

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Biología Celular**



**SEÑALIZACIÓN Y RESPUESTAS FISIOLÓGICAS  
INICIADAS EN EL ANTÍGENO CD53**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Mónica Yunta González

Bajo la dirección del doctor

Pedro A. Lazo - Zbikowski

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1723-3**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Departamento de Biología Celular**



**SEÑALIZACIÓN Y RESPUESTAS FISIOLÓGICAS**

**INICIADAS EN EL ANTÍGENO CD53**

**Tesis Doctoral**

**Mónica Yunta González**

**Madrid 2002**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Biología Celular**

**Centro Nacional de Biología Fundamental  
Instituto de Salud Carlos III**

**Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca**

**SEÑALIZACIÓN Y RESPUESTAS FISIOLÓGICAS  
INICIADAS EN EL ANTÍGENO CD53**

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctora en  
Biología por la licenciada

**Mónica Yunta González**

Director

**Dr. Pedro A. Lazo-Zbikowski**

Investigador Científico del C.S.I.C.

Tutor

**Dr. Agustín G. Zapata González**

Catedrático del Departamento de Biología Celular  
de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad  
Complutense de Madrid

**Madrid 2002**



Instituto de Biología Molecular y  
Celular del Cáncer  
Universidad de Salamanca-CSIC



Campus Miguel de  
Unamuno S/n  
37007, Salamanca, España  
Tel. 923 29 47 20  
Fax 923 29 47 43  
[www.cicancer.usal.org](http://www.cicancer.usal.org)

Mónica Yunta González ha realizado su tesis doctoral bajo mi dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca.

Las aportaciones más relevantes de este trabajo incluyen:

- La demostración de que el antígeno CD53 tiene capacidad de señalización por sí mismo.
- Identificación de la implicación de la ruta de la quinasa terminal de c-jun (JNK) en diferentes tipos celulares tras ligación de CD53.
- La inducción de proliferación en células mesangiales mediada por la vía de MEK-ERK.
- La protección frente a apoptosis en células tumorales linfoides.

Y para que así conste firmo el presente certificado

En Salamanca, el 15 de marzo de 2002

Fdo. Dr. Pedro A. Lazo-Zbikowski

**El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Salud Carlos III y en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, bajo la dirección del doctor Pedro A. Lazo-Zbikowski, y ha sido financiado con una Beca del Instituto de Salud Carlos III y una Beca de la Fundación para la Investigación del Cáncer en la Universidad de Salamanca.**

**Departamento de Biología Celular**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Universidad Complutense de Madrid**

A mi familia,  
Joaquín, Marisa y Nacho  
A José Luis

La espiga vana se yergue altiva hacia el cielo,  
en cambio, cuando la espiga está llena, se inclina amorosa  
hacia la tierra, en señal de agradecimiento.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi director de tesis el haberme dado la oportunidad de formarme en su laboratorio, y el haberse preocupado siempre de que conociese el mundo de la Ciencia, a través de colaboraciones y congresos.

A los doctores José Antonio Melero y Agustín Portela, les agradezco el haberme ayudado en mis comienzos.

A los doctores Xosé Bustelo y José María Rojas, gracias por su inestimable asesoramiento científico y por los reactivos que me han proporcionado.

Los doctores Vaclav Horejsi y Ramón Vilella nos proporcionaron varios anticuerpos.

A los doctores José Miguel López Novoa y Alicia Rodríguez-Barbero, gracias por preocuparos porque mi trabajo saliese adelante, por todos los consejos.

En la primera etapa de mi tesis, en el Carlos III, conocí a muchas personas, varias de las cuales puedo considerar mis amigos. Entre ellas están Paz y Elo, con las que conseguí desconectar tantas veces cambiando la bata por la bota, Victor ("in the morning"), Fali, las mariajoseses, Concha, Gonzalo (el rey del mojito), Nuria, Tito (el verdadero "number one"), Charo, que me ayudó con el microscopio de fluorescencia, las vecinas, M<sup>a</sup> Luisa, Susana, Pili y Belén, gracias por ayudarme con el citómetro y por todos los buenos ratos, y las otras vecinas, Yoli, Bea, Marta y Patricia. Con todos ellos compartí muy gratas comidas y sobremesas, con su sal y su pimienta, de las que conservo el sabor agradable del postre.

Durante mi estancia en el laboratorio de Agustín, conocí a Carmen, Enrique, Nacho, Dolores y Adela de los cuales guardo un grato recuerdo, y muy especialmente de Osvaldo, que me enseñó muchas cosas y tuvo el valor de dejarme cargar sus geles de secuencia.

En esta última etapa de mi tesis, en Salamanca, también tengo la suerte de haber conocido a muchas personas de las que he recibido cariño y apoyo. A Belén, Edurne y Ester, gracias por los buenos ratos, a Antonio y Elena, por su etapa de desinteresada ayuda con el confocal, a Josiño, Fátima, Rosa, Noelia, Miguel, Carmen, María, Avelino, Ana, Violeta,

Ricardo..., y un cada vez más largo etcétera, que llenamos el comedor cada día. Gracias a los encargados de citómetro Marta y Martín, y gracias a Fran, Celso, Carlos y Lucía, que se esfuerzan porque poco a poco todo vaya funcionando.

Gracias a Juana que me enseñó a hacer los cultivos primarios de las células mesangiales, y a Fernando por su ayuda durante los experimentos de cristal violeta.

A mis compañeros de laboratorio, Sandra, que es un ejemplo de serenidad para todos, Ana, que me cuida las "niñas" cuando estoy de viaje y que tantos consejos me ha dado sobre la presentación de la tesis, Claudio y Francisco, nuestros técnicos informáticos particulares, y Virginia, que con su simpatía ha conseguido que el laboratorio sea un sitio ordenado. A Francisco tengo que agradecerle además haberme ayudado con las mudanzas. A todos, gracias por estar siempre dispuestos a echar una mano. También tengo un buen recuerdo de otras personas que han pasado por el labo, como Victor, que nos hacía reír, y Estela.

Es corriente oír que este mundillo sólo lo entiende el que está dentro. Yo tengo la inmensa suerte de que mis amigos me hayan entendido, o al menos lo hayan intentado, y de que me hayan apoyado siempre. A Mari Carmen, Vicente, Pili, Alberto, Gema, Mónica, Pablo, María e Ika, gracias porque siempre parece ayer la última vez que nos vimos.

A mis colegas y amigos de la facultad, Lidia, Nacho, Manuel, Belén y David, con los que descubrí el apasionante mundo de la Biología en todos sus ámbitos, y a Lorena, que llegó después a nuestras vidas (a unas más que a otras).

A mis compañeras de piso, por el buen ambiente y la grata convivencia.

A mis padres, sin los cuales ni esto, ni nada hubiese sido posible, por regalarme lo más precioso, su tiempo, para que yo tuviese más, a mi padre por los madrugones, y a mi madre por las horas de cocina.

A mi hermano, porque sé que puedo contar con él.

A Pepe, porque mi agradecimiento no cabe en estas líneas.



	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS TETRASPAN .....	2
1.2. EXPRESIÓN TISULAR DE LA FAMILIA TETRASPAN .....	5
1.3. INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS TETRASPAN CON OTRAS MOLÉCULAS .....	5
1.3.1. Integrinas .....	6
1.3.2. Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).....	10
1.3.3. Otras moléculas .....	11
1.4. SEÑALIZACIÓN DE LAS TETRASPAN .....	13
1.4.1. Las Tetraspan como marcadores de activación celular .....	13
1.4.2. Señales inducidas por anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas Tetraspan.....	13
1.4.3. Señalización de los Complejos Tetraspan .....	15
1.5. EFECTOS BIOLÓGICOS MEDIADOS POR LAS PROTEÍNAS TETRASPAN .....	16
1.5.1. Proliferación y crecimiento celular.....	16
1.6. ADHESIÓN, MIGRACIÓN Y METÁSTASIS .....	18
1.6.1. Efectos sobre adhesión y migración mediados por anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas Tetraspan .....	18
1.6.1.1. <i>Adhesión Homotípica</i> .....	18
1.6.1.2. <i>Adhesión Heterotípica</i> .....	19
1.6.1.3. <i>Migración</i> .....	20
1.6.2. Efectos sobre migración inducidos por transfección de las Tetraspan en células tumorales .....	21
1.6.3. Los complejos Tetraspan en Adhesión y Migración .....	21
1.7. DIFERENCIACIÓN CELULAR .....	24
1.8. FUNCIONES ALTERADAS EN ORGANISMOS DEFICIENTES EN TETRASPAN .....	25
1.8.1. Humanos.....	25
1.8.2. Ratones .....	25
1.8.3. Drosophila .....	26

	<b>Página</b>
1.9. LAS TETRASPAN COMO MARCADORES DE PRONÓSTICO EN CÁNCER.....	26
1.10. ASPECTOS GENERALES DE LAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK) .....	28
1.10.1. Organización temporal de los módulos de MAPK.....	29
1.10.2. Especificidad en la función y activación de MAPK.....	30
1.11. QUINASA N-TERMINAL DE c-Jun, JNK.....	32
1.11.1. Mecanismos de activación de JNK.....	32
1.11.2. Factores de transcripción activados por JNK .....	33
1.11.3. Funciones mediadas por la activación de JNK.....	34
1.11.3.1. <i>Supervivencia y apoptosis</i> .....	34
1.11.3.2. <i>Proliferación</i> .....	35
1.11.3.3. <i>Migración</i> .....	35
1.11.3.4. <i>Inflamación</i> .....	36
1.12. QUINASA ACTIVADA POR ESTRÉS, p38 .....	36
1.12.1. Mecanismos de activación de p38.....	36
1.12.2. Sustratos de p38.....	38
1.12.3. Factores de transcripción activados por p38.....	38
1.12.4. Función.....	38
1,12.4.1. Inflamación.....	38
1.12.4.2. <i>Apoptosis</i> .....	39
1.12.4.3. <i>Proliferación</i> .....	39
1.12.4.4. <i>Diferenciación</i> .....	40
1.13. QUINASA ACTIVADA POR ESTÍMULOS EXTRACELULARES, ERK.....	40
1.13.1. Mecanismos de Activación de ERK.....	40
1.13.2. Sustratos de ERK.....	41
1.13.3. Factores de Transcripción Activados por ERK.....	41
1.13.4. Funciones mediadas por la activación de ERK .....	42
1.13.4.1. <i>Proliferación</i> .....	43
1.13.4.2. <i>Diferenciación</i> .....	43
1.13.4.3. <i>Migración</i> .....	43
1.13.4.4. <i>Inflamación</i> .....	44

	<b>Página</b>
1.13.4.5. <i>Apoptosis</i> .....	44
1.14. <b>ACTIVACIÓN DE JNK Y ERK MEDIADA POR INTEGRINAS</b> .....	44
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	47
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	49
3.1. <b>REACTIVOS</b> .....	50
3.1.1. Anticuerpos .....	50
3.1.2. Enzimas .....	51
3.1.3. Productos radiactivos .....	51
3.1.4. Material de cultivo para células de mamífero .....	51
3.1.5. Material de cultivo para células procariotas .....	52
3.1.6. Productos químicos .....	52
3.2. <b>CÉLULAS</b> .....	53
3.2.1. Células procariotas .....	53
3.2.2. Líneas celulares de mamífero .....	53
3.3. <b>PLÁSMIDOS</b> .....	54
3.4. <b>CONSTRUCCIÓN DE ADN<sub>s</sub> RECOMBINANTES</b> .....	55
3.4.1. Construcción de pCEFLKZ-hCD53 .....	55
3.5. <b>CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS</b> .....	55
3.6. <b>CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO</b> .....	55
3.6.1. Cultivo de líneas celulares .....	55
3.6.2. Cultivo primario de células Mesangiales de rata Wistar .....	56
3.6.3. Mantenimiento del cultivo primario de células Mesangiales de rata Wistar .....	57
3.7. <b>ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR</b> .....	57
3.7.1. Medida de la incorporación de timidina al ADN .....	57
3.7.2. Cuantificación del número de células por Cristal Violeta .....	58
3.7.3. Medida de la actividad mitocondrial .....	58
<b>Página</b>	
3.8. <b>TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN</b> .....	58
3.8.1. Citometría de Flujo .....	58

	<b>Página</b>
3.8.1.1. <i>Marcaje de antígenos de superficie</i> .....	58
3.8.1.2. <i>Marcaje de ADN para determinación de Ciclo Celular</i> .....	59
3.8.2. Microscopía de Fluorescencia y Confocal.....	59
3.8.3. Inmunohistoquímica .....	59
3.9. <b>EXPRESIÓN EN BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST</b> .....	60
3.10. <b>TRANSFECCIONES</b> .....	61
3.10.1. Transfección transitoria de células linfoides .....	61
3.10.2. Transfección transitoria de células epiteliales.....	61
3.10.3. Transfección transitoria de células NIH 3T3.....	62
3.10.4. Transfección estable de células NIH 3T3.....	62
3.11. <b>ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA</b> .....	62
3.11.1. Ensayos de actividad JNK endógena.....	62
3.11.2. Ensayos de actividad quinasa exógena.....	63
3.12. <b>INMUNOPRECIPITACIÓN Y "WESTERN BLOT"</b> .....	64
3.13. <b>ENSAYO DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL</b> .....	65
<b>4. RESULTADOS</b> .....	66
4.1. <b>ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ANTÍGENO CD53</b> .....	67
4.1.1. El anticuerpo MRC OX44 induce fosforilación de c-Jun en un linfoma de rata .....	67
4.1.2. MEM53 activa JNK endógena y exógena en células Jurkat .....	69
4.1.2.1. <i>Ensayo de actividad JNK endógena en células Jurkat</i> .....	69
4.1.2.2. <i>Ensayo de actividad JNK exógena en células Jurkat</i> .....	71
4.1.3. Expresión de hCD53 en 293T y posterior análisis de la activación de JNK.....	71
4.1.4. MEM53 activa la transcripción dependiente de c-Jun.....	75
4.1.5. Estudio de la implicación de Vav en la ruta de señalización de CD53 .....	76
4.1.6. MEM53 activa p38 y ERK exógenas en células epiteliales .....	80
4.1.6.1. <i>MEM53 activa p38 exógena en células 293T</i> .....	80
4.1.6.2. <i>MEM53 activa ERK en células Cos-1</i> .....	81
4.2. <b>EXPRESIÓN DE CD53 EN CÉLULAS MESANGIALES IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y SEÑALIZACIÓN</b> .....	83

	<b>Página</b>
4.2.1. Determinación de la expresión de CD53 en células mesangiales .....	83
4.2.2. Relación de los niveles de expresión de CD53 en la membrana plasmática de las células mesangiales con proliferación.....	85
4.2.3. Estudio de la incorporación de timidina al ADN en células mesangiales por efecto del anticuerpo MRC OX44 .....	86
4.2.3. Estudio de las vías de señalización implicadas en inducir la síntesis de ADN mediada por CD53.....	87
4.2.5. TGF- $\beta$ como posible factor bloqueante de la síntesis de ADN inducida por CD53 .....	89
4.2.6. Estudios de proliferación en células mesangiales por ligación de CD53 .....	91
4.2.7. Análisis del ciclo celular en células mesangiales de rata Wistar tratadas con el anticuerpo MRC OX44.....	93
4.3. EFECTO DE LA LIGACIÓN SOSTENIDA EN EL TIEMPO DE CD53 EN CÉLULAS IR938F .....	96
4.3.1. Análisis del ciclo celular en las células IR938F tratadas con el anticuerpo MRC OX44.....	96
4.3.2. Análisis mediante "western blot" de los niveles de expresión de las proteínas PCNA y PARP .....	99
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>117</b>

## **ABREVIATURAS**

ADN	ácido desoxirribonucleico
Amp <sup>r</sup>	resistencia a ampicilina
APS	persulfato amónico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ácido ribonucleasa
BcR	receptor de antígeno de los linfocitos B
BS	suero bovino
BSA	albúmina de suero bovino
cDNA	ADN complementario
Ci	unidad de radiactividad, correspondiente a $2.2 \times 10^5$ c.p.m.
c.p.m.	cuentas por minuto
DAPI	4,6-Diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EC1	dominio extracelular de menor tamaño de las proteínas Tetraspan
EC2	dominio extracelular de mayor tamaño de las proteínas Tetraspan
EDTA	ácido etilendiaminotetra-acético
ERK	quinasa regulada por estímulos extracelulares
FAK	quinasa de adhesión focal
FBS	suero bovino fetal
g	gramo
Hepes	ácido N-(2-hidroxietil)-piperacín-N'-(2-etano-sulfónico)
IL	interleuquina

## *Abreviaturas*

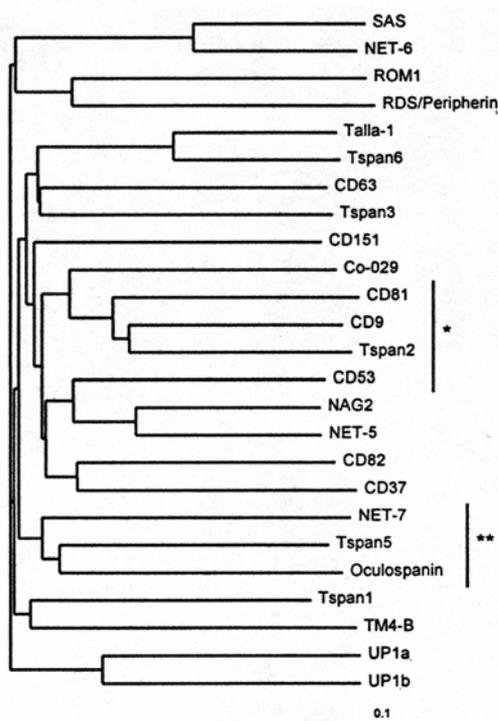
---

IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
JNK	quinasa N-terminal de c-Jun
Kda	kilodalton
M	molaridad
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKK	quinasa de la MAPK
$\mu$ Ci	microcurio
$\mu$ g	microgramo
$\mu$ l	microlitro
ml	mililitro
nm	nanometro
PBS	tampón fosfato salino
PI 3K	fosfatidil-inositol 3-quinasa
PI 4K	fosfatidil-inositol 4-quinasa
PKC	proteína quinasa C
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
SHR	ratas espontáneamente hipertensas
TcR	receptor de antígeno de los linfocitos T
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS TETRASPAN

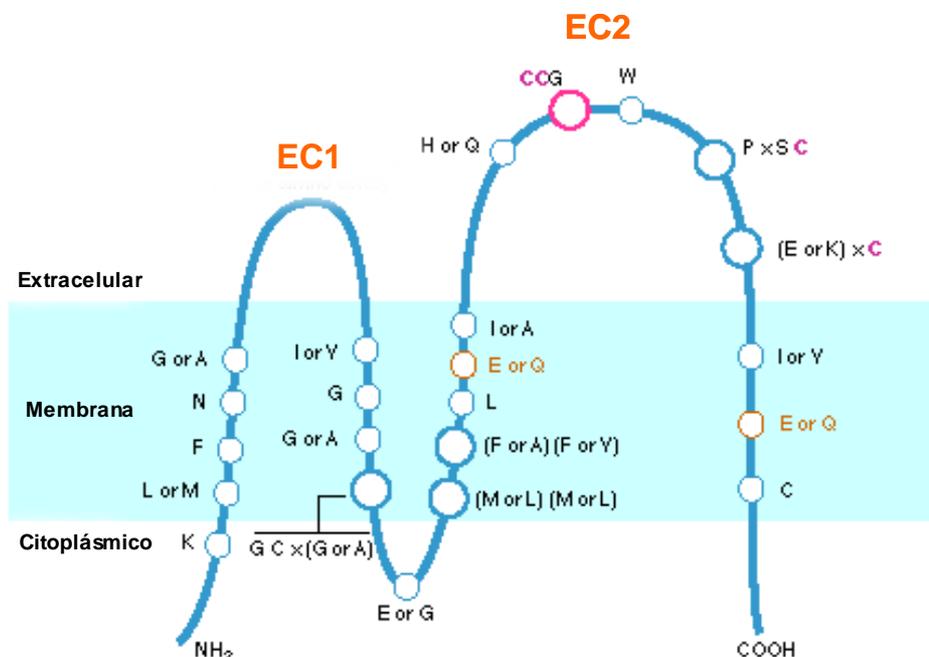
La familia Tetraspan comprende al menos 25 miembros en humanos. Fueron descubiertas en 1990 por dos grupos independientes, los cuales clonaron dos nuevos genes: CD81 [1] y Sm23 [2], cuyas secuencias de aminoácidos presentaban una alta homología con el antígeno de melanoma ME491 previamente descrito en 1989 [3] (Figura1).



**Figura 1. La familia de proteínas Tetraspan.** La figura muestra la familia Tetraspan en humanos. \* Indica las moléculas Tetraspan con cuatro cisteínas en el dominio EC2. \*\* Indica las Tetraspan con ocho cisteínas en el dominio EC2. El resto de las Tetraspan tienen seis cisteínas en el dominio EC2. La distancia entre las Tetraspan está indicada por una longitud relativa de la rama, donde 0.1 equivale a un 10% de los aminoácidos diferentes.

Las Tetraspan son proteínas de membrana tipo II, que se distinguen por tener una única cadena polipeptídica, de 200 a 300 aminoácidos, con cuatro dominios transmembrana (hidrofóbicos) muy conservados en la familia (Figura 2). Los extremos amino terminal y carboxilo terminal son cortos ( 5 a 14 aminoácidos) y se disponen hacia el citosol [4]. Los dominios transmembrana están unidos por un dominio extracelular de pequeño tamaño (20-27 residuos), EC1, entre los dominios transmembrana 1 y 2, un dominio intracitoplásmico, también pequeño, entre los dominios transmembrana 2 y 3 y un dominio extracelular de gran tamaño (75-130 aminoácidos), EC2, entre los dominios transmembrana 3 y 4 [5, 6], que se encuentra normalmente N-glicosilado [7]. Existen unos residuos específicos muy conservados,

localizados en el dominio transmembrana 2, el dominio intracelular y la región transmembrana 3. Existen miembros distantes, que comparten el mismo patrón estructural, y algunos residuos conservados, pero carecen de estos residuos conservados en los dominios transmembrana, como las Uroplaquinas o RDS/ROM (Figura 2).



**Figura 2. Estructura predicha para las proteínas Tetraspan.** La estructura propuesta está basada en la secuencia de aminoácidos y está pendiente de ser confirmada por cristalografía. Se representan en círculos los siguientes aminoácidos: azul, conservados; magenta, cisteínas conservadas en el dominio EC2; naranja, aminoácidos cargados del tercer y cuarto dominio transmembrana. El tamaño de los círculos indica si hay uno (círculo pequeño) o más (círculo grande) aminoácidos conservados en esa posición; x indica una posición donde todos los aminoácidos son potencialmente aceptables.

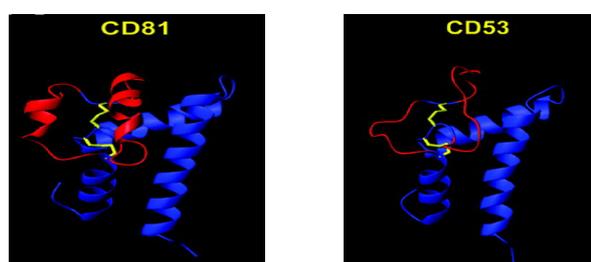
Los dominios transmembrana no presentan homología con los de otras familias de proteínas con cuatro dominios transmembrana como las Conexinas o CD20 [7]. Estos dominios contienen un alto número de aminoácidos polares, cuyo emplazamiento en la bicapa lipídica, en principio energéticamente desfavorable, parece estar implicado en la interacción con otras moléculas transmembrana, como ocurre en el caso de las interacciones de CD9 con HB-EGF [8], con el precursor de la cadena  $\beta$ 1 y la correspondiente cadena madura [9] o con CD9P-1 [10]

Los dominios extracelulares, por el contrario, presentan una elevada variabilidad en longitud, secuencia y grado de glicosilación. Todas la Tetraspan contienen en el dominio EC2 cuatro, seis u ocho cisteínas, que participan en la formación de puentes disulfuro, esenciales para el correcto plegamiento de la proteína.[6, 11]

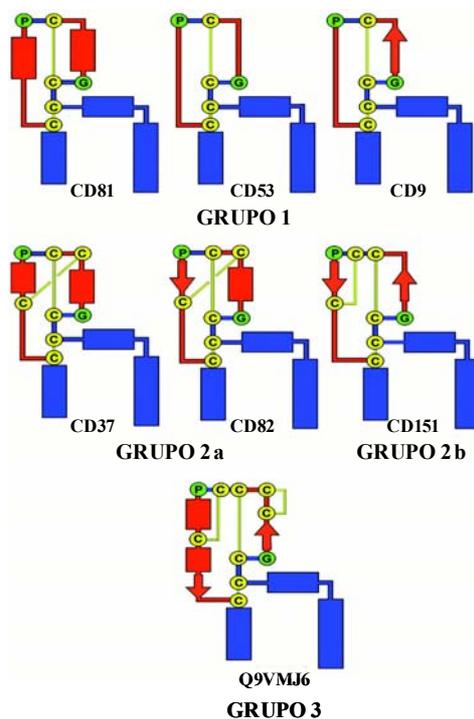
El dominio EC2 está organizado en dos subdominios (Figura 3 A). El primer subdominio, a pesar de su divergencia en secuencia, tiene un plegamiento conservado

que consiste en tres hélices. El segundo subdominio es altamente variable en longitud, estructura secundaria y plegamiento, está insertado en el subdominio conservado, y su topología relativa está gobernada por puentes disulfuro, cuyo número corresponde con diferentes subtipos de proteínas Tetraspan (Figura 3 B). El subdominio conservado, debe contener sitios que corresponden a interacciones comunes a todas las Tetraspan, como interacciones entre ellas o con integrinas, mientras que el subdominio variable debe estar implicado en interacciones específicas de cada Tetraspan, como interacciones con virus ó toxinas [6].

A



B



**Figura 3. Estructura cristalográfica del EC2 de las Tetraspan.** A) Estructura cristalográfica de dos moléculas Tetraspan humanas, CD81 y CD53. En azul se representan los subdominios conservados y en rojo el subdominio variable. B) Ejemplos de los tres subgrupos de Tetraspan, atendiendo al número de cisteínas en EC2 y la predicción del plegamiento en base a estas cisteínas. Los rectángulos, flechas y líneas finas corresponden a  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -hélice y coil, respectivamente. Los subdominios conservados y variables se representan en azul y rojo, respectivamente. Las cisteínas y los puentes disulfuro están indicados en amarillo. Otros residuos importantes se indican en verde.

Los dominios citoplásmicos presentan baja homología dentro de la familia, aunque algunos residuos están conservados en la mayoría de las moléculas Tetraspan clásicas. La homología dentro de la Filogenia es, sin embargo, elevada. [7]

Las proteínas Tetraspan aparecen temprano en la Filogenia, en la superficie de *Schistosoma mansoni*. [2]. En el genoma de *Caenorhabditis elegans* se han encontrado varios genes homólogos a los de las Tetraspan [12, 13] y en *Drosophila melanogaster*, el gen *lbl* (“late bloomer”, relacionado con la formación de sinapsis neuromusculares), presenta una elevada homología con los genes que codifican para las Tetraspan [14].

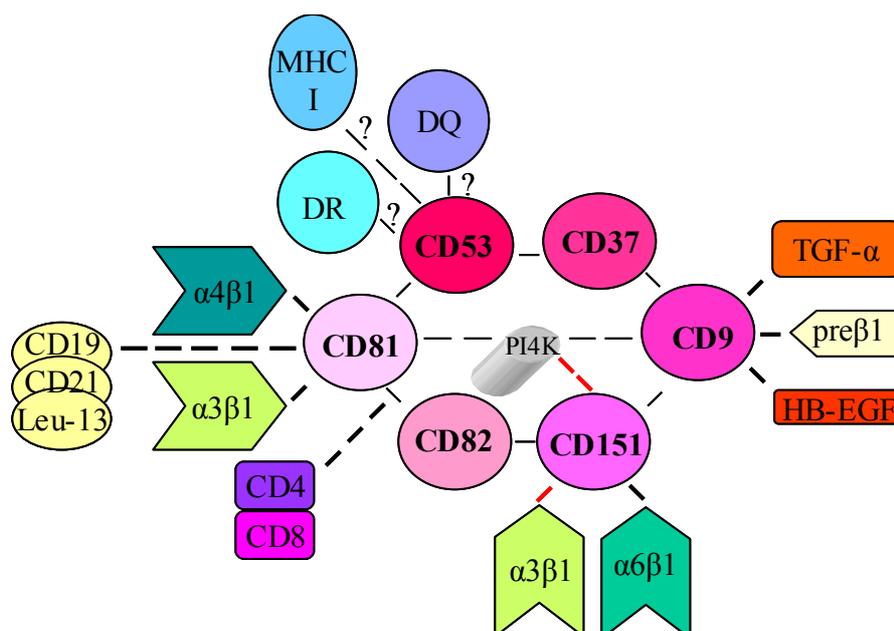
## **1.2. EXPRESIÓN TISULAR DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS TETRASPAN**

En mamíferos, algunas Tetraspan como CD81, CD82, CD9 o CD63 se expresan prácticamente en todos los tejidos. Varias de ellas son marcadores de diferenciación en leucocitos, como CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 y A15 [11, 15]. CD9 es característico de plaquetas y de células pre-B, CD63 es un componente ubicuo de la membrana lisosomal que se encuentra en los gránulos densos de plaquetas y en los corpúsculos de Weibel-Palade y aparece en la membrana plasmática de células tumorales y activadas, CD81 y CD82 se expresan ampliamente tanto en leucocitos como en otros tipos celulares, CO-029 se encuentra en carcinomas, CD53 es panleucocitario y se ha descrito su presencia en queratinocitos del sustrato espinoso y en la capa granular [16], mientras que CD37 está restringido a linfocitos B [17]

## **1.3. INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS TETRASPAN CON OTRAS MOLÉCULAS.**

Las proteínas Tetraspan interaccionan entre sí [18] y con otros tipos de moléculas transmembrana como integrinas y MHC, formando complejos macromoleculares en la membrana plasmática [18-20], [21] que conectan con moléculas intracelulares como PI4K [22-24] ó PKC [25] (Figura 4).

Las diferentes interacciones de las proteínas Tetraspan con otras moléculas se resumen en la Tabla I, al final del apartado 1.3.



**Figura 4. Complejo macromolecular de las Tetraspan.** Las proteínas Tetraspan interactúan entre sí en la membrana plasmática y con otros elementos formando complejos macromoleculares, dando lugar a la denominada “Red Tetraspan”. La figura muestra un modelo hipotético representativo que no corresponde a un modelo celular real. Nótese que las moléculas CD19 y CD37 se expresan en linfocitos B, mientras que CD4 y CD8 se expresan en linfocitos T.

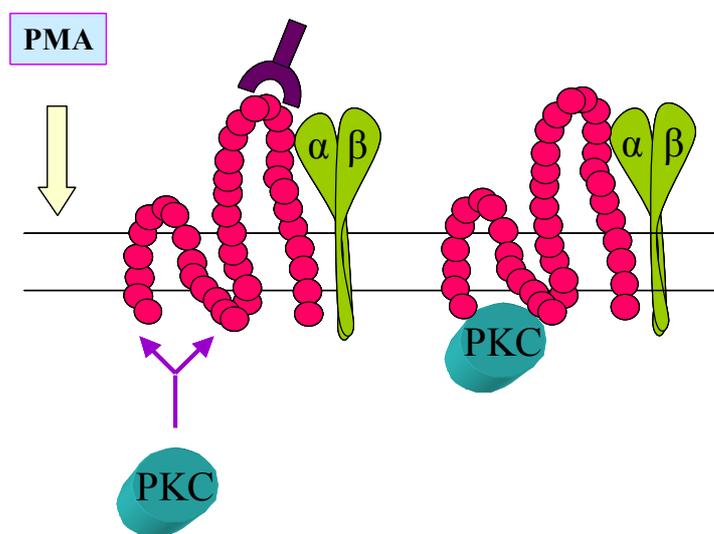
### 3.1. Integrinas.

La primera evidencia de la asociación de las Tetraspan con integrinas describió la interacción de CD9 con la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  en plaquetas. Dicha asociación no es constitutiva, sino que es inducida por el tratamiento con anticuerpos contra CD9 [26]. Posteriormente se han descrito la interacción de CD151 con la integrina  $\alpha\text{6}\beta\text{4}$  en los hemidesmosomas de queratinocitos humanos, donde regula la organización de los mismos [27] y la interacción de CD63 con CD11b/CD18 (integrina tipo  $\beta\text{2}$ ), que localizan en grandes complejos, de alta resistencia a solubilización en detergentes, en la membrana plasmática, tras la activación de neutrófilos humanos por tratamiento con anticuerpos que reconocen a CD63 [28]. Aparte de estos tres casos, las interacciones descritas hasta ahora entre las Tetraspan e integrinas implican siempre a la cadena  $\beta\text{1}$ , y son interacciones constitutivas. Concretamente todas las Tetraspan interactúan con las integrinas  $\alpha\text{3}\beta\text{1}$ ,  $\alpha\text{6}\beta\text{1}$  y  $\alpha\text{4}\beta\text{1}$  [19, 20, 29-31]. La interacción de CD9 con la integrina  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  ha sido descrita en células B [18, 29], aunque otros autores describen la ausencia de interacción, tanto de CD9 como de otras Tetraspan con  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  [19, 30, 31]. Asimismo, ni la integrina  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ , ni  $\alpha\text{6}\beta\text{4}$ , se asocian con las proteínas Tetraspan [19].

Se ha descrito la existencia de complejos multimoleculares en la membrana plasmática, en los cuales al menos las Tetraspan CD9, CD81, CD82 y CD63 se asocian entre sí y con las integrinas  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 1$ . En estos complejos también están presentes antígenos HLA-DR [18]. Otros estudios implican en estos complejos también a la integrina  $\alpha 3\beta 1$  [19].

Las Tetraspan CD81 y CD151 son las que más establemente interaccionan con integrinas. Estas interacciones estables están constituidas por CD81/ $\alpha 4\beta 1$ , CD151/ $\alpha 3\beta 1$  y CD151// $\alpha 6\beta 1$  [32]. CD81 forma asimismo uniones estables con  $\alpha 3\beta 1$  en filopodios, neuritas y conos en crecimiento de un modelo neuronal [33]. Esto sugiere que, entre las Tetraspan, CD81 y CD151 interaccionan directamente con las integrinas, mientras que las otras Tetraspan se asocian a integrinas indirectamente a través de CD81 y CD151 [32].

La interacción de las integrinas con las proteínas Tetraspan, está mediada por el dominio extracelular de la cadena  $\alpha$  [19] y el dominio extracelular grande de la molécula Tetraspan. Concretamente, la interacción entre CD151 y  $\alpha 3\beta 1$  se debe al dominio extracelular de la cadena  $\alpha 3$  (aminoácidos 570-705), el cual no se ha visto implicado en la interacción de las integrinas con otras proteínas de membrana, y el dominio extracelular grande de CD151 (aminoácidos 186-217) [4] (Figura 5).



**Figura 5. Modelo de interacción Integrina-Tetraspan-PKC.** Las moléculas Tetraspan CD81 y CD151 interaccionan directamente con las integrinas a través del dominio EC2 de las Tetraspan y el dominio extracelular de la cadena  $\alpha$ . Tras la estimulación celular con anticuerpos dirigidos contra EC2 o con ésteres de forbol, PKC es translocada a la membrana plasmática, donde se asocia con las Tetraspan a través de los dominios citosólicos a continuación de las dos primeras regiones transmembrana.

El hecho de que la integrina  $\alpha 6\beta 1$ , pero no  $\alpha 6\beta 4$ , interaccione con las Tetraspan, sugiere que la cadena  $\beta$  también esté implicada en la interacción [19].

CD9 interacciona con el precursor de la cadena  $\beta 1$  a través de dos regiones de CD9, el dominio extracelular grande y el cuarto dominio transmembrana (requeridos también para la asociación con la cadena madura) y los dominios transmembrana I y II, que se requieren únicamente para la interacción con la proteína inmadura. Dicha interacción es exclusiva de CD9, ya que otras Tetraspan, como CD81, CD82 y CD63, no se asocian con dicha molécula. [9].

En los complejos de las Tetraspan con integrinas están incluidas otras moléculas de membrana, como MHC [18]. CD46, molécula que protege a las células del ataque autólogo del complemento, interacciona con múltiples integrinas  $\beta 1$  y con las Tetraspan CD9, CD151, CD81 y CD82 [34]. CD36 es una glicoproteína de membrana implicada en agregación plaquetaria, que interacciona con las integrinas  $\alpha IIb\beta 3$  y  $\alpha 6\beta 1$  y con CD9 en plaquetas humanas [35]. Otras moléculas de membrana como HB-EGF forman parte de los complejos CD9- $\alpha 3\beta 1$  [30]. La interacción de CD9 con HB-EGF requiere el dominio extracelular largo, el dominio transmembrana 4 y el dominio citosólico carboxilo terminal de CD9 [8].

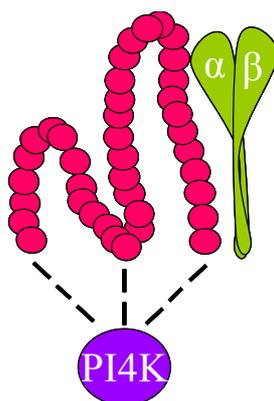
Las Tetraspan forman complejos en membrana en los que las integrinas están excluidas, tal es el caso de la asociación directa entre el receptor de EGF y CD82 [36]. CD9 y CD81 interaccionan directamente con CD9P-1/EWI-F [10, 37], molécula con dominios inmunoglobulina, cuyo homólogo en rata, la proteína FPRP, es capaz de regular la actividad del receptor de la prostaglandina  $PGF-2\alpha$ , aunque no se ha demostrado que su homólogo humano tenga esta función. CD63, CD82 y CD151 también interaccionan con CD9P-1/EWI-F, aunque más lábilmente que CD9 y CD81, sugiriendo éstos se asocian al complejo de manera indirecta a través de los otros dos. El dominio extracelular más grande y el cuarto dominio transmembrana de CD9 están implicados en la interacción [10]. EW1-2, molécula de la misma familia que CD9P-1/EWI-F, también interacciona directamente con CD9 y CD81 en ausencia de integrinas [38].

Moléculas citoplásmicas como PKC y PI 3K, también interaccionan con los complejos Tetraspan- integrinas.

Las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta II$  y  $\gamma$ , interaccionan con las proteínas Tetraspan CD9, CD53, CD81, CD82 y CD151. Esta asociación no es constitutiva, sino que ocurre como

consecuencia de su translocación a la membrana plasmática durante su activación. La especificidad de la asociación, parece residir en las colas citoplásmicas de los dos primeros dominios transmembrana de las proteínas Tetraspan [25]. Las Tetraspan son las moléculas conectoras entre las integrinas y PKC, lo cual explica por qué el dominio extracelular de la integrina  $\alpha 3$  es necesario para el anclaje a membrana de PKC y para la fosforilación del dominio citoplásmico de la cadena  $\alpha 3$  mediada por PKC [25] (Figura 4).

Las Tetraspan CD81, CD63, CD9, CD151 y A15/TALLA1 interaccionan constitutivamente con PI 4K tipo II en complejos en los cuales está presente la integrina  $\alpha 3\beta 1$ . En cambio, otras integrinas que también se asocian a CD81 y CD63, como  $\alpha 6\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$ , no forman parte de los complejos en que interviene PI 4K [24], y tampoco otras Tetraspan como CD82 y CD53, siendo esta la única ocasión en que éstas aparecen excluidas de un complejo en el que participan otras proteínas Tetraspan [22]. Los complejos de PI 4K con CD63 son mayoritariamente intracelulares, [22]. El antígeno CD63, predominantemente intracelular, presente en estos complejos en la membrana plasmática, podría tener una función de reciclaje de estructuras de adhesión en el frente de avance [24]. CD151 es el nexo que conecta a PI 4K y  $\alpha 3\beta 1$ , interaccionando con ambas moléculas directamente. La asociación de CD151 con  $\alpha 3\beta 1$ , requiere el dominio extracelular de  $\alpha 3$ , lo cual explica por qué la asociación de PI 4K con  $\alpha 3\beta 1$  requiere asimismo dicho dominio [23] (Figura 6).

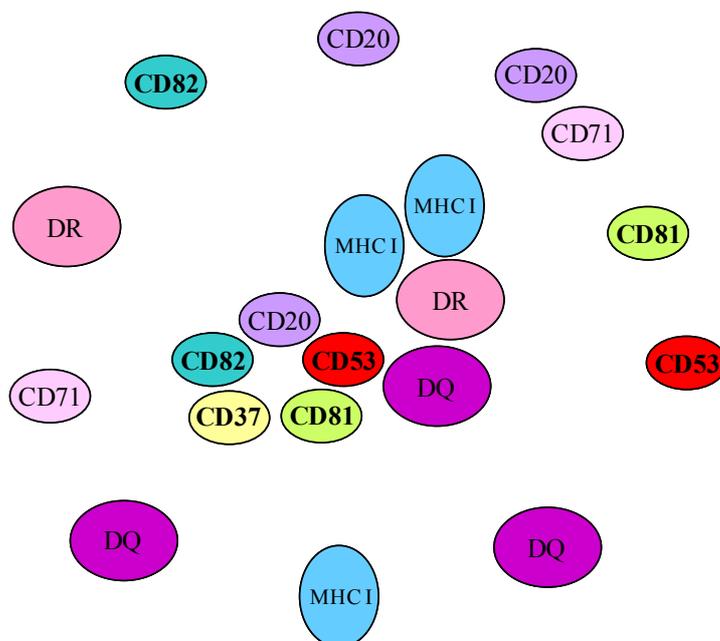


**Figura 6. Modelo de la interacción de Integrinas-Tetraspan-PI 4K.** La molécula CD151 es el nexo que conecta a las integrinas con PI4K. CD151 interacciona directamente con la integrina  $\alpha 3\beta 1$  a través de los dominios extracelulares de CD151 (EC2) y de la cadena  $\alpha$ . PI 4K interacciona con los dominios citosólicos de CD151 en una localización exacta desconocida.

Los complejos constituidos por las Tetraspan CD9 o CD81 y la integrina  $\alpha 3\beta 1$  y los complejos de la Tetraspan CD63 y PI 4K localizan en la membrana plasmática en microdominios similares a los "lipid rafts" (áreas de membrana con un alto contenido en colesterol, fosfolípidos y esfingolípidos), que no contienen caveolina y son más solubles que los "lipid rafts" clásicos [39].

