Lin, F.C., Bryan, M., Ringel, J., Moniaux, N., Lin, M.F., and Batra, S.K. (2003). Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. *Int J Oncol* 23, 1365-1371.

Katakowski, M., Jiang, F., Zheng, X., Gutierrez, J.A., Szalad, A., and Chopp, M. (2009). Tumorigenicity of cortical astrocyte cell line induced by the protease ADAM17. *Cancer Sci* 100, 1597-1604.

Kawaguchi, M., Mitsuhashi, Y., and Kondo, S. (2005). Overexpression of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis. *Br J Dermatol* 152, 915-919.

Kenny, P.A., and Bissell, M.J. (2007). Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest* 117, 337-345.

Kieseier, B.C., Pischel, H., Neuen-Jacob, E., Tourtellotte, W.W., and Hartung, H.P. (2003). ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS. *Glia* 42, 398-405.

Kilic, E., Ceyhan, T., and Cetinkaya, D.U. (2007). [Evaluation of differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to cartilage and bone cells]. *Acta Orthop*

Traumatol Turc 41, 295-301.

Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5, 546-559.

King, J.A., Ofori-Acquah, S.F., Stevens, T., Al-Mehdi, A.B., Fodstad, O., and Jiang, W.G. (2004). Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res* 6, R478-487.

Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G., and Bolognesi, M. (2001). CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J* 20, 12-18.

Kovalenko, O.V., Metcalf, D.G., DeGrado, W.F., and Hemler, M.E. (2005). Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct Biol* 5, 11.

Kovalenko, O.V., Yang, X., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2004). Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J* 377, 407-417.

Kovalenko, O.V., Yang, X.H., and Hemler, M.E. (2007). A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol Cell Proteomics* 6, 1855-1867.

Kristiansen, G., Pilarsky, C., Wissmann, C., Kaiser, S., Bruemmendorf, T., Roepcke, S., Dahl, E., Hinzmann, B., Specht, T., Pervan, J., et al. (2005). Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol* 205, 359-376.

Kulasingam, V., Zheng, Y., Soosaipillai, A., Leon, A.E., Gion, M., and Diamandis, E.P. (2009). Activated leukocyte cell adhesion molecule: a novel biomarker for breast cancer. *Int J Cancer* 125, 9-14.

Laessing, U., Giordano, S., Stecher, B., Lottspeich, F., and Stuermer, C.A. (1994). Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN. *Differentiation* 56, 21-29.

Lafleur, M.A., Xu, D., and Hemler, M.E. (2009). Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell* 20, 2030-2040.

Lagaudriere-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Hubeau, C., Fradelizi, D., and Conjeaud, H. (1998). Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leadin Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006a). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* 6, 6447-6454.

Le Naour, F., Andre, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J.F., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006b). Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 5, 845-857.

Lee, M.W., Choi, J., Yang, M.S., Moon, Y.J., Park, J.S., Kim, H.C., and Kim, Y.J. (2004). Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 273-278.

Lehmann, J.M., Riethmuller, G., and Johnson, J.P. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9891-9895.

Leonard, J.D., Lin, F., and Milla, M.E. (2005). Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem J* 387, 797-805.

Levy, S., and Shoham, T. (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5, 136-148.

Li, N., Boyd, K., Dempsey, P.J., and Vignali, D.A. (2007). Non-cell autonomous expression

of TNF-alpha-converting enzyme ADAM17 is required for normal lymphocyte development. *J Immunol* 178, 4214-4221.

Liang, S., Huang, C., Jia, S., and Wang, B. (2011). Activated leukocyte cell adhesion molecule expression is up-regulated in the development of endometrioid carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 21, 523-528.

Lineberry, N., Su, L., Soares, L., and Fathman, C.G. (2008). The single subunit transmembrane E3 ligase gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) captures and then ubiquitinates transmembrane proteins across the cell membrane. *J Biol Chem* 283, 28497-28505.

Longhurst, C.M., White, M.M., Wilkinson, D.A., and Jennings, L.K. (1999). A CD9, alphaIIb beta3, integrin-associated protein, and GPIIb/IIIa complex on the surface of human platelets is influenced by alphaIIb beta3 conformational states. *Eur J Biochem* 263, 104-111.