### 1.3.2. Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

Las interacciones de las proteínas Tetraspan con moléculas MHC se han estudiado sobre todo en linfocitos B, donde se han descrito complejos de CD81, CD37, CD53 y CD82 con glicoproteínas MHCII (-DR) [21, 40]. Mediante una técnica inmunofísica denominada Transferencia de Energía por Citometría de Flujo, se describe la existencia de complejos macromoleculares constituidos por las Tetraspan CD53, CD81, CD82 con los Complejos Principales de Histocompatibilidad, tanto de Clase I como de Clase II (en concreto DR y DQ), además de otras moléculas como CD71 (receptor de transferrina) y CD20. La proximidad de estas moléculas en la membrana plasmática, sugiere que se distribuyan formando complejos macromoleculares en la superficie celular. El modelo propone que sólo una proporción de estas moléculas esté en los complejos, mientras que otra proporción esté aislada o formando complejos "incompletos", en que faltan algunos elementos [41] (Figura 7).



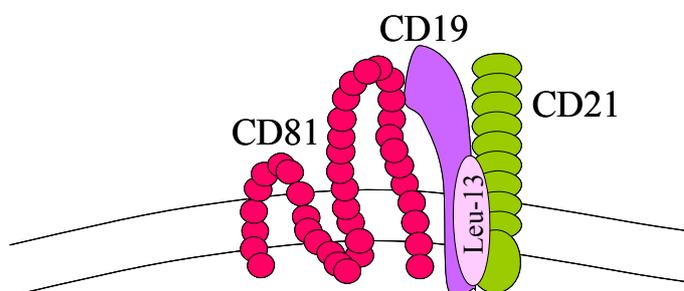
**Figura 7. Modelo de Transferencia de Energía por citometría de Flujo.** Las moléculas Tetraspan interactúan entre sí en la membrana plasmática y con moléculas MHC de Clase I y de Clase II, además de con otras moléculas como CD20 y CD71.

También existen interacciones entre las Tetraspan y las moléculas MHC II intracelulares. CD63 interacciona con MHC II en diversos compartimentos intracelulares de células dendríticas [42]. En linfocitos B, CD82 y CD63 son componentes de los MIIC, vesículas endocíticas tardías, que participan en presentación antigénica. En estos compartimentos, CD63 y CD82 interaccionan con las moléculas HLA-DR, HLA-DM (molécula que se asocia a MHCII y favorece la unión del péptido además de degradar la porción de la cadena invariable que ocupa el lugar del péptido, CLIP) y HLA-DO (molécula que se asocia a DM e inhibe su acción) en células B humanas. [43]

Las moléculas de MHC clase II que se encuentran asociadas con CD82 contienen péptido, y no están unidas a la cadena invariable (molécula que impide la unión prematura del péptido), lo cual sugiere que CD82 interviene en los últimos estadios de la maduración de las moléculas MHC II [43].

### 1.3.3. Otras moléculas.

Varias Tetraspan se asocian con diferentes moléculas que actúan como correceptoras en el sistema inmune. La proteína homóloga a CD53 en rata se asocia con CD2 en células T y en una línea NK [44], mientras que CD81 y CD82 coprecipitan con CD4 y CD8 en células T así como entre sí. La interacción de CD4 con CD81 es totalmente dependiente del dominio citoplásmico de CD4, aunque la interacción con CD82 depende tanto del dominio citoplásmico como del extracelular de CD4 [45]. CD81 también forma un complejo macromolecular que incluye a las moléculas CD21, CD19 y Leu-13 (antígeno inducible por interferón), en linfocitos B [46], (Figura 8).



**Figura 8. Interacción de las Tetraspan con el complejo de señalización de células B, CD21/CD19/Leu-13.** La molécula CD81 interacciona con el complejo CD19/CD21/Leu-13 a través del dominio EC2 de CD81 y el dominio extracelular de CD19. CD21 interacciona con CD19. La posición exacta de Leu-13 en el complejo no se conoce.

Las proteínas Tetraspan CD82 y CD9 también interactúan con CD19. La interacción entre CD81 y CD19 es directa a través del dominio extracelular de CD19, mientras que CD82 y CD9 interactúan con CD19 indirectamente a través de CD81. [47]. La señalización del complejo requiere el dominio citoplásmico de CD19, lo que sugiere que CD19 es la molécula implicada en transducir las señales enviadas por el complejo al interior celular [48].

**Tabla I. Interacciones de las Tetraspan con otras moléculas.**

	CD53	CD81	CD82	CD9	CD151	CD63	CD37	REFERENCIAS
<b><math>\alpha 3\beta 1</math></b>	+	+	+	+	+	+	+	[19, 20, 32, 33, 51]
<b><math>\alpha 4\beta 1</math></b>	+	+	+	+	ND	+	ND	[18, 20, 29, 32, 52]
<b><math>\alpha 6\beta 1</math></b>	+	+	+	+	+	+	ND	[18-20, 32]
<b><math>\alpha 5\beta 1</math></b>	ND	+	+	+	ND	+	ND	[18, 29]
<b>Precursor <math>\beta 1</math></b>	ND	—	—	+	ND	—	ND	[9]
<b><math>\alpha IIb\beta 3</math></b>	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	[26]
<b><math>\alpha 2\beta 1</math></b>	—	—	ND	—	—	—	—	[19]
<b><math>\alpha 6\beta 4</math></b>	ND	—	ND	—	+	—	ND	[27]
<b>HLA-DR</b>	+	+	+	ND	ND	+	+	[21, 40, 43]
<b>HLA-DM</b>	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	[43]
<b>HLA-DQ</b>	+	+	+	ND	ND	ND	ND	[41]
<b>HLA-DO</b>	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	[43]
<b>PI 4K</b>	—	+	—	+	+	+	ND	[22-24]
<b>PKC</b>	+	+	+	+	+	—	—	[25]
<b>EGF-R</b>	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	[36]
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	[50]
<b>HB-EGF</b>	ND	—?	—?	+	ND	ND	ND	[8]
<b>CD36</b>	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	[35]
<b>CD11/CD18</b>	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	[49]
<b>CD9P-1</b>	ND	+	+	+	+	+	ND	[10]
<b>CD2</b>	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	[44]
<b>CD4</b>	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	[45]
<b>CD8</b>	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	[45]
<b>CD21-CD19- Leu 13</b>	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	[46]
<b>CD19</b>	ND	+	+	+	ND	ND	ND	[47]
<b>CD20</b>	+	+	+	ND	ND	ND	ND	[41]
<b>CD46</b>	ND	+	+	+	+	ND	ND	[34]

**Tabla I:** En el eje horizontal de la tabla se indican las moléculas Tetraspan, y en el eje vertical las moléculas con las cuales se ha descrito la interacción. El símbolo + indica que se ha descrito la interacción. El símbolo — indica que se ha descrito la ausencia de interacción. ND indica que no se ha descrito la interacción.

Otras interacciones a destacar son las de CD63 con CD11/CD18 en neutrófilos humanos [49] y CD9 con el Factor de Crecimiento Transformante, TGF- $\alpha$ , transmembranal a través del dominio extracelular de TGF- $\alpha$  [50], Tabla I.

La variedad de complejos anteriormente expuestos, ha llevado a la hipótesis de que las Tetraspan funcionan como moléculas adaptadoras, dentro de complejos macromoleculares, donde organizan la posición relativa de otras moléculas de superficie, modulando su función [18] (Figura 4).

#### **1.4. SEÑALIZACIÓN DE LAS TETRASPAN**

##### **1.4.1. Las Tetraspan como marcadores de activación celular.**

Las Tetraspan se asocian con activación celular. Algunas ven aumentados sus niveles de expresión en células activadas: CD9 y CD53 ven aumentados sus niveles durante la activación celular de plaquetas y linfocitos, respectivamente [53, 54]. CD63 es un antígeno predominantemente intracelular que localiza en la membrana plasmática de células activadas como plaquetas [55-57] y en lesiones ateroscleróticas de conejos Watanabe (modelo de hiperlipidemia hereditaria) [58]. CD82 aumenta sus niveles en una línea monocítica (U937), en respuesta a varias citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, interferón- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [59], y CD81 aumenta sus niveles de expresión en eosinófilos de pacientes infectados con helmintos [60]. En otras ocasiones, los niveles de expresión se ven reducidos como consecuencia de la activación celular: CD53 disminuye sus niveles de expresión en neutrófilos humanos activados, en paralelo con una disminución de los niveles de CD44 y CD43 [61], y la expresión de CD37 se pierde rápidamente de la superficie de linfocitos B activados [7].

##### **1.4.2. Señales inducidas por anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas Tetraspan.**

La ligación de las proteínas Tetraspan por sí solas produce activación de múltiples líneas hematopoyéticas, como plaquetas por ligación de CD9 [62], linfocitos B y monocitos por ligación de CD53 [63, 64] o de neutrófilos por ligación de CD63 [49]. Dicha activación conduce a un aumento de los niveles de Ca<sup>+2</sup> intracelulares [62, 65], producción de DAG e inositol 1,4,5-trifosfato, así como activación de PKC [62], que conlleva su translocación a la membrana plasmática [65]. En macrófagos de rata, la ligación de CD53, además de estos procesos, induce liberación de óxido nítrico dependiente de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible [65], y en humanos, la ligación de CD53 activa el mecanismo oxidativo del monocito, a través de un proceso que parece ser independiente de PKC [64]. Otros efectos son la inducción de

secreción granular, en una línea basofílica transfectada con CD63 por ligación del mismo [66] o fosforilación en tirosina, por ligación de CD82 en monocitos [59]. La fosforilación en tirosina de p72syk por ligación de CD9, se produce tanto por ligación del anticuerpo completo [67], como de sus fragmentos F(a,b), [68]. Otros efectos de las Tetraspan son producidos por el anticuerpo completo, y no por los correspondientes fragmentos F(a,b), como aumento en los niveles de calcio intracelulares y fosforilación en tirosina, producidos por la ligación de CD53 en células leucémicas de rata con actividad NK [44]. En monocitos, la ligación simultánea de CD82 y del Receptor de Fc da lugar a un aumento de los niveles de calcio intracelulares sostenido, mientras que la ligación del Receptor de Fc sólo da lugar a una movilización transitoria [59].

Las proteínas Tetraspan CD53 y CD63 interaccionan con una actividad fosfatasa en rata, en lisados de ganglios linfáticos y en un timoma, y en una línea basofílica respectivamente, aunque las consecuencias funcionales de estas interacciones no se conocen [69]. CD63 interacciona asimismo con actividades quinasa de la familia Src sin identificar [49].

Las Tetraspan son capaces de inducir un efecto coestimulador en células T y B por coligación con los correspondientes Receptores de células T y B. Este es el caso de CD9 en linfocitos T [70] o de CD81 en linfocitos B. El complejo macromolecular que forman CD81, CD19, CD21 y Leu-13 en linfocitos B, [46] disminuye el umbral de señalización a través del receptor de células B [71, 72]. La ligación de CD82 produce una señal coestimuladora en linfocitos T, induce adhesión y produce cambios morfológicos [73], como desarrollo de extensiones de membrana [74]. Recíprocamente, coestímulos como CD2 y CD3 aumentan las alteraciones morfológicas inducidas por CD82, aunque ambos procesos, inducción de cambios morfológicos y activación de linfocitos T, son independientes [74]. La ligación simultánea de CD82 y CD3 produce cambios fenotípicos en las células Jurkat, como aumento en los niveles de expresión de HLA de clase I [73].

CD81 funciona como receptor del virus de la hepatitis C [75], mediante la interacción del dominio extracelular largo de CD81 con la proteína E2, de la envuelta del virus [76, 77]. La interacción de la proteína E2 con CD81 induce una señal coestimuladora para células T en humanos *in vitro*, y se piensa que este antígeno puede estar implicado en el proceso auto inmune asociado a la infección por HCV [78].

El antígeno CD81 modula asimismo las interacciones entre las células B y las T durante la presentación antigénica. La ligación de CD81 aumenta la producción de IL-4

por parte de las células T CD4<sup>+</sup> cuando estas son cocultivadas con células B, pero no cuando estas se cocultivan con monocitos. El proceso va acompañado de la formación de agregados celulares [79].

Tanto CD81 como CD82 interactúan con CD4 y CD8 en células T. Dicha interacción está implicada en señalización, ya que p56lck está excluida de los complejos CD81/CD82/CD4 [45].

#### **1.4.3. Señalización de los Complejos Tetraspan.**

Las proteínas Tetraspan CD81, CD82 y CD9 se asocian con CD19 en células B y la ligación con anticuerpos contra CD9 o CD81 producen un patrón similar de fosforilación en tirosina que incluye a la propia CD19 [47].

Los complejos formados por las proteínas Tetraspan CD9, CD63, CD151, CD81, CD82 y la integrina  $\alpha 3\beta 1$  están implicados en señalización. Células epiteliales sembradas sobre placas a las que previamente se han adherido anticuerpos contra integrinas, presentan una correcta adhesión y fosforilación de FAK, mientras que células sembradas sobre placas preadheridas con anticuerpos anti Tetraspan, presentan escasas prolongaciones y la fosforilación de FAK es menor que en células en suspensión. Sin embargo, en células sembradas simultáneamente sobre colágeno y anticuerpos anti Tetraspan, éstos potencian la fosforilación de FAK inducida por colágeno [80]. La expresión ectópica de CD9 en un fibrosarcoma provoca una disminución de la fosforilación de FAK, así como de los filamentos de actina en las áreas corticales, en células adheridas a colágeno, produciendo el efecto contrario en células adheridas a laminina [80]. De estos resultados se deduce que la influencia de las proteínas Tetraspan sobre el grado de fosforilación de FAK, es dependiente del sustrato.

Los efectos de las proteínas Tetraspan sobre señalización intracelular se resumen en la Tabla II.

**Tabla II. Señales transducidas por ligación de las proteínas Tetraspan con anticuerpos monoclonales u otros estímulos.**

ANTÍGENO	EFEECTO	CÉLULA	ANTICUERPO	REFERENCIA
CD9	↑ Ca+2 +PKC tyr-P p72syk-P	Plaqueta	NNKY 1-19	[68]
CD9	Syk-P Cbl-P	Macrófago	KMC 8.8	[67]
CD9+CD3	activación	Linfocito T	9D3	[70]
CD53	↑ Ca+2	Linfocito B	MEM53	[63]
CD53	↑ Ca+2	Linfocito B Monocito	HD77	[64]
CD53	↑ Ca+2 tyr-P	"Natural Killer"	7D2	[44]
CD53	↑NO ↑ DAG,↑IP3 ↑ Ca+2 +PKC	Macrófago	MRC OX44	[65]
CD63	↑ secreción granular	RBL-2H3	MO2, M36	[66]
CD63	↑CD11/CD18 ↓ CD62L	Neutrófilo	AHN-16, 16.1, 16.2, 16.3, 16.5	[49]
CD81/CD19+ CD21+Leu13	+PI 3K ↑ Ca+2 +PLC	Linfocito B		[71, 72]
CD81	↑ IL-4	Cocultivo Linfocito TCD4 <sup>+</sup> -B	5A6	[79]
CD81	Activación	Linfocito T	E2 (HCV)	[78]
CD82+CD3	↑ HLA I ↑ IL-2	Linfocito T	IA4, γC11 + OKT3	[73, 74]
CD82	↑ Ca+2 tyr-P	Monocito	IA4	[59]
CD81/CD9/CD19	Tyr-P CD19-P	Linfocito B	M38/SYB-1/B4	[47]
CD9/CD81/CD82/CD53 /CD151	+ PKC	Adherentes Suspensión	PMA	[25]
CD9/CD81/CD82/CD63 /CD151	+/- FAK-P	Carcinoma de mama humano	BU16/JS64/M104/ 6H1/5C11	[80]

**Tabla II:** La ligación de las Tetraspan con anticuerpos monoclonales o ésteres de forbol induce múltiples señales intracitoplásmicas como fosforilación en tirosina, activación celular o estimulación del metabolismo del calcio.

## 1.5. EFECTOS BIOLÓGICOS MEDIADOS POR LAS PROTEÍNAS TETRASPAN

### 1.5.1. Proliferación y crecimiento celular.

Las proteínas Tetraspan han sido implicadas en proliferación como potenciadores o como inhibidores, según los anticuerpos utilizados o el contexto celular empleado como sistema. (Tabla III).

La ligación simultánea de las Tetraspan y el Receptor de Células T produce un efecto coestimulador medido por la producción de interleuquina-2, que puede estar acompañado de estimulación o inhibición de la proliferación celular [8, 81].

La ligación de las proteínas Tetraspan por sí solas, también tiene efectos sobre proliferación, tanto potenciadores como inhibidores.

La ligación de CD53 en rata, induce proliferación en células T esplénicas [44], mientras que la ligación de CD53 humano, induce la entrada en G<sub>1</sub> de linfocitos B en reposo, pero el paso del punto de restricción de G<sub>1</sub> tardía y la entrada en la fase S sólo progresan en presencia de coestímulos como interleuquinas 2 y 4 [63].

En cuanto a los efectos antiproliferativos, CD37 bloquea la proliferación de células B inducida por tratamiento con inmunoglobulinas [17] y la ligación de los antígenos CD9, CD53, CD81, CD82 y CD37 se ha descrito como desencadenante de efectos antiproliferativos en múltiples ocasiones [1, 21, 40, 82].

Los efectos antiproliferativos del antígeno CD81 descritos en células B, parecen estar mediados por el complejo CD19/CD21/CD81/Leu-13, ya que la estimulación de cualquiera de los componentes de este complejo tienen los mismos efectos: bloqueo de la proliferación, que inicialmente es reversible, pero con tratamientos largos da lugar a muerte celular y coestimulación por ligación del Receptor de Células B [1, 46, 83].

Las proteínas Tetraspan modulan la actividad de diversos Receptores y Factores de Crecimiento. La expresión de CD9 aumenta la respuesta mitótica del receptor de EGF inducida por TGF- $\alpha$  y disminuye la proteólisis de TGF- $\alpha$  inducida por la estimulación del receptor. El proceso conduce a un aumento de la proliferación en ensayos yuxtacinos y a una disminución en la proliferación autocrina en células epiteliales [50]. La ligación de CD9, pero no de otras Tetraspan, también modula la actividad de HB-EGF, aumentando su respuesta como agente mitótico, [8] y como receptor de la toxina diftérica [84]. La proteína Tetraspan CD82/KAI-1, interacciona directamente con el Receptor de EGF, en células epiteliales que expresan CD82 de manera ectópica. La expresión de CD82 en estas células, provoca un aceleramiento en la desensibilización de las células al receptor, debido a un aumento en su velocidad de internalización, aunque no influye en la estimulación inicial del mismo [36].

La ligación de las Tetraspan regula el crecimiento celular, en estudios realizados en neuritas. La ligación de CD81 y CD151 bloquea el crecimiento de las neuritas cuando las neuronas crecen sobre un sustrato de la integrina  $\alpha 3 \beta 1$  (laminina-5), la cual interacciona con las Tetraspan, pero no tienen ningún efecto sobre células sembradas en

laminina -1 o fibronectina, que no son sustratos de  $\alpha 3\beta 1$ . [33]. En otros estudios, por el contrario, CD9 induce el crecimiento de las neuritas resultando bloqueado el proceso por anticuerpos contra  $\alpha 3$  [85].

**Tabla III. Efectos sobre proliferación y crecimiento celular inducidos por el tratamiento con anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas Tetraspan.**

ANTÍGENO	EFEECTO	CÉLULA	ANTICUERPO	REFERENCIA
CD81+CD3	+	Linfocito T	5A6	[81]
CD81	-	Linfocito B	RBG5, 5A6	[1, 83]
CD81	-	Linfocito B	5A6	[40]
HLA-DR			L243	
CD53	+	Linfocito T	7D2	[44]
CD53	+	Linfocito B	MEM53	[63]
CD37	-	Linfocito B	HD28	[17]
CD82	-	Linfocito B Monocito	IA4	[82]
(CD82, CD81, CD53, CD9, MHC I) + CD3	-	Linfocito T	(IA4, 5A6, MEM53, ALB-6) + OKT3	[8]
CD81 CD151	-	Neuritas	M38 5C11, 11B1G4	[33]
CD9	+	Neuritas	B2C11	[85]

**Tabla III:** La ligación de las proteínas Tetraspan produce efectos sobre la proliferación celular, inductores o inhibitorios, dependiendo del anticuerpo y del contexto celular.

## 1.6. ADHESIÓN, MIGRACIÓN Y METÁSTASIS.

### 1.6.1. Efectos sobre adhesión y migración mediados por anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas Tetraspan.

#### 1.6.1.1. Adhesión Homotípica

Los anticuerpos monoclonales contra las proteínas Tetraspan son capaces de inducir adhesión homotípica en la mayoría de los casos, y bloquearla en otros.

(Tabla IV).

La ligación de CD9 y CD151 induce agregación plaquetaria [86, 87], que es bloqueada por anticuerpos contra el Receptor para la cadena pesada de las inmunoglobulinas [26, 87]. En el caso de CD9, el proceso va acompañado de la asociación del antígeno con la integrina  $\alpha \text{IIb}/\beta \text{III}$  (GPIIb-IIIa) [26], y en monos, anticuerpos contra la integrina  $\alpha \text{IIb}/\beta \text{III}$  previenen la muerte por trombocitopenia causada por anticuerpos anti CD9 [88].

Numerosos antígenos Tetraspan han sido relacionados con inducción de adhesión homotípica en linfocitos B, como CD37 [89], CD9 [90], CD81 y CD53. En el caso de CD81 la inducción de adhesión va acompañada de inhibición de la proliferación [40], y el proceso ocurre de manera similar en células B y T, aunque existen diferencias; en células T el proceso es dependiente de iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y está mediado por LFA-1 y no por  $\alpha 4\beta 1$  [81], mientras que en células B, el proceso es independiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y no está mediado por LFA-1 [91]. En linfocitos B, sin embargo el proceso parece estar mediado por el complejo CD19/CD21/CD81/Leu-13, ya que la ligación de cualquiera de estos elementos induce adhesión homotípica [46].

La adhesión homotípica que la ligación del antígeno CD53, induce en células B de rata, es dependiente de quinasas de fosfoinosítidos y de PKC, así como de iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  [92], al contrario de lo que ocurre con CD81 en células B [91], aunque ambos antígenos coinciden en que el proceso es independiente de la ligación de LFA-1 [91, 92]. En células humanas la ligación de CD53 induce adhesión homotípica o no, dependiendo del anticuerpo utilizado, mediada por LFA-1 [93].

En otros tipos celulares como macrófagos y neutrófilos, la ligación de CD9 y CD63, respectivamente, produce agregación celular, que va acompañada de la formación de filopodios, en el primer caso [67], y es dependiente de LFA-1 y calcio extracelular en el segundo caso [49].

Todos estos resultados indican que el mecanismo por el cual las Tetraspan median adhesión es dependiente del tipo celular y de los anticuerpos empleados.

#### 1.6.1.2. Adhesión Heterotípica.

La ligación de las Tetraspan también induce agregación heterotípica. La ligación de CD9 induce adhesión de linfocitos B a fibroblastos de médula ósea [90], y de células mieloides a células estromales en cultivos de médula ósea de larga duración [94]. Mientras que la ligación de CD81 o CD19 induce la adhesión de linfocitos B al estroma de tonsilas en un proceso dependiente de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  [95], (Tabla IV).

**Tabla IV. Efectos de la ligación de las proteínas Tetraspan con anticuerpos monoclonales sobre adhesión celular.**

ANTÍGENO	EFEECTO	CÉLULA	ANTICUERPO	REFERENCIA
CD9	+	Plaquetas	MALL13	[86, 88]
CD9	+	Pre B	50H.19	[90]
		PreB-Médula Ósea	ALB6	
CD9	+	Mieloide-Estromal	KMC8.8	[94]
CD9	+	Macrófago	KMC8.8	[67]
CD63	+	Neutrófilo-Endotelial	AHN-16, 16.1, 16.2, 16.3, 16.5	[49]
CD81	+	Linfocito B	5A6	[40]
HLA-DR			L243	
CD151	+	Plaqueta	14A2.H1	[87, 96]
CD37	+	Linfocito B	G28-1	[89]
CD53	+	Linfocito B	MRC OX44	[92]
CD53	+	Linfocito	HI29	[93]
	—		MEM53	
CD9	+	Megacariocito	SYB-1	[8]
CD81			5A6, JS64	
CD82			γC11	
CD81	+	Endotelio-Matriz	5A6	[51]
CD151		Extracelular	LIA1/1, VJ1/16	
CD81	+	Linfocito B-Estroma de	5A6, JS69	[95]
CD19	+	tonsilas	J4-119, B43, BU12	
CD53	—		H129	

**Tabla IV:** La ligación de las proteínas Tetraspan con anticuerpos monoclonales, produce efectos inductores e inhibidores sobre adhesión homotípica y heterotípica.

### 1.6.1.3. Migración.

La ligación de las proteínas Tetraspan con anticuerpos monoclonales puede bloquear la migración celular. CD151 bloquea la migración de neutrófilos sobre fibronectina [23], (Tabla V, A). La ligación de CD9 bloquea la capacidad migratoria de una línea proveniente de adenocarcinoma de pulmón metastásico [97] y previene la migración *in vitro* de células derivadas de carcinoma de colon humano, sin influenciar la adhesión [98]. En las células derivadas de carcinoma de colon humano, donde la expresión de CD9 es mayor en el tumor primario que en las metástasis, las células derivadas del tumor primario presentan un mayor potencial migratorio que las derivadas de metástasis, lo cual sugiere que la expresión de CD9 es requerida para la motilidad de las células del tumor primario en el torrente circulatorio, mientras que la formación de metástasis en sitios alejados, que requiere extravasación y adhesión al endotelio, requiere disminución de la expresión de CD9 [98], (Tabla V, A).

La formación de lamelipodios y migración celular mediada por EGF está suprimida en células que expresan CD82 de manera ectópica, en las cuales CD82 y el Receptor de EGF interactúan directamente [36].

### **1.6.2. Efectos sobre migración inducidos por transfección de las Tetraspan en células tumorales.**

La transfección de los antígenos Tetraspan en líneas celulares derivadas de metástasis, generalmente bloquea la capacidad migratoria de dichas células, como ocurre con la transfección de CD82 en próstata [99]. Lo mismo ocurre cuando células de melanoma transfectadas con CD63 son inyectadas en ratones desnudos [100] o cuando CD9 es transfectado en numerosas líneas [101]. Sin embargo, CD9 transfectado en una línea celular B de escasa capacidad móvil produce el efecto contrario, estimulando la capacidad móvil de dichas células sobre fibronectina y laminina, en un proceso dependiente de integrinas  $\beta 1$  [102], (Tabla V, B).

Del mismo modo que la transfección, la fusión de células metastásicas de rata con células cancerosas no metastásicas, suprime la capacidad invasiva de las primeras mediante un proceso dependiente de CD82 [103].

La transfección de las Tetraspan en líneas metastásicas también afecta al crecimiento del tumor. La inyección de células de melanoma transfectadas con CD63 en ratones desnudos disminuye la velocidad de crecimiento del tumor, aunque este proceso no se observa *in vitro* [100]. Del mismo modo las células NIH3T3 transformadas con H-Ras, transfectadas con CD63, presentan una velocidad de crecimiento menor que las no transfectadas, cuando se inyectan en ratones desnudos, pero no se observan tales diferencias en la velocidad de crecimiento, en células creciendo *in vitro*. [104].

(Tabla V, B).

### **1.6.3. Los complejos Tetraspan en Adhesión y Migración.**

En células epiteliales las proteínas Tetraspan localizan en estructuras punteadas en los contactos intercelulares. La distribución exacta de estas proteínas en estructuras de adhesión depende del sustrato, apareciendo en el plano de adhesión y en la zona apical, además de en la periferia, en células sembradas en laminina, y sólo periféricamente, en células creciendo sobre colágeno y fibronectina [80]. Algunas Tetraspan, como CD9, se encuentran, en uniones intercelulares y en los "microvilli" simultáneamente, mientras que otras están sólo en las uniones intercelulares, lo cual

indica que existen varios complejos de proteínas Tetraspan con diferente localización [105].

Varias moléculas Tetraspan forman complejos entre sí y con integrinas como  $\alpha 3\beta 1$  en las uniones intercelulares, donde colocalizan con otros elementos de adhesión como E-Cadherina. Las integrinas asociadas a las Tetraspan se encuentran en un estado conformacional de baja afinidad, y estos complejos aparecen también en células que no expresan Cadherinas, lo cual indica que las Tetraspan, son funcionalmente relevantes en adhesión intercelular, en un proceso de adhesión o reconocimiento previo a la adhesión mediada por Cadherinas, que no parece requerir ni inducir, un estado de alta afinidad en las integrinas a las cuales se asocian [105]. Otros elementos de adhesión que colocalizan con los complejos Tetraspan-integrinas, como Talina, están presentes en las Adhesiones Focales, pero existen otros elementos de las Adhesiones Focales que están ausentes de los complejos Tetraspan, como vinculina. Todos estos resultados indican que las Tetraspan están fuera de estructuras que median fuertes uniones celulares. Las estructuras en las que aparecen las proteínas Tetraspan podrían ser unos nuevos Contactos de Adhesión o estructuras tempranas en la formación de Adhesiones Focales [80]. Debido a que estas estructuras carecen de los elementos propios de uniones fuertes de células inmóviles, su lábil unión con el citoesqueleto y su localización distal en filopodios y lamelipodios, la función de estos complejos puede ser la de estructuras dinámicas implicadas en anclaje/desprendimiento, influenciando la organización del citoesqueleto de actina durante la migración celular [80].

En células endoteliales, las proteínas Tetraspan también forman complejos en los cuales están incluidas integrinas como  $\alpha 3\beta 1$ , en uniones intercelulares. La ligación de CD151, CD81 o  $\alpha 3\beta 1$  en estas células aumenta su capacidad de adhesión a la matriz extracelular y bloquean su migración durante el proceso de cicatrización [51]. La ligación de los complejos Tetraspan también induce adhesión homotípica, al mismo tiempo que bloquea la capacidad migratoria de otros tipos celulares como leucemias [8]. Estos resultados indican, que la regulación de la migración por las proteínas Tetraspan, se debe a la modulación de la adhesión [51], (Tabla V, A).

Las proteínas Tetraspan están implicadas en procesos en los cuales se degradan estructuras de adhesión, como ocurre con la matriz extracelular durante la invasión tumoral. [106]. La ligación de cualquiera de los elementos del complejo  $\alpha 3\beta 1$ -Tetraspan aumenta la invasividad de las células tumorales por al menos dos

mecanismos dependientes de PI 3K: reordenamiento de los filamentos de actina y producción, aunque no activación, de MMP2 (metaloproteinasa 2 de la matriz extracelular), así como formación de protusiones de membrana [106], (Tabla V, A).

La molécula CD151 está implicada en la formación y organización de los hemidesmosomas. La transfección de la cadena  $\beta 4$ , en queratinocitos humanos deficientes en esa molécula, ocasiona la incorporación de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  a los complejos  $\alpha 3\beta 1$ -CD151, donde induce la formación de hemidesmosomas, quedando la integrina  $\alpha 3\beta 1$  restringida a las Adhesiones Focales. Como consecuencia de esto, el nivel de expresión de CD151 en los hemidesmosomas aumenta. Estos resultados indican que la interacción de CD151 con la integrina  $\alpha 6\beta 4$ , es esencial para la formación de hemidesmosomas en queratinocitos humanos [27].

**TABLA V: Migración y Metástasis.**

A) Efectos sobre migración celular mediada por anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas Tetraspan.

ANTÍGENO	ANTICUERPO	EFEECTO	CÉLULA	REFERENCIA
<b>CD81</b>	5A6	—	Megacariocito	[8]
	JS64	NO —	Linfocito B	
<b>CD82</b>	IA4, $\gamma$ C11	—		
<b>CD151</b>	LIA1/1, VJ1/16	—	Endotelio-Matriz	[51]
<b>CD81</b>	5A6	—	Extracelular	
<b>CD9</b>	GR2110	NO —		
<b>CD151</b>	SFA1-2B4	—	Neutrófilo	[23]
<b>CD9</b>	BU16	—		
<b>CD63</b>	6H1	—		
<b>CD9</b>	M31-15	—	Adenocarcinoma de pulmón	[97]
<b>CD151</b>	11B1.G4,14A2.H1	—	Endotelial	[107]
<b>CD9</b>	1AA2.H9	—		
<b><math>\beta 1</math></b>	8A2	—		
<b>CD9/CD63/CD81/ CD82/CD151</b>	C9-BB/6H1/M38/ M104/5C11	+	Carcinoma de mama humano	[106]

B) Efecto sobre migración mediada por transfección de las Tetraspan.

ANTÍGENO	CÉLULA	EFEECTO	REFERENCIA
CD82	Adenocarcinoma de próstata	–	[99]
CD63	Melanoma	–	[100]
CD9	Melanoma, Adenocarcinoma de pulmón, Mieloma	–	[101]
CD9	Linfocito B	+	[102]

**TablaV:** A) Muestra los efectos positivos (+) o negativos (–) sobre migración celular, inducidos por tratamiento con anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas Tetraspan. B) Muestra los efectos positivos (+) o negativos (–), que tiene sobre migración celular, la expresión ectópica de las proteínas Tetraspan.

### 1.7. DIFERENCIACIÓN CELULAR

La mayoría de los estudios de implicación de las Tetraspan en diferenciación se han realizado en células linfoides. CD53 parece estar implicado en la maduración de células T, ya que está presente en células dobles negativas (CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>), desaparece en células dobles positivas (células destinadas a morir en el timo), y vuelve a aparecer tras la selección positiva (células positivas para uno de los dos antígenos) [108, 109]

La expresión de los antígenos CD9 y CD37 en los diversos estadios de maduración de células B es excluyente, de manera que CD9 se expresa en estadios tempranos de diferenciación, pero no en células maduras quiescentes [53], mientras que CD37 se expresa en células maduras, pero no en estadios pre-B ni en células plasmáticas [17].

A15 se expresa en linfocitos T inmaduros pero no en linfocitos de sangre periférica. [110]

La coestimulación de CD82 y CD3 induce un proceso de diferenciación, como sugiere el hecho de se produzca inhibición del crecimiento celular, que no va acompañada de muerte celular, y sí de un aumento en la actividad metabólica [73].

CD9 está implicado en la producción de células mieloides en cultivos de médula ósea de larga duración. En los primeros estadios de establecimiento del cultivo, la ligación de CD9 inhibe la producción de células mieloides, pero no linfoides, aumentando su adhesión a las células estromales. En cultivos establecidos (cultivos de cuatro a seis semanas), sin embargo, el anticuerpo no produce disminución, sino aumento, del número de células mieloides [94].

El único estudio de implicación de las proteínas Tetraspan en diferenciación, en células no linfoides realizado hasta la fecha, describe la formación de estructuras

tubulares en células epiteliales CHO, inducida por tratamiento con anticuerpos monoclonales [105].

## **1.8. FUNCIONES ALTERADAS EN ORGANISMOS DEFICIENTES EN TETRASPAN**

### **1.8.1. Humanos.**

Un síndrome familiar, caracterizado por dar lugar a múltiples infecciones recurrentes y heterogéneas, presenta como única alteración la carencia de expresión del antígeno CD53, determinada en linfocitos y neutrófilos, las cuales, en situaciones normales expresan altos niveles de este antígeno. La patología es similar a las producidas por defectos en integrinas. [111].

### **1.8.2. Ratones.**

Los efectos de la ausencia de expresión de las proteínas Tetraspan en ratones se han estudiado con animales "Knock Out".

La ausencia de expresión de CD9 en ratones da lugar a hembras estériles. La interacción del espermatozoide con los "microvilli" del óvulo ocurre normalmente, pero existe una disfunción en la fusión posterior, proceso durante el cual, en animales normales, la molécula CD9 se concentra en el punto de anclaje del espermatozoide [112, 113]. No obstante, la fertilización ocurre normalmente cuando el esperma es micro inyectado en el óvulo [114].

Los ratones deficientes en CD81 presentan un desarrollo de las células T y B normal, aunque la expresión de CD19 es baja y las células B-1 están reducidas en número. La proliferación de las células T, en respuesta a la ligación del receptor de células T, está aumentada en estos animales, mientras que la proliferación de las células B, en respuesta a la ligación del receptor de células B, está severamente inhibida. A pesar de estas alteraciones en proliferación, tanto la fosforilación en tirosina como el flujo intracelular de calcio, en respuesta a la ligación de los receptores T y B es normal [115]. El aumento de calcio intracelular en respuesta a la ligación de CD19, en cambio está afectado en estos animales, seguramente como consecuencia de sus bajos niveles de expresión. Estos resultados indican que CD81 es importante para la señalización de CD19 y la función de las células B [116]. Otros estudios indican que los ratones deficientes para CD81, presentan una inhibición de la respuesta frente a antígenos que

estimulan la respuesta T cooperadora 2. Asimismo la producción de interleuquina-4 específica de antígeno, está reducida en el bazo y los nódulos linfoides de estos animales [117].

### **1.8.3. Drosophila.**

Las motoneuronas de organismos carentes de la proteína Tetraspan "late bloomer" son deficientes en diferenciación a nivel de formación de sinapsis neuromusculares [14].

## **1.9. LAS TETRASPAN COMO MARCADORES DE PRONÓSTICO EN CÁNCER**

Algunos antígenos como CO-029 y SAS fueron identificados en tumores [118, 119].

SAS, uno de los miembros más divergentes de la familia Tetraspan, en cuanto a secuencia de aminoácidos y organización genómica, es un antígeno frecuentemente amplificado en sarcomas humanos [119].

En general la pérdida de expresión de estos antígenos se ha relacionado con mal pronóstico.

CO-029 se expresa en carcinomas gástricos, colon, rectal y páncreas, pero no en tejidos normales [118]. En carcinoma hepatocelular (HCC), CO-029 está sobreexpresado en carcinomas invasivos, mientras que los antígenos CD9 y CD82 presentan una disminución de sus niveles de expresión en dichos tumores [120].

El antígeno CD82 ha sido ampliamente estudiado en varios tumores como próstata, esófago y gástrico, pancreático y cáncer de pulmón no microcítico.

En carcinoma de pulmón no microcítico [121] y próstata, la expresión del antígeno CD82 es un marcador de buen pronóstico. La expresión de este antígeno es baja en biopsias humanas de tumores metastásicos, mientras que en tumores no metastásicos los niveles se mantienen [99, 121], [122]. En próstata, la pérdida de expresión no es ni por mutación ni por pérdida alélica. Se postula que el efecto sea a nivel de mRNA, estando implicados procesos como metilación [122]. En cambio, en cánceres gástricos y de esófago o páncreas, CD82 no es un marcador de pronóstico, a pesar de que en páncreas, que no expresa CD82 en condiciones normales, los niveles de RNA mensajero codificante para CD82 aumentan en la mayoría de los tumores primarios, con niveles variables de expresión, existiendo un descenso de expresión en estados avanzados [123]. En cánceres gástricos, por el contrario, los niveles de

expresión de CD82 no varían, indicando que el antígeno CD82 no está implicado en el desarrollo de dichas enfermedades [124].

CD63 es un antígeno que no se expresa en melanocitos normales, pero sí en los primeros estadios de melanoma, estando reducida o ausente su expresión en las metástasis [100, 125, 126], lo cual indica que CD63 tiene un papel como gen supresor de tumores en melanoma humano, actuando como factor bloqueante de la invasión y progresión del tumor.

CD9 es un marcador de pronóstico en carcinomas de mama [127] y de pulmón no microcítico [128, 129], en los cuales, bajos niveles de expresión correlacionan con mal pronóstico. CD9 es asimismo un marcador del 90% de las leucemias linfoblásticas agudas no T y del 50% de las leucemias mieloide aguda y linfocítica crónica [53].

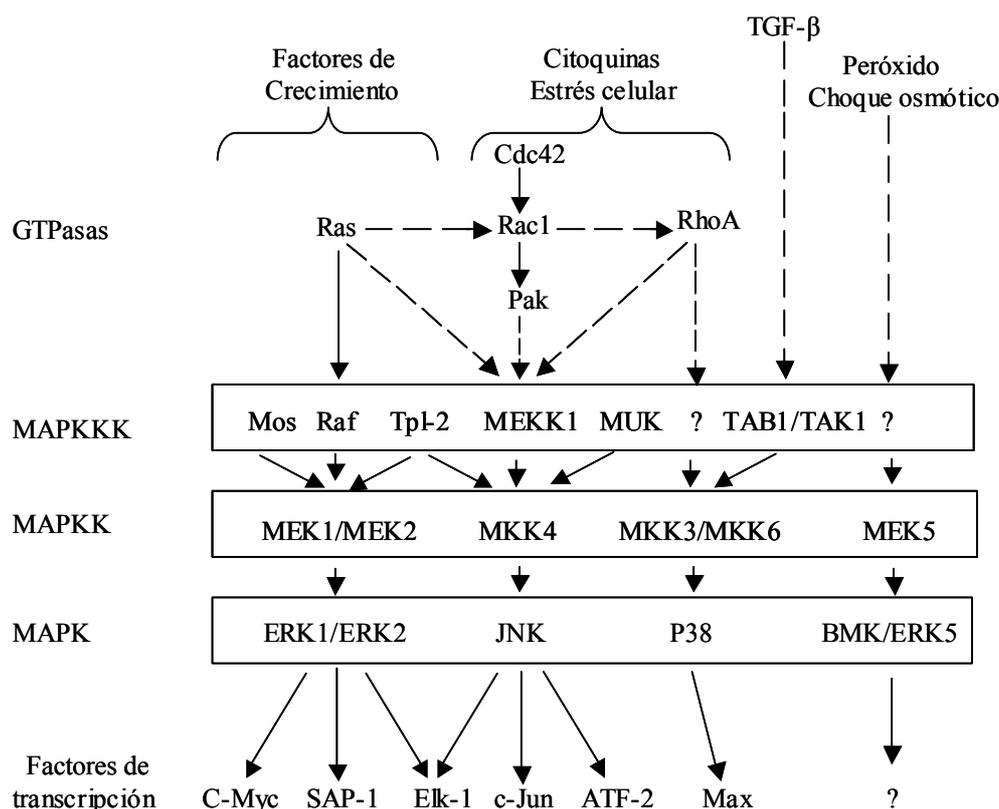
## 1.10. ASPECTOS GENERALES DE LAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

Las MAPK son enzimas conservadas evolutivamente. Responden a estrés físico y químico, controlando supervivencia y adaptación y están implicadas en procesos de crecimiento y diferenciación. Su actividad está regulada a través de cascadas compuestas por MAPK, MAPK quinasa, (MAPKK, MKK o MEK), y las MAPKK quinasa o MEK quinasa (MAPKKK o MEKK). Estos módulos pueden ser activados por STE20 quinasa o proteínas de unión a GTP monoméricas, siendo desactivadas por MAPK fosfatasas [130].

En mamíferos existen tres grupos de MAPK: ERK, p38 y JNK. ERK y p38 están relacionados con MAPK encontradas en levaduras y contienen los mecanismos de fosforilación duales Thr-Glu-Tyr y Thr-Gly-Tyr respectivamente. Las JNK han sido descritas en mamíferos y se fosforilan en el motivo Thr-Pro-Tyr [131].

Las MAPK participan en multitud de procesos celulares como son diferenciación celular, motilidad, proliferación y apoptosis. ERK 1 y 2 se han relacionado preferentemente con proliferación y diferenciación, y JNK y p38, preferentemente con respuestas a estrés como inflamación y apoptosis, aunque hay excepciones, y tanto JNK como p38 pueden mediar proliferación [132, 133].

En mamíferos se expresan al menos cuatro grupos de MAPK: quinasa relacionadas con señales extracelulares (ERK 1 y 2), quinasa N-terminales de c-Jun (JNK 1, 2 y 3), p38 (p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), y ERK 5. Estas a su vez son activadas por MAPKK específicas: MEK 1 y 2 para ERK 1 y 2, MKK 3 y 6 para p38, MKK 4 y 7 (JNKK 1 y 2) para JNK y MEK 5 para ERK 5. Cada MAPKK puede ser activada por más de una MAPKKK, aumentando la complejidad y la diversidad de las señales. Es posible que cada MAPKKK sea responsable de la respuesta a estímulos específicos [130]. Así, c-Raf, es el responsable de la respuesta de ERK 1 y 2 frente a factores de crecimiento, mientras que otras MAPKKK deben activar ERK 1 y 2 en respuesta a estímulos proinflamatorios [130]. MEKK 1 participa en la activación de JNK en células madre embrionarias o en fibroblastos por agentes desorganizadores de microtúbulos, agentes proinflamatorios y factores de crecimiento [134, 135], mientras que participa en la activación de JNK por TNF e IL-1 en células madre embrionarias, pero no en fibroblastos [135], (Figura 9).



**Figura 9. Módulos de activación de las MAPK en mamíferos.** Los módulos de MAPK se componen de MAPKKK, MAPKK y MAPK. Las GTPasas de la familia Ras y Rho transducen las señales extracelulares a la cascada de señalización de las MAPK. Las MAPKKK activadas, pueden a su vez activar una o varias MAPKK; sin embargo, las MAPKK son relativamente específicas para las MAPK. Una vez activadas, las MAPK fosforilan factores de transcripción, los cuales controlan procesos como crecimiento, diferenciación y apoptosis.

### 1.10.1. Organización temporal de los módulos de MAPK.

La organización temporal de las MAPK puede dar lugar a diferentes respuestas. La activación sostenida de ERK, en células PC12, da lugar a diferenciación celular, mientras que el crecimiento celular viene dado por su activación transitoria [136]. En cambio, en fibroblastos NIH3T3, la activación prolongada de ERK da lugar a crecimiento y transformación celular [137]. Las respuestas parecen ser, por tanto, dependientes del tipo celular [133]. JNK también parece responder de manera dependiente del tiempo de activación. En células T, frente a diversos estímulos como la ligación de CD28, ésteres de forbol, radiaciones o ionóforos, una activación sostenida conduce a apoptosis, mientras que una activación transitoria induce proliferación [138]

El hecho de que la activación de MAPK sea persistente o transitoria depende tanto de la acción de fosfatasa como del estado de activación de moléculas anteriores en la vía.

La regulación por fosfatasa comprende fosfatasa duales y serina/treonina fosfatasa. Entre las primeras están MAPK fosfatasa 3 (MKP3), que inactiva selectivamente a ERK; M3/6, exclusiva de SAPK; o MKP1 y MKP-2, las cuales defosforilan a ERK, JNK y p38. MKP-1, MKP-4 y MKP-5 pueden defosforilar a p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  [139, 140], mientras que p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  son resistentes a todos los miembros de la familia [141]. Las fosfatasa duales están restringidas a diferentes compartimentos. Así, MKP-1 localiza en el núcleo y MKP-3 localiza en el citoplasma [133]. Las serina/treonina fosfatasa, como PP1 y PP2A, regulan las cascadas de MAPK, presumiblemente por defosforilación de MEK y Raf, y PP2C tienen un importante papel en la regulación de la vía de señalización de HOG1 (homólogo de p38 en levaduras) [142].

Respecto a los elementos anteriores en la vía, parece que en las células PC12, la activación persistente de ERK se debe a Rap-1 [143], mientras que en la activación temprana interviene Ras.

### **1.10.2. Especificidad en la función y activación de MAPK.**

La especificidad en las cascadas de las MAPK está determinada por varios mecanismos: [130]:

1.- Proteínas “scaffold” que organizan los tres componentes de la cascada y sus elementos anteriores en un módulo específico (Figura 10). En mamíferos, se han identificado JIP1 y MP1, implicadas en la activación de las cascadas de JNK y ERK respectivamente. Ambas proteínas operan, sin embargo, de un modo diferente. Mientras que JIP1 interacciona con JNK, MKK 7, MLK-1 y DLK [144], MP1 se asocia selectivamente a con ERK 1 y MEK 1, pero no con Raf y Ras (Figura 10 A, B). Esta última parece ser muy específica para ERK 1, ya que no se une a ERK 2 y MEK 2 [133, 145].

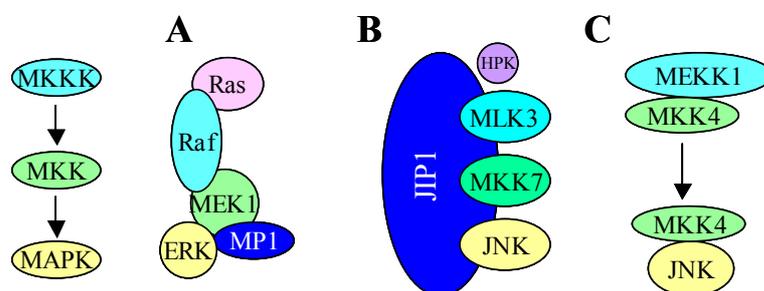
2.- Interacción física secuencial entre miembros de una cascada. Las interacciones proteína-proteína de cada módulo respectivo de MAPK dirigen la formación de complejos de señalización. La interacción de cada elemento se rompe con la activación de la quinasa consecutiva. En la cascada de ERK, Ras-GTP y Raf interaccionan a través del dominio efector de Ras y el dominio de unión a Ras de Raf (Figura 10 A). A su vez las MEKs se unen a Raf, y las ERKs se unen a los dominios N-terminales de MEK. Interacciones similares han sido descritas para el activador de JNK, MKK4, el cual parece organizar el módulo MEKK1, MKK4 y JNK (Figura 10 C).

Teóricamente estas interacciones son suficientes para formar un complejo de señalización, haciendo que proteínas "scaffold" sean innecesarias en mamíferos, al contrario de lo que ocurre en levaduras (Figura 10 A, C). Mientras que las proteínas "scaffold" aumentan la especificidad a expensas de la amplificación, las interacciones secuenciales aportan amplificación sin sacrificar la especificidad [146]. Ambos mecanismos podrían operar en paralelo, dando lugar a una activación diferencial de las mismas MAPK en respuesta a diferentes estímulos.

3.- Señales autocrinas negativas y positivas mediadas por la regulación indirecta de la expresión, tanto de ligandos como de inhibidores de los receptores de membrana implicados en su cascada de señalización [147].

4.- Interacciones enzima-sustrato. En las cascadas de señalización de las MAPK, cada enzima por debajo de la vía, sirve de sustrato a la quinasa inmediatamente superior, de manera que las interacciones enzima-sustrato juegan un papel importante en la transmisión de la señal y ofrecen la posibilidad de crear especificidad [133]. Las MAPK interactúan de forma bipartita con sus sustratos. La especificidad de las interacciones de las MAPK, es una combinación, tanto de la especificidad intrínseca de la región catalítica, por las serinas y treoninas con una prolina en la posición +1, como de dominios que determinan la estabilidad de la unión de la enzima con el sustrato [148], [133].

5.- Localización espacial de las moléculas. La disposición de las moléculas de la vía en distintas localizaciones celulares modula su función. Así, MKK 4 y MKK 7 localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma, a diferencia de los activadores de ERK, MEK 1 y MEK 2, que localizan en el citoplasma. [131].



**Figura 10. Interacciones enzima-sustrato y proteínas ("scaffolds") en mamíferos.** En las cascadas de MAPK en mamíferos, las interacciones secuenciales entre los elementos de la vía hacen prescindible la participación de proteínas "scaffold" (A, C); no obstante, se han descrito proteínas "scaffold" en mamíferos, como JIP1, que organiza el módulo de JNK (B) y MP1 que organiza el módulo de ERK (A).

### **1.11. QUINASA N-TERMINAL DE c-Jun, JNK.**

JNK fue identificada y purificada [149] como la proteína asociada a microtúbulos p54 activada por cicloheximida. Posteriormente se describió que esta proteína se unía al dominio amino terminal de activación de c-Jun y que fosforilaba a ésta en las serinas 63 y 73 [150, 151]. JNK es una MAPK perteneciente al subgrupo de SAPK o proteínas quinasas de respuesta a estrés. Además de fosforilar a c-Jun en aminoácidos específicos, JNK fosforila a otras proteínas AP-1 como son JunB, JunD, y ATF-2 [131].

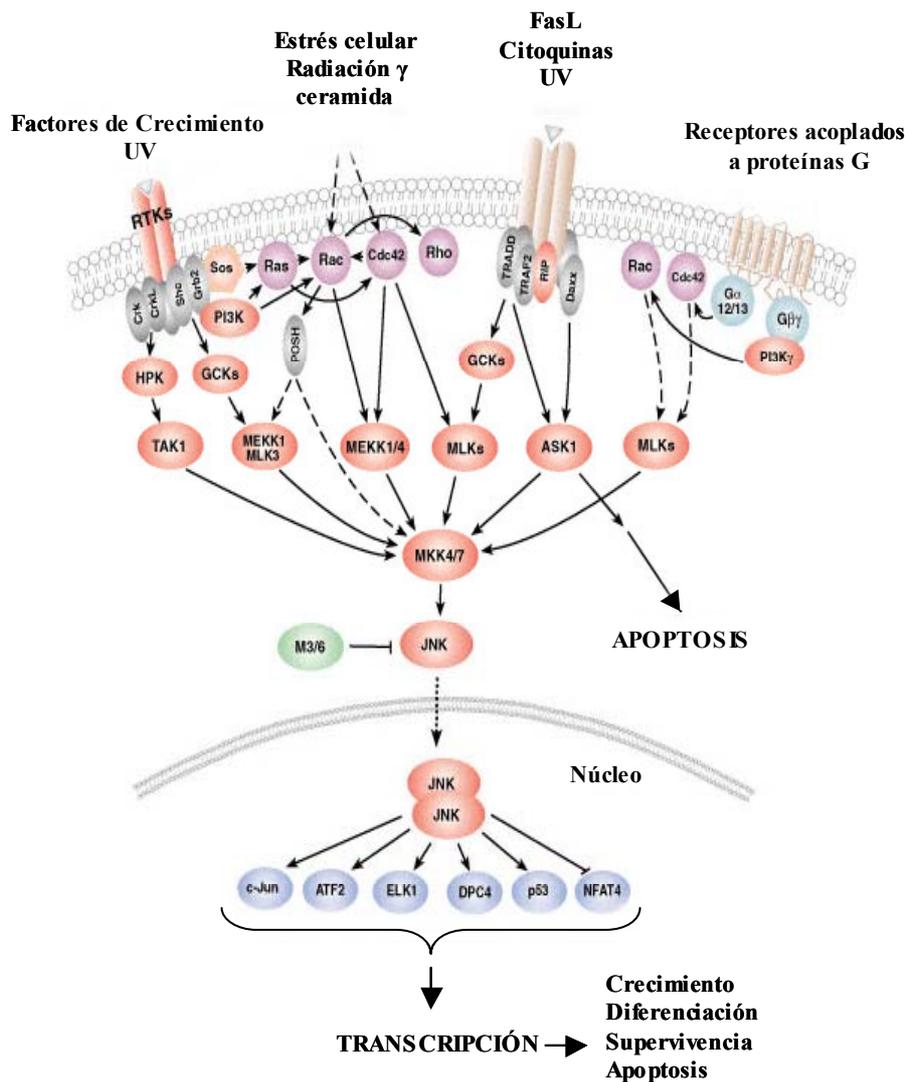
Las JNK están codificadas por tres genes. JNK1 y 2 se expresan ubicuamente, mientras que JNK3 se expresa en el cerebro, corazón y testículos. Estos genes sufren procesamientos alternativos que dan lugar a diez isoformas distintas, cuatro para JNK1, cuatro para JNK 2, y dos para JNK3 [152].

#### **1.11.1. Mecanismos de activación de JNK.**

JNK es activada por 2 quinasas duales, MKK4 (SEK1) y MKK7 (Figura 11), que a su vez constan de varias isoformas creadas por procesamientos alternativo. Existen diferencias en cuanto a los estímulos que regulan estas dos proteínas, de manera que, MKK4 se activa preferentemente por estrés, mientras que MKK7 se activa preferentemente por citoquinas [131].

Se han identificado varias MAPKKK (MKKK o MEKK) en la ruta de señalización de JNK, como son, MEKK1, MUK/DLK, MLK3/SPRK, TAK, Tpl-1/2, ASK1, MEKK2, MKK3, MKK4/MTK1, MAPKKK5/MEKK5 y MST/MLK2. Todas estas fosforilan a MKK4 y MKK7 [152], (Figura 11).

Otras proteínas como las homólogas de Ste 20, PAK( quinasa activada por p21), GCK (quinasa de los centros germinales), HPK (quinasa de la progenie hematopoyética), NIK (proteína que interacciona con Nck), KHS (quinasa homóloga de SPS1/Ste 20) y GLK (quinasa similar a GCK), activan la ruta de JNK. PI 3K activa JNK por receptores acoplados a proteínas G o receptores con actividad tirosina quinasa [152]. Las proteínas TRAF y Daxx participan en la activación de JNK mediada por citoquinas y FasL respectivamente [152], (Figura 11).



**Figura 11. Cascadas de señalización de JNK.** JNK es activada por multitud de estímulos extracelulares como factores de crecimiento, estímulos inflamatorios o señales de estrés. Dichos estímulos, a través de proteínas adaptadoras (gris) y proteína quinasas (gris y rojo), activan a proteínas G monoméricas (malva), las cuales se encargan de transducir la señal a las MAPKKK que activan la vía de señalización de JNK (rojo), como MEKK 1/4, TAK 1 o ASK 1. Una vez activadas, éstas traducen la señal a JNK, la cual fosforila y activa diversos factores de transcripción (azul). Las fosfatasas, que inactivan a las MAPK provocando la vuelta al estado basal inactivo, se indican en verde.

### 1.11.2. Factores de transcripción activados por JNK.

JNK fosforila el dominio de activación transcripcional de ATF-2 y ATFa, c-Jun, Jun-D, Elk-1 y Sap-1. La fosforilación de estos factores de transcripción aumenta su capacidad transcripcional. JNK también regula la expresión génica por otros mecanismos como son regulación de la estabilidad proteica y transporte al núcleo. JNK aumenta la estabilidad proteica de c-Jun, por fosforilación de los residuos 63 y 73, impidiendo su ubiquitinación. Este proceso aumenta la vida media de c-Jun, causando

su acumulación. JNK regula el transporte nuclear de ciertos factores de transcripción, como NFAT-4 cuya fosforilación por JNK ocasiona su salida del núcleo, inhibiendo así su capacidad transcripcional [152], (Figura 11).

### **1.11.3. Funciones mediadas por la activación de JNK.**

JNK está implicada en numerosos procesos como inflamación, apoptosis, supervivencia, crecimiento, desarrollo tumoral y morfogénesis.

#### *1.11.3.1. Supervivencia y apoptosis.*

JNK ha sido implicada en inducción de apoptosis en múltiples sistemas, frente a varios estímulos como cis-platino, radiaciones ultravioleta y gamma, calor, ceramida, TNF y Fas [138, 153-157].

JNK ha sido mecanísticamente implicada en inducción de apoptosis. En células mieloides humanas, oligonucleótidos antisentido para JNK inhiben la apoptosis producida por drogas anticancerígenas [158], y en células procedentes de un neuroblastoma, la apoptosis mediada por Fas, requiere la activación de JNK [157], (Figura 11). Sin embargo, en algunas ocasiones no existe buena correlación entre la activación de JNK y la inducción de apoptosis por la vía de Fas. Esto es lo que sucede en células T, donde la inhibición de JNK no bloquea la apoptosis mediada por Fas [138, 159].

La activación de JNK durante la apoptosis puede ser debida, tanto a una respuesta temprana de protección frente a estrés, como a que esta proteína media los procesos de apoptosis en respuesta a estrés. Es posible que JNK inicie la reparación de ADN después de un daño [160].

El mecanismo por el cual JNK induce apoptosis por estímulos como radiación ultravioleta, implica la disminución del potencial de membrana mitocondrial, proceso tardío en la inducción de apoptosis, que depende de la activación de caspasas. Asimismo, media un proceso mitocondrial temprano en la respuesta frente a la activación de JNK, la salida de citocromo C, posiblemente a través de la fosforilación de c-Jun [161], a pesar de que la apoptosis mediada por radiación ultravioleta no requiere transcripción génica [162].

JNK no es necesaria para la apoptosis mediada por receptores de muerte que dependen de la caspasa-8, pero se requiere para la apoptosis inducida por estrés mediada por la caspasa-9 [162].

La mayoría de los estímulos que activan JNK, no obstante, no producen apoptosis. Aunque TNF es un potente activador de JNK, en la mayoría de las ocasiones sólo produce apoptosis cuando las células han sido tratadas previamente con cicloheximida o actinomicina D. En otros estudios, la activación de JNK se ha descrito incluso como protectora frente a apoptosis. Tal es el caso de un estudio en timocitos, donde la activación de JNK protege frente a la apoptosis mediada por CD3 y CD95 [163], y en cultivos primarios de fibroblastos, la vía de señalización de JNK está implicada en la supervivencia celular, mediada por la interacción de integrinas con fibronectina, en ausencia de suero [164].

El hecho de que JNK produzca respuestas tanto apoptóticas como anti-apoptóticas, incluso en el mismo tipo celular, puede ser debido a que diferentes isoformas tengan distintas funciones o a que los efectos biológicos inducidos por JNK dependan del estado de activación de otras rutas, siendo la acción de JNK más permisiva que inductora [152]. Esto puede ser debido a que se activen simultáneamente mecanismos de supervivencia [131]. También se ha propuesto que el tiempo de activación de JNK determine el tipo de respuesta. Así, una activación sostenida está relacionada con apoptosis, mientras que una activación transitoria se relaciona con supervivencia [165].

#### 1.11.3.2. Proliferación.

Existen estudios en los cuales JNK media proliferación en respuesta a interleuquinas, al mismo tiempo que parece no mediar la apoptosis inducida por ceramida. En células pre-B BAF3, que sufren apoptosis en respuesta a tratamiento con ceramida o privación de IL-3, si son transfectadas con la fosfatasa M3/6, la estimulación de JNK mediada por ceramida resulta bloqueada, mientras que la apoptosis mediada por ceramida o por privación de IL-3 ocurre normalmente. La proliferación en respuesta a tratamiento con IL-3, sí resulta en cambio inhibida. En este sistema, por tanto, JNK parece estar mediando proliferación, y no ser requerida, en cambio, para apoptosis [132]. Por otro lado, JNK estimula la proliferación de linfocitos T, al inducir la expresión de IL-2 [166].

#### 1.11.3.3. Migración.

JNK es requerida para migración en respuesta a factores de crecimiento [167] y durante embriogénesis en *Drosophila* [168, 169].

#### 1.11.3.4. *Inflamación.*

La activación de JNK media el proceso inflamatorio a distintos niveles. El proceso inflamatorio inducido por tratamiento con citoquinas, como TNF- $\alpha$  o IL-1, está mediado por JNK a través de las proteínas adaptadoras TRAF, que a su vez activan a MKK-1 [131], (Figura 11). Asimismo JNK es activada durante la coestimulación de las células T, contribuyendo a la secreción de IL-2 y la proliferación de los timocitos, y durante el programa de diferenciación que lleva a la formación de células Th1 y Th2 efectoras. Por otro lado, JNK coopera con p38 durante la inducción de la expresión de E-selectina en linfocitos activados con TNF- $\alpha$ , permitiendo la extravasación de los linfocitos en las zonas de daño tisular [152].

### **1.12. QUINASA ACTIVADA POR ESTRÉS, p38.**

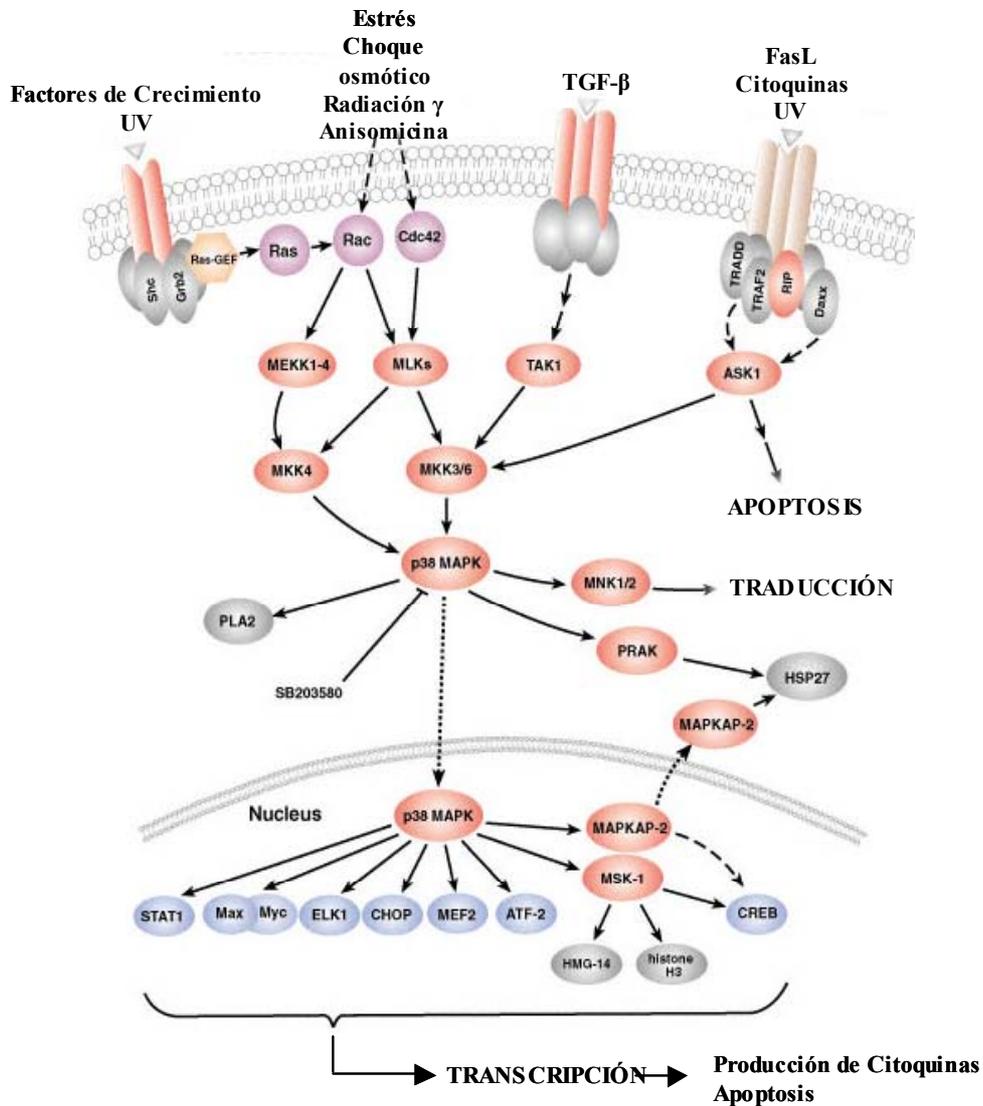
p38 es una MAPK perteneciente al grupo de las SAPK o quinasas de respuesta a estrés. La isoforma p38 $\alpha$  (p38) fue aislada como una proteína de 38 Kda, que resultaba rápidamente estimulada en respuesta a LPS [170, 171]. Asimismo fue purificada y clonada como una molécula que se unía a los derivados de piridinil imidazol, sustancias que inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias [172]. En mamíferos han sido clonadas otras tres proteínas homólogas a p38, p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  (ERK 6 o SAPK3) y p38 $\delta$  (SAPK 4). p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  se expresan ubicuamente [173], mientras que p38 $\gamma$  se expresa predominantemente en músculo esquelético [174] y p38 $\delta$  se expresa en pulmón, riñón, testículos, páncreas e intestino [175].

#### **1.12.1. Mecanismos de activación de p38.**

Los estímulos extracelulares que activan p38 son inflamatorios, como LPS [171], TNF [176] o trombina [177]. Factores de crecimiento, como el factor estimulante de colonias monocito-macrófago (GM-CSF) [178], factor de crecimiento de fibroblastos [179], eritropoyetina [180], IL-2 [181], factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [182] o factor de crecimiento derivado de plaquetas [183]. Otros estímulos que activan p38 son el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) [184], choque térmico [185] e isquemia [186], (Figura 12). La activación de p38 depende del tipo celular; así, la insulina activa p38 en adipocitos 3T3-L1 [187], pero inhibe su actividad en neuronas de pollo [188].

Como todas las MAPK, p38 resulta activada por quinasa duales, las MAPKK (MKK), (Figura 12). MKK6 puede activar las cuatro isoformas, mientras que MKK3

activa sólo p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  [189]. MKK4 activa p38 $\alpha$  y p38 $\delta$  [173] y MKK7 activa p38 $\delta$  [190].



**Figura 12. Vías de señalización de p38.** p38 es activada por estímulos proinflamatorios como citoquinas, factores de estrés y factores de crecimiento. Dichos estímulos conducen a la fosforilación y activación de las MKKK que activan a p38 como MEKK1-4, MLK o TAK, a través de las MKK 3 y 6, principalmente. La estimulación de p38 conduce a la activación de numerosos factores de transcripción. Las quinasas y proteínas adaptadoras en la membrana se indican en gris, rojo o amarillo, las proteínas G monoméricas en malva. La cascada de las MAPK se indica en rojo. Otras proteínas citosólicas y nucleares se indican en gris y los factores de transcripción en azul.

Otras proteínas por encima de p38 en la cascada de activación son las MKK quinasas (MAP3K), (Figura 12). MTK1, MLK2/MST, MLK3/PTK/SPRK, DLK/MUK/ZPK, ASK1/MAPKKK5 y TAK activan tanto a p38 como a JNK, lo cual puede justificar que ambas moléculas resulten a menudo coactivadas [141]. La activación de cada una de ellas es dependiente del estímulo. Así, MTK1 media las señales de estrés pero no de citoquinas [191].

### **1.12.2. Sustratos de p38.**

La proteína activada por Map quinasa 2 (MAPKAP-K2 ó M2) [192, 193] y M3 [193] son activadas por p38. M2 es requerida para la activación traduccional de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  [194]. M2 y M3 tienen varios sustratos como la proteína de choque térmico HSP27 [195], (Figura 12), la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB) [179] o ATF 1 [179]. Otras proteínas por debajo de p38 son MNK 1, que es fosforilada por p38 y ERK 1 pero no por JNK [196, 197], (Figura 12). Dicha proteína fosforila al factor de iniciación eucariota 4E (eIF-4E), lo cual sugiere un vínculo potencial entre la activación de MAPK y el inicio de la traducción [196]. PRAK, quinasa activada/regulada por p38, es una proteína activada por estrés, que puede ser fosforilada por p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  [198]. La quinasa activada por estrés y por mitógenos, (MSK/RSK-B/RLPK) es activada por p38 $\alpha$  [199], (Figura 12).

### **1.12.3. Factores de transcripción activados por p38.**

Numerosos factores de transcripción son fosforilados, y consecuentemente activados por p38, como ATF-2 [200], ATF-1 [179], proteína accesoria a SRF 1 (Sap1); CHOP, gen 153 inducible por daño al ADN y parada de ciclo, implicado en la regulación de crecimiento y diferenciación [201]; p53; C/EBP $\beta$ , implicado en la diferenciación de adipocitos [202]; MEF2C y MEF2A [141], (Figura 12).

### **1.12.4. Función.**

#### *1.12.4.1. Inflamación.*

La activación de p38 induce la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 [203], IL-12 o IFN- $\gamma$  [204]; expresión de enzimas como iNOS [205, 206] e inducción de proteínas adherentes como VCAM-1 [176].

La estimulación de leucocitos por citoquinas proinflamatorias da lugar a la activación de p38 [207]. En general, en células inflamatorias, hay dos mecanismos distintos que dan lugar a la activación de p38, uno vía MKK4, regulado por Rac/Cdc 42, que no puede ser activado por TNF- $\alpha$  [208], y otro, dependiente de MKK3 y MKK6, activado por TNF- $\alpha$ , que no depende de Rac/Cdc 42 [209], (Figura 12).

p38 regula la localización de los linfocitos en los sitios de daño celular en numerosos pasos, como la inducción de E-selectina en células endoteliales. La generación de citoquinas inflamatorias da lugar a la producción de quimioquinas por parte de células endoteliales e infiltradas. La expresión de la quimioquina IL-8 en neutrófilos requiere de la estimulación de p38 por parte de TNF- $\alpha$ , GM-CSF y LPS. p38 está también implicado en la expresión de moléculas de adhesión como integrina  $\alpha_m\beta_2$ , y VCAM-1 a nivel post-transcripcional [207].

#### 1.12.4.2. Apoptosis.

p38 funciona por encima y por debajo en la activación de caspasas. Inhibidores de caspasas bloquean la activación de p38 por coligación de Fas [210], y la sobreexpresión de MKK6 constitutivamente activa induce activación de caspasas y muerte celular [211].

La implicación de p38 en apoptosis es dependiente tanto del estímulo como del tipo celular. p38 media la apoptosis de fibroblastos, células endoteliales y diversas líneas celulares producida por diversos estímulos; sin embargo, la activación de p38 en las células Jurkat, por ligación de Fas, no es requerida para la apoptosis [141].

#### 1.12.4.3. Proliferación.

p38 regula la proliferación y diferenciación de células del sistema inmune por GM-CSF, CSF, EPO, CD40 e interleuquinas [141]. En linfocitos B la ligación de CD40 induce estimulación de p38 y MAPKAPK-2, dando lugar a proliferación celular e inducción de la expresión de ICAM [207], y en linfocitos T, el tratamiento con IL-2 e IL-7 activa p38, e induce proliferación [207]. No obstante, la mayoría de las evidencias sugieren un papel negativo para p38 en proliferación celular [212]; así, la sobreexpresión de p38 $\alpha$  en levaduras da lugar a disminución de la velocidad de crecimiento [213]. En mamíferos, el tratamiento de neuronas fetales con insulina causa la inhibición de p38 [188], y la microinyección de Cdc 42, en las células NIH 3T3, causa la parada del ciclo celular, dependiente de p38 [214]. En cuanto a la regulación del ciclo celular,

p38 bloquea la transcripción de la ciclina D1, bloqueando la progresión del ciclo [215], y es activada durante el punto de chequeo del ensamblaje del huso mitótico [216].

#### 1.12.4.4. *Diferenciación.*

p38 está implicado en la diferenciación de numerosas líneas celulares a adipocitos, neuronas o miotubos [141].

### **1.13. QUINASA ACTIVADA POR ESTÍMULOS EXTRACELULARES, ERK.**

El subgrupo de las MAPK, ERK, fueron originalmente identificadas como proteínas fosforiladas que interaccionaban con la proteína asociada a microtúbulos-2 en respuesta a la activación de receptores con actividad tirosina quinasa [217].

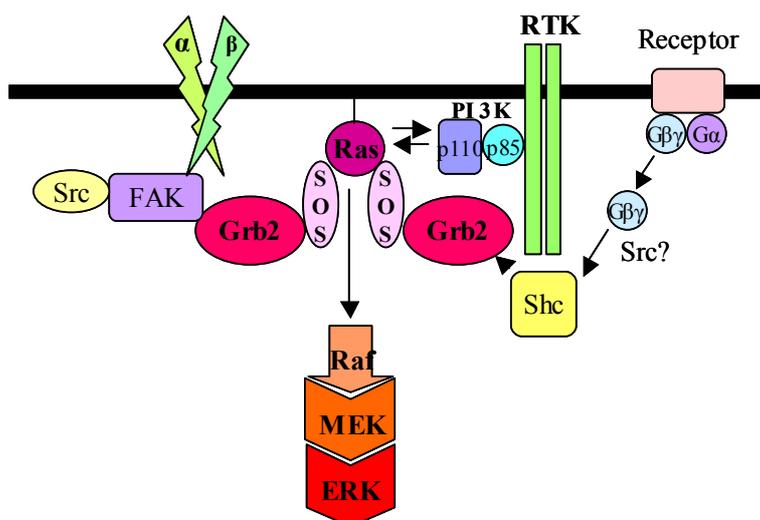
Tres ERKs han sido clonadas, ERK1, ERK2 y ERK3. La proteína de 44 Kda ERK1 (también denominada p44 MAPK) y la proteína de 42 Kda ERK2 (o p42 MAPK) son los únicos sustratos establecidos de MEK [218, 219]. Las ERKs comparten secuencia de fosforilación con JNK y p38, por lo que existe un potencial cruce de señalización entre ellas [217].

#### **1.13.1. Mecanismos de Activación de ERK.**

La quinasa regulada por estímulos extracelulares, ERK, resulta activada por estímulos como factores de crecimiento, la ligación de receptores acoplados a proteínas G triméricas y activación de integrinas por unión a proteínas de la matriz extracelular. [156].

La activación de ERK por ligación de integrinas está mediada por la quinasa de adhesión focal, FAK, la cual mediante autofosforilación crea un sitio de unión para el dominio SH2 de Src. Ésta a su vez fosforila a FAK en un segundo sitio, que sirve de unión a GRB-2-SOS, dando lugar a la activación de la vía de ERK [156], (Figura 13).

La activación de ERK mediada por Receptores acoplados a proteínas G triméricas está mediada por la liberación de la subunidad  $\beta\gamma$ , que da lugar a la fosforilación en tirosina de Shc, lo que ocasiona la incorporación al complejo de Grb2-SOS, que a su vez activa la vía de ERK a través de Ras [156], (Figura 13).



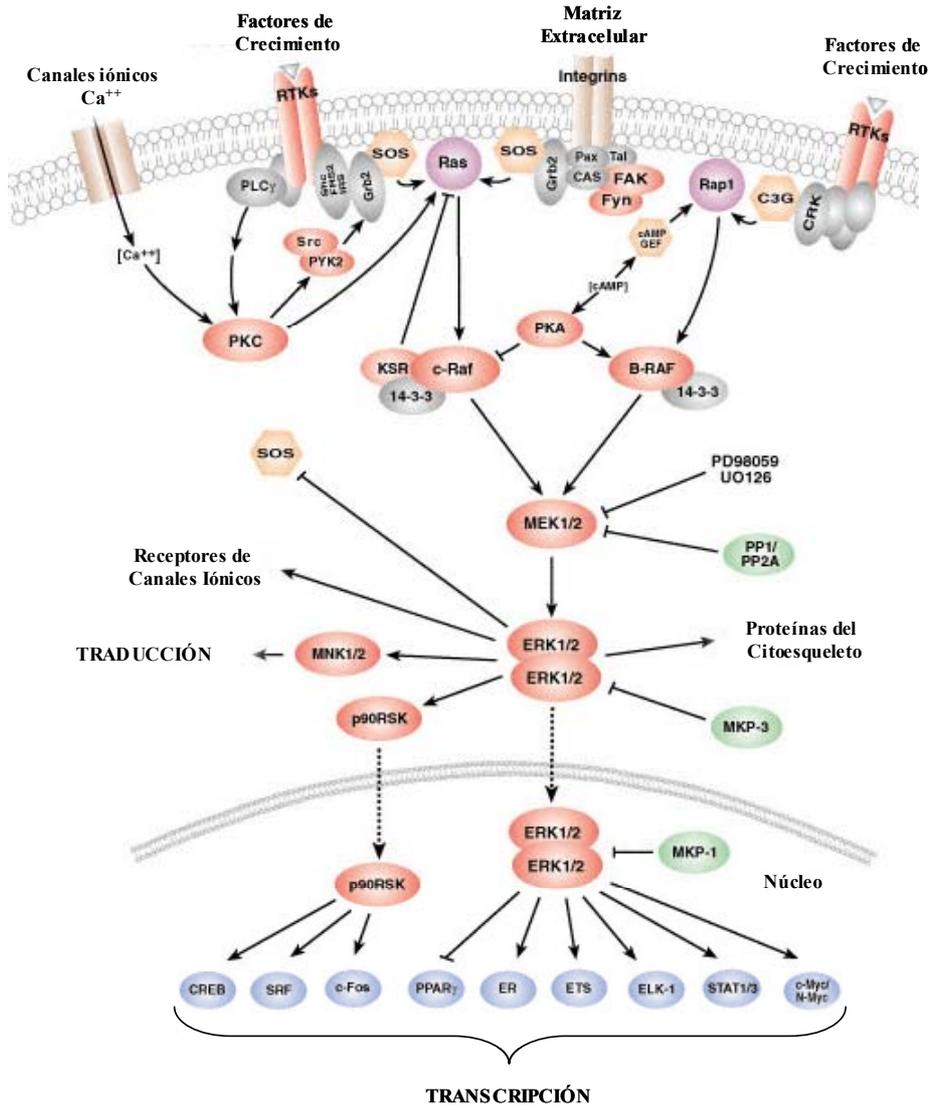
**Figura 13. Mecanismo de activación de la vía de ERK.** La vía de señalización de ERK se activa por ligación de receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa, acoplados a proteínas G e integrinas. Los receptores de factores de crecimiento una vez activados se autofosforilan formando dímeros que reclutan proteínas que transducen la señal a ERK1/2. Los receptores de membrana acoplados a proteína G activados transducen la señal a la vía de señalización de ERK a través de la subunidad  $\beta\gamma$ . Las integrinas activan a ERK a través de FAK.

### 1.13.2. Sustratos de ERK.

ERK fosforila a factores de transcripción como Elk-1 [220], TAL1 [221], SAP-1a, c-Myc y el receptor de estrógenos; otras proteínas nucleares como RNA polimerasa II [222] y proteínas citoplásmicas como el factor de traducción, PHAS-I/eIF4E-BP [223], (Figura 14); proteínas implicadas en fosforilación/defosforilación como la quinasa S6 de p90 ribosomal [224]; y la proteína fosfatasa 2C [225]. También fosforilan otras proteínas de señalización como fosfolipasa A2 [226] y tirosina hidrolasa [227]. Otros sustratos de las ERKs son proteínas estructurales como la proteína básica de la mielina [228] y la proteína asociada a microtúbulos-2 [229].

### 1.13.3. Factores de Transcripción Activados por ERK.

Los factores de transcripción activados por ERK son miembros de la familia TCF como Elk1 y SAP1, Ets1 y Ets2, y CREB, cuya fosforilación depende de la proteína activada por ERK, RSK2 [230], (Figura 14). La fosforilación de Elk-1 por parte de ERK promueve la fosforilación de c-fos en respuesta a factores de crecimiento.



**Figura 14. Vías de señalización de ERK.** ERK es activada por multitud de estímulos extracelulares como factores de crecimiento o proteínas de Matriz Extracelular. Dichos estímulos conducen a la fosforilación y activación de las MAPKKK que activan a ERK como B-Raf y c-Raf, u otras quinasas como PKC, las cuales son activadas como consecuencia de la activación de proteínas G monoméricas como Rap-1 o Ras. La estimulación de ERK conduce a la activación de numerosos factores de transcripción. Las quinasas se indican en gris y rojo. Las proteínas adaptadoras se indican en amarillo y las proteínas G monoméricas en malva. La cascada de las MAPK se indica en rojo. Las fosfatasas se indican en verde y los factores de transcripción en azul.

#### 1.13.4. Funciones mediadas por la activación de ERK.

La vía de señalización de ERK fue la primera vía de señalización de MAPK estudiada en mamíferos. La activación de la vía Ras/Raf/MEK/ERK gobierna los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia [231].

#### 1.13.4.1. *Proliferación.*

Las MAPK de la subfamilia ERK son potentemente activadas por factores de crecimiento que se unen a receptores de membrana celular con actividad quinasa [232], (Figura 13). La ligación del receptor provoca dimerización y autofosforilación del dominio citoplásmico, lo que provoca la captación de moléculas adaptadoras con dominios SH2 como Grb2 o Shc [233]. A continuación, otras moléculas entran a formar parte del complejo, como Sos, intercambiador de nucleótidos de guanina, que activa a Ras [234]. Una vez activada, Ras se une a Raf-1, que es translocado a la membrana [235]. Si bien la translocación de Raf-1 es necesaria para su activación, no es suficiente, y se requiere un segundo paso consistente en su fosforilación por proteínas con actividad tirosina quinasa no receptoras, de la familia Arc [236, 237]. Una vez activada, Raf-1 fosforila y activa a las MAPKK, MEK-1 y MEK-2 [238, 239]. Tanto MEK-1 como MEK-2 pueden activar a ERK-1 y ERK-2 por fosforilación [240]. Ambas son muy específicas para ERK siendo éstas sus únicos sustratos. Una vez activadas, una fracción de las ERKs es translocada al núcleo donde ejercen su función de activación transcripcional [241], (Figura 13).

Por otro lado, ERK activada fosforila a Sos, Raf-1 y MEK promoviendo su vuelta al estado inactivo. [242-244].

Además de Raf-1, otras MAPKKK que activan a MEK son Mos, serina/treonina quinasa que regula la meiosis durante el desarrollo de las células germinales [245], y Tpl-2, que regula el ciclo celular en linfocitos T [156].

#### 1.13.4.2. *Diferenciación.*

La estimulación sostenida de ERK se relaciona con diferenciación, mientras que la activación transitoria se relaciona con proliferación [136]. Así, la estimulación de ERK por factores de crecimiento como EGF se relaciona con proliferación en fibroblastos, mientras que en células PC12, la fosforilación de ERK en respuesta a NGF, da lugar a parada de crecimiento y diferenciación a fenotipo neuronal.

#### 1.13.4.3. *Migración.*

La interacción celular con proteínas de la matriz extracelular o la interacción de los factores de crecimiento con sus receptores, activan ras y la vía de ERK. En células sembradas sobre múltiples sustratos, ERK 1 y ERK 2 promueven la migración celular provocando la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) [246].

#### 1.13.4.4. *Inflamación.*

Muchos son los estímulos proinflamatorios que activan a ERK1,2, como el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), interleuquina-8, o forbol miristato acetato (PMA). La ligación de P o L Selectina a PSGL-1 (P-selectina glicoproteína ligando 1), provoca la secreción de IL-8 por parte de los leucocitos, proceso que es regulado por ERK [207].