Longo, N., Yanez-Mo, M., Mittelbrunn, M., de la Rosa, G., Munoz, M.L., Sanchez-Madrid, F., and Sanchez-Mateos, P. (2001). Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood* 98, 3717-3726.

Lozahic, S., Christiansen, D., Manie, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2000). CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol* 30, 900-907.

Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., and Becherer, J.D. (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8, 161-171.

Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Becherer, J.D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Tempst, P., Choi, Y., and Blobel, C.P. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274, 13613-13618.

Luque, A., Gomez, M., Puzon, W., Takada, Y., Sanchez-Madrid, F., and Cabanas, C. (1996). Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem* 271, 11067-11075.

Maecker, H.T., Todd, S.C., and Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 11, 428-442.

Masedunskas, A., King, J.A., Tan, F., Cochran, R., Stevens, T., Sviridov, D., and Ofori-Aquah, S.F. (2006). Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett* 580, 2637-2645.

McGowan, P.M., Ryan, B.M., Hill, A.D., McDermott, E., O'Higgins, N., and Duffy, M.J. (2007). ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin Cancer Res* 13, 2335-2343.

Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., and Clevers, H.C. (1991). CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 266, 3239-3245.

Mezyk, R., Bzowska, M., and Bereta, J. (2003). Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Acta Biochim Pol* 50, 625-645.

Mezzanzanica, D., Fabbi, M., Bagnoli, M., Staurengo, S., Losa, M., Balladore, E., Alberti, P., Lusa, L., Ditto, A., Ferrini, S., et al. (2008). Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 14, 1726-1733.

Micciche, F., Da Riva, L., Fabbi, M., Pilotti, S., Mondellini, P., Ferrini, S., Canevari, S., Pierotti, M.A., and Bongarzone, I. (2011). Activated leukocyte cell adhesion molecule expression and shedding in thyroid tumors. *PLoS One* 6, e17141.

Milla, M.E., Leesnitzer, M.A., Moss, M.L., Clay, W.C., Carter, H.L., Miller, A.B., Su, J.L., Lambert, M.H., Willard, D.H., Sheeley, D.M., et al. (1999). Specific sequence elements are required

for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 274, 30563-30570.

Miller, B.J., Georges-Labouesse, E., Primakoff, P., and Myles, D.G. (2000). Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J Cell Biol* 149, 1289-1296.

Minner, S., Kraetzig, F., Tachezy, M., Kilic, E., Graefen, M., Wilczak, W., Bokemeyer, C., Huland, H., Sauter, G., and Schlomm, T. (2011). Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostate-specific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol*.

Miyake, M., Koyama, M., Seno, M., and Ikeyama, S. (1991). Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility. *J Exp Med* 174, 1347-1354.

Miyake, M., Nakano, K., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C.L., Itoi, S., Koh, T., and Taki, T. (1995). Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res* 55, 4127-4131.

Miyake, M., Nakano, K., Itoi, S.I., Koh, T., and Taki, T. (1996). Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 56, 1244-1249.

Mohan, M.J., Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., Moyer, M., Patel, I., Waitt, G.M., Becherer, J.D., et al. (2002). The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* 41, 9462-9469.

Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.

Montero, J.C., Yuste, L., Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A., and Pandiella, A. (2002). Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases. *Biochem J* 363, 211-221.

Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Haraguchi, M., Ueo, H., Barnard, G.F., and Akiyoshi, T. (1998). Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. *Clin Cancer Res* 4, 1507-1510.

Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385, 733-736.

Moss, M.L., White, J.M., Lambert, M.H., and Andrews, R.C. (2001). TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today* 6, 417-426.

Mullberg, J., Althoff, K., Jostock, T., and Rose-John, S. (2000). The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* 11, 27-38.

Mullberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P.C., and Rose-John, S. (1994). The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol* 152, 4958-4968.

Murumkar, P.R., DasGupta, S., Chandani, S.R., Giridhar, R., and Yadav, M.R. (2010). Novel TACE inhibitors in drug discovery: a review of patented compounds. *Expert Opin Ther Pat* 20, 31-57.