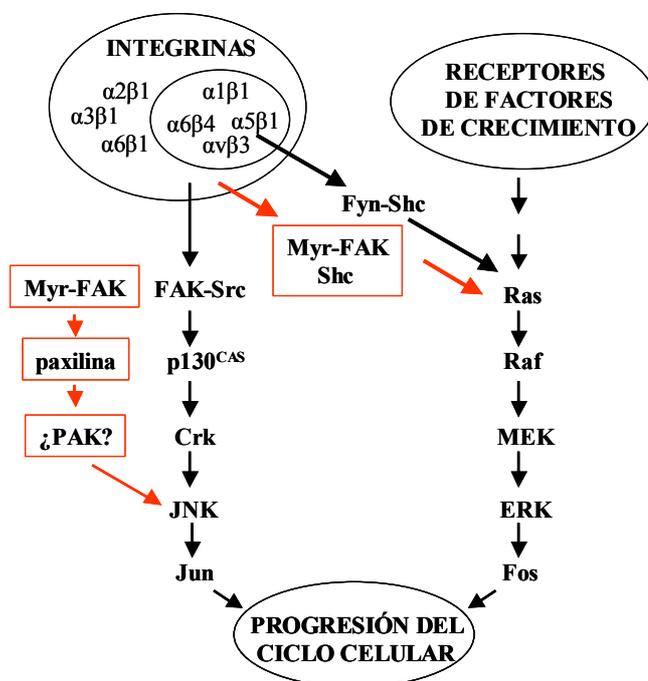
#### 1.13.4.5. *Apoptosis.*

En numerosas ocasiones ERK es inhibida en la inducción de apoptosis. En las células PC12, el factor de crecimiento nervioso, NGF, causa apoptosis y activa p38 y JNK junto con la inhibición de ERK [247]. No obstante, en otras ocasiones la activación de ERK va unida al desencadenamiento de apoptosis; así, en células B humanas, la activación de JNK por CD40 previene la apoptosis, mientras que la activación de ERK por ligación de IgM causa apoptosis [248].

### **1.14. ACTIVACIÓN DE JNK Y ERK MEDIADA POR INTEGRINAS.**

La señalización de las integrinas presenta patrones comunes a todas, y señales que son específicas de un grupo de integrinas. En progresión del ciclo celular, las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha 6\beta 4$  median la activación de ERK. Dicha activación es independiente de FAK y dependiente de Shc y Ras [249], (Figura 15). La estimulación combinada de Ras por integrinas asociadas a Shc y factores de crecimiento, es requerida para la progresión de la fase G1 del ciclo celular [249, 250]. Otras integrinas, como  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ , y  $\alpha 6\beta 1$ , en cambio son incapaces de activar Ras [249]. Mientras que sólo un subgrupo de integrinas son capaces de activar la vía Shc-Ras-ERK, todas las integrinas son capaces de activar la vía FAK-PI3K-Akt, [251]. Las integrinas capaces de estimular Ras mediante Shc promueven proliferación y migración en respuesta a factores de crecimiento, mientras que aquellas incapaces de producir este efecto están implicadas en parada de ciclo celular, así como de protección frente a apoptosis por pérdida de adhesión (proceso mediado por FAK y PI 3K), o diferenciación [251]. No obstante, las integrinas son también capaces de promover progresión del ciclo celular, mediante la activación de JNK y c-Jun a través de FAK [252], (Figura 15). El mecanismo por el cual las integrinas activan JNK, parece consistir en que la activación de FAK causa su autofosforilación, la cual crea un sitio de unión para el dominio SH2 de Src o Fyn [253]. El complejo FAK-Src fosforila entonces a p130<sup>CAS</sup>, creando un

sitio de unión para la proteína adaptadora Crk [254]. La forma en que Crk activa JNK se desconoce, pero parece ser a través de Rac [252].



**Figura 15. Modelos de proliferación dependiente de adhesión.** Las integrinas y los factores de crecimiento cooperan para activar las vías de JNK y ERK. Según Oktay 1999 (negro) la activación de JNK mediada por integrinas es un proceso común a todas ellas que requiere la fosforilación de FAK, mientras que sólo algunas integrinas activan ERK a través de Ras independientemente de FAK. Según Igishi 1999 (rojo), la activación de JNK mediada por integrinas requiere la presencia de FAK en membrana (myr-FAK, FAK miristoilada) y es independiente de su fosforilación. Asimismo proponen que la translocación de FAK a la membrana plasmática también activa a ERK a través de Ras.

Otros autores [255], coinciden con los anteriores en que la activación de PI 3K, JNK y ERK mediada por la ligación de integrinas ocurre mediante tres mecanismos independientes, coincidiendo en que la activación de PI 3K mediada por FAK participa en la supervivencia en condiciones de pérdida de anclaje con la matriz extracelular. Sin embargo, discrepan en lo que respecta a la activación de JNK, inducida por ligación de integrinas, mediada por FAK. Estos autores proponen que el proceso requiere la translocación de FAK y paxilina a la membrana plasmática, siendo innecesaria la fosforilación de dichas proteínas. Una vez en membrana, proponen que la quinasa p95PKL interaccione con paxilina y con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina para la familia Rho, PIX, provocando la translocación de PAK al complejo, mediando la activación de JNK [255], (Figura 15).

Estos autores [255], también discrepan con los anteriores [252] en que para estos últimos, la activación de ERK mediada por Shc sí depende de FAK, siendo necesaria la translocación de ésta a la membrana plasmática, pero no su fosforilación en tirosina, al igual que ocurre para la activación de JNK mediada por FAK [255], (Figura 15).

Finalmente, para ambos autores [252, 255], la activación de ERK y JNK mediada por FAK no depende de PI 3K.

## **2. OBJETIVOS**

- 1- Identificar las vías de señalización activadas por CD53 y determinar la implicación de las proteína quinasas activadas por mitógenos, MAPK.
- 2- Estudio de la expresión de CD53 en células con similitudes funcionales a los macrófagos.
- 3- Efectos fisiológicos mediados por CD53. Influencia de la ligación de CD53 sobre el ciclo celular: proliferación, supervivencia y apoptosis.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. REACTIVOS.**

#### **3.1.1. Anticuerpos.**

El anticuerpo monoclonal que reconoce a CD53 humano, clon MEM53 [256], fue suministrado por Vaclav Horejsi (Instituto de Genética Molecular, Academia de Ciencias de la República Checa) o por Serotec, y fue empleado a una dilución 1:10 para inmunofluorescencia, 1:100 para "western blot" y a una concentración de 10 µg/ml para la estimulación de las células "in vivo".

Los anticuerpos monoclonales que reconocen a CD53 humano: clones 202-24b (IgG1), 161-2 (IgG2a) y 63-5A3 (IgG2b) fueron suministrados por el Doctor Ramón Vilella (Hospital Clínico, Universidad de Barcelona). Dichos anticuerpos se emplearon a una concentración de 10 µg/ml para estimulación celular "in vivo".

El anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína CD53 de rata, clon MRC OX44 (Serotec), fue empleado a una concentración de 10 µg/ml para estimulación celular "in vivo" y a una dilución 1:50 para citometría de flujo, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

El anticuerpo policlonal que reconoce a Vav [257] fue suministrado por el Doctor Xose R. Bustelo (Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca). Este anticuerpo se empleó a una dilución 1:200 para inmunoprecipitación y 1:1.000 para "western blot".

El anticuerpo monoclonal que reconoce a CD3 humano, clon UCHT1 (Dako), se utilizó a una concentración entre 0.1-10 µg/ml para la estimulación celular "in vivo".

El anticuerpo monoclonal anti fosfotirosina, clon PY99 (Santa Cruz Biotechnology), fue empleado a una dilución 1:1.000 para "western blot".

El anticuerpo monoclonal que reconoce al epítipo HA (clon 16B12), suministrado por BabCO, fue empleado a una dilución 1:500 para inmunoprecipitación y a una dilución 1:1000 para "western blot".

El anticuerpo monoclonal que reconoce a PCNA (Transduction Laboratories) se empleó a una dilución 1:5.000 para "western blot".

El anticuerpo monoclonal que reconoce a PARP (Enzyme System Products) fue empleado a una dilución 1:5.000 para "western blot".

El anticuerpo monoclonal que reconoce a β-actina, clon AC-15, fue suministrado por Sigma-Aldrich y fue empleado en "western blot" a una dilución 1:5.000.

El anticuerpo monoclonal que reconoce a ERK 1,2 fosforilada en la Tyr 204 (clon E-4) y el anticuerpo policlonal que reconoce a ERK 1,2 (clon C-14), fueron suministrados por Santa Cruz Biotechnology y se emplearon a una dilución 1: 10.000 y 1:5.000 respectivamente, para "western blot".

Los anticuerpos que reconocen la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, conjugados con peroxidasa o biotina fueron suministrados por Amersham-Bioscience y se utilizaron a una dilución de 1:5.000 y 1:1.000 respectivamente.

Los anticuerpos monoclonales que reconocen IgG de ratón, conjugados con fluorocromos empleados para inmunofluorescencia fueron dos: el conjugado con FITC (Sigma), se utilizó a una dilución 1:100 para citometría de flujo y a una dilución 1:50 para inmunofluorescencia, y el conjugado con CY2 (Amersham-Bioscience), se utilizó a una dilución 1:1000 para inmunofluorescencia;

### **3.1.2. Enzimas.**

Las enzimas de restricción empleadas fueron suministradas por Amersham-Bioscience e Invitrogen y la ligación de fragmentos de ADN se realizó con T4 ADN ligasa de Amersham-Bioscience.

### **3.1.3. Productos radiactivos.**

Los ensayos de incorporación de timidina al ADN se realizaron añadiendo al medio de cultivo celular timidina tritiada de New England Nuclear, y posteriormente se midió la actividad presente en los extractos con líquido de centelleo Ecoscint<sup>TM</sup> A de National Diagnostics.

En los ensayos de actividad quinasa se utilizó [ $\gamma^{32}$ -P]ATP de Amersham-Bioscience.

### **3.1.4. Material de cultivo para células de mamífero.**

Los medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM, los sueros de ternera (CS) y de ternera fetal (FBS), la mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina, la anfotericina B, la L-glutamina, la tripsina-EDTA y el colorante "tripan blue" fueron suministrados por Invitrogen.

La insulina, transferrina, selenito sódico y la Colagenasa 1 A fueron suministrados por Sigma-Aldrich .

Los medios Dulbecco y PBS se prepararon en el laboratorio:

**Dulbecco:** NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, glucosa 5,6 mM, pH 7.2.

**PBS:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4.

### **3.1.5. Material de cultivo para células procariotas.**

Los medios de cultivo LB y LB-agar fueron preparados en el laboratorio.

**LB:** bacteriotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%.

**LB-agar:** medio LB + agar 2%.

### **3.1.6. Productos químicos.**

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos (metanol, glicerol, etanol y cloroformo) fueron suministrados por Merck.

Los componentes de los medios de cultivo para bacterias (bacteriotripton, agar y extracto de levaduras) fueron suministrados por Pronadisa y Difco.

La geneticina (G418) para la selección de clones estables fue suministrada por Boehringer-Mannheim.

Los reactivos para electroforesis, acrilamida, N,N'-metilen-bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS) y β-mercaptoetanol, fueron suministrados por Boehringer Mannheim. El N-N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), el azul de Coomassie R-250, fueron suministrados por Sigma-Aldrich y la agarosa fue suministrada por Pronadisa. Los marcadores de peso molecular "Benchmark prestained protein Ladder" y la Lipofectamina fueron suministrados por Invitrogen.

Sigma-Aldrich suministró también otros compuestos como la ampicilina, el isopropil-β-D-tiogalacto piranosido (IPTG) el dimetilsulfóxido (DMSO), la seroalbúmina bovina fracción V (BSA), la anisomicina y la cicloheximida, el deoxicolato sódico, la lisozima, los inhibidores de proteasas (fenilmetanosulfonilo (PMSF), benzamidina, inhibidor de tripsina, pepstatina A, aprotinina y leupeptina), de fosfatasas (ortovanadato sódico y fluoruro sódico), los inhibidores de rutas metabólicas (bisindol-maleimida, wortmanina, genisteína, piceatanol, PD98059).

Los detergentes Tritón X-100 y Brij 97 fueron suministrados por Bio-Rad y el Tween-20 fue suministrado por Merck.

El gelvatol, empleado para el montaje de preparaciones de microscopía fue suministrado por Amersham-Bioscience. El colorante para tinción de ADN fluorescente DAPI fue suministrado por Boehringer-Mannheim. En inmunohistoquímica se

emplearon la hematosilina y la 3,3' diaminobencidina, ambos suministrados por Sigma-Aldrich; la solución de citrato, suministrada por BioGenex; y la parafina y la formalina, ambas suministradas por Merck.

La Sepharosa para la purificación de inmunocomplejos "γ bind", y el "Glutation-sepharosa 4B" para la purificación de proteínas de fusión, fueron suministrados por Amersham-Bioscience.

El reactivo para la medida de la concentración de proteínas, basado en el método de Bradford, fue suministrado por Bio-Rad.

Los productos empleados en el revelado de "western blot" y autorradiografía fueron membranas de PVDF (Immobilon T, Millipore), películas Fuji (Super RX) y "Kodak" (X-OMAT), y ECL<sup>TM</sup> (Amersham-Bioscience).

Algunos experimentos y preparaciones se realizaron empleando los siguientes "Kits" comerciales: "Dual Luciferase Reporter Assay" para medida de actividad luciferasa (Promega), "High Purity Maxiprep System" para obtención de maxipreparaciones de ADN (Invitrogen), "High Pure Plasmid Isolation kit" para obtención de minipreparaciones de ADN (Roche), "Cell Proliferation Kit II (XTT)", para la medida de la actividad mitocondrial (Roche) y "Envision + system" (Dako), para la tinción de tejidos basada en la reacción de la peroxidasa.

## 3.2. CÉLULAS

### 3.2.1. Células procariotas.

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas fueron:

**DH5α:** *supE44 ΔlacU169 (Ø80lacZΔM15) hsdR17RecA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1.*

**XL1-Blue:** *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>.*

### 3.2.2. Líneas celulares de mamífero.

**NIH3T3:** línea celular originada a partir de fibroblastos obtenidos de embrión de la cepa de ratón NIH Swiss, "American Type Culture Collection", ATCC: CRL 1658.

**293T:** células 293 (línea celular originada a partir de células epiteliales de riñón de embrión humano transformadas con el ADN del adenovirus humano tipo 5, ATCC: CRL 1573), que llevan integrada una copia de la región temprana del genoma de SV40.

**COS-1:** línea celular de riñón de mono verde africano, derivada de CV-1 transformada con un mutante de SV40 que codifica para el antígeno T silvestre, ATCC: CRL-1650.

**JURKAT:** línea celular humana procedente de una leucemia T aguda, establecida a partir de la sangre periférica de un individuo de 14 años de edad. Esta línea produce interleuquina-2 e interferón  $\gamma$ , ATCC: TIB-152.

**IR938F:** preinmunocitoma B espontáneo de rata Louvain [258]

### 3.3. PLÁSMIDOS

**Tabla VI: Plásmidos y construcciones empleados para clonaje y transfección.**

Plásmido	Características	Referencia
<b>pCEFL-KZ-HA</b>	Amp <sup>r</sup> , secuencia Kozak, epítipo AU5, Neo <sup>r</sup>	Silvio Gutkind (laboratorio)
<b>pCEFL-KZ-AU5</b>	Amp <sup>r</sup> , secuencia Kozak, epítipo AU5, Neo <sup>r</sup>	Silvio Gutkind (laboratorio)
<b>pCEFL-KZ-hCD53</b>	cDNA codificante para CD53 humano	Pedro Lazo (laboratorio)
<b>pMEXneo-hCD53</b>	cDNA codificante para CD53 humano	Pedro Lazo (laboratorio)
<b>pCEFL KZ -HA-JNK-1</b>	cDNA codificante para JNK-1 en posición 5' respecto al epítipo	Silvio Gutkind (laboratorio)
<b>pCEFL-KZ-HA-p38</b>	cDNA codificante para p38 en posición 5' respecto al epítipo	[259]
<b>pCEFL-KZ-HA-ERK2</b>	cDNA codificante para ERK-2 en posición 5' respecto al epítipo	Silvio Gutkind (laboratorio)
<b>pCEFL-KZ-AU5-KRASV12</b>	Codifica para K Ras constitutivamente activo con sustitución de Gly 12 por Val	José María Rojas (laboratorio)
<b>pRL-TK</b>	Expresa la encima luciferasa <i>Renilla</i> bajo el control del promotor de TK de HSV	Promega
<b>pGal4-Luc (en pGL3, Promega)</b>	Gen de luciferasa <i>Photinus</i> bajo el promotor de Gal-4	[259]
<b>pGal-jun-RSV</b>	Expresa gal-jun silvestre bajo el promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous)	[260]
<b>PGal-jun-ala/ala</b>	Gen de jun constitutivamente inactivo con las serinas 63 y 73 sustituidas por ala	[260]

**Tabla VI:** la tabla representa los vectores de clonaje y las construcciones empleadas para las transfecciones en células de mamífero.

### **3.4. CONSTRUCCIÓN DE ADN<sub>s</sub> RECOMBINANTES.**

#### **3.4.1. Construcción de pCEFLKZ-hCD53.**

El cDNA de hCD53 completo de 1.7 pb fue subclonado en el vector pCEFL KZ AU5 entre los sitios *Bam*HI-*Bg*III, de manera que el epítipo AU5 fue eliminado.

El ADN correspondiente a la secuencia completa de CD53 fue digerido con 10 unidades de las enzimas *Bam*HI-*Bg*III, en el tampón indicado por el fabricante durante tres horas y, tras digerir el vector con las mismas enzimas, se ligaron cantidades equimoleculares del inserto y del vector. Para ello se utilizó la enzima T4 ligasa diluida en el tampón que recomienda el fabricante, en presencia de ATP 0.5 mM. La reacción se llevó a cabo durante un mínimo de 4 horas a 16 °C.

Las bacterias DH5 $\alpha$  se hicieron competentes y seguidamente fueron transformadas según el método de Hanahan [261], a continuación se sembraron en medio LB-agar con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las bacterias crecieron a 37 °C durante 16-18 horas y de las colonias obtenidas, se seleccionaron varias al azar que de nuevo crecieron 16-18 horas, en medio LB con ampicilina 50  $\mu$ g/ml, en agitación fuerte, para permitir la correcta oxigenación del cultivo. Una vez crecidos los cultivos, se realizaron minipreparaciones de ADN por el método de Roche y, con las mismas enzimas de restricción empleadas para el clonaje, se seleccionaron las que tenían el inserto.

### **3.5. CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS**

Las bacterias crecieron en medio LB líquido o en LB-agar, con el antibiótico de selección codificado por el vector de clonaje, a 37 °C con fuerte agitación, para permitir su correcta oxigenación, cuando crecieron en medio líquido.

### **3.6. CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO**

#### **3.6.1. Cultivo de líneas celulares.**

Las células crecieron a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y con una humedad del 98%.

**Líneas linfoides:** las células IR938F y Jurkat crecieron en medio RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal y la mezcla de antibióticos penicilina 50 unidades/ml-estreptomicina 50  $\mu$ g/ml.

**Líneas epiteliales:** Las células 293T y Cos-1 crecieron en DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal y la mezcla de antibióticos penicilina 50 unidades/ml-estreptomicina 50 µg/ml.

**Fibroblastos:** Las células NIH3T3 crecieron en DMEM complementado con suero bovino y la mezcla de antibióticos penicilina 50 unidades/ml-estreptomicina 50 µg/ml.

### **3.6.2. Cultivo primario de células Mesangiales de rata Wistar.**

El método de aislamiento de glomérulos renales se basa en el tamizado diferencial de los riñones de rata y es una modificación del método de Misra [262].

Los animales empleados fueron ratas macho de 4 semanas, los cuales fueron anestesiados con éter etílico. Después de una laparotomía media, y tras pinzar la arteria renal, se extrajeron los riñones, que fueron introducidos en una solución de DEOCIL-CAT durante dos minutos en hielo para lavar. Transcurrido este tiempo, se pasaron los riñones a una solución de Dulbecco estéril en hielo conteniendo penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml. A continuación se decapsularon los riñones. Para ello se abrió cada uno longitudinalmente y, mediante disección macroscópica, se aisló la corteza, que fue troceada con un bisturí sobre un cristal mantenido a 4 °C, hasta que tuvo una consistencia pastosa. El material biológico se hizo pasar a través de varios tamices de acero inoxidable, con distinto diámetro de poro (Cisa, Barcelona, España). Primeramente, el material se hizo pasar, con la ayuda de una espátula estéril, a través de un tamiz de 150 µm de diámetro de poro, con el objeto de separar los glomérulos de los elementos tisulares adyacentes. El material obtenido en la cara inversa del tamiz, fue recogido con una espátula estéril y colocado en un segundo tamiz de 50 µm de diámetro de poro. Posteriormente se procedió a lavar varias veces el material retenido en el tamiz con PBS, utilizando una jeringa. Este tamiz retiene los glomérulos, dejando pasar estructuras menores y glomérulos fragmentados. Todo el material retenido se recogió en un tubo FALCON y se completó el volumen hasta 50 ml con PBS. Una vez centrifugados los glomérulos a 180 x g fueron resuspendidos en una solución de Colagenasa 1A 45 µg/ml en Dulbecco. Los glomérulos se mantuvieron en esta solución durante 30 minutos a 37 °C con agitación ocasional, tras lo cual, se añadió medio RPMI frío complementado con 10% de FBS, penicilina 50 U/ml-estreptomicina 50 µg/ml, anfotericina B 2,5 µg/ml, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, selenito sódico 5 ng/ml y L- Glutamina 1 mM. La suspensión de glomérulos y células se llevó

posteriormente a un tamiz de 25  $\mu\text{m}$  de poro, y se lavó varias veces con RPMI para eliminar la colagenasa. Una vez lavados los glomérulos, se recogieron del tamiz y, tras una centrifugación, se sembraron en medio RPMI con los complementos indicados anteriormente en frascos de cultivo Falcon de 175  $\text{cm}^2$ . Transcurridas 48 horas, se recogió el sobrenadante de los frascos de cultivo y se resembraron los glomérulos que aún no se habían adherido al sustrato. Se dejó crecer el cultivo entre 20 y 25 días cambiando el medio de cultivo cada 48 horas.

En estas condiciones, las células epiteliales presentes en el cultivo mueren dando paso a la proliferación de las células mesangiales.

### **3.6.3. Mantenimiento del cultivo primario de células Mesangiales de rata Wistar.**

Las células mesangiales crecieron en una atmósfera al 95% de humedad y 5% de  $\text{CO}_2$  a una temperatura de 37 °C en medio RPMI 1640 complementado con 10% FBS, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50  $\mu\text{g/ml}$ , anfotericina B 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , insulina 5  $\mu\text{g/ml}$ , transferrina 5  $\mu\text{g/ml}$ , selenito sódico 5  $\text{ng/ml}$  y L- Glutamina 1 mM.

## **3.7. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

### **3.7.1. Medida de la incorporación de timidina al ADN.**

Las células mesangiales de rata Wistar fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 15.000 células por pocillo. Tras 48 horas de cultivo, cuando las células se encontraban aún en subconfluencia, se pusieron en medio al 0% de suero durante 24 horas, tras lo cual, se cambió el medio a RPMI con los complementos de crecimiento (insulina, transferrina y selenio) sin suero y con los estímulos correspondientes. Se incubó el cultivo durante 18 horas a 37 °C en atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ , y a continuación se añadió 1  $\mu\text{Ci}$  de timidina tritiada por pocillo. Se incubaron las células durante 6 horas más en las mismas condiciones. Posteriormente se procedió a la extracción de ADN. Para ello, se lavaron las células con PBS y se incubaron en ácido tricloroacético al 10% frío durante 15 minutos en hielo. A continuación se eliminó el sobrenadante y se extrajo el ADN añadiendo a las células 1 ml de NaOH 0,1 N e incubando a 60 °C durante 30 minutos con agitación ocasional. Seguidamente se añadieron 500  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a 5 ml de líquido de centelleo y, transcurridas 12 horas se midieron las c.p.m en un contador de centelleo 1409 DSA de Wallac.

### **3.7.2. Cuantificación del número de células por Cristal Violeta.**

Las células mesangiales de rata Wistar fueron lavadas con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 10% durante 10 minutos. Tras lavar repetidas veces con PBS se tiñeron los núcleos con cristal violeta al 0.2% durante 30 minutos en oscuridad. A continuación, se lavaron las placas repetidas veces con PBS hasta eliminar completamente el excedente de cristal violeta que no había teñido los núcleos. Las placas se dejaron secar al aire, y a continuación se añadieron 2 ml de ácido acético al 10%, y se leyó la absorbancia a 595 nm.

### **3.7.3. Medida de la actividad mitocondrial.**

La sal tetrazolio XTT, es convertida a una sal formazán por la actividad succinato-tetrazolio reductasa, perteneciente a la cadena respiratoria mitocondrial, la cual es activa sólo en células viables. La cantidad de sal formazán producida por el cultivo correlaciona directamente con el número de células viables. Dicho ensayo se realizó según el método de Roche.

## **3.8. TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN**

### **3.8.1. Citometría de Flujo.**

#### *3.8.1.1. Marcaje de antígenos de superficie.*

El análisis de la expresión de antígenos de superficie mediante citometría de flujo se llevó a cabo utilizando un millón de células, las cuales fueron lavadas dos veces con PBS, y a continuación fueron incubadas con el anticuerpo específico, a la dilución correspondiente, en un volumen final de 50  $\mu$ l durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavaron las células dos veces con PBS y se incubaron en las mismas condiciones que en el paso anterior, con un anticuerpo anti IgG conjugado con un fluorocromo. A continuación, se lavaron las células dos veces con PBS y fueron resuspendidas en un volumen final de 300  $\mu$ l. En estas condiciones se analizaron las células en el momento por un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) o se fijaron con formaldehído al 0.5% cuando no fueron analizadas inmediatamente.

### *3.8.1.2. Marcaje de ADN para determinación de Ciclo Celular.*

La tinción de ADN con yoduro de propidio se llevó a cabo con un millón de células, que fueron resuspendidas en 700 µl de etanol al 70% frío y se mantuvieron en esta solución a 4 °C entre 15 minutos y 1 hora. A continuación se lavaron las células tres veces con PBS y fueron resuspendidas en una solución de 500 µl de PBS con 100 µg/ml RNAsa y 5 µg/ml de yoduro de propidio. En estas condiciones se incubaron las células durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad y en agitación, y a continuación se analizaron mediante citometría de flujo.

### **3.8.2. Microscopía de Fluorescencia y Confocal.**

Las células se sembraron en cubres de 20 x 20 mm o en cámaras de cristal (Nalge Nunc International).

El proceso de tinción celular comenzó con dos lavados de las células con PBS y posterior fijación con paraformaldehído 4%, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, sacarosa 5%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con suero de cobaya al 20% en PBS para evitar posteriores uniones inespecíficas de los anticuerpos anti IgG hechos en cobaya. Las incubaciones con los anticuerpos específico y anti IgG conjugado con fluorocromo se llevaron a cabo en suero de cobaya al 20%, a la dilución correspondiente, a 37 °C durante 30 minutos o a temperatura ambiente durante 1 hora. Entre cada incubación con anticuerpo se realizaron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Los núcleos se tiñeron con DAPI a una dilución 1:1000 en agua durante 5 minutos. Seguidamente, las células se lavaron dos veces con PBS, y el último lavado se realizó con agua desionizada para eliminar las sales. Finalmente se montaron las preparaciones con gelvatol y se dejaron secar al aire durante varias horas, tras lo cual, se visualizaron las células en un microscopio confocal LSM 510, de Zeiss.

### **3.8.3. Inmunohistoquímica.**

Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico y a continuación se realizó una perfusión renal a través de la aorta abdominal, a fin de lavar la sangre del riñón. Un fragmento del riñón, incluyendo la corteza y la médula fue fijada con formalina al 4% durante 24 horas. A continuación, el material fue deshidratado y embebido en parafina. Se realizaron secciones de 3 µm, las cuales fueron montadas en portaobjetos de cristal. Posteriormente se realizó la recuperación de los antígenos con una solución de citrato,

durante tres minutos en un horno. A continuación las preparaciones se lavaron con PBS, y la peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno. A continuación se procedió a la tinción de las preparaciones con el anticuerpo MRC OX44 a una dilución 1:500, durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido del empleo del "kit" "Envision + system" (Dako), según las instrucciones del fabricante. El cromógeno empleado para la reacción de la peroxidasa fue 3,3' diaminobencidina y los núcleos fueron teñidos con hematosilina.

### **3.9. EXPRESIÓN EN BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST**

La obtención de las proteínas de fusión GST-c jun (aa 1-223) y GST-ATF-2 (aa 1-109) se realizó creciendo las bacterias XL1-Blue que contienen el plásmido pGEX-2T-cJun en LB con 100 µg/ml de ampicilina.

Cuando el cultivo alcanzó una densidad de 0.6-0.9 a una longitud de onda de 600 nm, se indujo la expresión de la proteína con IPTG 100 µM a 37 °C durante 3 horas. A continuación el cultivo fue centrifugado a 13000 x g durante 30 minutos a 4 °C, y las bacterias fueron lisadas en el tampón de lisis: PBS, PMSF 0.5 mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, lisozima 1 mg/ml, EDTA 0.1 mM, sonicando mediante seis pulsos de 10 segundos, y con posterior adición de Tritón X-100 1%. El extracto se incubó en estas condiciones durante 30 minutos a 4 °C en agitación. A continuación se centrifugó el extracto, a fin de descartar el material insoluble y se purificó la proteína por incubación con "Glutation-sepharosa 4B" (Amersham) durante 1 hora a 4 °C, seguido de sucesivos lavados con el tampón de lisis. Seguidamente se realizó la elución de la proteína con un volumen de Hepes 50 mM pH 8, glutatión 20 mM reducido, incubando durante una hora a 4 °C en rotación. Este paso se repitió tres veces. Posteriormente se dializó la proteína contra PBS dos veces, durante dos horas y toda la noche, respectivamente.

La pureza de la proteína obtenida se comprobó en un gel de poliacrilamida, visualizándose las bandas por tinción del gel con Coomassie 0.5% en metanol: acético: agua (5:1:4), y posterior destinción con metanol: acético: agua (5:1:4).

Asimismo, se determinó la concentración de proteína en la muestra mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad).

### **3.10. TRANSFECCIONES**

#### **3.10.1. Transfección transitoria de células linfoides.**

Las células Jurkat fueron transfectadas con Lipofectamina (Invitrogen, Paisley, Scotland), según las indicaciones del fabricante. Las células crecieron hasta una densidad de  $5 \times 10^5$  células por ml. Se utilizaron  $3 \times 10^6$  células por punto. Las células se lavaron con DMEM sin antibióticos y fueron resuspendidas en 800  $\mu$ l de DMEM en una placa de 35 mm de diámetro. A continuación, se prepararon las mezclas de 3  $\mu$ g de ADN de pCEFLKZ HA-JNK en un volumen final de 100  $\mu$ l de DMEM y 15  $\mu$ l de lipofectamina en un volumen final de 100  $\mu$ l de DMEM. Ambos volúmenes se mezclaron y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió dicha mezcla al cultivo celular, y se incubaron las células 5 horas a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se sembraron las células en el medio de crecimiento. Transcurridas 48 horas se utilizaron los cultivos para ensayos de actividad JNK.

#### **3.10.2. Transfección transitoria de células epiteliales.**

Las células 293T se transfectaron con lipofectamina, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, las células se sembraron 24 horas antes de la transfección a una densidad del 20% en placas de 100 mm de diámetro. Se preparó una solución con 100  $\mu$ l de DMEM y 20  $\mu$ l de lipofectamina, y otra solución con los ADNs en un volumen final de 100  $\mu$ l de DMEM. Ambos volúmenes se mezclaron y se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente. En el momento de la transfección, se lavaron las células con DMEM sin antibióticos dos veces y se dejaron en un volumen final del mismo de 4 ml. En este momento se añadió a las placas la mezcla de ADN-lipofectamina previamente diluida en un volumen final de 1 ml. En este medio se mantuvieron las células 5 horas a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se añadieron al cultivo 5 ml de medio DMEM al 20% de FBS, a fin de obtener una concentración final de FBS al 10%. A las 12 horas se cambió el medio de cultivo a las células, y a las 48 horas se utilizaron los cultivos para la realización de experimentos de actividad quinasa.

### **3.10.3. Transfección transitoria de células NIH 3T3.**

Las células NIH 3T3 se transfectaron por el método de fosfato cálcico [263]. Para ello, 24 horas antes de la transfección, se sembraron 90.000 células en placas de 60 mm de diámetro. En el momento de la transfección se preparó la mezcla de ADN en un volumen final de 300  $\mu$ l. A cada tubo se añadió 300  $\mu$ l de cloruro cálcico 500 mM. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante una hora. A continuación se preparó el tampón HNP (NaCl 280 mM, Hepes 50 Mm, Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1.5 mM). Sobre 600  $\mu$ l de esta solución, en agitación fuerte, mediante burbujeo, se añadió la mezcla de ADN-cloruro cálcico gota a gota. La solución restante se incubó durante una hora a temperatura ambiente y, a continuación se añadió al cultivo celular, el cual se encontraba en un volumen de 5 ml. Transcurridas 18 horas, se cambió el medio de cultivo a las células por medio de crecimiento normal.

### **3.10.4. Transfección estable de células NIH 3T3.**

Las células NIH 3T3 fueron transfectadas siguiendo el mismo protocolo que para las transfecciones transitorias. Para la selección de clones estables se añadió al medio geneticina 400  $\mu$ g/ml. En estas condiciones se mantuvo el cultivo hasta que las células sensibles murieron, dando paso a las células que habían incorporado el vector, proceso que duró aproximadamente tres semanas. Una vez establecidos los clones, éstos se aislaron y se dejaron crecer independientemente en placas Falcon de 96 pocillos. Una vez expandidos los clones individuales, se analizó la expresión de hCD53 en la membrana plasmática celular mediante citometría de flujo.

## **3.11. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA**

### **3.11.1. Ensayos de actividad JNK endógena.**

Los cultivos crecieron hasta una densidad de  $5 \times 10^5$  células por ml, las cuales se emplearon a razón de  $6 \times 10^6$  células por punto. Dichas células fueron lisadas en el tampón WCE300 (Hepes 25 mM pH 7.7, NaCl 0.3 M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Tritón X-100 0.1%,  $\beta$ -glicerofosfato 20 mM, ortovanadato sódico 100  $\mu$ M, leupeptina 2  $\mu$ g/ml, aprotinina 2  $\mu$ g/ml, PMSF 100  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se diluyó el sobrenadante con el tampón de dilución ( Hepes 20 mM pH 7.7, EDTA 0.1

mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Tritón X-100 0.05%, β- glicerofosfato 20 mM, ortovanadato sódico 100 μM, aprotinina 2 μg/ml, leupeptina 2 μg/ml, PMSF 100 μg/ml). Las muestras fueron incubadas en este tampón durante 10 minutos a 4 °C y, tras centrifugación, el sobrenadante obtenido se incubó entre 5 y 12 horas con 10 μg de la proteína de fusión GST c-Jun y 30 μl de "Glutathione Sepharose 4B". A continuación, se lavaron los complejos formados con el tampón HBID (Hepes 20 mM pH 7.7, EDTA 0.1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.05%, β- glicerofosfato 20 mM, ortovanadato sódico 100 μM, aprotinina 2 μg/ml, leupeptina 2 μg/ml, PMSF 100 μg/ml) y fueron resuspendidas en 30 μl de tampón de ensayo de actividad quinasa (Hepes 20 mM pH 7.6, DTT 2 mM, β-glicerofosfato 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, ortovanadato sódico 100 μM, ATP 20 μM, 5 μCi γ-<sup>32</sup>ATP). La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a 30 °C y se detuvo con la adición del tampón de carga (Tris-HCl 80 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.1%). Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%, y tras secar el gel, se visualizaron las bandas mediante autorradiografía en un "Personal Molecular Imager", (Bio-Rad).

### **3.11.2. Ensayos de actividad quinasa exógena.**

Las células fueron lisadas en el tampón de lisis (Hepes 25 mM pH 7.5, NaCl 0.3 M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Tritón X-100 1%, β-glicerofosfato 20 mM, SDS 0.1%, deoxicolato sódico 0.5%, DTT 0.5 mM, ortovanadato sódico 0.1 mM, leupeptina 2 μg/ml, aprotinina 2 μg/ml, PMSF 100 μg/ml), durante 10 minutos a 4 °C. A continuación se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12.000 x g a 4 °C . El sobrenadante fue inmunoprecipitado con un anticuerpo contra el epítipo HA y, a continuación, se lavaron los inmunocomplejos: una vez con PBS, NP40 1%, ortovanadato sódico 2 mM; una vez con Tris-HCl 100 mM pH 7.5, LiCl 0.5 M y una vez con el tampón de reacción quinasa (MOPS 12.5 mM pH 7.5, β-glicerofosfato 12.5 mM , MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM, EGTA 0.5 mM, NaF 0.5 mM , ortovanadato sódico 0.5 mM, DTT 3.3 mM, 10 μg de sustrato, ATP 20 μM, 10 μCi γ-<sup>32</sup>ATP). La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 30 minutos y se detuvo con la adición del tampón de carga (Tris-HCl 80 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.1%). Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% y, tras secar el gel, se visualizaron las bandas mediante autorradiografía en un "Personal Molecular Imager", (Bio-Rad).

### **3.12. INMUNOPRECIPITACIÓN Y "WESTERN BLOT"**

Los experimentos con los anticuerpos anti PARP, anti PCNA, anti Vav, anti PLC-gamma y anti-fosfotirosina PY99 se llevaron a cabo utilizando como tampón de lisis: Tris-HCl 10 mM pH 8, Tritón X-100 1%, NaCl 50 mM, PMSF 0.25 mM, aprotinina 2 µl/ml, leupeptina 2 µg/ml, NaF 1 mM, ortovanadato sódico 100 µM.

Los ensayos con PCNA se realizaron con el mismo tampón que en el caso anterior conteniendo además SDS 0.1% y deoxicolato sódico 1% (tampón RIPA). En este caso los lisados se trataron con 100 U/ml de DNAsa a fin de degradar el ADN que pudiese estar asociado a la proteína PCNA.

El "western blot" con anti HA se realizó utilizando como tampón de lisis el indicado en el apartado de ensayos de actividad quinasa.

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo incubando los extractos con el anticuerpo a la concentración adecuada durante 2 horas a 4 °C, y a continuación se añadieron 30 µl de gamma-bind plus Sepharosa o de proteína A-Sepharosa al 50%, incubando a 4 °C en rotación durante 1 hora más.

Los extractos se analizaron en condiciones desnaturalizantes. El tampón de carga empleado fue: Tris HCl 80 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, β-mercaptoetanol 5%.

La cantidad de extracto analizada fueron 20-100 µg de proteína en geles a un porcentaje de acrilamida de (7.5-12)% según el peso molecular de la proteína a analizar.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, en el tampón: Tris 2.5 mM, glicina 19.2 mM, metanol 20%.

La membrana se bloqueó durante 2 horas con leche al 5% en TBS-T (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, KCl 2.5 mM, Tween 20 0.1%), o BSA al 5% en TBS-T para el anticuerpo antifosfotirosina.

Las incubaciones con el anticuerpo específico, y anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa fueron de 1 hora a temperatura ambiente a la dilución adecuada. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos entre ambos anticuerpos y al final de ambas incubaciones. Seguidamente, se revelaron las membranas con ECL.

En los "western blot" realizados con el anticuerpo anti PARP, tras el anticuerpo primario, se empleo un anticuerpo anti IgG conjugado con biotina y a continuación estreptavidina-peroxidasa, ambos a una dilución 1:1.000, para amplificar la señal.

### **3.13. ENSAYO DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL**

Las células NIH 3T3 fueron sembradas a una densidad de 90.000 células en placas de 60 mm de diámetro 24 horas antes de la transfección.

La transfección se realizó mediante el método de cloruro cálcico [263], empleándose las siguientes cantidades de ADN: 2 µg de pRL-TK (actividad luciferasa de *Renilla*), 1µg de pCEFL KZ HA-JNK1, 3 µg de pGal-luc (gen de la luciferasa de *Photinus* bajo el control del promotor de la galactosidasa), 1µg de Gal-jun RSV (Jun silvestre) o 1 µg de Gal-jun ala/ala (sustitución de las serinas 63 y 73, dianas de fosforilación de JNK, por alaninas).

Transcurridas 48 horas desde la transfección, y tras mantener las células dos horas en ayuno, éstas se trataron con los estímulos correspondientes y se mantuvieron durante seis horas en el incubador, a fin de permitir la expresión proteica. Finalmente se recogieron las células, que fueron lisadas en "passive lysis buffer" (Promega), y centrifugadas a 12000 x g durante 2 minutos. El sobrenadante se utilizó para medir la actividad luciferasa. La medición de la actividad luciferasa de *Photinus* y *Renilla* se realizó con "Dual-Luciferase Reporter Assay System" (Promega). La luz emitida por la reacción durante 30 segundos se cuantificó en un luminómetro OPTOCOMP 1 de MGM Instruments. La actividad luciferasa *Renilla* presente en cada extracto se utilizó para la normalización de la actividad luciferasa de *Photinus*.

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ANTÍGENO CD53**

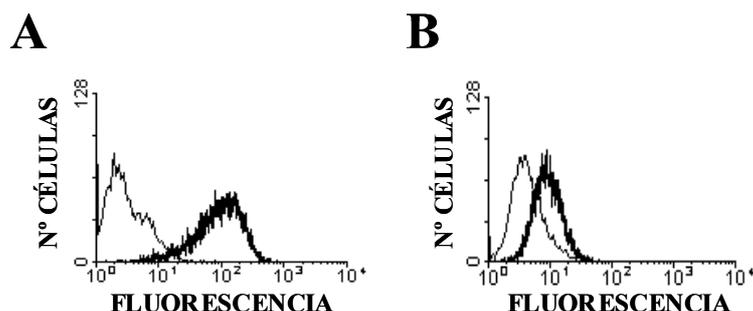
Estudios previos indicaron que la ligación del antígeno CD53, inducía un aumento en los niveles de óxido nítrico dependientes de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), en macrófagos de rata [65].

La expresión del gen que codifica para la enzima iNOS es dependiente de la activación de MAPK frente a estímulos como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o LPS. En macrófagos estos estímulos producen activación de las quinasas ERK, JNK y p38, aunque sólo la inhibición de JNK bloquea la inducción de la enzima [264]. Del mismo modo, IL-4 bloquea la inducción de iNOS mediada por los citados estímulos, mediante la inhibición de ERK y JNK, sin que tenga ningún efecto sobre p38 [265], y en algunas ocasiones, parece que la activación de p38 es capaz de bloquear la inducción de iNOS, mediada por LPS [266]. En otros tipos celulares como células mesangiales de riñón, la inducción de iNOS mediada por IL-1 conlleva la activación de JNK y p38 [267]. Estos resultados indican que las MAPK son relevantes en la inducción de iNOS frente a estímulos proinflamatorios.

Estos estudios sugerían que las MAPK podían ser relevantes en la vía de señalización iniciada en el antígeno CD53, por lo que se estudió la implicación de estas rutas en la señalización de dichos antígenos de manera general, analizando la activación de estas rutas por ligación de CD53 en diversos tipos celulares, como linfoides y epiteliales.

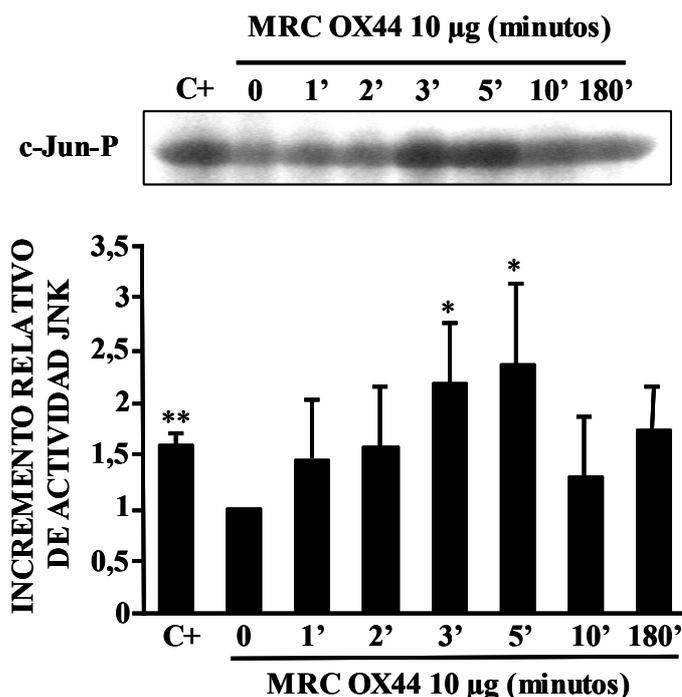
##### **4.1.1. El anticuerpo MRC OX44 induce fosforilación de c-Jun en un linfoma de rata.**

Para estudiar la activación de JNK, medida por fosforilación de c-Jun, se empleó como sistema la línea derivada de un inmunocitoma pre-B de rata, IR938F. Los niveles de expresión del antígeno CD53 en la membrana plasmática de estas células son elevados, como se comprobó mediante citometría de flujo (Figura 16).



**Figura 16. Expresión de CD53 en la membrana plasmática de células linfoides.** Las células IR938F (A) y Jurkat (B) fueron teñidas sin permeabilización, con los anticuerpos MRC OX44 y MEM53 respectivamente, ambos a una dilución 1:100, seguido de una tinción con un anticuerpo contra la cadena pesada de la IgG de ratón, conjugado con el fluorocromo fluoresceína, a la misma dilución que los anticuerpos anteriores. Se analizó la expresión de dichos antígenos en la membrana plasmática mediante citometría de flujo.

Una vez comprobados los niveles de expresión, se realizaron experimentos de actividad quinasa endógena. Las células IR938F crecieron hasta una densidad de  $5 \times 10^5$  células por mililitro y fueron mantenidas en medio de ayuno, en presencia de 0.5% de suero durante dos horas, a fin de conseguir niveles basales de activación de la actividad quinasa. A continuación se realizaron curvas de tiempo estimulando las células con 10  $\mu\text{g}$  del anticuerpo MRC OX44 a tiempos cortos, en un rango de 1 a 30 minutos. El control positivo empleado para este experimento fue cicloheximida 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 30 minutos a 37° C. Tras lisar las células, se incubaron los extractos celulares totales con 10  $\mu\text{g}$  de la proteína de fusión GST-cJun (aminoácidos 1-223) y Glutación-Sepharosa a fin de precipitar la actividad quinasa asociada a la proteína de fusión GST-cJun, y a continuación se realizaron ensayos de actividad quinasa añadiendo fósforo marcado radiactivamente a los complejos formados, a fin de visualizar el grado de fosforilación del sustrato, inducido por la actividad quinasa posiblemente asociada. Estos experimentos dieron como resultado que la ligación de CD53 en las células IR938F produce un aumento rápido y transitorio de la fosforilación de c-Jun, en el intervalo de 3 a 5 minutos tras estimulación con el anticuerpo (Figura 17). La conclusión de este experimento es que la ligación del antígeno CD53 por sí sola es capaz de activar JNK endógena en células linfoides.

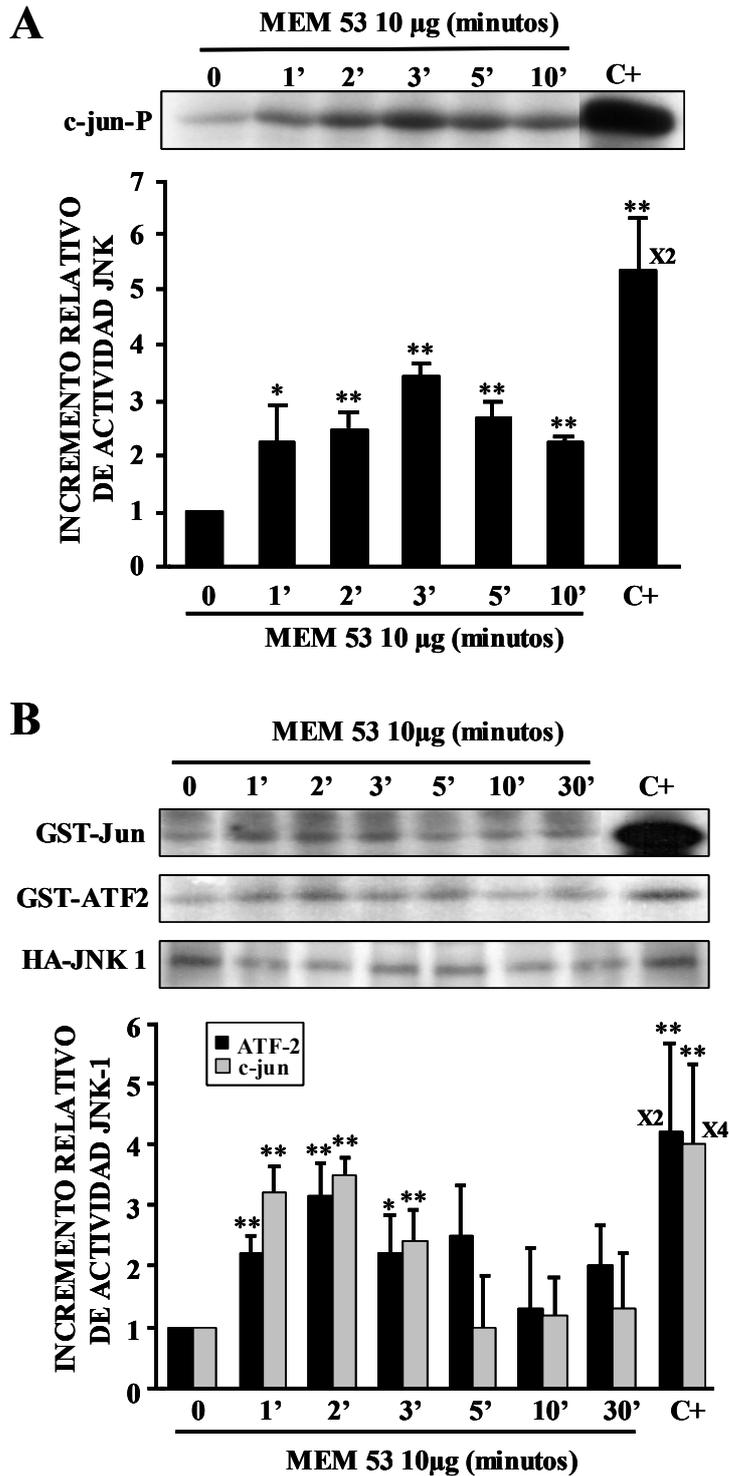


**Figura 17. Ensayo de actividad quinasa endógena de células IR938F.** Las células fueron estimuladas con 10 µg del anticuerpo MRC OX44. El sustrato empleado para los ensayos de actividad quinasa fue la proteína de fusión GST-c Jun. El control positivo empleado fue cicloheximida 10 µg/ml durante 30 minutos. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. \*representa una  $p < 0.01$ ; \*\* representa un  $p < 0.001$ ; ambas según la función T de "Student".

#### 4.1.2. MEM53 activa JNK endógena y exógena en células Jurkat.

##### 4.1.2.1. Ensayo de actividad JNK endógena en células Jurkat.

A fin de generalizar la observación realizada en las células IR938F, a otras células linfoides, las células Jurkat, linfoma T humano, que expresan CD53 (Figura 16), fueron empleadas como sistema de estudio de fosforilación de c-Jun en extractos celulares totales. Para ello se siguió el mismo desarrollo experimental que en el apartado anterior, pero en este caso la curva de tiempo de estimulación se realizó con 10 µg de MEM53, anticuerpo que reconoce específicamente a CD53 humano, y el control positivo de activación empleado fue la adición de anisomicina a 10 µg/ml durante 30 minutos a 37° C (Figura 18 A). El resultado obtenido en células T humanas es equivalente al obtenido en células B de rata. Se obtiene una activación rápida y transitoria de la actividad JNK. Este resultado indica que la ligación del antígeno CD53 por el anticuerpo MEM53 es suficiente, por sí solo, para inducir una activación transitoria de la actividad JNK.



**Figura 18. A). Ensayo de actividad quinasa endógena de células Jurkat.** Las células fueron estimuladas con 10  $\mu$ g del anticuerpo MEM53. El sustrato utilizando fue GST-cJun. El control positivo empleado fue anisomicina 10  $\mu$ g/ml durante 30 minutos. **B) Ensayo de actividad JNK exógena.** Las células Jurkat fueron transfectadas con la construcción pCEFL-KZ-HA-JNK1. Los sustratos empleados fueron GST-cJun y GST-ATF2. Se analizaron los niveles de transfección de HA-JNK1 mediante "western blot" con un anticuerpo contra el epítipo HA. El control positivo empleado fue anisomicina 10  $\mu$ g/ml durante 30 minutos. Ambos gráficos muestran la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. X2/X4 se refiere a la media. \*representa una  $p < 0.01$ ; \*\* representa un  $p < 0.001$ ; ambas según la función T de "Student".

#### 4.1.2.2. *Ensayo de actividad JNK exógena en células Jurkat.*

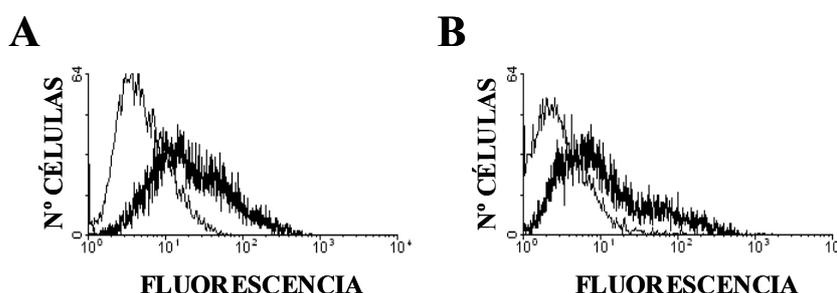
Para comprobar los resultados obtenidos en los experimentos de actividad quinasa endógena, se realizaron experimentos de actividad quinasa exógena sobre-expresando JNK, mediante la transfección transitoria de una construcción que codifica para JNK1, clonada en el vector pCEFL-KZ-HA. Se realizaron transfecciones transitorias de pCEFL-KZ-HA-JNK1 en las células Jurkat. Transcurridas 48 horas desde la transfección, se mantuvieron las células en medio de ayuno (0.5% de suero bovino fetal) durante dos horas y a continuación se realizaron curvas de tiempo con 10 µg del anticuerpo MEM53, tras lo cual se lisaron las células y, a continuación, en inmunoprecipitados contra HA se realizaron ensayos de actividad quinasa, utilizando como sustrato 10 µg de GST-jun o GST-ATF2. El control positivo empleado en este ensayo fue tratamiento de las células con anisomicina en las mismas condiciones que en el apartado anterior. En este caso se obtuvo una estimulación temprana de la actividad JNK, que es transitoria, siendo la magnitud y tiempo de la respuesta similares a los obtenidos con la actividad JNK endógena (Figura 18 B).

#### 4.1.3. **Expresión de hCD53 en 293T y posterior análisis de la activación de JNK.**

Las señales inducidas por la ligación de las proteínas Tetraspan han sido estudiadas en células linfoides. No obstante, la mayoría de las proteínas Tetraspan son ubicuas [11], y la ligación de varios miembros, a menudo produce los mismos efectos [51, 80], debido posiblemente, a que estas proteínas forman macro-complejos, de varios miembros de la familia, en la membrana plasmática [18].

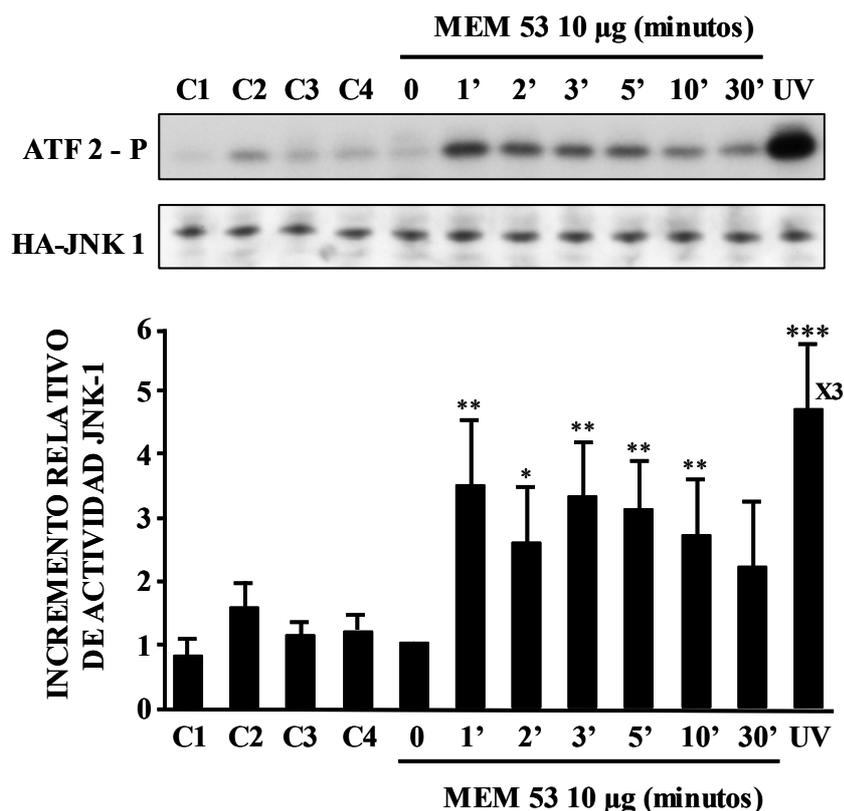
El antígeno CD53 y su homólogo en rata se expresan principalmente en tejido linfoide [15]. Los procesos fisiológicos en los cuales se han implicado estos antígenos, inducción de proliferación [44, 63], agregación homotípica [92, 93] o diferenciación linfoide [108, 109], se han estudiado en dicho tejido. No obstante, se ha descrito la expresión de CD53 en tejidos epiteliales [16]. Debido a estos resultados, se decidió estudiar si la respuesta de activación de JNK, mediada por CD53, era un proceso restringido a las células linfoides o, por el contrario, la expresión ectópica de CD53 podía reconstituir la respuesta. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron transfecciones transitorias de la línea de carcinoma renal humano 293T con una construcción de hCD53 clonado en pCEFL-KZ. Transcurridas 24 horas desde la transfección, se analizó por citometría de flujo la expresión de hCD53 en la membrana plasmática de estas células. El 100% de la población es positiva para CD53 en este

punto con unos niveles de expresión variables, donde el 50 % de la población presenta altos niveles de expresión de CD53 en la membrana plasmática (Figura 19).



**Figura 19. Análisis de la expresión ectópica de hCD53 en la superficie de células epiteliales.** Las células 293T o Cos-1 fueron transfectadas con la construcción pCEFL-KZ-hCD53 o con el vector. Para comprobar la expresión de CD53 en la membrana plasmática, las células se tiñeron con el anticuerpo MEM53 y con un anticuerpo contra la cadena pesada de inmunoglobulina conjugada con FITC y, a las 48 horas, se analizó la expresión de CD53 mediante citometría de flujo. A) Células 293T transfectadas con la construcción pCEFL-KZ-hCD53, sobre el fondo que da el vector, ambas teñidas con MEM53. B) Células Cos-1 en las mismas condiciones que en el apartado A.

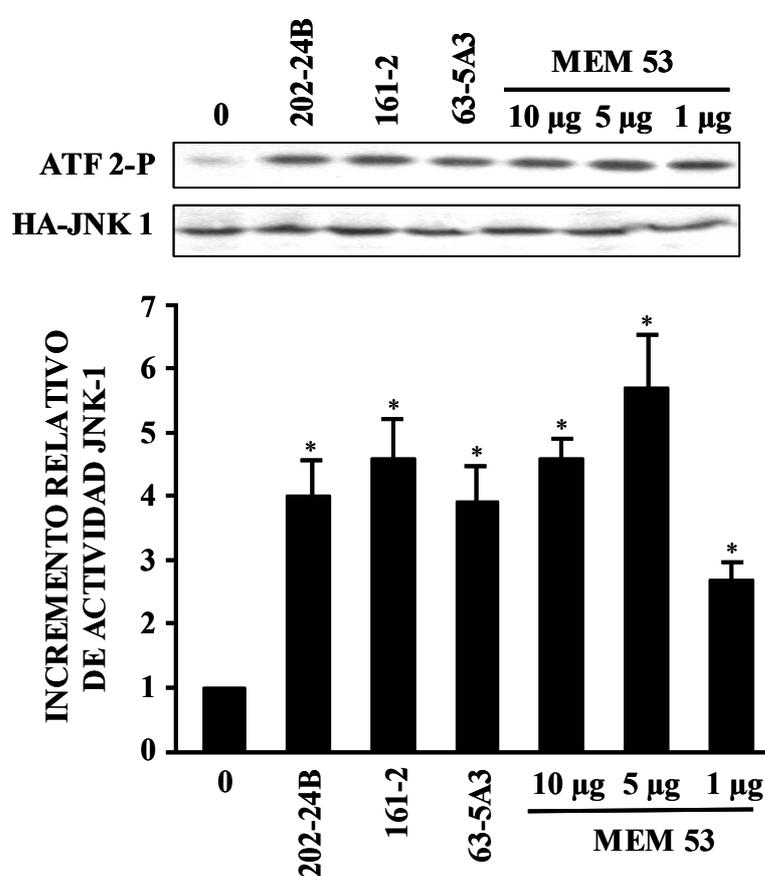
Una vez comprobado que la construcción se expresaba correctamente en la membrana plasmática, se realizaron experimentos de actividad JNK exógena en las células 293T transfectadas de manera transitoria con pCEFL-KZ-hCD53 y pCEFL-KZ HA-JNK1. Transcurridas 48 horas desde la transfección, se mantuvieron las células dos horas en medio de ayuno con 0.5% de FBS, y a continuación se realizaron curvas de tiempo con 10  $\mu$ g del anticuerpo MEM53. El control positivo consistió en el tratamiento de las células con radiación ultravioleta durante un pulso de 30 segundos a máxima energía. Una vez lisadas las células, se inmunoprecipitó la actividad JNK exógena utilizando un anticuerpo que reconoce al epítipo HA, y con los inmunocomplejos obtenidos se realizaron ensayos de actividad JNK utilizando como sustrato la proteína de fusión GST-c Jun. El resultado obtenido fue un incremento en la activación de JNK rápido y transitorio, que no se produce en los controles transfectados con el vector sin estimular ni estimulado con el anticuerpo MEM53 a varios tiempos (Figura 20). Este resultado demuestra que la expresión ectópica de CD53 en células epiteliales que no lo expresan de manera natural, conlleva su translocación a la membrana plasmática, y la reconstitución de vías de señalización que operan en otros sistemas, como el linfocito, que expresa CD53 de manera natural.



**Figura 20. Ensayo de actividad JNK exógena en células 293T.** Las células fueron transfectadas con pCEFL-KZ-hCD53 y pCEFL-KZ-HA-JNK1. El sustrato empleado en el ensayo fue GST-ATF2. Se analizaron los niveles de transfección de HA-JNK1 mediante "western blot" con un anticuerpo contra el epítipo HA. Los controles empleados fueron: UV: control positivo, pulso de radiación ultravioleta de 30 segundos; C1: vector; C2: vector estimulado con 10  $\mu$ g del anticuerpo MEM53 durante 3 minutos; C3: vector estimulado con 10  $\mu$ g de un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que MEM53 durante 3 minutos; C4: vector estimulado con 10  $\mu$ g de un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que MEM53 durante 30 minutos. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. \*representa una  $p < 0.05$ ; \*\* representa un  $p < 0.01$ ; \*\*\* representa una  $p < 0.001$ ; todas según la función T de "Student".

Estudios previos demostraron que las proteínas Tetraspan pueden inducir respuestas antagonicas dependiendo del anticuerpo utilizado. La ligación de CD53 con el anticuerpo HI29 induce adhesión homotípica en células linfoides, mientras que el tratamiento con MEM53 no tiene este efecto [93]. Del mismo modo, los anticuerpos 161-2 y 202-24b, que reconocen a CD53 humano, son capaces de disminuir la proliferación de linfocitos T en un 70% [268], mientras que el anticuerpo MEM53 se ha relacionado con inducción de un proceso proliferativo en células B [63], y antiproliferativo en células T [8]. Por el contrario, el anticuerpo 7D2, que reconoce a CD53 de rata produce un efecto proliferativo en células T [44]. Por estos resultados antagonicos, que parecen ser dependientes tanto del tipo celular, como del anticuerpo empleado, se decidió analizar el efecto de varios clones de anticuerpos que reconocen

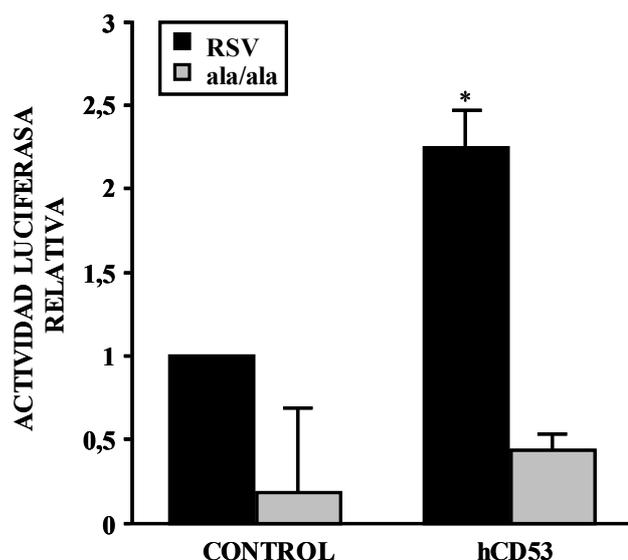
a CD53 humano sobre la activación de JNK. En las células 293T, se realizaron experimentos de actividad JNK exógena, estimulando las células con varios clones de anti CD53 humano de diferentes isotipos: MEM53 1, 5 y 10  $\mu\text{g}$  o 10  $\mu\text{g}$  de 202-24b (IgG1), 161-2 (IgG2a) y 63-5A3 (IgG2b). Todos los anticuerpos producen un efecto similar de activación de JNK (Figura 21). Este resultado indica que todos los anticuerpos empleados en este experimento son equivalentes en su función relacionada con la activación de JNK, lo que hace suponer que reconozcan epítomos situados en el mismo dominio de la proteína, de manera que al unirse a la molécula CD53 induzcan un cambio de conformación equivalente.



**Figura 21. Ensayo de actividad JNK exógena en células 293T.** Las células fueron estimuladas con anticuerpos que reconocen a CD53 humano de distinto isotipo: 202-24B: IgG 1; 161-2: IgG 2a; 63-5A3: IgG 2b; MEM53: IgG 1. El sustrato empleado para la reacción quinasa fue GST-ATF2. Los niveles de transfección de HA-JNK1 se comprobaron mediante "western blot" con un anticuerpo contra el epítomo HA. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. \*representa una  $p < 0.001$  según la función T de "Student".

#### 4.1.4. MEM53 activa la transcripción dependiente de c-Jun.

El antígeno CD53 ha sido relacionado previamente con transcripción génica dependiente de AP-1 [65]. Del mismo modo, la activación de JNK mediada por CD53 hace suponer que se active la transcripción de c-Jun. Para comprobar esta hipótesis, las células NIH 3T3 fueron transfectadas de manera estable con el ADN codificante para CD53 humano, clonado en el vector pMEXneo. Estas células fueron empleadas para experimentos de actividad transcripcional, por el método de medición de la actividad luciferasa. Las células que expresan CD53 o el vector sin inserto como control, fueron transfectadas, mediante el método de cloruro cálcico, con la construcción pCEFL KZ HA-JNK1, y con una construcción codificante para la proteína Jun silvestre o bien con una construcción codificante para Jun con las treoninas 63 y 73, sitios de fosforilación de JNK, mutadas a alaninas, de manera que resulta una proteína constitutivamente inactiva. Ambas construcciones tienen acoplado el ADN codificante para el dominio de unión al promotor de la galactosidasa. Asimismo fueron transfectadas dichas proteínas con una construcción que codifica para la enzima luciferasa de *Photinus* bajo el control del promotor de la galactosidasa. Se incluyó en la transfección una construcción codificante para la actividad luciferasa de *Renilla* (actividad luciferasa bacteriana), a fin de poder normalizar los niveles de transfección. Las células transfectadas con estas construcciones se dejaron crecer durante 48 horas, y fueron mantenidas en medio de ayuno durante dos horas. A continuación se añadieron al medio 10 µg del anticuerpo MEM53, y se dejaron las células en el incubador durante 6 horas más para permitir la expresión proteica. A continuación se lisaron las células, y se midieron las actividades luciferasa de *Photinus* y de *Renilla* con un "kit" de Promega. La medida de la actividad luciferasa de *Photinus* fue corregida por la medida de la actividad luciferasa de *Renilla* (Figura 22). Los resultados obtenidos indican que el anticuerpo MEM53 induce la fosforilación de c-Jun mediada por JNK, dando lugar a la activación transcripcional mediada por c-Jun. Estos resultados confirman que existe una activación de la vía de señalización de JNK.

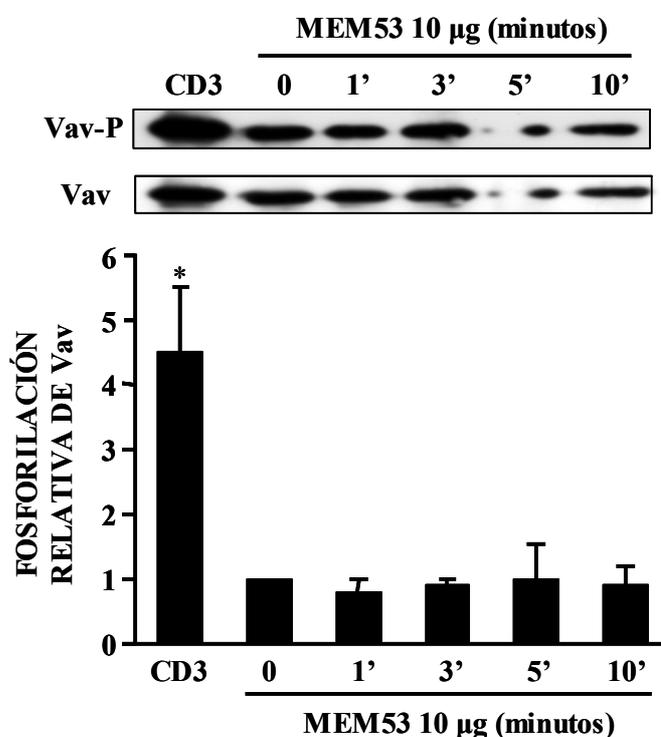


**Figura 22. Ensayo de actividad luciferasa en las células NIH3T3.** El gráfico muestra la actividad luciferasa normalizada por la actividad *Renilla* de células que expresan el vector pMEXneo (CONTROL) o pMEXneo-hCD53 (hCD53), siendo la serie indicada en negro células transfectadas con Gal Jun-RSV (codifica para jun silvestre), y la serie gris células transfectadas con Gal Jun ala/ala (codifica para jun constitutivamente inactivo). Se representa la actividad luciferasa, relativa al control en negro, que son células que han sido transfectadas con Jun silvestre y con el vector pMEXneo sin inserto. Se muestran la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. \*representa una  $p < 0.001$  según la función T de "Student".

#### 4.1.5. Estudio de la implicación de Vav en la ruta de señalización de CD53.

Vav es un intercambiador de nucleótidos de guanina para las proteínas G monoméricas Rac1 y RhoG y en menor medida para RhoA, siendo su actividad sobre Cdc42 controvertida [269, 270]. Vav se expresa en células hematopoyéticas mayoritariamente [270], y su activación, requiere de fosforilación en tirosina [271]. Debido a que la activación de Vav y Rac1, conocidos activadores de JNK [272, 273], intervienen en la activación de linfocitos T y B a través de la ligación de sus correspondientes Receptores de antígeno [270], y que el antígeno CD53, así como Vav, se expresa mayoritariamente en células linfoides, parecía lógico pensar que Vav podría estar implicado en transducir la señal desde CD53 hasta JNK. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron curvas de tiempo con el anticuerpo MEM53 en células Jurkat. El control positivo empleado fue el tratamiento de las células con 10  $\mu\text{g}$  de anti CD3 durante 2 minutos. Una vez lisadas las células se inmunoprecipitaron los extractos con un anticuerpo policlonal que reconoce a Vav y se analizó la fosforilación de Vav mediante "western blot" con un anticuerpo anti fosfotirosina, para ver la posible fosforilación de Vav, y con anti Vav para comprobar que los niveles totales de la proteína en cada punto eran homogéneos. Como se muestra en la Figura 23, no se

produce un incremento de la fosforilación de Vav con la adición del anticuerpo MEM53. De este resultado se concluye que la ligación de CD53 no es capaz de inducir la fosforilación de Vav, al menos por sí sola, y que la señal de activación de JNK inducida por MEM53 no es el resultado de la activación previa de Vav.

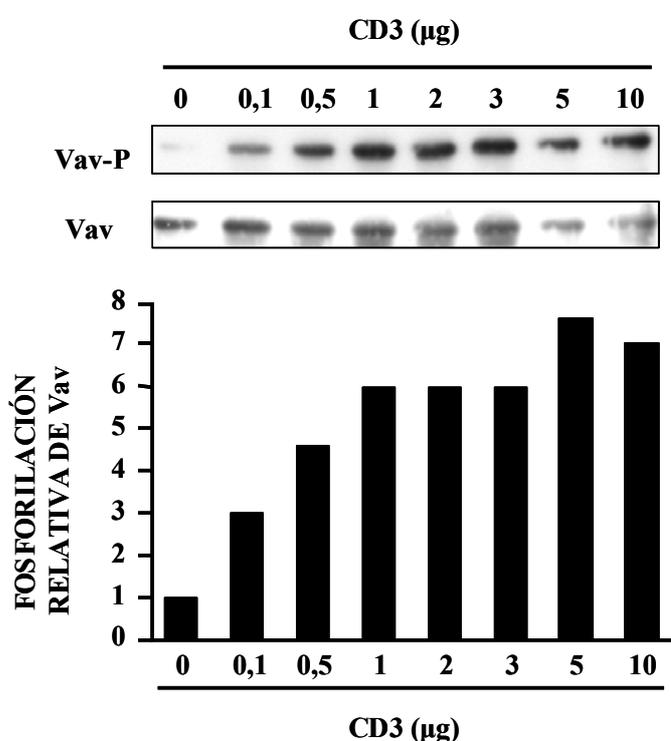


**Figura 23. Fosforilación de Vav mediada por CD53 en células Jurkat.** Las células fueron estimuladas con 10 µg del anticuerpo MEM53. El grado de fosforilación de Vav se analizó mediante "western blot" con el anticuerpo monoclonal anti fosfo-tirosina PY99, corrigiendo por los niveles totales de Vav analizados mediante "western blot", del mismo gel, con un anticuerpo policlonal que reconoce a Vav. El control positivo fue estimulación con 10 µg de un anticuerpo que reconoce a CD3 humano durante 2 minutos. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. \* representa un  $p < 0.01$  según la función T de "Student".

La ligación de las proteínas Tetraspan y del Receptor de Células T (mediante el tratamiento con anticuerpos anti CD3) es capaz de inducir un efecto coestimulador en linfocitos T [8, 74]. De manera similar, la ligación del complejo de células B constituido por CD81/CD19/CD21/Leu-13, disminuye el umbral de señalización a través el Receptor de Células B [71]. Las proteínas Tetraspan están, por lo tanto, íntimamente relacionadas con coestimulación en linfocitos. Como se ha comentado anteriormente, la ligación del Receptor de las Células T induce la activación de Vav [274, 275].

Debido a la capacidad de las proteínas Tetraspan de potenciar la señalización a través de los Receptores de antígeno de los linfocitos, se estudió la posible implicación

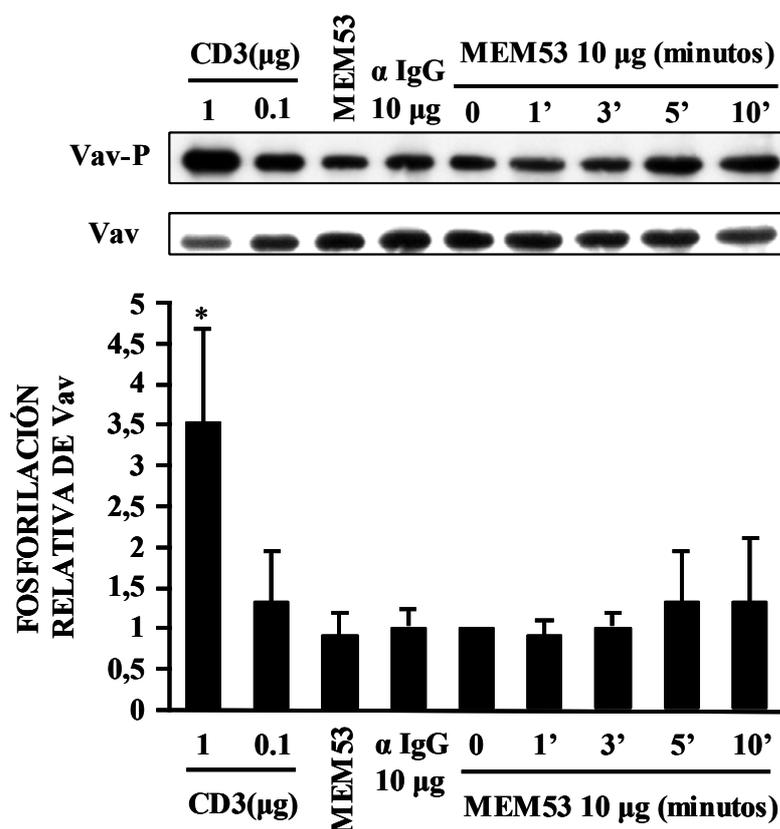
de CD53 en coestimulación de linfocitos T, que fue medida a través de la activación de Vav. Para ello, primero se determinó qué concentración de anti CD3 era capaz de producir una estimulación subóptima de Vav, a fin de obtener una fosforilación no saturada de la proteína y así poder detectar el posible incremento inducido por MEM53. Este dato se obtuvo realizando una curva de dosis con un anticuerpo anti CD3, y se visualizó la fosforilación de Vav mediante “western blot” antifosfotirosina, corrigiendo por la cantidad total de Vav mediante “western blot” con anti Vav (Figura 24). Como se puede observar en la figura, se produce un incremento gradual en el grado de fosforilación de Vav a partir de una dosis de 0.1  $\mu$ g de anti CD3.



**Figura 24. Curva de fosforilación de Vav a distintas dosis de anti CD3 en células Jurkat.** Se realizaron "western blot" con el anticuerpo anti fosfotirosina PY99, corrigiendo por los niveles totales de Vav, determinados mediante "western blot" con un anticuerpo policlonal que reconoce a Vav, realizado en el mismo gel. El gráfico muestra la cuantificación de intensidad de fosforilación de un experimento representativo.

Una vez determinada la dosis subóptima de estimulación de Vav por ligación de CD3, se realizaron experimentos de fosforilación del mismo, mediante coligación de 10  $\mu$ g de MEM53 y 0.1  $\mu$ g de CD3, con 10  $\mu$ g de un anticuerpo anti IgG para unir ambos, a fin de determinar el posible efecto sinérgico producido por ambos anticuerpos. Dichos anticuerpos se preincubaron a 37 °C durante 15 minutos, a fin de que se uniesen entre sí y, a continuación, fueron añadidos a las células. El control positivo empleado

fue, tratamiento con 1  $\mu\text{g}$  de anti CD3. Se determinó el grado de fosforilación de Vav mediante inmunoprecipitación con anti Vav y "western blot" anti fosfotirosina como en el caso anterior (Figura 25). Estos experimentos demuestran que CD3 induce una fosforilación de Vav que no es potenciada por la co-ligación con MEM53. De estos resultados se puede concluir que MEM53 induce una activación de JNK, que no es transducida por la proteína Vav y que no es potenciada por la ligación del TcR.



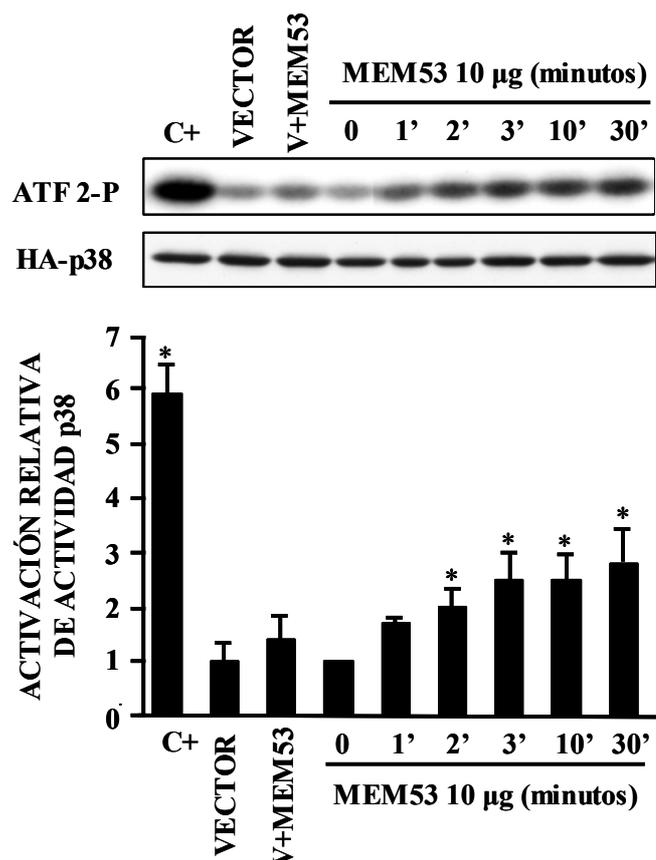
**Figura 25. Curva de tiempo de fosforilación de Vav por coligación de hCD53 y CD3.** Las concentraciones de anticuerpos empleadas para la curva de tiempo fueron 10  $\mu\text{g}$  de MEM53, dosis subóptima de estimulación de CD3 (anti hCD3 0.1  $\mu\text{g}$ ) y 10  $\mu\text{g}$  de un anticuerpo anti inmunoglobulina para unir los otros dos. Los controles empleados fueron: anti CD3 1  $\mu\text{g}$ ; anti CD3 0.1  $\mu\text{g}$ ; MEM53 10  $\mu\text{g}$ ; anti IgG 10  $\mu\text{g}$ . Se realizaron "western blot" anti fosfotirosina con el anticuerpo PY99. Los niveles de fosforilación de Vav se corrigieron por los niveles totales de Vav, realizando un "western blot" con un anticuerpo policlonal que reconoce a Vav, (ambos "western blot" se realizaron en el mismo gel). El gráfico muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. \*representa un  $p < 0.01$  según la función T de "Student".

#### 4.1.6. MEM53 activa p38 y ERK exógenas en células epiteliales.

Las proteínas Tetraspan interaccionan con múltiples elementos en la membrana plasmática, como integrinas [20], factores de crecimiento [8, 50] y otras muchas moléculas, tal como se indica en la introducción. La hipótesis más aceptada hoy en día, es que el papel de las proteínas Tetraspan consiste, en modular la función de dichas moléculas y conectar diversos elementos a nivel de membrana [15]. Cabe la posibilidad, por tanto, de que las proteínas Tetraspan estén implicadas en transducir varios tipos de señales simultáneamente. Asimismo, existen estímulos que son capaces de activar varias señales simultáneamente, tal es el caso de estímulos proinflamatorios (ver introducción), los cuales conducen a señales como la inducción de iNOS, en la cual ha sido implicado el antígeno CD53, como se indicó anteriormente, o la ligación de los Receptores de células B y T [276, 277]. Por esta razón se estudió la implicación de otras MAP quinasas en la vía de señalización de CD53.

##### 4.1.6.1. MEM53 activa p38 exógena en células 293T.

La posible implicación de p38 en la vía de señalización iniciada en el antígeno CD53, se estudió en células 293T, las cuales fueron transfectadas con p38 clonada en el vector pCEFL-KZ-HA y con hCD53, del mismo modo que en los experimentos de actividad JNK. Transcurridas 48 horas, las células se mantuvieron en ayuno al 0.5% de suero durante dos horas y a continuación se realizaron curvas de tiempo con 10 µg del anticuerpo MEM53. Los ensayos de actividad quinasa se realizaron siguiendo el mismo protocolo experimental que en los ensayos de actividad JNK exógena en las células 293T. El sustrato empleado para la reacción fue 5 µg de GST-ATF2, (Figura 26). El resultado obtenido en estos experimentos es que se produce una estimulación de la actividad quinasa de p38, como consecuencia de la ligación del antígeno CD53 temprana que persiste más allá de los 30 minutos de estimulación. Los resultados obtenidos indican que la ligación de CD53 expresado de manera ectópica en células epiteliales, es capaz, por si solo, de estimular a otras proteínas de la familia MAPK, como p38.

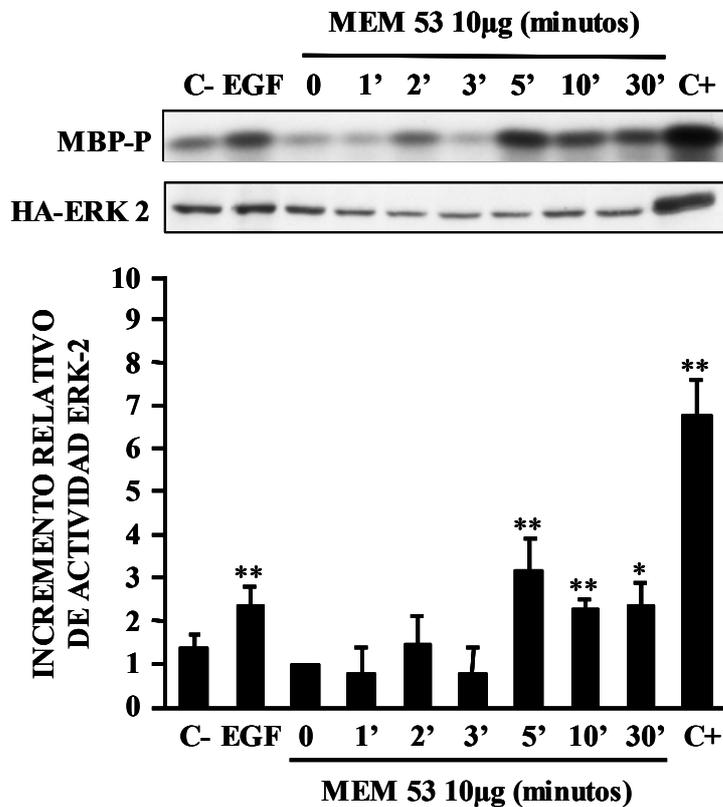


**Figura 26. Ensayo de actividad p38 en células 293T.** Las células fueron transfectadas con pCEFL KZ hCD53 y pCEFL-KZ-HA-p38. Los ensayos de actividad quinasa se realizaron utilizando como sustrato GST-ATF 2. Los niveles de transfección de HA-p38 fueron analizados mediante "western blot" con un anticuerpo contra el epítipo HA. Los controles empleados fueron: C+: anisomicina 10 µg/ml durante 30 minutos; Vector; Vector estimulado con MEM53 durante 3 minutos. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. \* representa un  $p < 0.001$  según la función T de "Student".