Nakamura, K., Mitamura, T., Takahashi, T., Kobayashi, T., and Mekada, E. (2000). Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity. *J Biol Chem* 275, 18284-18290.

Nakamura, T., Abe, H., Hirata, A., and Shimoda, C. (2004). ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 3, 27-39.

Nelissen, J.M., Peters, I.M., de Grooth, B.G., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell

adhesion through the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11, 2057-2068.

Nishiuchi, R., Sanzen, N., Nada, S., Sumida, Y., Wada, Y., Okada, M., Takagi, J., Hasegawa, H., and Sekiguchi, K. (2005). Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1939-1944.

Oh, S.T., Schramme, A., Stark, A., Tilgen, W., Gutwein, P., and Reichrath, J. (2009). The disintegrin-metalloproteinases ADAM 10, 12 and 17 are upregulated in invading peripheral tumor cells of basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol* 36, 395-401.

Ohneda, O., Ohneda, K., Arai, F., Lee, J., Miyamoto, T., Fukushima, Y., Dowbenko, D., Lasky, L.A., and Suda, T. (2001). ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 98, 2134-2142.

Ohta, S., Harigai, M., Tanaka, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Fukasawa, C., Hara, M., and Kamatani, N. (2001). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28, 1756-1763.

Osoario, L.M., Rottenberg, M., Jondal, M., and Chow, S.C. (1998). Simultaneous cross-linking of CD6 and CD28 induces cell proliferation in resting T cells. *Immunology* 93, 358-365.

Oswald, J., Boxberger, S., Jorgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhauser, M., and Werner, C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22, 377-384.

Ouchi, N., Kihara, S., Yamashita, S., Higashiyama, S., Nakagawa, T., Shimomura, I., Funahashi, T., Kameda-Takemura, K., Kawata, S., Taniguchi, N., et al. (1997). Role of membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 on macrophages. *Biochem J* 328 (Pt 3), 923-928.

Ovalle, S., Gutierrez-Lopez, M.D., Olmo, N., Turnay, J., Lizarbe, M.A., Majano, P., Molina-Jimenez, F., Lopez-Cabrera, M., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., et al. (2007). The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 121, 2140-2152.

Papadakis, K.A., and Targan, S.R. (2000). Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 51, 289-298.

Paschke, K.A., Lottspeich, F., and Stuermer, C.A. (1992). Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *J Cell Biol* 117, 863-875.

Patel, D.D., Wee, S.F., Whichard, L.P., Bowen, M.A., Pesando, J.M., Aruffo, A., and Haynes, B.F. (1995). Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med* 181, 1563-1568.

Patel, I.R., Attur, M.G., Patel, R.N., Stuchin, S.A., Abagyan, R.A., Abramson, S.B., and Amin, A.R. (1998). TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *J Immunol* 160, 4570-4579.

Peduzzi, J.D., Irwin, M.H., and Geisert, E.E., Jr. (1994). Distribution and characteristics of a 90 kDa protein, KG-CAM, in the rat CNS. *Brain Res* 640, 296-307.

Peiretti, F., Canault, M., Deprez-Beauclair, P., Berthet, V., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., and Nalbone, G. (2003). Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp Cell Res* 285, 278-285.

Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., et al. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281-1284.

Pourquie, O., Corbel, C., Le Caer, J.P., Rossier, J., and Le Douarin, N.M. (1992a). BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is expressed in a variety of developing systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5261-5265.

Pourquie, O., Hallonet, M.E., and Le Douarin, N.M. (1992b). Association of BEN glycoprotein