#### 4.1.6.2. MEM53 activa ERK en células Cos-1.

La posible implicación de ERK-2 en la vía de señalización de CD53 se estudió en las células Cos-1. La razón de no realizarlo en células 293T como los experimentos de JNK y p38, es que la medida de la actividad ERK requiere unas condiciones de ayuno que no son soportadas por las células 293T, cuya adhesión al sustrato es muy lábil. En este estudio, las células fueron transfectadas con la construcción pCEFL-KZ-HA-ERK2 y con pCEFL-KZ-hCD53. Transcurridas 48 horas se analizó, mediante citometría de flujo, la expresión de hCD53 en la membrana plasmática, siendo aproximadamente un 30% de la población positiva para CD53 (Figura 19). Una vez comprobado que hCD53 se expresaba en la membrana plasmática de células transfectadas, se realizaron los experimentos de actividad ERK. Para ello se mantuvieron las células en ayuno en medio al 0.5% de suero durante 12 horas, y a

continuación, se procedió a la realización la curva de tiempo con 10 µg del anticuerpo MEM53, seguida de un ensayo de actividad quinasa, siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos de actividad JNK y p38 exógenas. El sustrato empleado para este ensayo fue 10 µg de MBP (proteína básica de la mielina), y el control positivo, transfección con K-Ras V12 (K-Ras en el que se ha sustituido la glicina en posición 12 por valina, resultando una proteína constitutivamente activa), clonado en el vector pCEFL-KZ-Au5, (Figura 27). El resultado obtenido es una estimulación de ERK-2 temprana y transitoria. De estos experimentos se concluye que CD53 es una molécula encargada de transducir múltiples señales simultáneamente, que conducen a la activación de JNK, p38 y ERK, al menos cuando estas proteínas son expresadas de forma ectópica en células epiteliales.



**Figura 27. Ensayo de actividad ERK-2 en células Cos-1.** Las células fueron transfectadas con pCEFL-KZ-hCD53 y pCEFL-KZ-HA-ERK2. El sustrato empleado fue la proteína MBP. Los niveles de transfección de HA-ERK2 fueron analizados mediante "western blot" con un anticuerpo contra el epítipo HA. Los controles empleados fueron, C+: K RAS V12; C-: vector vacío; EGF 100 ng/ml. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes.

\*representa una  $p < 0.01$ ; \*\* representa una  $p < 0.001$ ; ambos según la función T de "Student".

## **4.2. EXPRESIÓN DE CD53 EN CÉLULAS MESANGIALES. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y SEÑALIZACIÓN**

Las células mesangiales están presentes en la matriz mesangial del glomérulo renal. Son células adherentes, de morfología estrellada, con una alta capacidad fagocítica, similares a la célula hepática de Kuffer, que poseen elementos contráctiles constituidos por filamentos de actina y miosina, similares a los de las células musculares lisas, y llevan a cabo la síntesis de la matriz mesangial. La célula mesangial, por tanto, presenta marcadas analogías con las células del músculo liso, macrófagos y fibroblastos, constituyendo una especie única dentro del mesangio glomerular, que lleva a cabo funciones secretoras, mecánicas y metabólicas.

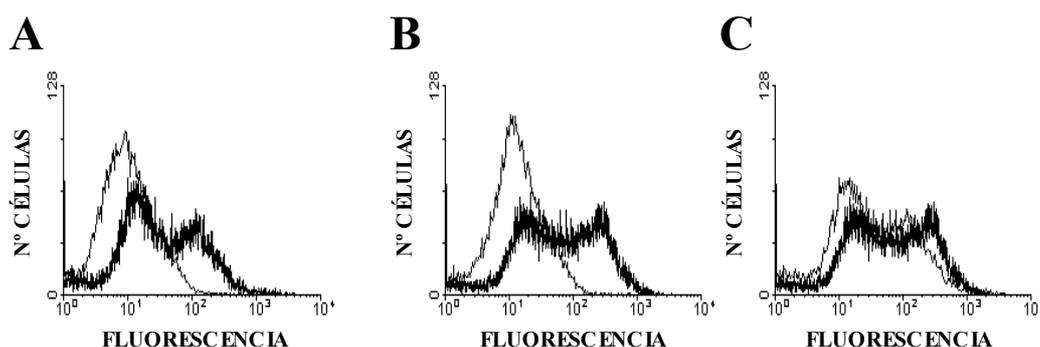
Estudios preliminares demostraron que CD53 tiene un importante papel en la fisiología de los macrófagos, estimulando la producción de óxido nítrico, mediado por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible [65].

Debido a la similitud de las células mesangiales con células tipo macrófago, se pensó que era posible que el antígeno CD53 se expresara en estas células, de modo que, en caso positivo, se podrían estudiar las posibles implicaciones fisiológicas de este antígeno en dichas células.

Se emplearon dos modelos de experimentación animal: células mesangiales procedentes de ratas Wistar sanas y células mesangiales procedentes de rata Wistar espontáneamente hipertensas (SHR).

### **4.2.1. Determinación de la expresión de CD53 en células mesangiales.**

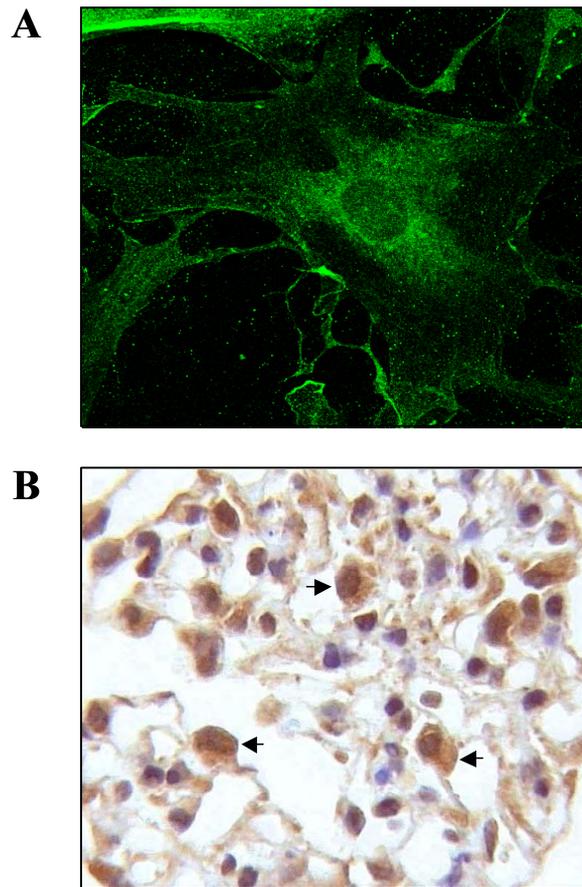
A fin de determinar la expresión de CD53 en la membrana plasmática de las células mesangiales, se marcaron las células sin permeabilizar, con el anticuerpo MRC OX44 y, a continuación, con un anticuerpo anti IgG conjugado con el fluorocromo fluoresceína (FITC). Seguidamente se analizó la expresión del antígeno CD53 en la membrana plasmática de células sanas e hipertensas mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 28, las células mesangiales expresan CD53 en la superficie de la membrana plasmática existiendo dos poblaciones, una de baja expresión y otra de alta expresión, tanto en ratas sanas como hipertensas. Las células procedentes de ratas hipertensas presentan mayores niveles de expresión de CD53 que las ratas sanas.



**Figura 28. Las células mesangiales de rata Wistar expresan el antígeno CD53 en la superficie de la membrana plasmática.** Las células mesangiales fueron teñidas, sin permeabilizar, con el anticuerpo MRC OX44 y, a continuación, con un anti IgG conjugado con el fluorocromo verde FITC. Posteriormente se analizó la expresión del antígeno por citometría de flujo. En la figura A se muestra la expresión en membrana del antígeno CD53 en ratas Wistar sanas sobre el fondo de fluorescencia que emite el anticuerpo anti IgG conjugado con FITC. En la figura B se muestra la fluorescencia emitida por el antígeno CD53, sobre el fondo del anticuerpo anti IgG-FITC sólo, en la superficie de células mesangiales de rata Wistar espontáneamente hipertensas. En la figura C se muestra la superposición de la fluorescencia de las células procedentes de rata hipertensa sobre la de las ratas sanas.

La expresión de CD53 en células mesangiales, se determinó asimismo mediante inmunofluorescencia. En este caso, las células fueron permeabilizadas con Brij96, debido a que este detergente es el que mejor preserva la presencia de las proteínas Tetraspan en la membrana plasmática [80]. Como se observa en la Figura 29, el antígeno CD53 se expresa tanto en la superficie de la membrana plasmática, como en el citoplasma.

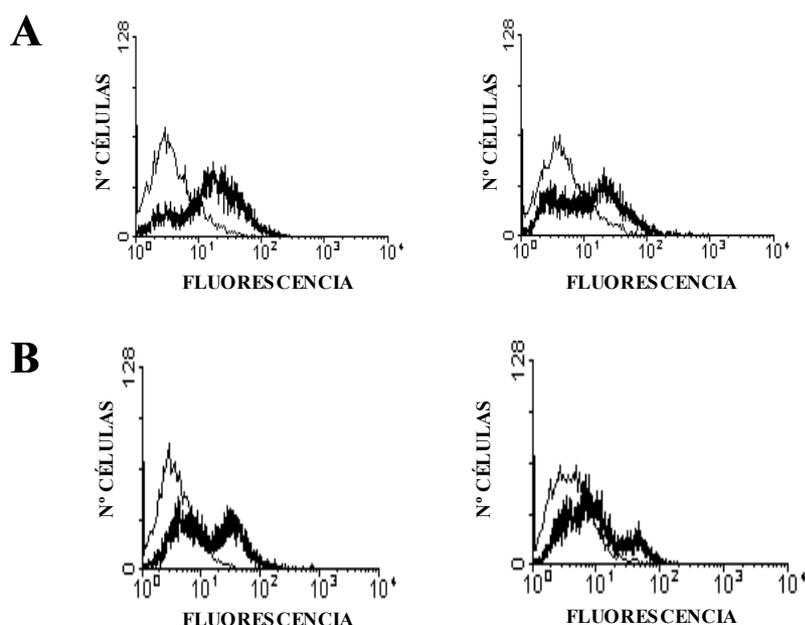
A fin de demostrar que la expresión del antígeno CD53 en las células mesangiales no era un artefacto del cultivo, sino que ocurría también "in vivo", se realizó inmunohistoquímica con secciones de tejido de ratas espontáneamente hipertensas, (Figura 29 B), comprobándose que, efectivamente, el tejido en condiciones fisiológicas también es positivo para el antígeno.



**Figura 29. Análisis de la expresión de CD53 en células mesangiales, mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.** A) Las células mesangiales de rata Wistar fueron fijadas con para-formaldehído y permeabilizadas con Brij-96. A continuación fueron teñidas con el anticuerpo MRC OX44 y con un anticuerpo secundario unido al fluorocromo CY2. La expresión de CD53 se visualizó mediante microscopía confocal. B) El tejido extraído de los animales fue teñido con el anticuerpo MRC OX44 y el antígeno fue visualizado mediante la reacción de la peroxidasa.

#### **4.2.2. Relación de los niveles de expresión de CD53 en la membrana plasmática de las células mesangiales con proliferación.**

Las células mesangiales procedentes de ratas espontáneamente hipertensas presentan una velocidad de crecimiento mayor que las células procedentes de ratas sanas. Este fenómeno parecía indicar que los niveles de expresión del antígeno CD53 en la membrana plasmática estuviesen asociados a la velocidad de división celular. Para comprobar esta hipótesis, se mantuvieron las células durante 24 horas en ayuno con carencia absoluta de suero y, otras 24 horas, con carencia de suero, pero en presencia de insulina, transferrina y selenio. A continuación, se analizó la expresión de CD53 en la superficie de la membrana plasmática, mediante citometría de flujo, comprobándose que, ciertamente, en células mantenidas en ayuno, la población que más CD53 expresa disminuye y la población que expresa más bajos niveles de CD53 aumenta (Figura 30).



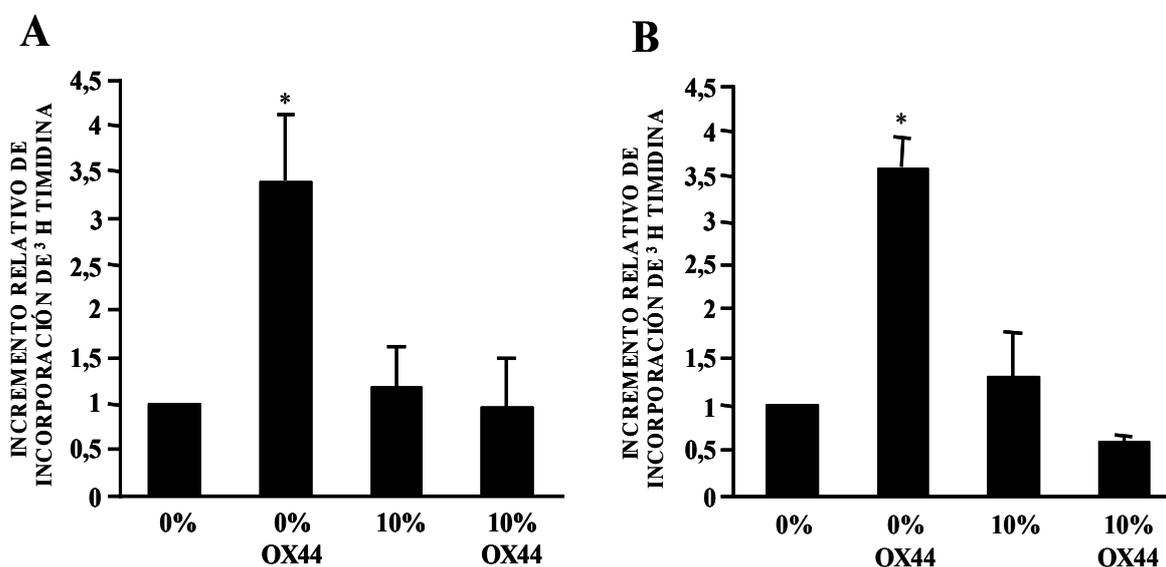
**Figura 30. Efecto del tratamiento en condiciones de ayuno sobre la expresión del antígeno CD53 en la superficie de células mesangiales de rata Wistar.** Las células fueron marcadas con el anticuerpo CD53 y un anticuerpo anti IgG conjugado con FITC, para analizar la expresión del antígeno en la membrana plasmática. A) La figura muestra la expresión en membrana del antígeno CD53, de izquierda a derecha: como control, células creciendo constantemente en presencia de 10% de suero respecto al fondo del anticuerpo anti IgG-FITC; células mantenidas en ayuno sobre el fondo del anticuerpo anti IgG-FITC. B) lo mismo con células mesangiales procedentes del riñón de ratas espontáneamente hipertensas.

#### 4.2.3. Estudio de la incorporación de timidina al ADN en células mesangiales por efecto del anticuerpo MRC OX44.

Numerosos estudios preliminares indican que las proteínas Tetraspan están implicadas tanto en inducción como en inhibición de la proliferación celular, obteniéndose distintos resultados según los anticuerpos empleados, el tipo celular en que se realiza el estudio y la molécula Tetraspan contra la cual estén dirigidos dichos anticuerpos [1, 8, 44].

La ligación del antígeno CD53 con el anticuerpo 7D2 en linfocitos T de rata, está descrita como un efecto inductor de la proliferación celular [44], por lo que se pensó que en las células mesangiales, la ligación del antígeno CD53 con el anticuerpo MRC OX44, podría tener asimismo efectos sobre la proliferación celular. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron experimentos de medida de incorporación de timidina al ADN en células de rata sana y de rata hipertensas. Las células fueron sometidas a condiciones de ayuno en ausencia total de suero y factores de crecimiento durante 24 horas. Las 24 horas siguientes, las células se mantuvieron en presencia de insulina, transferrina y selenio solamente, o con 10 % de suero, y en presencia o no de 10  $\mu$ g del anticuerpo MRC OX44. Como se puede observar en la Figura 31, el

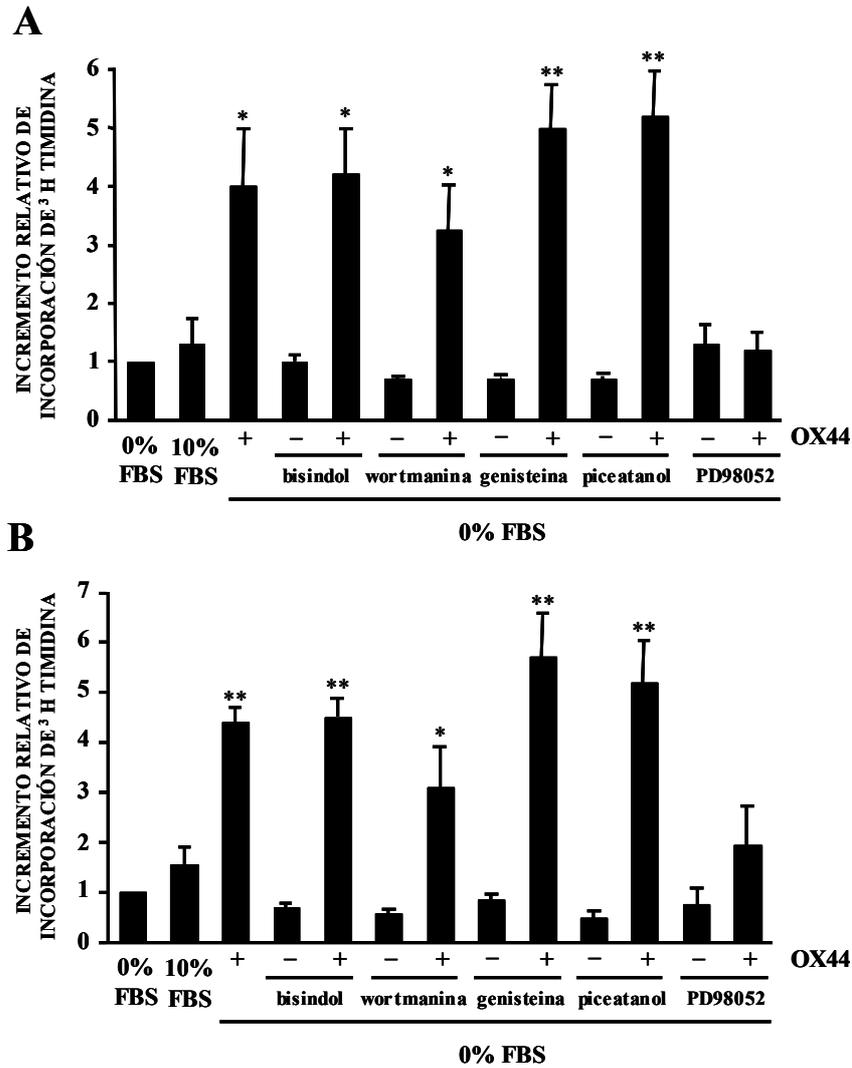
anticuerpo MRC OX44 tiene un efecto potenciador de la síntesis de ADN en células mantenidas en ausencia de suero, mientras que la presencia de suero bloquea totalmente este efecto.



**Figura 31. El anticuerpo MRC OX44 induce un aumento en la síntesis de ADN en células mesangiales de rata Wistar.** Las células fueron tratadas 24 horas con 10  $\mu$ g del anticuerpo MRC OX44, en presencia o ausencia de suero. A continuación se midió la incorporación de timidina de: A) Ratas Wistar sanas. B) Ratas espontáneamente hipertensas. La figura muestra la media y la desviación estándar de seis experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \*representa una  $p < 0.001$  según la función T de "Student".

#### 4.2.3. Estudio de las vías de señalización implicadas en inducir la síntesis de ADN mediada por CD53.

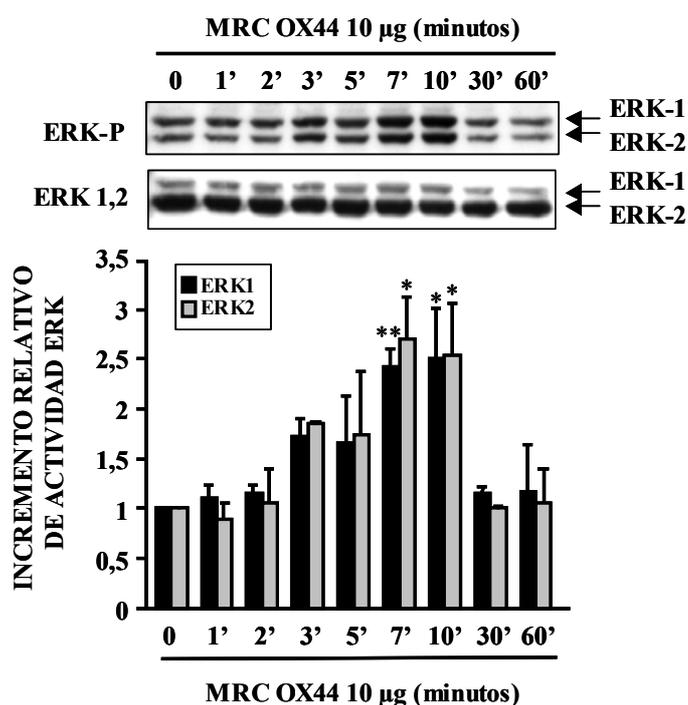
A fin de determinar la vía de señalización implicada en transducir la señal de síntesis de ADN enviada por la ligación del antígeno CD53, se emplearon diferentes inhibidores de rutas metabólicas, en células mantenidas en ausencia de suero, para comprobar si alguno de ellos era capaz de bloquear el efecto inducido por el anticuerpo. Se utilizaron los distintos inhibidores solos o en combinación con el anticuerpo. De todos los inhibidores utilizados, el compuesto PD98059, inhibidor específico de MEK1, bloqueó totalmente el efecto de aumento de la incorporación de timidina inducido por el anticuerpo, mientras que inhibidores de PI 3K (wortmanina), PKC (bisindol-maleimida) ó de tirosina quinasas (genisteína y piceatanol), no produjeron ningún efecto (Figura 32).



**Figura 32. Efecto de inhibidores de rutas metabólicas sobre la inducción de incorporación de timidina por el antígeno CD53 en ausencia de suero en células mesangiales de rata Wistar.** La figura muestra el efecto de varios inhibidores solos o en combinación con 10 µg/ml del anticuerpo MRC OX44 sobre la incorporación de timidina tritiada. Los inhibidores son (de izquierda a derecha): bisindol 100 nM (inhibidor de PKC), wortmanina 100 nM (inhibidor de PI 3K), genisteína 10 ng/ml, piceatanol 100 nM (los dos últimos son inhibidores de tirosina quinasa), PD98059 10 µM (inhibidor de MEK). La figura A muestra las células mesangiales de rata Wistar sana y la figura B muestra las células mesangiales de rata Wistar espontáneamente hipertensa. Los gráficos representan las medias y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \*\*representa una  $p < 0.001$ ; \*representa una  $p < 0.01$ ; ambas relativas al control, según un análisis de ANOVA seguido del "test" de Scheffé.

MEK1 es una MAPKK que fosforila selectivamente a ERK [130]. El efecto del inhibidor de MEK1 sobre la síntesis de ADN inducida por el anticuerpo MRC OX44, sugiere que la vía de ERK es la responsable de inducir este efecto. Para comprobar esta hipótesis, en extractos celulares totales, se realizaron "western blot" con anti fosfo ERK, a fin de determinar los niveles de ERK fosforilado, y con anti ERK, para corregir los niveles de proteína fosforilada por los niveles totales de dicha proteína. Previamente, las células fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro, a una densidad de 200.000

células por placa, y se dejaron crecer durante 48 horas. A continuación se mantuvieron las células durante 24 horas en ausencia de suero, y otras 24 horas en presencia de los agonistas insulina, transferrina y selenio, en ausencia de suero. Transcurrido este tiempo, se realizó una curva de tiempo de estimulación con 10 µg del anticuerpo MRC OX44 (Figura 33). Los resultados obtenidos indican que se produce un aumento en la cantidad de ERK 1 y 2 fosforilado a partir de los 5-10 minutos de estimulación, que a continuación descende. Este resultado confirma que la ligación del antígeno CD53 induce activación de ERK 1 y 2, en ausencia de suero.

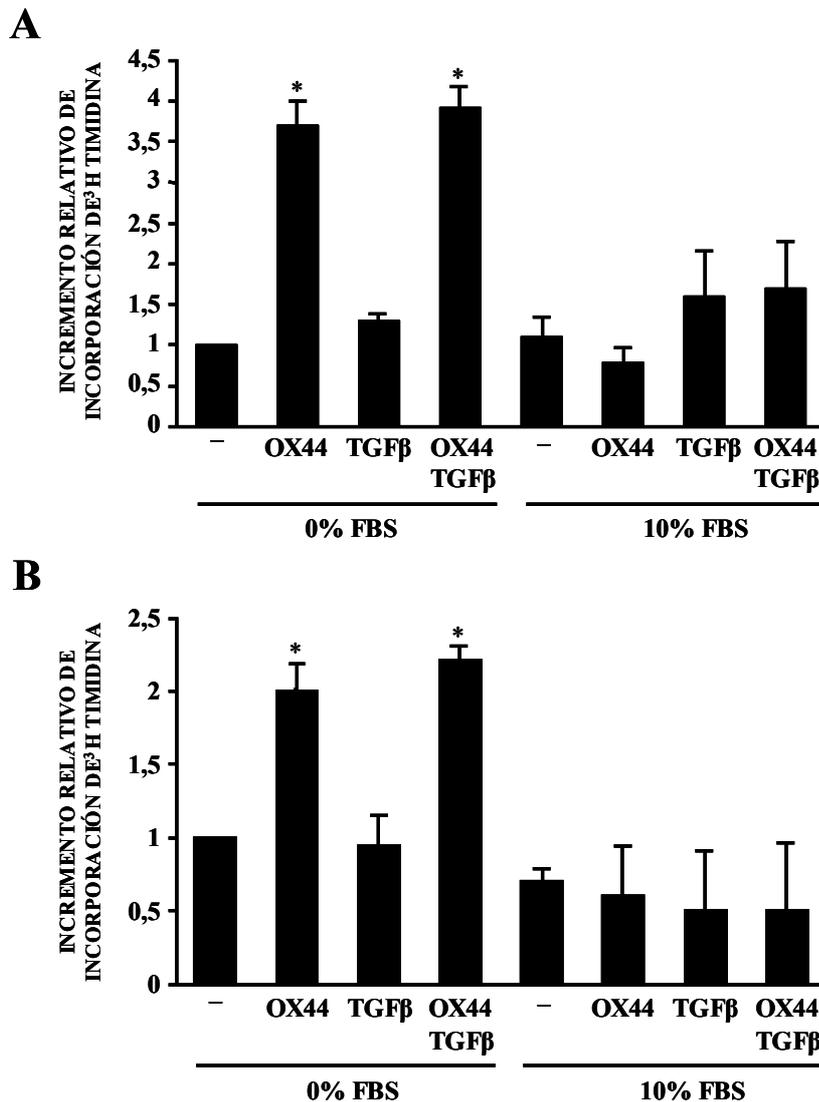


**Figura 33. Medida de la actividad ERK en células mesangiales de rata Wistar.** Se realizaron extractos celulares totales de las células estimuladas con 10 µg del anticuerpo MRC OX44, de los cuales se analizaron 30 µg de proteína total en geles de poliacrilamida. A continuación se realizaron "western blot" con anti fosfo-ERK, para determinar el grado de fosforilación y con anti ERK para corregir el grado de fosforilación por los niveles totales de proteína. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. \*representa una  $p < 0.01$ ; \*\* representa un  $p < 0.001$ ; ambas según la función T de "Student".

#### 4.2.5. TGF-β como posible factor bloqueante de la síntesis de ADN inducida por CD53.

El efecto inductor de síntesis de ADN producido por CD53 es bloqueado totalmente en presencia de suero. TGF-β es un factor inhibidor de la síntesis de ADN inducida por EGF en células mesangiales, la cual es dependiente de la activación de la ruta de ERK [278]. Se pensó, por tanto, que el factor presente en el suero capaz de

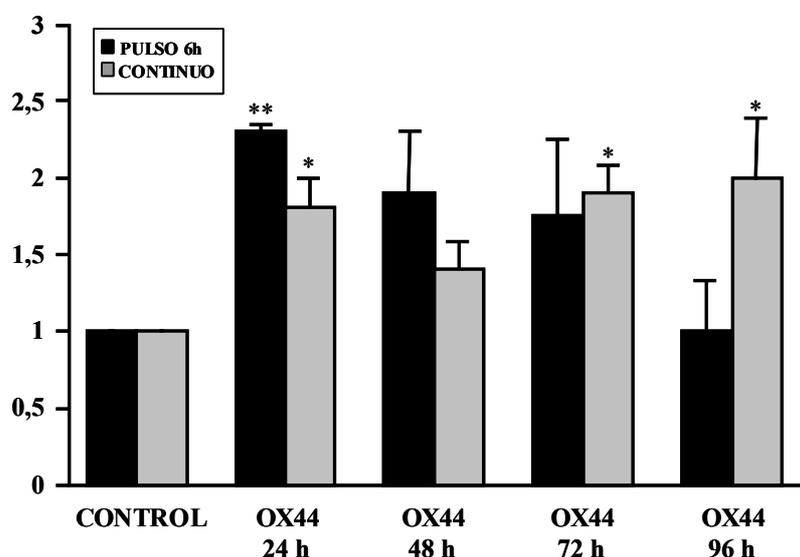
bloquear el efecto de OX44 podía ser TGF- $\beta$ . Para comprobar dicha hipótesis se realizaron experimentos de medida de incorporación de timidina al ADN, añadiendo TGF- $\beta$  al medio tanto en presencia como en ausencia de suero en combinación o no con el anticuerpo MRC OX44. Como se muestra en la Figura 34, TGF- $\beta$  no bloquea el efecto inductor de la síntesis de ADN inducido por MRC OX44 en ausencia de suero, lo cual indica que TGF- $\beta$  no es el factor presente en el suero bloqueante del efecto producido por el anticuerpo MRC OX44.



**Figura 34. El factor de crecimiento TGF- $\beta$  no es capaz de bloquear el efecto de inducción de síntesis de ADN inducido por el antígeno CD53.** En la figura se muestran el incremento de incorporación de timidina tritiada al ADN, de células tratadas con el anticuerpo MRC OX44, con TGF- $\beta$ , o con ambos, respecto al control (células no tratadas). A) Células mesangiales de rata Wistar sana; B) Células mesangiales de ratas Wistar espontáneamente hipertensas. La figura muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \* representa una  $p < 0.001$  según la función T de "Student".

#### 4.2.6. Estudios de proliferación en células mesangiales por ligación de CD53.

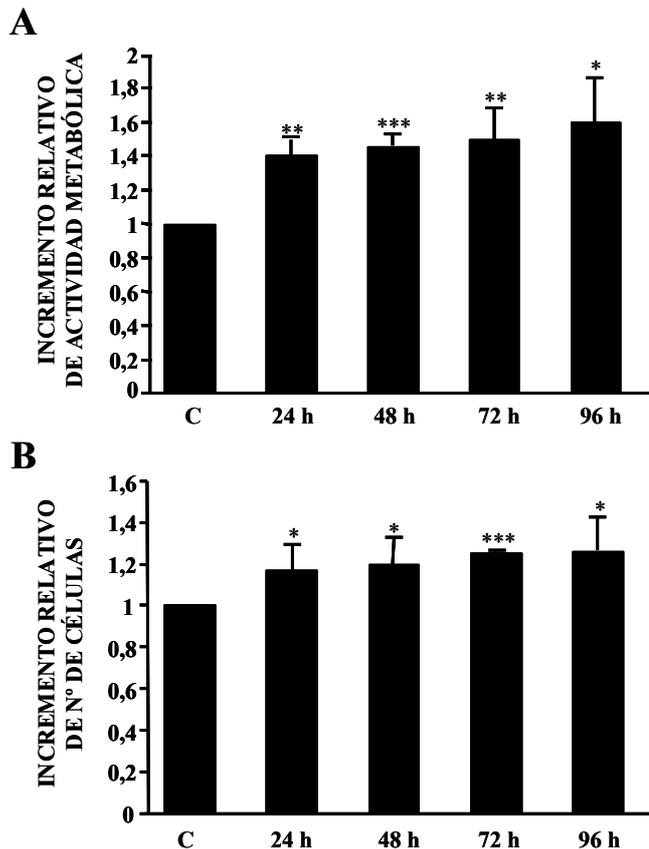
El aumento de la síntesis de ADN inducido por MRC OX44 parecía indicar que el antígeno CD53 inducía proliferación en células mesangiales. No obstante, las células mesangiales crecen lentamente en cultivo, por lo que parecía interesante comprobar el efecto de incorporación de timidina al ADN a tiempos más largos de 24 horas. Para realizar este experimento, las células se mantuvieron en ausencia total de suero durante 24 horas, añadiéndose a continuación insulina, transferrina y selenio, junto con 10  $\mu\text{g}$  del anticuerpo MRC OX44. La incorporación de timidina se realizó mediante dos abordajes experimentales distintos: se añadió la timidina mediante pulsos de 6 horas al final de tiempos de estimulación con el anticuerpo de 24, 48, 72 y 96 horas, o se añadió la timidina junto con el anticuerpo y los demás agonistas, de manera que la timidina estuvo presente de continuo en el medio, durante periodos completos de 24, 48, 72 y 96 horas (Figura 35). La incorporación de timidina mediante pulsos de 6 horas es mayor durante las primeras 24 horas que en tiempos posteriores, mientras que con la presencia continuada de timidina en el medio, la incorporación de timidina es mayor a las 96 horas. Estos resultados indican que existe una incorporación de timidina continua, que es más acusada las primeras 24 horas, que en las siguientes, dando lugar a un proceso acumulativo con timidina constante en el medio.



**Figura 35. Efecto del anticuerpo MRC OX44 sobre la incorporación de timidina en células mesangiales de rata Wistar durante 96 horas.** La medida de incorporación de timidina se realizó mediante pulsos de timidina cada día de 6 horas coincidiendo con el final de ciclos de 24 horas (serie en negro), ó con el mantenimiento de la timidina de continuo en el medio desde el momento en que se añadieron los factores de crecimiento y el anticuerpo MRC OX44 (serie en gris). La figura muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

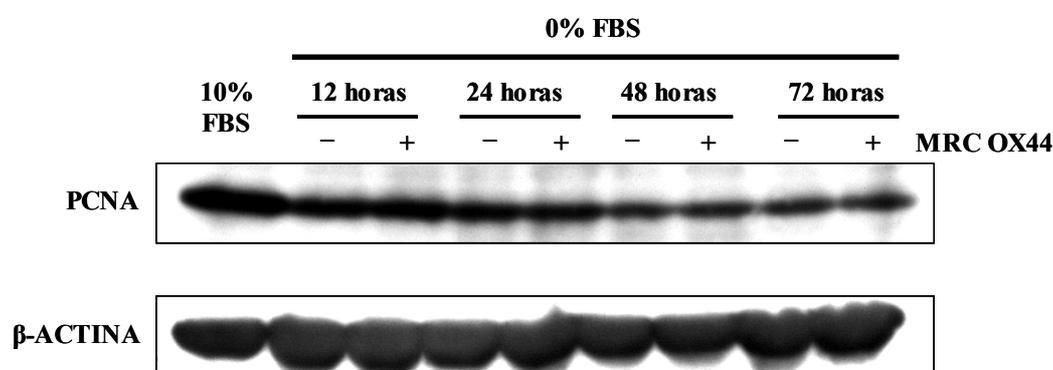
\*\* representa una  $p < 0.001$ ; \* representa una  $p < 0.01$ ; ambas según la función T de "Student".

Para comprobar si el anticuerpo MRC OX44 induce proliferación en células mesangiales, se emplearon otros métodos de medida de proliferación celular, como son tinción de núcleos con cristal violeta y medida de la actividad mitocondrial con un ensayo XTT, en células mantenidas en depleción durante 24 horas. A continuación se añadieron al medio insulina, transferrina y selenio y 10  $\mu\text{g}$  del anticuerpo MRC OX44, y se analizaron muestras a las 24, 48, 72 y 96 horas de haber añadido el anticuerpo. (Figura 36). Los resultados obtenidos indican que existe un aumento muy pequeño del número de células y de la actividad mitocondrial, que indican tan solo una leve inducción de la proliferación celular. Estos indican que la ligación del antígeno CD53 en células mesangiales no da lugar a un aumento relevante en el número de células, lo que podría indicar que el antígeno induce una señal proliferativa, que no progresa en estas células.



**Figura 36. Ensayos de proliferación mediante medida de actividad metabólica y tinción de núcleos en células mesangiales de rata Wistar.** A) Se midió la actividad respiratoria mitocondrial por la conversión de XTT, que da lugar a un producto coloreado naranja, en tiempos de reacción de tres horas. Se recogieron muestras durante cuatro días y se midió la absorbancia a 490 nm. Cada día se corrigió la absorbancia obtenida con el anticuerpo por la obtenida con el control. B) Se tiñeron los núcleos con Cristal Violeta, recogiendo muestras a los mismos tiempos que en A, y se midió la absorbancia a 595 nm. El gráfico muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos realizados por cuadruplicado. \* representa una  $p < 0.05$ ; \*\*representa una  $p < 0.01$ ; \*\*\* representa un  $p < 0.001$ ; todas calculadas según la función T de "Student".

Otro marcador frecuentemente utilizado para el análisis de proliferación celular es la medida de expresión de la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), la cual es un cofactor de las polimerasas de ADN  $\delta$  y  $\epsilon$  y es activada tanto en procesos de reparación de ADN [279] como de síntesis de ADN, debida a proliferación celular [280]. Los niveles de expresión de PCNA en células mesangiales tratadas con el anticuerpo MRC OX44 a distintos tiempos, se midieron realizando "western blot " en extractos celulares totales, con un anticuerpo que reconoce a dicha proteína, corregidos por los niveles de expresión de  $\beta$ -actina (Figura 37). Los resultados obtenidos indican que no existe un cambio en los niveles de PCNA, por tratamiento con el anticuerpo, al menos en los tiempos medidos.

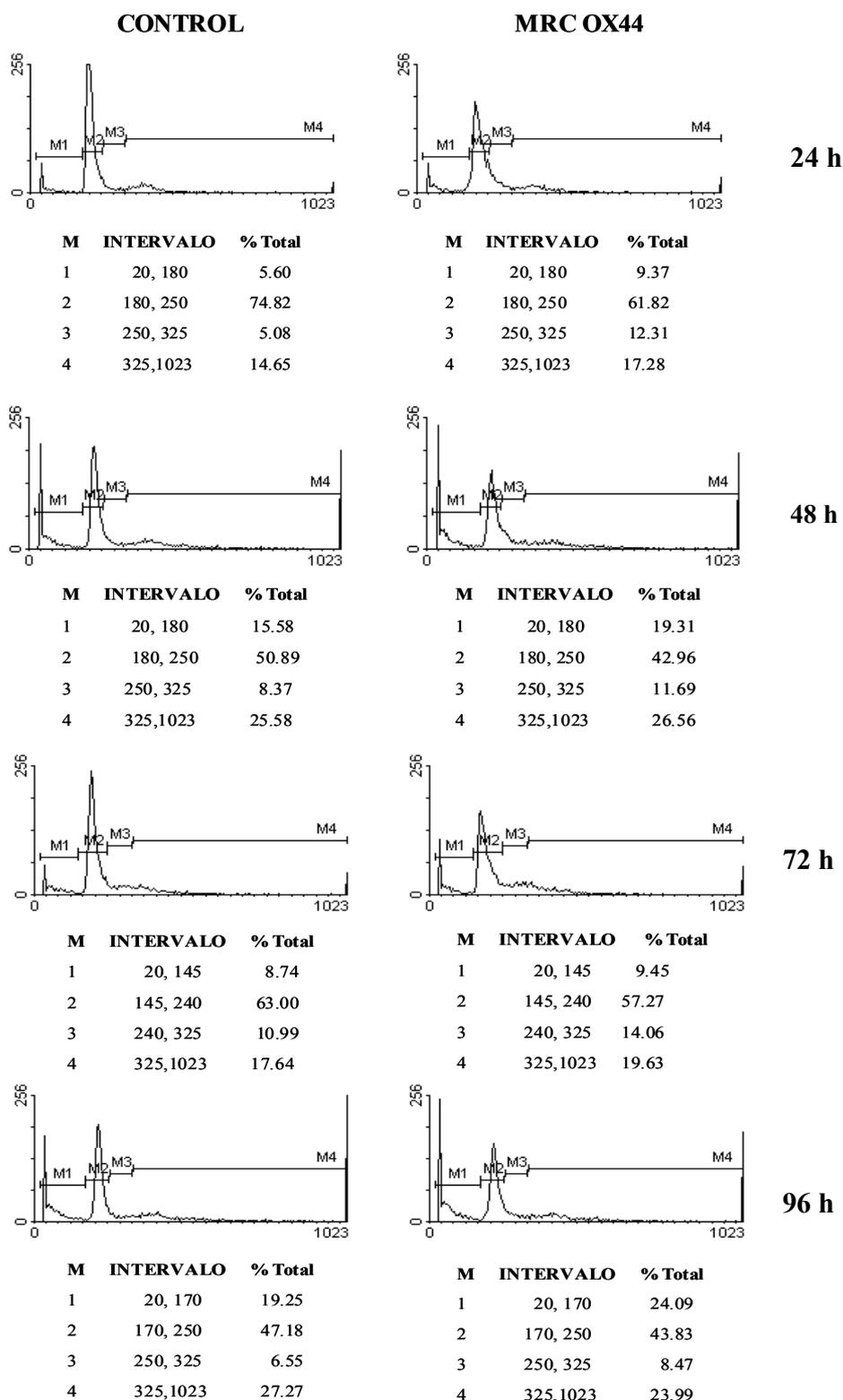


**Figura 37. Análisis de la expresión de la proteína PCNA en células mesangiales.** En extractos celulares totales de células mesangiales de rata Wistar, estimuladas con 10  $\mu$ g del anticuerpo MRC OX44, se analizó la expresión de la proteína PCNA mediante "western blot", utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce a PCNA a una dilución 1:5000. Los niveles de carga en cada punto fueron determinados mediante "western blot" con un anticuerpo monoclonal que reconoce a la  $\beta$ -actina.

#### 4.2.7. Análisis del ciclo celular en células mesangiales de rata Wistar tratadas con el anticuerpo MRC OX44.

La medida de ciclo celular por incorporación de yoduro de propidio al ADN y análisis por citometría de flujo, indica el estado del ciclo celular en que se encuentra una población de células. Para poder concluir qué efecto estaba induciendo el antígeno CD53 en las células mesangiales, se analizaron células mantenidas en ayuno durante 48 horas en las mismas condiciones en que se mantuvieron para realizar los experimentos de medida de incorporación de timidina al ADN. Se analizaron dos grupos de células, unas tratadas con 10  $\mu$ g del anticuerpo MRC OX44, y otras sin tratar, estas últimas empleadas como control, y se recogieron muestras a tiempos de 24, 48, 72 y 96 horas. El análisis por citometría de flujo indica que el anticuerpo induce un incremento tanto

de la población correspondiente a apoptosis, como de síntesis de ADN, respecto a las células control, a expensas de una disminución de la población en G1. La suma de los incrementos en S y G2 es de entre un 5 y un 10 % durante las primeras 72 horas, mientras que a las 96 horas ya no existe dicho incremento (Figura 38). De estos resultados podemos concluir que el antígeno CD53 induce un leve incremento en la síntesis de ADN que ocasiona que una pequeña subpoblación celular entre en fase S, y otra pequeña población llegue al estadio G2. Existe otra pequeña subpoblación que muere por apoptosis, seguramente debido un fracaso en el proceso de proliferación.



**Figura 38. Efecto del anticuerpo MRC OX44 en el ciclo celular de las células mesangiales de rata Wistar.** Las células se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. La figura muestra los histogramas de número de células en el eje Y, respecto a la Fluorescencia 2H (valor de altura de pico de fluorescencia) en el eje X, de 10.000 eventos, de los cuales se analizó el total. Se tomaron 4 marcadores que indican: M1, porcentaje de células en apoptosis; M2, porcentaje de células en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>; M3, porcentaje de células en S. M4, porcentaje de células en G<sub>2</sub>. Se indican la amplitud del intervalo que ocupa cada marcador en el eje X y el porcentaje de eventos en dicho intervalo.

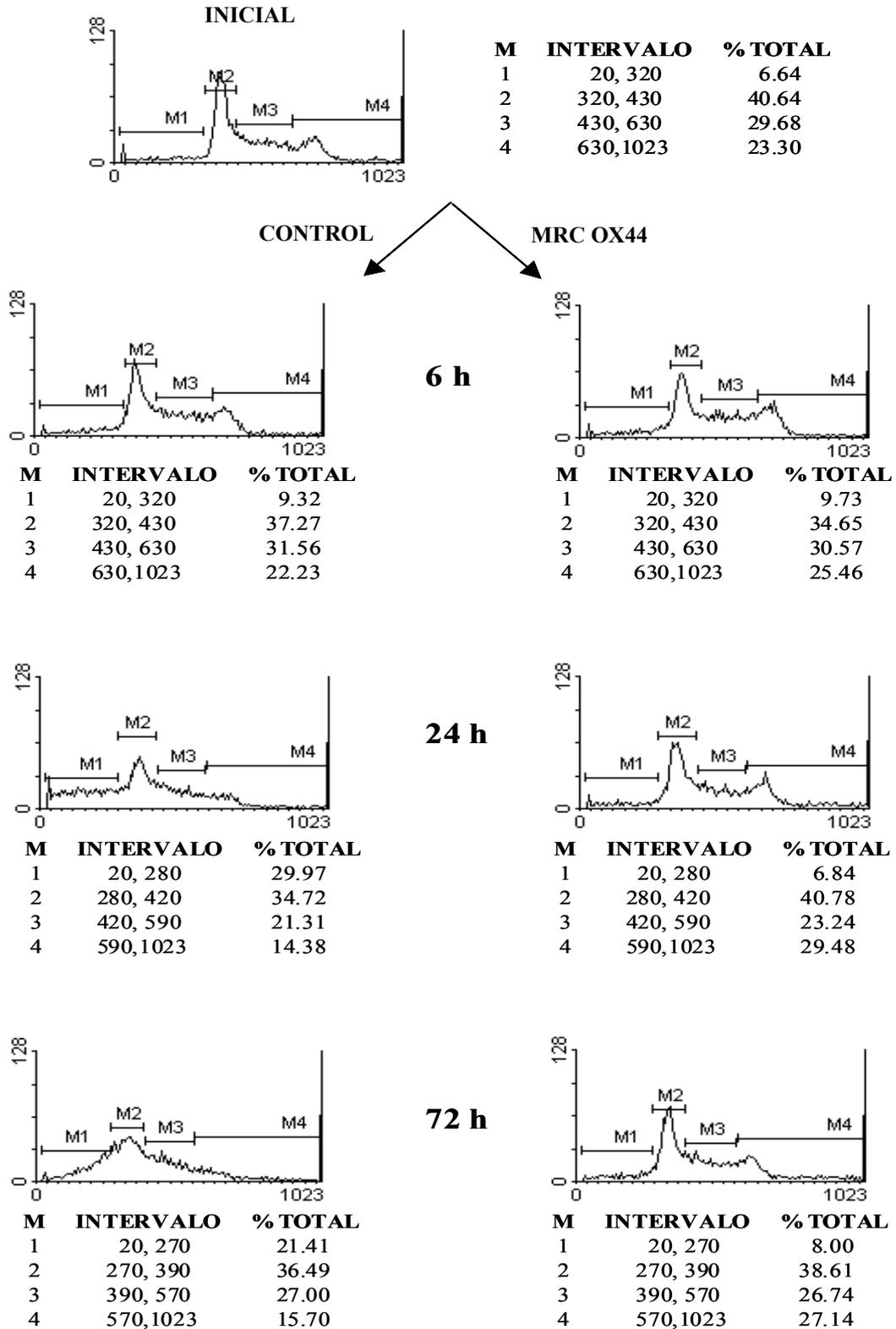
### **4.3. EFECTO DE LA LIGACIÓN SOSTENIDA EN EL TIEMPO DE CD53 EN CÉLULAS IR938F**

La ligación del antígeno CD53 produce efectos fisiológicos en células linfoides. En las células IR938F, concretamente, la ligación de dicho antígeno con el anticuerpo MRC OX44 induce agregación homotípica [92]. La coligación sostenida en el tiempo de las proteínas Tetraspan CD53, CD81, CD82 y CD9, junto con dosis subóptimas de anticuerpos anti CD3, en el linfoma T humano, Jurkat, produce un efecto coestimulador, medido por síntesis de IL-2, acompañado de adhesión homotípica, que va acompañada de una inhibición en la proliferación [8]. Los anticuerpos anti Tetraspan, por si solos, también inducen un efecto antiproliferativo, aunque menos potente que el producido mediante coestimulación [8]. Existe, por tanto, la posibilidad de que la presencia sostenida del anticuerpo MRC OX44 en el medio de cultivo de las células IR938F, tenga un efecto sobre la proliferación celular. Para comprobar esta hipótesis, se estudiaron los efectos inducidos por el anticuerpo MRC OX44, en las células IR938F. Para ello, las células crecieron en presencia de 10% de suero bovino fetal, hasta una densidad de  $5 \times 10^5$  células por mililitro y se mantuvieron en ayuno, en ausencia de suero, durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo se cambió a medio de ayuno con 0.5% de suero bovino fetal, y se añadieron 10  $\mu$ g del anticuerpo MRC OX44 en unos casos, y nada, en otros, a fin de emplear estas últimas células como control. Se recogieron muestras a varios tiempos, desde 1 hora, hasta 72 horas. De las células tratadas,  $1 \times 10^6$  fueron teñidas con bromuro de propidio, tal como se indica en el apartado de materiales y métodos, y analizadas en su estado del ciclo celular por citometría de flujo, y  $2 \times 10^6$  células fueron lisadas para analizarlas mediante "western blot".

#### **4.3.1. Análisis del ciclo celular en las células IR938F tratadas con el anticuerpo MRC OX44.**

Los resultados obtenidos mediante medida del ciclo celular por citometría de flujo, de células tratadas con el anticuerpo, y los correspondientes controles sin tratar, indican que el anticuerpo MRC OX44, provoca que las células se mantengan en un estado proliferativo, (Figura 39), con el típico patrón de población heterogénea de células en crecimiento, donde se observa una pequeña población en apoptosis, una población en G1, células que están replicando el ADN, y células que han alcanzado el estado G2. Este proceso persiste, incluso, tras 72 horas post-tratamiento. Las células

control inicialmente siguen este patrón; no obstante, transcurridas 12 horas, las células sin tratar comienzan a acusar la ausencia de suero y entran en apoptosis, con un desplazamiento gradual de toda la población a la zona del histograma que indica degradación del ADN, de manera que a las 72 horas en presencia de 0.5% de suero, la mayor parte de la población control ha comenzado un proceso apoptótico, mientras que la población tratada con el anticuerpo MRC OX44, continúa teniendo un patrón de crecimiento normal. Estos resultados demuestran que la ligación del antígeno CD53 induce supervivencia celular en condiciones de estrés por falta de factores de crecimiento.



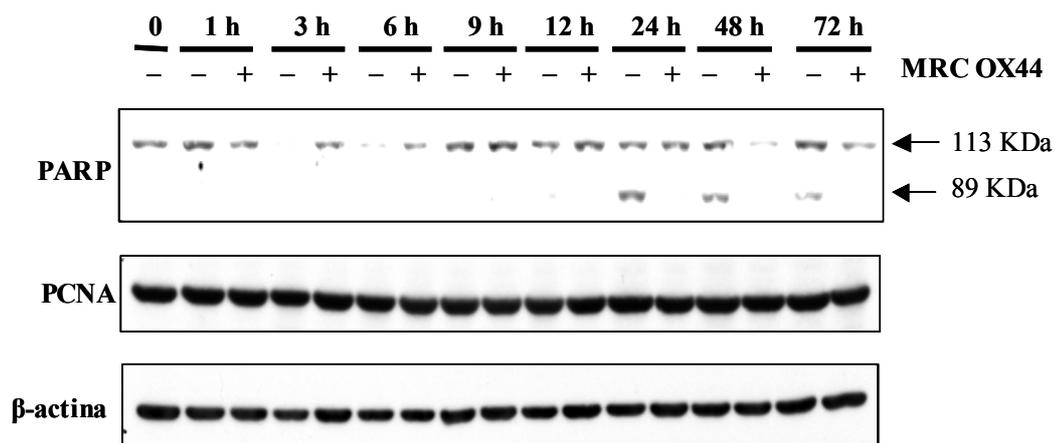
**Figura 39. Efecto del anticuerpo MRC OX44 en el ciclo celular de las células IR938F.** La figura muestra los histogramas de número de células, en el eje Y respecto a la fluorescencia 2H (valor de altura de pico de fluorescencia) en el eje X, de 10.000 eventos, de los cuales se analizó el total. Se tomaron 4 marcadores que indican: M1, porcentaje de células en apoptosis; M2, porcentaje de células en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>; M3, porcentaje de células en S; M4, porcentaje de células en G<sub>2</sub>. Se indica la amplitud del intervalo que ocupa cada marcador en el eje X y el porcentaje de eventos en dicho intervalo.

#### **4.3.2. Análisis mediante "western blot" de los niveles de expresión de las proteínas PCNA y PARP.**

Los niveles de expresión de las proteínas PCNA y PARP se analizaron mediante "western blot" en extractos celulares totales. La proteína PCNA, como se ha comentado anteriormente, está implicada en procesos de reparación y de proliferación. La proteína PARP, poli ADP-ribosa polimerasa, es hidrolizada durante la apoptosis por la caspasa-3 [280], de manera que, en condiciones normales, la proteína tiene un peso molecular de 113 KDa, y la forma hidrolizada por la caspasa-3 da lugar a un producto proteolítico de 89 KDa. La expresión de ambas proteínas fue analizada por "western blot" con 100 µg de proteína total, procedente de extractos celulares totales, de las células IR938F. La extracción total de PCNA requiere la solubilización de la membrana nuclear y digestión del ADN para liberar la proteína localizada en el núcleo asociada al ADN. Los niveles de carga se determinaron mediante "western blot" con 20 µg de proteína total, visualizando la proteína con un anticuerpo monoclonal que reconoce a la β-actina.

Los niveles de la proteína PCNA permanecen constantes en todos los puntos, no observándose cambios de niveles a lo largo del tiempo, ni con la adición del anticuerpo MRC OX44, con lo que se puede concluir que este análisis no nos aporta información (Figura 40). El análisis de la expresión de la proteína PCNA está considerado como un ensayo de medida de proliferación; no obstante, como se ha destacado anteriormente, los niveles de expresión de esta proteína aumentan tanto en procesos de proliferación como de reparación, por lo que no sería un buen marcador de proliferación.

Los niveles de expresión de PARP, proteolizada y no proteolizada indican que a partir de las 12 horas de tratamiento con el anticuerpo MRC OX44, se produce un aumento de la proteína proteolizada en los controles correspondientes a células sin tratar, que no se observa en las células tratadas con el anticuerpo (Figura 40). La proteólisis de la proteína PARP se debe, como se ha comentado anteriormente, a la acción específica de la caspasa-3, la cual resulta activada durante el proceso de apoptosis. Estos resultados confirman que la ligación del antígeno CD53 con el anticuerpo MRC OX44, induce protección frente a la apoptosis ocasionada por falta de suero, proceso que persiste incluso tras 72 horas de tratamiento con el anticuerpo.



**Figura 40. Análisis de la expresión de las proteínas PCNA y PARP mediante “western blot” en las células IR938F.** En extractos celulares totales se realizaron “western blot” con los anticuerpos anti PARP y PCNA a una dilución 1:5000. La cantidad total de proteína en cada punto se determinó mediante “western blot” anti β-actina.

## **5. DISCUSIÓN**

*Antecedentes del mecanismo de transducción de señales a través de las proteínas Tetraspan.*

Las proteínas Tetraspan, como se ha comentado en la introducción, poseen dos dominios extracelulares muy variables [7]. Esto hizo suponer que dichos dominios, estuviesen implicados en interacciones específicas de cada proteína, mientras que los dominios transmembrana y citosólicos estarían implicados en interacciones comunes para todos los miembros de la familia y en transmisión de señales de un modo general [7]. No obstante, recientemente se ha descrito que el dominio EC2, a pesar de su elevada divergencia en secuencia de aminoácidos, tanto dentro de la familia como de la Filogenia, tiene un plegamiento común a todos los miembros que consiste en tres hélices conservadas, en las que está insertado un subdominio variable [6]. Las interacciones descritas hasta el momento entre las proteínas Tetraspan y otras proteínas de membrana incluyen este dominio, y son interacciones tanto comunes de todos los miembros [20, 21, 32], como específicas [8, 75, 78].

Los dominios citosólicos no se ha descrito hasta el momento que tengan actividad enzimática intrínseca, ya que no se ha observado autofosforilación ni fosforilación de ningún sustrato, pero están implicados en interacciones con moléculas de señalización citoplásmicas, constitutivas, como en el caso de PI 4K [22, 23] o dependientes de activación, como en el caso de PKC.

Actualmente se conocen ciertas señales y funciones de las Tetraspan, y se piensa que el dominio EC2 es el responsable de las interacciones comunes y específicas, que conecta señales exteriores con el interior celular, mientras que los dominios citosólicos serían los encargados de transducir las señales generales en que han sido implicadas las Tetraspan. Esta hipótesis está avalada por el hecho de que existen numerosos anticuerpos dirigidos contra el dominio EC2, que son capaces por sí solos de enviar señales al interior celular, y que la mayoría de esas señales, como aumento de los niveles de calcio intracitoplásmicos [62, 65] o fosforilación en tirosina [44], son comunes a todos los miembros. El mecanismo al cual imitan estos anticuerpos es desconocido. Es posible que dichos anticuerpos induzcan cambios conformacionales que influyan en las moléculas de membrana a las cuales se asocian las Tetraspan, de forma que éstas tengan la función de modular los mecanismos en los cuales intervienen otras proteínas de membrana. Otra posibilidad es que estos anticuerpos mimeticen el efecto de algún ligando soluble o de matriz extracelular, que señalice a través de las Tetraspan por sí mismas, cuya identidad no ha sido determinada hasta el momento.

El que las señales transducidas por las Tetraspan y las funciones en que participan sean comunes a todos los miembros, parece ser debido al hecho de que las proteínas Tetraspan interaccionan entre sí formando macrocomplejos, donde las interacciones específicas para un miembro se aportan al complejo, de manera que éste funciona como un todo.

Sin embargo, aparte de estos fenómenos generales, poco se sabe de las moléculas encargadas de transducir las señales enviadas por la ligación de los antígenos Tetraspan. En el presente trabajo se aportan datos sobre las señales enviadas por la ligación del dominio EC2 de la Tetraspan CD53, desconocidos hasta el momento. Dichas señales son transmitidas por los anticuerpos por sí solos y no dependen de otros coestímulos.

#### *El antígeno CD53 en señalización linfoide.*

El antígeno CD53 se expresa particularmente en el tejido linfoide [7], aunque también se expresa en epitelios, como queratinocitos [16] y en las células mesangiales de glomérulo renal, tal como se describe en este trabajo. Este antígeno está implicado en diferenciación linfoide, por su expresión según los estadios de diferenciación en linfocitos T [109].

El anticuerpo MEM53 y el anticuerpo MRC OX44, que reconocen a la molécula CD53 humana y su homólogo en rata, respectivamente, producen los citados efectos de aumento de los niveles de calcio intracitoplásmicos y fosforilación en tirosina [44, 64]. El anticuerpo MRC OX44 además induce la formación de diacilglicerol e inositol trifosfato, así como activación de PKC medida por su translocación a la membrana plasmática [65].

En el presente trabajo se describe que, en linfocitos B y T, la ligación del antígeno CD53 es suficiente por sí sola para producir la activación de JNK, comprobada mediante ensayos de actividad quinasa, tanto de la proteína endógena como de la exógena [291], por fosforilación de dos sustratos conocidos de JNK como son c-Jun y ATF-2 [131]. Asimismo, la activación transcripcional mediada por fosforilación de c-Jun silvestre, y la falta de activación transcripcional a través de un mutante de c-Jun truncado en los sitios de fosforilación de JNK, confirman la activación de JNK por ligación del antígeno CD53, y su consiguiente efecto de activación transcripcional.

El significado fisiológico de la activación de JNK mediada por CD53 en células linfoides no se conoce, pero se sabe que JNK participa en procesos pro-inflamatorios en

células hematopoyéticas. JNK es activada en macrófagos tras estimulación con lipopolisacárido [281, 282] y la expresión de JNK es inducida en linfocitos T CD4+ periféricos durante su diferenciación a células efectoras Th1 y Th2 [283]. JNK también participa en la expresión de la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  [284] y es requerida para la expresión de E-selectina inducida por TNF- $\alpha$ , en células endoteliales, lo cual es un efecto crítico para la adhesión e infiltración de leucocitos [285, 286]. Existen tanto experimentos que indican la activación de las MAPK JNK, p38 y ERK, como su inhibición por estrés oxidativo [287, 288]. NO es capaz de activar Ras por S-nitrosilación, lo que conlleva la activación de PI 3K y Raf-1, dando lugar a la activación de ERK [289]. La producción de óxido nítrico mediada por IFN- $\gamma$  produce la S-nitrosilación de la cisteína 116 de JNK1 de macrófagos, lo cual conlleva la inhibición de la actividad de JNK1 [290]. La cisteína 116 está conservada en las JNK, lo cual indica que, de entre todas las vías de MAPK que resultan activadas durante la respuesta inflamatoria, el óxido nítrico específicamente reprime la actividad de JNK. Esto sugiere que la inactivación de JNK es crítica para la finalización de la respuesta inflamatoria. Todos estos resultados concluyen que JNK es estimulada durante el proceso inflamatorio y es reprimida en el momento de bloquear la inflamación para que este no sea un proceso permanente. [288]. Previos estudios describieron que la ligación del antígeno CD53 por el anticuerpo MRC OX44 interviene en el aumento en los niveles de NO en el sobrenadante de cultivo de macrófagos de rata [65]. En el presente trabajo se demuestra que CD53 interviene en la estimulación de JNK en células inflamatorias como Jurkat [291]. Todos estos resultados parecen indicar que CD53 esté regulando los procesos inflamatorios tanto en su progresión como en su posterior vuelta al estado basal.

Otras evidencias de la relación de CD53 con inflamación son, que el antígeno CD53 se ha encontrado ausente en una familia que sufre un extraño síndrome, caracterizado por numerosas infecciones recurrentes y heterogéneas, cuya única alteración manifiesta es la ausencia de expresión de este antígeno en linfocitos y neutrófilos [111]. Por otro lado, la ligación de CD53 con el anticuerpo HI29, produce adhesión homotípica en células linfoides, incluyendo unas células con una alteración que causa un síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria [93]. Por esta implicación del antígeno CD53 en adhesión, y debido a que es la proteína Tetraspan que más próxima se encuentra en la membrana con moléculas MHC [41], los enfermos que

presentan ausencia de expresión de CD53, podrían tener dificultades en la infiltración leucocitaria o en presentación antigénica.

Vav es un intercambiador de nucleótidos de guanina para proteínas G monoméricas, expresado principalmente en el sistema linfoide, que activa la fosforilación de JNK en linfocitos T y B, por ligación del TcR y del BcR respectivamente [270]. Debido a que CD53 se expresa, de igual manera que Vav, en el sistema linfoide principalmente, y que tanto CD53 como Vav están en la ruta de señalización de JNK, existía la posibilidad de que anticuerpos contra CD53 pudiesen estimular ambas moléculas. Sin embargo, en las células Jurkat, linfoma T humano, el anticuerpo MEM53, no provoca la fosforilación de Vav [291]. No obstante, en las células Jurkat, anticuerpos contra varias Tetraspan son capaces de inducir una respuesta coestimuladora con CD3 medida como inhibición de la proliferación y producción de IL-2 [8]. Dicha coestimulación se produce cuando hay anti CD3 fijo en la placa de cultivo y los anticuerpos anti Tetraspan son añadidos al cultivo en alta concentración durante largos periodos de tiempo, (24-48 horas) [8]. Debido a estos resultados, se pensó que CD53 podría tener un efecto coestimulador con el TcR; sin embargo, en el sistema empleado en este trabajo, cuando coestimulamos las células Jurkat con el anticuerpo MEM53 y dosis subóptimas de estimulación de CD3, se observa una inducción de la fosforilación de Vav, que corresponde a la de la ligación de CD3 sólo, y que no es potenciada por la presencia del anticuerpo MEM53. MEM53 no es capaz, por tanto, de inducir una respuesta coestimuladora con CD3 para la activación de Vav a tiempos cortos [291]. Estos resultados indican que la molécula CD53 no tiene un papel coestimulador en el contexto de señalización del TcR, al menos en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo. Sin embargo, no se puede afirmar que CD53 no potencie el efecto estimulador de CD3, ya que las condiciones experimentales descritas en este trabajo, son diferentes tanto en tiempo como en concentración del anticuerpo MEM53 a las de Lagaudriere-Gesbert y colaboradores [8].

CD19, correceptor del Receptor de las Células B, se asocia con el receptor del complemento, CD21, conectando la inmunidad humoral y la inmunidad innata. La ligación de CD19 provoca aumento en los niveles de calcio del citosol sin inducir fosforilación de PLC $\gamma$ , lo que sugiere que lo que provoca es un aumento de la eficiencia de la enzima o de la disponibilidad del sustrato. CD19 produce un efecto coestimulador con el receptor de células B para la estimulación de ERK2, JNK y p38, y aumenta la fosforilación de Vav por sí sólo, pero este efecto es mayor por coligación

con el receptor de células B. El antígeno CD81, que forma parte del complejo de señalización de CD19 y CD21, y contribuye a la señalización mediada por calcio, podría tener un efecto cooperativo en la coestimulación del BcR, aunque dicha implicación no ha sido descrita. Otras Tetraspan, como CD82 y CD9 interaccionan con CD19, aunque a diferencia de lo que ocurre con CD81, la asociación no es directa. La ligación de CD53 no induce un aumento en los niveles de fosforilación de Vav, a pesar de activar a JNK [291] e inducir aumento en los niveles de calcio intracitoplásmicos, [44, 64] lo que sugiere que no coopera con la coestimulación del receptor de células B mediada por CD19, o que su distancia en el complejo es lo suficientemente grande como para que la ligación de CD53 con anticuerpos no llegue a modular la señalización de CD19. Estos resultados demuestran, que la activación de JNK por ligación de CD53 en las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo, no corresponde al desencadenamiento de una respuesta típicamente linfóide, como pueda ser la activación de los receptores de las células T y B. Dicha respuesta podría, en cambio, estar mediando las señales enviadas por estímulos ubicuos por sí mismo o modulando la actividad de otras moléculas como integrinas, factores de crecimiento o MHC.

*Señalización iniciada en el antígeno CD53 en células epiteliales.*

En células epiteliales, que no expresan CD53 de manera natural, transfectadas con JNK y con CD53, se comprobó que es posible reconstituir el sistema de señalización de CD53 en células que no expresan este antígeno de forma natural, pero que sí expresan otras moléculas de la familia Tetraspan cuya distribución es ubicua [7]. La ligación de CD53 en células linfoides y epiteliales, produce la misma señal, activación de JNK, con una cinética similar, sugiriendo que la función de esta activación juega un papel biológico general, pudiendo estar mediando procesos tanto específicos del sistema inmune como generales. En el sistema epitelial linfóide 293T, se estudió la implicación de otras MAPK en la ruta de señalización de CD53, y se vio que ERK y p38 también resultan activadas por la ligación de CD53 en este sistema. A pesar de que su estimulación en un sistema linfóide, que expresa CD53 de manera natural, no ha sido comprobada, cabe pensar que la respuesta sea similar, como ocurre en el caso de JNK; sin embargo, la cinética de activación de JNK, ERK y p38 es diferente. Mientras que para JNK se observa una rápida subida, seguida de una rápida bajada, p38 presenta una rápida subida más persistente en el tiempo y ERK presenta también una activación transitoria. Estos resultados sugieren que CD53, expresado de manera ectópica, entra a

formar parte de los complejos macromoleculares de proteínas Tetraspan. Las proteínas Tetraspan, cuando son sobre-expresadas en tejidos en los cuales no se expresan de forma natural, entran a formar parte del complejo mediante asociaciones intermoleculares dentro de la familia, entrando en competencia con otros miembros de la familia, por la asociación de unos con los otros, pudiendo quedar algunos miembros expresados de manera natural por el tejido, excluidos del complejo, al menos en cierta medida [18]. Las consecuencias funcionales que la modificación del complejo pueda ocasionar, son hasta el momento desconocidas.

La incorporación de las moléculas Tetraspan a los complejos macromoleculares, en situaciones en que no debieran expresarse, y la competencia que establecen con los otros miembros de la familia por entrar a formar parte de dicho complejo, podría tener un papel en el desarrollo tumoral, ya que estas proteínas aparecen sobre-expresadas en tumores, cuyo tejido sano no expresa dicha proteína, como ocurre con CO-029 en carcinomas del tejido digestivo, [118], SAS en sarcomas [119], y CD63, antígeno intracelular que aparece en la membrana plasmática de células de melanoma [100].

El hecho de que una misma señal active al menos tres vías simultáneamente indica dos posibilidades: CD53 está señalizando las tres vías por sí solo, o bien está modulando los efectos de otras moléculas con las cuales interaccionan las Tetraspan, como MHC o integrinas, modulando el efecto de una de ellas o que el efecto del anticuerpo afecte a varias interacciones simultáneamente.

*Relación de las respuestas inducidas por CD53 con las de otras moléculas que interaccionan con las Tetraspan.*

La ligación de las moléculas Tetraspan produce los mismos efectos que la de otras moléculas como MHC o integrinas.

La ligación de MHC I induce activación de tirosina quinasas y aumento de los niveles de calcio intracitoplásmicos [292, 293]. MHC-I transduce señales en todos los tipos celulares donde se expresa, desde linfocitos hasta fibroblastos [294] y, al igual que con los anticuerpos anti Tetraspan, las respuestas varían dependiendo del anticuerpo utilizado, el tipo celular o el grado de coestimulación. La ligación de las moléculas MHC-I produce muchos efectos como adhesión, apoptosis, anergia, secreción de IL-2 o proliferación, [295]. La fosforilación en tirosina inducida por MHC-I incluye proteínas como p56lck, ZAP-70, o p72syk [295]. Ésta última también es activada por ligación de CD9 [68]. Asimismo la ligación de MHC-I regula la fosforilación en tirosina inducida

por ligación de CD3 [293], y puede inhibir la proliferación inducida por dicha coestimulación [296]. De la misma manera, la ligación tanto de las moléculas Tetraspan como de MHC I son capaces de inducir una respuesta coestimuladora en células T, que va acompañada de un bloqueo de la proliferación [8]

El aumento en los niveles de calcio intracitoplásmicos producido por ligación de MHC I, está mediado posiblemente por la fosforilación en tirosina de PLC- $\gamma$ 1 [292]. La ligación de las Tetraspan produce aumento en los niveles de calcio intracitoplásmicos, aumento de DAG, e IP3, lo que hace pensar que también requiera la estimulación previa de PLC-  $\gamma$ .

La estimulación de MHC I, al igual que lo descrito en el presente trabajo para CD53, produce fosforilación de JNK [291]. La estimulación de JNK por ligación de MHC I es dependiente de PI 3K [297], mientras que la implicación de PI 3K en la activación de JNK mediada por CD53 no ha sido descrita. La activación de JNK mediada por la ligación de MHC I, en linfocitos T humanos, da lugar a apoptosis en un proceso que implica a MKK4 y PI 3K [297], mientras que la implicación de las Tetraspan en este proceso no ha sido demostrada. Los resultados descritos hasta la fecha que relacionan a MHC-I y las Tetraspan, como inductores de los mismos procesos por ligación con anticuerpos describen procesos de proliferación y adhesión, pero no de apoptosis. Ejemplos de equivalencia funcional de las proteínas Tetraspan y MHC-I se dan en linfocitos T humanos, donde la coligación de las Tetraspan o MHC-I con el Receptor de células T provoca activación celular y bloqueo de la proliferación [8], mientras que células epiteliales adheridas sobre anticuerpos contra las Tetraspan o contra MHC-I presentan escasa extensión y baja fosforilación de FAK [80].

La adhesión inducida por MHC-I es, así como la señalización, dependiente del tipo celular y del anticuerpo empleado, siendo promovida o inhibida según el caso [298, 299], pudiendo ser dependiente o independiente de LFA-1 [298]. La adhesión mediada por MHC-I requiere activación de PKC y fosforilación en tirosina [298], al igual que ocurre con la adhesión homotípica inducida por ligación del antígeno CD53 con el anticuerpo MRC OX44 en células B de rata [92]. Por otro lado, CD53 parece ser la molécula Tetraspan más cercana a las moléculas MHC en la membrana plasmática [41].

Las moléculas MHC-I, al igual que las Tetraspan, no presentan actividad quinasa intrínseca en sus dominios citosólicos. La señalización inducida por MHC-I es independiente del dominio citoplásmico, y la adhesión requiere del dominio transmembrana, pero no el citoplásmico de MHC-I [300], por lo que se postula que las

funciones mediadas por MHC-I son dependientes de su interacción con otras moléculas de membrana [295]. Las moléculas MHC-I interactúan con varias moléculas en la membrana plasmática además de con las Tetraspan, como son CD8, CD20, TCR/CD3, CD45, o receptores de EGF, insulina e IL-2 [295]. Debido a que anticuerpos contra las Tetraspan y contra MHC-I producen los mismos efectos en señalización y adhesión, sugiriendo que los efectos inducidos por ambas moléculas dependen de su interacción mutua, cabe la posibilidad de que las moléculas asociadas a MHC-I encargadas de transducir las señales al interior celular, sean las Tetraspan. Si esta hipótesis resulta cierta, la principal proteína Tetraspan implicada en este proceso podría ser CD53, por ser la más próxima de las moléculas de esta familia a las proteínas MHC, en la superficie celular.

Las integrinas interactúan con las proteínas Tetraspan, generalmente de manera constitutiva [20], dando lugar a complejos macromoleculares, en los cuales, las Tetraspan modulan la adhesión mediada por integrinas [51, 95]. La asociación entre ambos tipos de moléculas parece ser muy específica, ya que únicamente las integrinas  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ , en todos los casos, y  $\alpha 5\beta 1$  en algunas ocasiones, se han encontrado asociadas con las proteínas Tetraspan, y si bien estas integrinas se asocian con todas las Tetraspan con las cuales se ha estudiado dicha interacción, la estabilidad de la misma es diferente, siendo CD81 y CD151 las Tetraspan que más establemente interactúan con integrinas [32].

Las integrinas median progresión del ciclo celular, de forma general, mediante un proceso en el que está implicada la estimulación de JNK a través de FAK. Si consideramos que anticuerpos contra las Tetraspan son capaces de modular la activación de FAK [80], y de activar JNK, y que algunos anticuerpos contra las Tetraspan son capaces de inducir proliferación, es posible que las Tetraspan tengan un papel en la progresión del ciclo celular mediada por integrinas tipo  $\beta 1$ , FAK y JNK.

Las moléculas Tetraspan interactúan con factores de crecimiento y sus precursores, así como con receptores de los mismos [8, 36, 50]. Estas moléculas están implicadas, así como las Tetraspan, en proliferación y migración. Estas interacciones son específicas, y se ha descrito que tienen un papel fisiológico. Las Tetraspan se han relacionado con la inducción de metaloproteasas de membrana [106], necesarias, entre otros procesos, para la solubilización de factores de crecimiento. La implicación de las Tetraspan en proliferación podría explicarse, al menos en parte, por su papel en

modulación de señales inducidas por factores de crecimiento y en solubilización de los mismos.

*Expresión de CD53 en células Mesangiales. Significado fisiológico de la expresión del antígeno CD53 en el Mesangio Glomerular.*

La proteína Tetraspan CD53 se consideró durante mucho tiempo un antígeno expresado exclusivamente en tejido linfoide; sin embargo, dicha proteína se expresa en algunas células epiteliales [16]. Las funciones promovidas por este antígeno son proliferación, señalización o desarrollo linfoide. En macrófagos de rata provoca inducción de óxido nítrico sintetasa y producción de óxido nítrico mediante un mecanismo dependiente PKC. Esto indica que CD53 puede estar expresado en otras células similares a los macrófagos y con funcionalidad similar, como las células hepáticas de Kuffer o las células mesangiales del glomérulo renal. En este trabajo se describe que el antígeno CD53 se expresa, efectivamente, en otros tipos celulares con similitud a los macrófagos, como son las células mesangiales. Las poblaciones de células mesangiales son heterogéneas, teniendo unas células mayor capacidad contráctil y otras mayor capacidad fagocítica. En cuanto a la expresión de CD53, en las células mesangiales creciendo en presencia de 10% de suero, existen dos poblaciones distintas. Una población que presenta elevados niveles de expresión de CD53 y otra, también positiva, pero que expresa bajos niveles del antígeno. Esta diferencia se debe a que los niveles de expresión del antígeno CD53 dependen del estado proliferativo de las células, de manera que en células mantenidas en condiciones de ayuno, la población de mayor expresión de CD53 disminuye drásticamente, simultáneamente con el aumento de la población de menor expresión, mientras que en presencia de suero, la expresión de CD53 aumenta, apareciendo la población que expresa altos niveles de CD53.

Las proteínas Tetraspan intervienen en proliferación, tanto en inducción como en inhibición. El que resulte un efecto u otro parece depender más del anticuerpo empleado que de la molécula de la cual se trata; así, tanto el anticuerpo MEM53, como anticuerpos contra otras Tetraspan bloquean proliferación en linfocitos T humanos [8], mientras que el anticuerpo 7D2, que reconoce a CD53 de rata es proliferativo en células T esplénicas [44]. Por ello parecía interesante estudiar el efecto de CD53 sobre proliferación en células mesangiales. Para estos experimentos se empleó el anticuerpo MRC OX44, comprobándose que en células mesangiales mantenidas en condiciones de ayuno, este anticuerpo induce síntesis de ADN, que es bloqueada en presencia de suero,

lo cual indica que en el suero existe alguna sustancia que bloquea el efecto del anticuerpo. Asimismo indica que la población de células que está respondiendo es la de bajos niveles de expresión de CD53.

TGF- $\beta$  es una citoquina con un importante papel en la fisiología de las células mesangiales, que está relacionado con la nefropatología debida a hiperglucemia e hipertensión glomerular, donde media el incremento en la producción de proteínas de matriz extracelular, como colágeno o fibronectina, mediante la activación de ERK [301-303]. Debido a que TGF- $\beta$  bloquea la señal proliferativa mediada por EGF, de inducción de síntesis de ADN y estimulación de ERK en células mesangiales [278], se pensó que pudiera ser la sustancia presente en el suero, capaz de bloquear el efecto de inducción de síntesis de ADN mediado por CD53. No obstante, cuando dicho factor es añadido a las células en ausencia de suero, junto con el anticuerpo MRC OX44, no se observa el bloqueo en la síntesis de ADN inducido por el suero. Debido a que el suero es una sustancia de composición desconocida, rica en multitud de factores de crecimiento, la sustancia que esté bloqueando el efecto producido por CD53 es difícil de identificar, pudiendo ser una conjunción de varios factores.

La medida de incorporación de timidina marcada con tritio al ADN es un método tradicional de medida de proliferación celular [304]. No obstante, las células mesangiales crecen lentamente en cultivo, por lo que resulta interesante ver la evolución de la incorporación de timidina a tiempos más largos de 24 horas. Por ello se estudio la evolución de la incorporación de timidina recogiendo muestras cada 24 horas hasta un máximo de 96 horas. El efecto esperado es que exista un máximo de acumulación, que posteriormente descienda, o que el proceso aumente a medida que aumenta el tiempo. Se realizaron dos tipos de medidas: pulsos de timidina de 6 horas al final de cada periodo de 24 horas, y presencia de timidina constante en el medio. La medida mediante pulsos de timidina indica que existe un pico de acumulación a las 24 horas de tratamiento, que desciende en las horas consecutivas, habiendo cesado a las 96 horas, mientras que con timidina constante en el medio, la cantidad de ADN marcado aumenta progresivamente como consecuencia de la acumulación. Estos resultados indican que el proceso desencadenado por el antígeno no es persistente, sino transitorio. Esta acumulación de timidina marcada, debida a síntesis de ADN, debiera manifestarse en un aumento de células a las 96 horas. La medida del número de células, se realizó mediante tinción y posterior recuento de núcleos y determinación de la actividad metabólica, por respiración mitocondrial, ambas medidas realizadas cada periodo de 24 horas, hasta las

96 horas. Sorprendentemente, observamos sólo un discreto aumento en el número de núcleos y un leve aumento en la actividad metabólica, que no se corresponde con el esperado, a juzgar por el elevado aumento de incorporación de timidina. Estos resultados sugieren que el anticuerpo MRC OX44 induce una señal proliferativa que, por razones desconocidas, no resulta amplificadas. El análisis de ciclo celular por citometría de flujo confirma que no se produce una inducción de la proliferación exitosa mediada por CD53. Las células presentan un ligero aumento de la población en S-G<sub>2</sub> a expensas de una disminución en la población en G<sub>1</sub>. Asimismo se produce un aumento en la población en apoptosis, también a expensas de la disminución de G<sub>1</sub>, seguramente debido a que parte de las células que reciben un estímulo inductor de síntesis de ADN, no consiguen completar el ciclo mitótico, por lo cual desencadenan una respuesta apoptótica. El aumento de la incorporación en timidina, que no da lugar a un aumento importante en el número de células, y el aumento en el pico de apoptosis, acompañado del ligerísimo aumento de la población en G<sub>2</sub>, avalan la hipótesis de que el antígeno CD53 en células mesangiales, está regulando la proliferación, mediante cooperación con otros estímulos, hasta ahora desconocidos, de manera que la señal inducida por CD53 necesita otra señal coestimuladora para progresar. Un efecto similar es el observado en linfocitos B humanos en reposo, donde el anticuerpo MEM53 induce la entrada en G<sub>1</sub>, aunque la entrada en S sólo progresa en presencia de coestímulos como interleuquinas, de manera que es posible que el anticuerpo esté induciendo la síntesis de receptores de interleuquinas, preparando a las células para recibir el coestímulo [63]. Las células mesangiales en cultivo responden a interleuquinas [305-307], por lo cual, es posible que el inicio de proliferación inducido por MRC OX44, progrese en presencia de interleuquinas.

Las señales enviadas por los anticuerpos que reconocen a las Tetraspan son aumento de los niveles de calcio intracitoplásmicos, activación de PKC o activación de tirosina quinasas (ver introducción). Se estudiaron los efectos de diversos inhibidores de éstas y otras rutas metabólicas sobre la síntesis de ADN inducida por CD53. Inhibidores de PKC como bisindol, de tirosina quinasas como genisteína y piceatanol, o de PI 3K como wortmanina, no tuvieron efecto, pero PD98059, inhibidor de MEK 1,2, bloqueó el efecto inducido por el anticuerpo. MEK1,2 son MAPKKs que activan a ERK 1 y ERK 2, en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos. Esto sugiere que ERK está implicada en la vía de señalización de CD53. La activación de ERK en respuesta a factores de crecimiento es un proceso temprano, aunque los efectos de una señal

inductora de proliferación se observen más tardíamente. El análisis mediante “western blot”, realizados en extractos con o sin inhibidor, revela que la activación de la síntesis de ADN, inducida por la ligación de CD53, es un proceso tardío que se debe a una activación temprana de ERK 1 y ERK 2.

ERK 1,2 induce multitud de procesos en células mesangiales como proliferación [308-311], supervivencia y apoptosis [312], desarrollo fetal [313], o síntesis de matriz mesangial frente a estímulos inflamatorios o estrés mecánico [302, 314]. En nuestro sistema, la inhibición de la vía de MAPK bloquea selectivamente la síntesis de ADN. Sin embargo, la apoptosis que ocurre simultáneamente con la síntesis de ADN, mediada por CD53, también podría ser debida a la activación de ERK, puesto que ha sido descrito que la activación transitoria de ERK, en respuesta a estímulos inflamatorios como peróxido de hidrógeno, son capaces de inducir apoptosis, mientras que una activación basal constante, media la supervivencia celular [312].