- expression with climbing fiber axonogenesis in the avian cerebellum. *J Neurosci* 12, 1548-1557.
- Pretzel, D., Linss, S., Rochler, S., Endres, M., Kaps, C., Alsalameh, S., and Kinne, R.W. (2011). Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res Ther* 13, R64.
- Primakoff, P., and Myles, D.G. (2000). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16, 83-87.
- Prince, J.T., Nishiyama, A., Healy, P.A., Beasley, L., and Stallcup, W.B. (1992). Expression of the F84.1 glycoprotein in the spinal cord and cranial nerves of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 68, 193-201.
- Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J., and Black, R.A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275, 14608-14614.
- Resnick, D., Pearson, A., and Krieger, M. (1994). The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 19, 5-8.
- Rosso, O., Piazza, T., Bongarzone, I., Rossello, A., Mezzanzanica, D., Canevari, S., Orengo, A.M., Puppo, A., Ferrini, S., and Fabbi, M. (2007). The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 5, 1246-1253.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Billard, M., Prenant, M., and Boucheix, C. (1994). CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur J Immunol* 24, 3005-3013.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H., and Boucheix, C. (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 26, 2657-2665.
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Wolf, J.P., Le Naour, F., and Boucheix, C. (2006). The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 17, 254-263.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164, 769-779.
- Sala-Valdes, M., Ursa, A., Charrin, S., Rubinstein, E., Hemler, M.E., Sanchez-Madrid, F., and Yanez-Mo, M. (2006). EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem* 281, 19665-19675.
- Sammons, J., Ahmed, N., El-Sheemy, M., and Hassan, H.T. (2004). The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3). *Stem Cells Dev* 13, 273-280.
- Sanchez-Martin, L., Sanchez-Sanchez, N., Gutierrez-Lopez, M.D., Rojo, A.I., Vicente-Manzanares, M., Perez-Alvarez, M.J., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X.R., Cuadrado, A., Sanchez-Madrid, F., et al. (2004). Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. *J Biol Chem* 279, 16194-16205.
- Sanchez-Mateos, P., Cabanas, C., and Sanchez-Madrid, F. (1996). Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol* 7, 99-109.
- Sastre, M., Walter, J., and Gentleman, S.M. (2008). Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* 5, 25.
- Scherberich, A., Moog, S., Haan-Archipoff, G., Azorsa, D.O., Lanza, F., and Beretz, A. (1998). Tetraspanin CD9 is associated with very late-acting integrins in human vascular smooth muscle cells and modulates collagen matrix reorganization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1691-1697.
- Schlondorff, J., Becherer, J.D., and Blobel, C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347 Pt 1, 131-138.
- Schlondorff, J., and Blobel, C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112 (Pt 21), 3603-3617.
- Schmidt, C., Kunemund, V., Wintergerst, E.S., Schmitz, B., and Schachner, M. (1996). CD9

of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 43, 12-31.

Schmidt, D.S., Klingbeil, P., Schnolzer, M., and Zoller, M. (2004). CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res* 297, 329-347.

Seehafer, J.G., Slupsky, J.R., Tang, S.C., and Shaw, A.R. (1988). The functional cell surface glycoprotein CD9 is distinguished by being the major fatty acid acylated and a major iodinated cell-surface component of the human platelet. *Biochim Biophys Acta* 952, 92-100.

Seifert, T., Kieseier, B.C., Ropele, S., Strasser-Fuchs, S., Quehenberger, F., Fazekas, F., and Hartung, H.P. (2002). TACE mRNA expression in peripheral mononuclear cells precedes new lesions on MRI in multiple sclerosis. *Mult Scler* 8, 447-451.

Seigneuret, M. (2006). Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys J* 90, 212-227.

Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C., and Conjeaud, H. (2001). Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem* 276, 40055-40064.

Sekine-Aizawa, Y., Omori, A., and Fujita, S.C. (1998). MuSC, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is expressed in neurons of a subset of cranial sensory ganglia in the mouse embryo. *Eur J Neurosci* 10, 2810-2824.

Seshi, B., Kumar, S., and Sellers, D. (2000). Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 26, 234-246.

Shi, W., Chen, H., Sun, J., Buckley, S., Zhao, J., Anderson, K.D., Williams, R.G., and Warburton, D. (2003). TACE iShi, W., Fan, H., Shum, L., and Derynck, R. (2000). The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol* 148, 591-602.

Si, Z., and Hersey, P. (1993). Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma. *Int J Cancer* 54, 37-43.

Sincock, P.M., Mayrhofer, G., and Ashman, L.K. (1997). Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem* 45, 515-525.

Skonier, J.E., Bowen, M.A., Emswiler, J., Aruffo, A., and Bajorath, J. (1996a). Mutational analysis of the CD6 binding site in activated leukocyte cell adhesion molecule. *Biochemistry* 35, 14743-14748.

Skonier, J.E., Bowen, M.A., Emswiler, J., Aruffo, A., and Bajorath, J. (1996b). Recognition of diverse proteins by members of the immunoglobulin superfamily: delineation of the receptor binding site in the human CD6 ligand ALCAM. *Biochemistry* 35, 12287-12291.

Slupsky, J.R., Kamiguti, A.S., Rhodes, N.P., Cawley, J.C., Shaw, A.R., and Zuzel, M. (1997). The platelet antigens CD9, CD42 and integrin alpha IIb beta IIIa can be topographically associated and transduce functionally similar signals. *Eur J Biochem* 244, 168-175.

Slupsky, J.R., Seehafer, J.G., Tang, S.C., Masellis-Smith, A., and Shaw, A.R. (1989). Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 264, 12289-12293.

Stewart, K., Monk, P., Walsh, S., Jefferiss, C.M., Letchford, J., and Beresford, J.N. (2003). STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res* 313, 281-290.

Stewart, M.P., Cabanas, C., and Hogg, N. (1996). T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1. *J Immunol* 156, 1810-1817.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2001a). EWI-2 is a major CD9 and CD81

partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem* 276, 40545-40554.

Stipp, C.S., Orlicky, D., and Hemler, M.E. (2001b). FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J Biol Chem* 276, 4853-4862.

Sun, T.T., Zhao, H., Provet, J., Aebi, U., and Wu, X.R. (1996). Formation of asymmetric unit membrane during urothelial differentiation. *Mol Biol Rep* 23, 3-11.

Swart, G.W. (2002). Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 81, 313-321.

Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., and Linnenbach, A.J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6833-6837.

Tachezy, M., Effenberger, K., Zander, H., Minner, S., Gebauer, F., Vashist, Y.K., Sauter, G., Pantel, K., Izbicki, J.R., and Bockhorn, M. (2011). ALCAM (CD166) expression and serum levels are markers for poor survival of esophageal cancer patients. *Int J Cancer*.

Tachibana, I., and Hemler, M.E. (1999). Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol* 146, 893-904.

Tachida, Y., Nakagawa, K., Saito, T., Saido, T.C., Honda, T., Saito, Y., Murayama, S., Endo, T., Sakaguchi, G., Kato, A., et al. (2008). Interleukin-1 beta up-regulates TACE to enhance alpha-cleavage of APP in neurons: resulting decrease in Abeta production. *J Neurochem* 104, 1387-1393.

Takagi, S., Fujikawa, K., Imai, T., Fukuhara, N., Fukudome, K., Minegishi, M., Tsuchiya, S., Konno, T., Hinuma, Y., and Yoshie, O. (1995). Identification of a highly specific surface marker of T-cell acute lymphoblastic leukemia and neuroblastoma as a new member of the transmembrane 4 superfamily. *Int J Cancer* 61, 706-715.

Takamune, Y., Ikebe, T., Nagano, O., and Shinohara, M. (2008). Involvement of NF-kappaB-mediated maturation of ADAM-17 in the invasion of oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 393-398.

Tan, F., Ghosh, S., Mbeunkui, F., Thomas, R., Weiner, J.A., and Ofori-Acquah, S.F. (2010). Essential role for ALCAM gene silencing in megakaryocytic differentiation of K562 cells. *BMC Mol Biol* 11, 91.

Tanaka, H., Matsui, T., Agata, A., Tomura, M., Kubota, I., McFarland, K.C., Kohr, B., Lee, A., Phillips, H.S., and Shelton, D.L. (1991). Molecular cloning and expression of a novel adhesion molecule, SC1. *Neuron* 7, 535-545.

Tanaka, Y., Miyamoto, S., Suzuki, S.O., Oki, E., Yagi, H., Sonoda, K., Yamazaki, A., Mizushima, H., Maehara, Y., Mekada, E., et al. (2005). Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11, 4783-4792.

Tarrant, J.M., Robb, L., van Spriel, A.B., and Wright, M.D. (2003). Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol* 24, 610-617.

Te Riet, J., Zimmerman, A.W., Cambi, A., Joosten, B., Speller, S., Torensma, R., van Leeuwen, F.N., Figdor, C.G., and de Lange, F. (2007). Distinct kinetic and mechanical properties govern ALCAM-mediated interactions as shown by single-molecule force spectroscopy. *J Cell Sci* 120, 3965-3976.

Thathiah, A., Blobel, C.P., and Carson, D.D. (2003). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem* 278, 3386-3394.

Thathiah, A., Brayman, M., Dharmaraj, N., Julian, J.J., Lagow, E.L., and Carson, D.D. (2004). Tumor necrosis factor alpha stimulates MUC1 synthesis and ectodomain release in a human uterine epithelial cell line. *Endocrinology* 145, 4192-4203.

Tomita, K., van Bokhoven, A., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J., and Schalken, J.A. (2000). Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 870-874.

Tsai, W.C., Hsu, P.W., Lai, T.C., Chau, G.Y., Lin, C.W., Chen, C.M., Lin, C.D., Liao, Y.L., Wang, J.L., Chau, Y.P., et al. (2009). MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49, 1571-1582.

Tsai, Y.C., Mendoza, A., Mariano, J.M., Zhou, M., Kostova, Z., Chen, B., Veenstra, T., Hewitt, S.M., Helman, L.J., Khanna, C., et al. (2007). The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med* 13, 1504-1509.

Tsakadze, N.L., Sithu, S.D., Sen, U., English, W.R., Murphy, G., and D'Souza, S.E. (2006). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem* 281, 3157-3164.

Tseng, S.Y., Waite, J.C., Liu, M., Vardhana, S., and Dustin, M.L. (2008). T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C theta. *J Immunol* 181, 4852-4863.

Uchida, N., Yang, Z., Combs, J., Pourquie, O., Nguyen, M., Ramanathan, R., Fu, J., Welply, A., Chen, S., Weddell, G., et al. (1997). The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells. *Blood* 89, 2706-2716.

Uhlenbrock, K., Eberth, A., Herbrand, U., Daryab, N., Stege, P., Meier, F., Friedl, P., Collard, J.G., and Ahmadian, M.R. (2004). The RacGEF Tiam1 inhibits migration and invasion of metastatic melanoma via a novel adhesive mechanism. *J Cell Sci* 117, 4863-4871.

van Kempen, L.C., Meier, F., Egeblad, M., Kersten-Niessen, M.J., Garbe, C., Weidle, U.H., Van Muijen, G.N., Herlyn, M., Bloemers, H.P., and Swart, G.W. (2004). Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. *J Invest Dermatol* 122, 1293-1301.

van Kempen, L.C., Nelissen, J.M., Degen, W.G., Torensma, R., Weidle, U.H., Bloemers, H.P., Figdor, C.G., and Swart, G.W. (2001). Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J Biol Chem* 276, 25783-25790.

van Kempen, L.C., van den Oord, J.J., van Muijen, G.N., Weidle, U.H., Bloemers, H.P., and Swart, G.W. (2000). Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 156, 769-774.

van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 140, 13-21.

Verma, A., Shukla, N.K., Deo, S.V., Gupta, S.D., and Ralhan, R. (2005). MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 68, 462-470.

Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E., and Checler, F. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem* 276, 37743-37746.

Wakabayashi, T., Craessaerts, K., Bammens, L., Bentahir, M., Borgions, F., Herdewijn, P., Staes, A., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Rubinstein, E., et al. (2009). Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat Cell Biol* 11, 1340-1346.

Wang, J., Gu, Z., Ni, P., Qiao, Y., Chen, C., Liu, X., Lin, J., Chen, N., and Fan, Q. (2011). NF-kappaB P50/P65 hetero-dimer mediates differential regulation of CD166/ALCAM expression via interaction with microRNA-9 after serum deprivation, providing evidence for a novel negative auto-regulatory loop. *Nucleic Acids Res* 39, 6440-6455.

Wang, X., He, K., Gerhart, M., Huang, Y., Jiang, J., Paxton, R.J., Yang, S., Lu, C., Menon, R.K., Black, R.A., et al. (2002). Metalloprotease-mediated GH receptor proteolysis and GHBP shedding. Determination of extracellular domain stem region cleavage site. *J Biol Chem* 277, 50510-50519.

Wang, Y., Herrera, A.H., Li, Y., Belani, K.K., and Walcheck, B. (2009). Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding. *J Immunol* 182, 2449-2457.

Weichert, W., Knosel, T., Bellach, J., Dietel, M., and Kristiansen, G. (2004). ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* 57, 1160-1164.

Weidle, U.H., Eggle, D., Klostermann, S., and Swart, G.W. (2010). ALCAM/CD166: cancer-related issues. *Cancer Genomics Proteomics* 7, 231-243.

Weskamp, G., Schlondorff, J., Lum, L., Becherer, J.D., Kim, T.W., Saftig, P., Hartmann, D., Murphy, G., and Blobel, C.P. (2004). Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem* 279, 4241-4249.

Whitney, G.S., Starling, G.C., Bowen, M.A., Modrell, B., Siadak, A.W., and Aruffo, A. (1995). The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J Biol Chem* 270, 18187-18190.

Wilihoeff, U., Campos-Gongora, E., Touzni, S., Bruchhaus, I., and Tannich, E. (2001). Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist* 152, 149-156.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7, 297-303.

Xu, D., Sharma, C., and Hemler, M.E. (2009). Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *FASEB J* 23, 3674-3681.

Yan, Y., Shirakabe, K., and Werb, Z. (2002). The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol* 158, 221-226.

Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M.A., Ashman, L.K., de Landazuri, M.O., and Sanchez-Madrid, F. (1998). Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 141, 791-804.

Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gonzalo, P., Batista, A., Megias, D., Genis, L., Sachs, N., Sala-Valdes, M., Alonso, M.A., Montoya, M.C., et al. (2008). MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood* 112, 3217-3226.

Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M., and Sanchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* 19, 434-446.

Yanez-Mo, M., Mittelbrunn, M., and Sanchez-Madrid, F. (2001). Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation* 8, 153-168.

Yang, X., Claas, C., Kraeft, S.K., Chen, L.B., Wang, Z., Kreidberg, J.A., and Hemler, M.E. (2002). Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* 13, 767-781.

Yang, X.F., He, X., He, J., Zhang, L.H., Su, X.J., Dong, Z.Y., Xu, Y.J., Li, Y., and Li, Y.L. (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 18, 59.

Yao, H., Kim, K., Duan, M., Hayashi, T., Guo, M., Morgello, S., Prat, A., Wang, J., Su, T.P., and Buch, S. (2011). Cocaine hijacks sigma1 receptor to initiate induction of activated leukocyte cell adhesion molecule: implication for increased monocyte adhesion and migration in the CNS. *J Neurosci* 31, 5942-5955.

Yauch, R.L., Berditchevski, F., Harler, M.B., Reichner, J., and Hemler, M.E. (1998). Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell* 9, 2751-2765.

Yauch, R.L., and Hemler, M.E. (2000). Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J* 351 Pt 3, 629-637.

Zhang, X.A., Bontrager, A.L., and Hemler, M.E. (2001). Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 276, 25005-25013.

Zhang, Y., Li, C., Jiang, X., Zhang, S., Wu, Y., Liu, B., Tang, P., and Mao, N. (2004). Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 32, 657-664.

Zhao, J., Chen, H., Peschon, J.J., Shi, W., Zhang, Y., Frank, S.J., and Warburton, D. (2001). Pulmonary hypoplasia in mice lacking tumor necrosis factor-alpha converting enzyme indicates an indispensable role for cell surface protein shedding during embryonic lung branching morphogenesis. *Dev Biol* 232, 204-218.

Zhou, B., Liu, L., Reddivari, M., and Zhang, X.A. (2004). The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res* 64, 7455-7463.

Zhu, G.Z., Miller, B.J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C.C., Hynes, R.O., Myles, D.G., and Primakoff, P. (2002). Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development* 129, 1995-2002.

Zimmerman, A.W., Joosten, B., Torensma, R., Parnes, J.R., van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G. (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 107, 3212-3220.

Zimmerman, A.W., Nelissen, J.M., van Emst-de Vries, S.E., Willems, P.H., de Lange, F., Collard, J.G., van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G. (2004). Cytoskeletal restraints regulate homotypic ALCAM-mediated adhesion through PKCalpha independently of Rho-like GTPases. *J Cell Sci* 117, 2841-2852.



ANEXOS

ABREVIATURAS

Las abreviaturas y acrónimos procedentes del inglés se han mantenido en ese idioma.

ADAM: *a desintegrin and metalloproteinase.*

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ALCAM: *activated leukocyte cell adhesion molecule.*

ARN: ácido ribonucleico.

ARNhp: ácido ribonucleico en horquilla pequeño.

ARNip: ácido ribonucleico interferente pequeño.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

CD: *cluster of differentiation.*

CPA: célula presentadora de antígeno.

DMEN: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium.*

EGF: *epidermal grow factor.*

FBS: *fetal bovine serum.*

GPI: glicosilfosfatidilinositol.

GST: *glutation-S-transferase.*

GSH: *reduced glutation.*

HB-EGF: *heparin-binding epidermal growth factor-like.*

HEPES: 4-(2-hidroxethyl) piperazine 1-ethanesulfonic acid.

HUVEC: *human umbilical vein endotelial cells.*

ICAM-1: *intercellular adhesion molecule one.*

IFN- γ : interferon gamma.

LEL: *large extracellular loop.*

MAPK: *mitogen activated protein kinase.*

MFI: *mean fluorescence intensity.*

MHC: *major histocompatibility complex.*

MMP-2: *matrix metalloproteinase two.*

MT1-MMP: *membrane type-matrix metalloproteinase one.*

NK: *natural killer.* Célula asesina nata.

PAGE: *poli-acrylamide gel electrophoresis.*

PBL: *peripheral blood limphocytes.*

PBS: *phosphate buffered saline.*

PHA: fitohemaglutinina.

PLA: *in situ proximity ligation assays.*

PLL: poly-L-Lysina.

PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate.*

PMSF: *phenyl methyl sulfonyl flouride.*

RT-PCR: *reverse transcription-polymerase chain reaction*

SDS: *sodium dodecyl sulfate.*

SEL: *short extracellular loop.*

SEE: *Staphylococcal enterotoxin E*

SMAC: *supramolecular activation clusters.*

TACE: *TNF- α converting enzyme* o ADAM-17.

TBS: *Tris buffered saline.*

TCR: *T cell receptor.*

TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha.*

VCAM-1: *vascular adhesion molecule one.*

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

PUBLICACIONES DURANTE LA TESIS

- **Álvaro Gilsanz**, Lorena Sánchez-Martín, María Dolores Gutiérrez-López, Susana Ovalle, Guido W. Swart, Carl G. Figdor, Esther M. Lafuente y Carlos Cabañas. ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. En revisión en *Cellular and Molecular Life Science*.

- Gema Pérez-Rivero, Graciela Cascio, Silvia Fernández Soriano, **Álvaro Gilsanz**, Julia Sáez de Guinoa, José M. Rodríguez-Frade, Borja L. Holgado, Carlos Cabañas, Yolanda R. Carrasco, Jens V. Stein and Mario Mellado. JAK1 and JAK2 deficiency alter naïve T cell homing to lymph nodes. En revisión.

- Elisa Rossi*, Carmen Langa*, **Álvaro Gilsanz***, Francisco J. Blanco, Juan Ayllón, Enrique Villar, Luisa M. Botella, Carlos Cabañas, Marlene Shaw y Carmelo Bernabeu. Characterization of chichen Endoglin and its tissue expresion. *Gene* 2012 Jan 1;491(1):31-9. * Estos autores contribuyeron igualmente en este trabajo

- M.D. Gutiérrez López*, **A. Gilsanz***, M. Yáñez-Mó*, S. Ovalle, E.M. Lafuente, C. Domínguez, P.N. Monk, I. González Álvaro, F. Sánchez-Madrid y C. Cabañas. The Sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cellular and Molecular Life Science*. 2011 Oct;68(19):3275-92. *Estos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.



PUBLICACIONES