#### *Significado fisiológico de la ligación del antígeno CD53 en linfocitos B.*

En la línea celular B, IR938F, el anticuerpo MRC OX44 mantenido de manera sostenida en el medio, tiene un efecto protector frente a la apoptosis desencadenada por falta de suero; es decir, induce señales de supervivencia. La medida del ciclo celular mediante citometría de flujo indica que células mantenidas en ayuno, cuando se les añade el anticuerpo MRC OX44 presentan un patrón de crecimiento normal, incluso tras 72 horas de tratamiento. En cambio, las células mantenidas en ayuno en ausencia del anticuerpo, a las 24 horas de tratamiento desencadenan un proceso apoptótico, medido por el desplazamiento del ADN hacia el pico de apoptosis, como consecuencia de su fragmentación. El análisis de la expresión de PARP mediante "western blot" confirma los resultados obtenidos mediante citometría. Dicha proteína resulta hidrolizada por la caspasa-3 durante el proceso de apoptosis, dando lugar a una proteína de menor tamaño. En nuestros experimentos, dicho producto proteolítico aparece en las células control aumentada con respecto a las células tratadas con el anticuerpo, a partir de las 24 horas de tratamiento. Este resultado indica que, efectivamente, el tratamiento con el anticuerpo MRC OX44 protege a las células de la activación de la caspasa-3, evitando la consiguiente proteólisis de la proteína PARP. Estos resultados confirman que la ligación del antígeno CD53 induce supervivencia en respuesta al estrés producido por ausencia de factores de crecimiento. Los mecanismos por los cuales ocurre este efecto son hasta el momento desconocidos, aunque el hecho de que las Tetraspan medien la

activación de FAK, podría tener que ver con este efecto, ya que, como se ha descrito anteriormente, FAK es capaz de rescatar de apoptosis células que han perdido la adhesión con el sustrato, en un proceso mediado a su vez por PI 3K.

Las proteínas Tetraspan han sido relacionadas con adhesión homotípica, en varios sistemas, existiendo anticuerpos tanto inductores como inhibidores de tal efecto. El anticuerpo MRC OX44, induce adhesión homotípica en la línea celular IR938F [92], las mismas células en las que se observa la protección frente a apoptosis descrita en esta trabajo. La adhesión celular está relacionada con supervivencia, lo cual podría indicar que la protección frente a apoptosis, inducida por CD53, es una consecuencia de la inducción de adhesión.

La implicación del antígeno CD53 en supervivencia celular se puso de manifiesto por primera vez en experimentos de desarrollo tímico, donde CD53 se expresa en células dobles negativas y simples positivas, mientras que se pierde su expresión en células dobles positivas, que son células destinadas a morir en el timo. Estos experimentos llevaron a la hipótesis de que la expresión de CD53 es una señal de supervivencia [7, 108]. Recientemente ha sido descrito, mediante experimentos de “microarrays”, que el antígeno CD53 está presente en células procedentes de un linfoma B murino resistentes a apoptosis frente a radiación ionizante [315].

Se conocen multitud de señales encargadas de inducir supervivencia en linfocitos B, las más importantes de las cuales son la interacción de CD40 con CD40L [316, 317], IL-4 [318], interacción cooperativa de las células B con las células T, la cual a su vez requiere de la ligación de CD40 y da lugar a la producción de IL-4 [319], o la recientemente descrita interacción de BAFF (miembro de la familia de TNF- $\alpha$ ) con su receptor [320]. Actualmente no se conoce si el antígeno CD53 regula alguno de estos procesos en particular o si supone una nueva vía de supervivencia celular. No obstante, se ha descrito que la ligación con anticuerpos del antígeno CD81, miembro de la familia Tetraspan, media la producción de IL-4 por parte de las células T, durante la interacción de las células T con células B [79], y la Tetraspan CD9 interacciona con el factor de crecimiento TNF- $\alpha$  en la membrana plasmática, modulando la proteólisis y actividad mitótica de dicho factor [50].

**6. CONCLUSIONES**

1- La ligación del antígeno CD53 produce por sí misma una estimulación rápida y transitoria de la quinasa N-terminal de c-Jun, que conlleva un incremento en la actividad transcripcional de c-Jun. Dicho proceso no va acompañado de la estimulación previa de Vav.

2- La estimulación de JNK mediada por CD53 es un proceso general, que ocurre en células linfoides, y puede ser reconstituido en otros sistemas, como células epiteliales o fibroblastos.

3- La ligación de CD53 estimula otras MAPK como ERK y p38, al menos en células epiteliales.

.....

4- Las células mesangiales glomerulares de rata expresan el antígeno CD53 en la superficie celular. Los niveles de expresión son dependientes de la concentración de factores de crecimiento en el medio.

5- La ligación de CD53, en las células mesangiales induce, por sí misma, un incremento en la síntesis de ADN en ausencia de factores de crecimiento, que no va seguido de un aumento considerable del número de células.

6- El incremento en la síntesis de ADN, mediado por CD53 en las células mesangiales, es dependiente de la activación de MEK y ERK.

.....

7- El antígeno CD53 está implicado en protección frente a apoptosis ocasionada por falta de suero, en linfocitos B.

**7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R. & Levy, S. (1990) TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins, *Mol Cell Biol.* **10**, 4007-15.
2. Wright, M. D., Henkle, K. J. & Mitchell, G. F. (1990) An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen, *J Immunol.* **144**, 3195-200.
3. Hotta, H., Takahashi, N. & Homma, M. (1989) Transcriptional enhancement of the human gene encoding for a melanoma associated antigen (ME491) in association with malignant transformation, *Jpn.J.Cancer Res.* **80**, 1186-1191.
4. Yauch, R. L., Kazarov, A. R., Desai, B., Lee, R. T. & Hemler, M. E. (2000) Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151, *J Biol Chem.* **275**, 9230-8.
5. Tomlinson, M. G., Williams, A. F. & Wright, M. D. (1993) Epitope mapping of anti-rat CD53 monoclonal antibodies. Implications for the membrane orientation of the Transmembrane 4 Superfamily, *Eur J Immunol.* **23**, 136-40.
6. Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C. & Conjeaud, H. (2001) Structure of the tetraspanin main extracellular domain. a partially conserved fold with a structurally variable domain insertion, *J Biol Chem.* **276**, 40055-64.
7. Wright, M. D. & Tomlinson, M. G. (1994) The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily, *Immunol Today.* **15**, 588-594.
8. Lagaudriere-Gesbert, C., La Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., Boucheix, C., Conjeaud, H. & Rubinstein, E. (1997) Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity, *Cell. Immunol.* **182**, 105-112.
9. Rubinstein, E., Poindessous-Jazat, V., Le Naour, F., Billard, M. & Boucheix, C. (1997) CD9, but not other tetraspans, associates with the B1 integrin precursor, *Eur.J.Immunol.* **27**, 1919-1927.
10. Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S. M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner: Identification and characterization of the complexes, *J Biol Chem.* **276**, 14329-14337.
11. Boucheix, C. T. D., G.H; Jasmin C; Rubinstein, E. (2001) Tetraspanins and malignancy, *expert reviews in molecular medicine.* <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk,txt001cbv>.
12. Tomlinson, M. G. & Wright, M. D. (1996) A new transmembrane 4 superfamily molecule in the nematode, *Caenorhabditis elegans*, *J Mol Evol.* **43**, 312-4.
13. Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copesey, T., Cooper, J. & et al. (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*, *Nature.* **368**, 32-8.
14. Kocczynski, C. C., Davis, G. W. & Goodman, C. S. (1996) A neural tetraspanin, encoded by late bloomer, that facilitates synapse formation, *Science.* **271**, 1867-70.
15. Maecker, H. T., Todd, S. C. & Levy, S. (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators, *FASEB J.* **11**, 428-442.
16. Okochi, H., Kato, M., Nashiro, K., Yoshie, O., Miyazono, K. & Furue, M. (1997) Expression of tetra-spans transmembrane family (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 and CD82) in normal and neoplastic human keratinocytes: an association of CD9 with alpha 3 beta 1 integrin, *Br.J.Dermatol.* **137**, 856-863.
17. Schwartz-Albiez, R., Dorken, B., Hofmann, W. & Moldenhauer, G. (1988) The B-cell associated antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein, *J.Immunol.* **140**, 905-914.
18. Rubinstein, E., La Naour, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H. & 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.
19. Berditchevski, F., Zutter, M. M. & 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.
20. Hemler, M. E., Mannion, B. A. & Berditchevski, F. (1996) Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer, *Biochem Biophys Acta.* **1287**, 67-71.
21. Angelisova, P., Hilgert, I. & Horejsi, V. (1994) Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA- 1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins, *Immunogenetics.* **39**, 249-56.
22. Yauch, R. L. & Hemler, M. E. (2000) Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase, *Biochem J.* **351**, 629-637.
23. Yauch, R. L., Berditchevski, F., Harler, M. B., Reichner, J. & 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**, 2751-65.
24. Berditchevski, F., Toliás, K. F., Wong, K., Carpenter, C. L. & 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.
25. Zhang, X. A., Bontrager, A. L. & 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**, 25005-13.
26. Slupsky, J. R., Seehafer, J. G., Tang, S.-C., Masellis-Smith, A. & Shaw, A. R. E. (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.
27. Sterk, L. M., Geuijen, C. A., Oomen, L. C., Calafat, J., Janssen, H. & Sonnenberg, A. (2000) The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes, *J Cell Biol.* **149**, 969-82.
28. Skubitz, K. M., Campbell, K. D. & Skubitz, A. P. (2000) CD63 associates with CD11/CD18 in large detergent-resistant complexes after translocation to the cell surface in human neutrophils, *FEBS Lett.* **469**, 52-6.
29. Rubinstein, E., Le Naour, F., Billard, M., Prenant, M. & Boucheix, C. (1994) CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes, *Eur J Immunol.* **24**, 3005-13.
30. Nakamura, K., Iwamoto, R. & Mekada, E. (1995) Membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27)/CD9 form a complex with integrin alpha 3 beta 1 at cell-cell contact sites, *J Cell Biol.* **129**, 1691-705.
31. Berditchevski, F., Bazzoni, G. & Hemler, M. E. (1995) Specific association of CD63 with VLA-3 and VLA-6 integrins, *J Biol Chem.* **270**, 17784-17790.
32. Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D. O., Lanza, F., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (1999) Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions, *Biochem J.* **340**, 103-111.
33. Stipp, C. S. & Hemler, M. E. (2000) Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth, *J Cell Sci.* **113**, 1871-82.
34. Lozahic, S., Christiansen, D., Manie, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2000) CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans, *Eur J Immunol.* **30**, 900-7.
35. Miao, W. M., Vasile, E., Lane, W. S. & Lawler, J. (2001) CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets, *Blood.* **97**, 1689-96.
36. Odintsova, E., Sugiura, T. & Berditchevski, F. (2000) Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1, *Curr Biol.* **10**, 1009-12.
37. Stipp, C. S., Orlicky, D. & Hemler, M. E. (2001) FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9- associated protein, *J Biol Chem.* **276**, 4853-62.
38. Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. (2001) EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner, and member of a novel Ig protein subfamily, *J Biol Chem.* **276**, 40545-40554.
39. Claas, C., Stipp, C. S. & Hemler, M. E. (2001) Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts, *J Biol Chem.* **276**, 7974-84.
40. Schick, M. R. & Levy, S. (1993) The TAPA1 molecule is associated on the surface of B cells with HLA-DR molecules, *J Immunol.* **151**, 4090-4097.
41. Szollosi, J., Horejsi, V., Bene, L., Angelisova, P. & Damjanovich, S. (1996) Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY, *J Immunol.* **157**, 2939-2946.
42. Engering, A. & Pieters, J. (2001) Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells, *Int Immunol.* **13**, 127-134.
43. Hammond, C., Denzin, L. K., Pan, M., Griffith, J. M., Geuze, H. J. & Cresswell, P. (1998) The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules, *J Immunol.* **161**, 3282-91.
44. Bell, G. M., Seaman, W. E., Niemi, E. C. & Imboden, J. B. (1992) The OX-44 molecule couples to signaling pathways and is associated with CD2 on rat T lymphocytes and a natural killer cell line, *J Exp Med.* **175**, 527-36.
45. Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M. & Yoshie, O. (1995) Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82, *J Immunol.* **155**, 1229-39.
46. Bradbury, L. E., Kansas, G. S., Levy, S., Evans, R. L. & Tedder, T. F. (1992) The

- CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules, *J Immunol.* **149**, 2841-50.
47. Horvath, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (1998) CD19 Is Linked to the Integrin-associated Tetraspans CD9, CD81, and CD82, *J Biol Chem.* **273**, 30537-30543.
48. Sato, S., Miller, A. S., Howard, M. C. & Tedder, T. F. (1997) Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19, *J.Immunol.* **159**, 3278-3287.
49. Skubitz, K. M., Campbell, K. D., Lida, J. & Skubitz, A. P. N. (1996) CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils, *J.Immunol.* **157**, 3617-3626.
50. Shi, W., Fan, H., Shum, L. & 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.
51. Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M. A., Ashman, L. K., de Landazuri, M. O. & Sanchez-Madrid, F. (1998) Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with  $\alpha$ 3  $\beta$ 1 integrin localized at endothelial lateral junctions, *J Cell Biol.* **141**, 791-804.
52. Mannion, B. A., Berditchevski, F., Kraeft, S., Chen, L. B. & Hemler, M. E. (1996) Transmembrane-4-superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associate with integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (CD49d/CD29), *J immunol.* **157**, 2039-2047.
53. Boucheix, C., Benoit, P., Frachet, P., Billard, M., Worthington, R. E., Gagnon, J. & Uzan, G. (1991) Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins, *J Biol Chem.* **266**, 117-22.
54. Wright, M. D., Rochelle, J. M., Tomlinson, M. G., Seldin, M. F. & Williams, A. F. (1993) Gene structure, chromosomal localization, and protein sequence of mouse CD53 (Cd53): evidence that the transmembrane 4 superfamily arose by gene duplication, *Int Immunol.* **5**, 209-216.
55. Nieuwenhuis, H. K., van Oosterhout, J. J., Rozemuller, E., van Iwaarden, F. & Sixma, J. J. (1987) Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation, *Blood.* **70**, 838-45.
56. Azorsa, D. O., Hyman, J. A. & Hildreth, J. E. (1991) CD63/Pltgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491, *Blood.* **78**, 280-4.
57. Hildreth, J. E., Derr, D. & Azorsa, D. O. (1991) Characterization of a novel self-associating Mr 40,000 platelet glycoprotein, *Blood.* **77**, 121-32.
58. Sohma, Y., Suzuki, T., Sasano, H., Nagura, H., Nose, M. & Yamamoto, T. (1994) Increased mRNA for CD63 antigen in atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *Cell Struct Funct.* **19**, 219-25.
59. Lebel-Binay, S., Lagaudriere, C., Fradelizi, D. & Conjeaud, H. (1995) CD82, tetraspan transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U937 monocytic cell line, *J.Leuk.Res.* **57**, 956-963.
60. Mawhorter, S. D., Stephany, D. A., Ottesen, E. A. & Nutman, T. B. (1996) Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. Application of whole-blood flow cytometry to eosinophils, *J Immunol.* **156**, 4851-8.
61. Mollinedo, F., Martin-Martin, B., Gajate, C. & Lazo, P. A. (1998) Physiological activation of human neutrophils downregulates CD53 cell surface antigen, *J.Leuk.Biol.* **63**, 699-703.
62. Jennings, L. K., Fox, C. F., Kouns, W. C., McKay, C. P., Ballou, L. R. & Schultz, H. E. (1990) The activation of human platelets mediated by anti-human platelet p24/CD9 monoclonal antibodies, *J Biol Chem.* **265**, 3815-22.
63. Rasmussen, A., Blomhoff, H. K., Stokke, T., Horejsi, V. & Smeland, E. B. (1994) Cross-linking of CD53 promotes activation of resting human B lymphocytes, *J. Immunol.* **153**, 4997-5007.
64. Olweus, J., Lund-Johansen, F. & Horejsi, V. (1993) CD53, a protein with four membrane-spanning domains, mediates signal transduction in human monocytes and B cells, *J immunol.* **151**, 707-716.
65. Boscá, L. & Lazo, P. A. (1994) Induction of nitric oxide release by MRC OX-44 (anti-CD53) through a protein kinase C-dependent pathway in rat macrophages, *J. Exp. Med.* **179**, 1119-1126.
66. Smith, D. A., Monk, P. N. & Partridge, L. J. (1995) Antibodies against human CD63 activate transfected rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells, *Mol Immunol.* **32**, 1339-1344.
67. Kaji, K., Takeshita, S., Miyake, K., Takai, T. & Kudo, A. (2001) Functional Association of CD9 with the Fc $\gamma$  Receptors in Macrophages, *J Immunol.* **166**, 3256-3265.
68. Ozaki, Y., Satoh, K., Kuroda, K., Qi, R., Yatomi, Y., Yanagi, S., Sada, K., Yamamura,

- H., Yanabu, M., Nomura, S. & et al. (1995) Anti-CD9 monoclonal antibody activates p72syk in human platelets, *J Biol Chem.* **270**, 15119-24.
69. Carmo, A. M. & Wright, M. D. (1995) Association of the tetraspan 4 superfamily molecule CD53 with a tyrosine phosphatase activity, *Eur J Immunol.* **25**, 2090-2095.
70. Tai, X. G., Yashiro, Y., Abe, R., Toyooka, K., Wood, C. R., Morris, J., Long, A., Ono, S., Kobayashi, M., Hamaoka, T., Neben, S. & Fujiwara, H. (1996) A role for CD9 molecules in T cell activation, *J Exp Med.* **184**, 753-8.
71. Matsumoto, A. K., Martin, D. R., Carter, R. H., Klickstein, L. B., Ahearn, J. M. & Fearon, D. T. (1993) Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes, *J Exp Med.* **178**, 1407-17.
72. Fearon, D. T. & Carter, R. H. (1995) The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity, *Annu Rev Immunol.* **13**, 127-49.
73. Lebel-Binay, S., Lagaudriere, C., Fradelizi, D. & Conjeaud, H. (1995) CD82, member of the tetra-span-transmembrane protein family, is a costimulatory protein for T cell activation, *J immunol.* **155**, 101-110.
74. Lagaudriere-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Hubeau, C., Fradelizi, D. & Conjeaud, H. (1998) Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation, *Eur. J. Immunol.* **28**, 4332-4344.
75. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81, *Science.* **282**, 938-41.
76. Hadlock, K. G., Lanford, R. E., Perkins, S., Rowe, J., Yang, Q., Levy, S., Pileri, P., Abrignani, S. & Fong, S. K. (2000) Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes, *J Virol.* **74**, 10407-16.
77. Higginbottom, A., Quinn, E. R., Kuo, C. C., Flint, M., Wilson, L. H., Bianchi, E., Nicosia, A., Monk, P. N., McKeating, J. A. & Levy, S. (2000) Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2, *J Virol.* **74**, 3642-9.
78. Wack, A., Soldaini, E., Tseng, C. T., Nuti, S., Klimpel, G. R. & Abrignani, S. (2001) Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells, *Eur J Immunol.* **31**, 166-175.
79. Secrist, H., Levy, S., DeKruiff, R. & Umetsu, D. T. (1996) Ligation of TAPA1 (CD81) or major histocompatibility complex class II in co-cultures of human B and T lymphocytes enhances interleukin 4 synthesis by antigen-specific CD4+ T cells, *Eur J Immunol.* **26**, 1435-1442.
80. Berditchevski, F. & Odintsova, E. (1999) Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling, *J. Cell. Biol.* **146**, 477-492.
81. Todd, S. C., Lipps, S. G., Crisa, L., Salomon, D. R. & Tsoukas, C. D. (1996) CD81 expressed on human thymocytes mediates integrin activation and interleukin 2 dependent proliferation, *J.Exp.Med.* **184**, 2055-2060.
82. Gil, M. L., Vita, N., Lebel-Binay, S., Miloux, B., Chalon, P., Kaghad, M., Marchiol-Fournigault, C., Conjeaud, H., Caput, D., Ferrara, P. & et al. (1992) A member of the tetra spans transmembrane protein superfamily is recognized by a monoclonal antibody raised against an HLA class I- deficient, lymphokine-activated killer-susceptible, B lymphocyte line. Cloning and preliminary functional studies, *J Immunol.* **148**, 2826-33.
83. Vaickus, L. & Levy, R. (1985) Antiproliferative monoclonal antibodies: detection and initial characterization, *J Immunol.* **135**, 1987-97.
84. Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. & 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**, 2322-30.
85. Banerjee, S. A., Hadjiargyrou, M. & Patterson, P. H. (1997) An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially alpha3beta1 integrin-dependent manner, *J Neurosci.* **17**, 2756-65.
86. Boucheix, C. & 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**, 201-2.
87. Fitter, S., Tetaz, T. J., Berndt, M. C. & Ashman, L. K. (1995) Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3, *Blood.* **86**, 1348-1355.
88. Kawakatsu, T., Suzuki, M., Kido, H., Sakane, H., Hada, S., Yamaguchi, K., Fukuroi, T., Yanabu, M., Nagata, H., Nomura, S. & et al. (1993) Antithrombotic effect of an anti-glycoprotein IIB/IIIa antibody in primate lethal thrombosis, *Thromb Res.* **70**, 245-54.

89. Barrett, T. B., Shu, G. & Clark, E. A. (1991) CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells, *J Immunol.* **146**, 1722-9.
90. Masellis-Smith, A. & Shaw, A. R. (1994) CD9-regulated adhesion. Anti-CD9 monoclonal antibody induce pre-B cell adhesion to bone marrow fibroblasts through de novo recognition of fibronectin, *J Immunol.* **152**, 2768-77.
91. Takahashi, S., Doss, C., Levy, S. & Levy, R. (1990) TAPA1, the target of an antiproliferative antibody, is associated on the cell surface with the Leu-13 antigen, *J Immunol.* **145**, 2207-2213.
92. Lazo, P. A., Cuevas, L., Gutierrez del Arroyo, A. & Orue, E. (1997) Ligation of CD53/OX44, a tetraspan antigen, induces homotypic adhesion mediated by specific cell-cell interactions, *Cell.Immunol.* **178**, 132-140.
93. Cao, L., Yoshino, T., Kawasaki, N., Sakuma, I., Takahashi, K. & Akagi, T. (1997) Anti-CD53 monoclonal antibody induced LFA-1/ICAM-1-dependent and -independent lymphocyte homotypic adhesion, *Immunobiology.* **197**, 70-81.
94. Oritani, K., Wu, X., Medina, K., Hudson, J., Miyake, K., Gimble, J. M., Burstein, S. A. & Kincaid, P. W. (1996) Antibody ligation of CD9 modifies production of myeloid cells in long-term cultures, *Blood.* **87**, 2252-61.
95. Behr, S. & Schriever, F. (1995) Engaging CD19 or target of an antiproliferative antibody 1 on human B lymphocytes induces binding of B cells to the interfollicular stroma of human tonsils via integrin  $\alpha 4/\beta 1$  and fibronectin, *J Exp Med.* **182**, 1191-1199.
96. Ashman, L. K., Aylett, G. W., Mehrabani, P. A., Bendall, L. J., Niutta, S., Cambareri, A. C., Cole, S. R. & Berndt, M. C. (1991) The murine monoclonal antibody, 14A2.H1, identifies a novel platelet surface antigen, *Br J Haematol.* **79**, 263-70.
97. Miyake, M., Koyama, M., Seno, M. & 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**, 1347-54.
98. Cajot, J.-F., Sordat, I., Silvestre, T. & Sordat, B. (1997) Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells, *Cancer Res.* **57**, 2593-2597.
99. Mohler, J. L., Bakewell, W. E., Sharief, Y., Coleman, W. B., Chay, C. H., Silvers, S. M. & Smith, G. J. (1995) Detection of candidates for cancer cell motility inhibitory protein in the Dunning adenocarcinoma model, *Clin Exp Metastasis.* **13**, 474-80.
100. Radford, K. J., Mallesh, J. & Hersey, P. (1995) Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491), *Int J Cancer.* **62**, 631-635.
101. Ikeyama, S., Koyama, M., Yamaoko, M., Sasada, R. & Miyake, M. (1993) Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP1/CD9) DNA, *J. Exp. Med.* **177**, 1231-1237.
102. Shaw, A. R. E., Domanska, A., Mak, A., Gilchrist, A., Dobler, K., Visser, L., Poppema, S., Fliegel, L., Letarte, M. & Willet, B. J. (1995) Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers B1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation, *J Biol Chem.* **270**, 24092-24099.
103. Dong, J., Lamb, P. W., Rinker-Schaeffer, C. W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J. T. & Barrett, J. C. (1995) KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2, *Science.* **268**, 884-886.
104. Hotta, H., Hara, I., Miyamoto, H. & Homma, M. (1991) Overexpression of the human melanoma-associated antigen ME491 partially suppresses in vivo malignant phenotypes of H-ras-transformed NIH3T3 cells in athymic nude mice, *Melanoma Res.* **1**, 125-32.
105. Yanez-Mo, M., Tejedor, R., Rousselle, P. & Sanchez-Madrid, F. (2001) Tetraspanins in intercellular adhesion of polarized epithelial cells: spatial and functional relationship to integrins and cadherins, *J Cell Sci.* **114**, 577-87.
106. Sugiura, T. & Berditchevski, F. (1999) Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), *J Cell Biol.* **146**, 1375-1389.
107. Sincock, P. M., Fitter, S., Parton, R. G., Berndt, M. C., Gamble, J. R. & Ashman, L. K. (1999) PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function, *J Cell Sci.* **112**, 833-44.
108. Tomlinson, M. G., Hanke, T., Hughes, D. A., Barclay, A. N., Scholl, E., T. H. n. & Wright, M. D. (1995) Characterization of mouse CD53: epitope mapping, cellular distribution and induction by T cell receptor engagement during repertoire selection, *Eur. J.Immunol.* **25**, 2201-2206.
109. Paterson, D. J. & Williams, A. F. (1987) An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen, *J Exp Med.* **166**, 1603-1609.

110. Emi, N., Kitaori, K., Seto, M., Ueda, R., Saito, H. & Takahashi, T. (1993) Isolation of a novel cDNA clone showing marked similarity to ME491/CD63 superfamily, *Immunogenetics*. **37**, 193-8.
111. Mollinedo, F., Fontán, G., Barasoain, I. & Lazo, P. A. (1997) Recurrent Infectious Diseases in Human CD53 Deficiency, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **4**, 229-231.
112. Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. & Boucheix, C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice, *Science*. **287**, 319-21.
113. Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S. & Kudo, A. (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice, *Nat Genet.* **24**, 279-82.
114. Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M. & Mekada, E. (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization, *Science*. **287**, 321-4.
115. Miyazaki, T., Muller, U. & Campbell, K. S. (1997) Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81., *EMBO J.* **16**, 4271-4225.
116. Tsitsikov, E. N., Gutierrez-Ramos, J. C. & Geha, R. S. (1997) Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81- deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 10844-9.
117. Maecker, H. T., Do, M. S. & Levy, S. (1998) CD81 on B cells promotes interleukin 4 secretion and antibody production during T helper type 2 immune responses, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 2458-62.
118. Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H. & 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.USA.* **87**, 6833-6837.
119. Jankowski, S. A., De Jong, P. & Meltzer, P. S. (1995) Genomic structure of SAS, a member of the transmembrane 4 superfamily amplified in human sarcomas, *Genomics.* **25**, 501-6.
120. Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Yamasaki, S., Lanza, F., Kanematsu, T. & Hirohashi, S. (2001) Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma, *J Hepatol.* **35**, 637-42.
121. Adachi, M., Taki, T., Ieki, Y., Huang, C., Higashiyama, M. & Miyake, M. (1996) Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Res.* **56**, 1751-1755.
122. Dong, J., Suzuki, H., Pin, S. S., Bova, G. S., Schalken, J. A., Isaacs, W. B., Barrett, J. C. & Isaacs, J. T. (1996) Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss, *Cancer Res.* **56**, 4387-4390.
123. Guo, X., Friess, H., Graber, H. U., Kashigami, M., Zimmerman, A., Kore, M. & MW, B. c. (1996) KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases, *Cancer Res.* **56**, 4876-4880.
124. Guo, X.-Z., Friess, H., Maurer, C., Berberat, P., Tang, W.-H., Zimmerman, A., Naef, M., Graber, H. U., Kore, M. & Buchler, M. W. (1998) KAI1 is unchanged in metastatic and nonmetastatic esophageal and gastric cancers, *Cancer Res.* **58**, 753-758.
125. Atkinson, B., Ernst, C. S., Ghrist, B. F., Herlyn, M., Blaszczyk, M., Ross, A. H., Herlyn, D., Steplewski, Z. & Koprowski, H. (1984) Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies, *Cancer Res.* **44**, 2577-81.
126. Atkinson, B., Ernst, C. S., Ghrist, B. F., Ross, A. H., Clark, W. H., Herlyn, M., Herlyn, D., Maul, G., Steplewski, Z. & Koprowski, H. (1985) Monoclonal antibody to a highly glycosylated protein reacts in fixed tissue with melanoma and other tumors, *Hybridoma.* **4**, 243-55.
127. Miyake, M., Nakano, K., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C., Itoi, S., Koh, T. & Taki, T. (1995) Motility related protein 1(MRP1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer, *Cancer Res.* **55**, 4127-4131.
128. Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H., Adachi, M., Huang, C., Taki, T., Kasugai, T., Ishiguro, S., Nakamori, S. & Miyake, M. (1997) Immunohistochemically detected expression of motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) in lung adenocarcinoma and its relation to prognosis, *Int J Cancer.* **74**, 205-211.
129. Higashiyama, M., Taki, T., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C., Koh, T., Kodama, K., Doi, O. & Miyake, M. (1995) Reduced motility related protein-1(MRP1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer, *Cancer Res.* **55**, 6040-6044.
130. Chang, L. & Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades, *Nature.* **410**, 37-40.
131. Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell.* **103**, 239-52.
132. Smith, A., Ramos-Morales, F., Ashworth, A. & Collins, M. (1997) A role for JNK/SAPK

- in proliferation, but not apoptosis, of IL-3-dependent cells, *Curr Biol.* **7**, 893-6.
- 133.** Schaeffer, H. J. & Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers, *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435-2444.
- 134.** Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G. R. & Karin, M. (2000) MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 5243-8.
- 135.** Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G. R. & Johnson, G. L. (1998) Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption, *Science.* **282**, 1911-4.
- 136.** Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation, *Cell.* **80**, 179-85.
- 137.** Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. & Marshall, C. J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells, *Cell.* **77**, 841-52.
- 138.** Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J. & Tan, T. H. (1996) The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation, *J Biol Chem.* **271**, 31929-36.
- 139.** Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U. & Arkinstall, S. (1998) Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase, *Science.* **280**, 1262-5.
- 140.** Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A. & Arkinstall, S. (1996) The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases, *J Biol Chem.* **271**, 27205-8.
- 141.** Ono, K. & Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function, *Cell Signal.* **12**, 1-13.
- 142.** Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. & Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast, *Nature.* **369**, 242-5.
- 143.** York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W. & Stork, P. J. (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor, *Nature.* **392**, 622-6.
- 144.** Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J. & Davis, R. J. (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation, *Science.* **281**, 1671-4.
- 145.** Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A. & Weber, M. J. (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade, *Science.* **281**, 1668-71.
- 146.** Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B. & Karin, M. (1998) JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension, *Genes Dev.* **12**, 3369-81.
- 147.** Wasserman, J. D. & Freeman, M. (1998) An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the Drosophila egg, *Cell.* **95**, 355-64.
- 148.** Clark-Lewis, I., Sanghera, J. S. & Pelech, S. L. (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase, *J Biol Chem.* **266**, 15180-4.
- 149.** Kyriakis, J. M. (1999) Signaling by the germinal center family of protein kinases, *J. Biol. Chem.* **274**, 5259-5262.
- 150.** Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F. & Kraft, A. S. (1992) Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity, *J Biol Chem.* **267**, 17001-5.
- 151.** Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. & Karin, M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain, *Genes Dev.* **7**, 2135-48.
- 152.** Ip, Y. T. & Davis, R. J. (1998) Signal transduction by the c-jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development, *Current Op. Cell Biol.* **10**, 205-219.
- 153.** Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L. A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F. F. & Woodgett, J. R. (1996) The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat, *Curr Biol.* **6**, 606-13.
- 154.** Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S. & Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate, *Nature.* **381**, 800-3.
- 155.** Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. & Kolesnick, R. N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK

- signalling in stress- induced apoptosis, *Nature*. **380**, 75-9.
- 156.** Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways, *J Mol Med*. **74**, 589-607.
- 157.** Goillot, E., Raingeaud, J., Ranger, A., Tepper, R. I., Davis, R. J., Harlow, E. & Sanchez, I. (1997) Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 3302-7.
- 158.** Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M. & Tsuruo, T. (1997) c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis, *J Biol Chem*. **272**, 4631-6.
- 159.** Lenczowski, J. M., Dominguez, L., Eder, A. M., King, L. B., Zacharchuk, C. M. & Ashwell, J. D. (1997) Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis, *Mol Cell Biol*. **17**, 170-81.
- 160.** Potapova, O., Haghghi, A., Bost, F., Liu, C., Birrer, M. J., Gjerset, R. & Mercola, D. (1997) The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin, *J Biol Chem*. **272**, 14041-4.
- 161.** Wisdom, R., Johnson, R. S. & Moore, C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms, *Embo J*. **18**, 188-197.
- 162.** Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. & Davis, R. J. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c- mediated death pathway, *Science*. **288**, 870-4.
- 163.** Nishina, H., Fischer, K. D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E. A., Bernstein, A., Mak, T. W., Woodgett, J. R. & Penninger, J. M. (1997) Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3, *Nature*. **385**, 350-3.
- 164.** Almeida, E. A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C. R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D. D. & Damsky, C. H. (2000) Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase, *J Cell Biol*. **149**, 741-54.
- 165.** Chen, Y. R. & Tan, T. H. (2000) The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review), *Int J Oncol*. **16**, 651-62.
- 166.** Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J. P., Jochum, W., Wagner, E. F. & Karin, M. (1999) JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development, *Curr Biol*. **9**, 116-25.
- 167.** Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G. R. & Karin, M. (2000) MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 5243-5248.
- 168.** Glise, B. & Noselli, S. (1997) Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in Drosophila morphogenesis, *Genes Dev*. **11**, 1738-47.
- 169.** Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. & Hafen, E. (1996) The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye, *Genes Dev*. **10**, 2759-68.
- 170.** Han, J., Lee, J. D., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. J. (1993) Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14, *J Biol Chem*. **268**, 25009-14.
- 171.** Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L. & Ulevitch, R. J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells, *Science*. **265**, 808-811.
- 172.** Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W. & et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis, *Nature*. **372**, 739-46.
- 173.** Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S. & Han, J. (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen- activated protein kinase (p38 $\beta$ ), *J Biol Chem*. **271**, 17920-6.
- 174.** Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P. & Ullrich, A. (1996) ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 4355-9.
- 175.** Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C. & Young, P. R. (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles, *Biochem Biophys Res Commun*. **235**, 533-8.
- 176.** Pietersma, A., Tilly, B. C., Gaestel, M., de Jong, N., Lee, J. C., Koster, J. F. & Sluiter, W. (1997) p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level, *Biochem Biophys Res Commun*. **230**, 44-8.
- 177.** Saklatvala, J., Rawlinson, L., Waller, R. J., Sarsfield, S., Lee, J. C., Morton, L. F., Barnes, M. J. & Farndale, R. W. (1996) Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet

- aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue, *J Biol Chem.* **271**, 6586-9.
- 178.** Foltz, I. N., Lee, J. C., Young, P. R. & Schrader, J. W. (1997) Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, *J Biol Chem.* **272**, 3296-301.
- 179.** Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P. & Comb, M. J. (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2, *Embo J.* **15**, 4629-42.
- 180.** Nagata, Y., Moriguchi, T., Nishida, E. & Todokoro, K. (1997) Activation of p38 MAP kinase pathway by erythropoietin and interleukin-3, *Blood.* **90**, 929-34.
- 181.** Crawley, J. B., Rawlinson, L., Lali, F. V., Page, T. H., Saklatvala, J. & Foxwell, B. M. (1997) T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation, *J Biol Chem.* **272**, 15023-7.
- 182.** Rousseau, S., Houle, F., Landry, J. & Huot, J. (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells, *Oncogene.* **15**, 2169-77.
- 183.** Pyne, N. J. & Pyne, S. (1997) Platelet-derived growth factor activates a mammalian Ste20 coupled mitogen-activated protein kinase in airway smooth muscle, *Cell Signal.* **9**, 311-7.
- 184.** Wang, W., Zhou, G., Hu, M. C., Yao, Z. & Tan, T. H. (1997) Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction, *J Biol Chem.* **272**, 22771-5.
- 185.** Cuenda, A., Cohen, P., Buee-Scherrer, V. & Goedert, M. (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38), *Embo J.* **16**, 295-305.
- 186.** Bogoyevitch, M. A., Gillespie-Brown, J., Ketterman, A. J., Fuller, S. J., Ben-Levy, R., Ashworth, A., Marshall, C. J. & Sugden, P. H. (1996) Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion, *Circ Res.* **79**, 162-73.
- 187.** Sweeney, G., Somwar, R., Ramlal, T., Volchuk, A., Ueyama, A. & Klip, A. (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes, *J Biol Chem.* **274**, 10071-8.
- 188.** Heidenreich, K. A. & Kummer, J. L. (1996) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons, *J Biol Chem.* **271**, 9891-4.
- 189.** Keesler, G. A., Bray, J., Hunt, J., Johnson, D. A., Gleason, T., Yao, Z., Wang, S. W., Parker, C., Yamane, H., Cole, C. & Lichenstein, H. S. (1998) Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta, *Protein Expr Purif.* **14**, 221-8.
- 190.** Hu, M. C., Wang, Y. P., Mikhail, A., Qiu, W. R. & Tan, T. H. (1999) Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines, *J Biol Chem.* **274**, 7095-102.
- 191.** Takekawa, M., Posas, F. & Saito, H. (1997) A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways, *Embo J.* **16**, 4973-82.
- 192.** Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. & Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27, *Cell.* **78**, 1039-49.
- 193.** McLaughlin, M. M., Kumar, S., McDonnell, P. C., Van Horn, S., Lee, J. C., Livi, G. P. & Young, P. R. (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase, *J Biol Chem.* **271**, 8488-92.
- 194.** Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H. D. & Gaestel, M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis, *Nat Cell Biol.* **1**, 94-7.
- 195.** Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P. & Gaestel, M. (1992) Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins, *FEBS Lett.* **313**, 307-13.
- 196.** Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G. & Cooper, J. A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2, *Embo J.* **16**, 1909-20.
- 197.** Fukunaga, R. & Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates, *Embo J.* **16**, 1921-33.
- 198.** New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato, Y., Parry, G. C. & Han, J. (1998) PRAK, a novel protein kinase

- regulated by the p38 MAP kinase, *Embo J.* **17**, 3372-84.
- 199.** Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M. & Alessi, D. R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB, *Embo J.* **17**, 4426-41.
- 200.** Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. & Davis, R. J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine, *J Biol Chem.* **270**, 7420-6.
- 201.** Wang, X. Z. & Ron, D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase, *Science.* **272**, 1347-9.
- 202.** Engelman, J. A., Lisanti, M. P. & Scherer, P. E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3- L1 adipogenesis, *J Biol Chem.* **273**, 32111-20.
- 203.** Perregaux, D. G., Dean, D., Cronan, M., Connelly, P. & Gabel, C. A. (1995) Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence, *Mol Pharmacol.* **48**, 433-42.
- 204.** Lu, H. T., Yang, D. D., Wusk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R. J. & Flavell, R. A. (1999) Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice, *Embo J.* **18**, 1845-57.
- 205.** Badger, A. M., Cook, M. N., Lark, M. W., Newman-Tarr, T. M., Swift, B. A., Nelson, A. H., Barone, F. C. & Kumar, S. (1998) SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes, *J Immunol.* **161**, 467-73.
- 206.** Da Silva, J., Pierrat, B., Mary, J. L. & Lesslauer, W. (1997) Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes, *J Biol Chem.* **272**, 28373-80.
- 207.** Herlaar, E. & Brown, Z. (1999) p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease, *Mol Med Today.* **5**, 439-47.
- 208.** Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y. & Nishida, E. (1997) A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses, *Embo J.* **16**, 7045-53.
- 209.** Yuasa, T., Ohno, S., Kehrl, J. H. & Kyriakis, J. M. (1998) Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen- activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38, *J Biol Chem.* **273**, 22681-92.
- 210.** Juo, P., Kuo, C. J., Reynolds, S. E., Konz, R. F., Raingeaud, J., Davis, R. J., Biemann, H. P. & Blenis, J. (1997) Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases, *Mol Cell Biol.* **17**, 24-35.
- 211.** Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G. & Frisch, S. M. (1997) The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases, *Cell.* **90**, 315-23.
- 212.** Robinson, M. J. & Cobb, M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways, *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 180-6.
- 213.** Ziegler-Heitbrock, H. W., Blumenstein, M., Kafferlein, E., Kieper, D., Petersmann, I., Endres, S., Flegel, W. A., Northoff, H., Riethmuller, G. & Haas, J. G. (1992) In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion, *Immunology.* **75**, 264-8.
- 214.** Molnar, A., Theodoras, A. M., Zon, L. I. & Kyriakis, J. M. (1997) Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK, *J Biol Chem.* **272**, 13229-35.
- 215.** Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R. & Pouyssegur, J. (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway, *J Biol Chem.* **271**, 20608-16.
- 216.** Takenaka, K., Moriguchi, T. & Nishida, E. (1998) Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest, *Science.* **280**, 599-602.
- 217.** Sugden, P. H. & Clerk, A. (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein- coupled receptors, *Cell Signal.* **9**, 337-51.
- 218.** Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Gregory, J. S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. & Cobb, M. H. (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control, *Science.* **249**, 64-7.
- 219.** Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. & Yancopoulos, G. D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF, *Cell.* **65**, 663-75.
- 220.** Gille, H., Sharrocks, A. D. & Shaw, P. E. (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary

- complex formation at c-fos promoter, *Nature*. **358**, 414-7.
- 221.** Wadman, I. A., Hsu, H. L., Cobb, M. H. & Baer, R. (1994) The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain, *Oncogene*. **9**, 3713-6.
- 222.** Dubois, M. F., Bellier, S., Seo, S. J. & Bensaude, O. (1994) Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during heat shock and inhibition of transcription in HeLa cells, *J Cell Physiol*. **158**, 417-26.
- 223.** Proud, C. G. (1994) Translation. Turned on by insulin, *Nature*. **371**, 747-8.
- 224.** Sturgill, T. W., Ray, L. B., Erikson, E. & Maller, J. L. (1988) Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II, *Nature*. **334**, 715-8.
- 225.** Peraldi, P., Zhao, Z., Filloux, C., Fischer, E. H. & Van Obberghen, E. (1994) Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44- kDa mitogen-activated protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 5002-6.
- 226.** Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. & Davis, R. J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell*. **72**, 269-78.
- 227.** Haycock, J. W., Ahn, N. G., Cobb, M. H. & Krebs, E. G. (1992) ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 2365-9.
- 228.** Erickson, A. K., Payne, D. M., Martino, P. A., Rossomando, A. J., Shabanowitz, J., Weber, M. J., Hunt, D. F. & Sturgill, T. W. (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase, *J Biol Chem*. **265**, 19728-35.
- 229.** Ray, L. B. & Sturgill, T. W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 1502-6.
- 230.** Minden, A. & Karin, M. (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases, *Biochim Biophys Acta*. **1333**, F85-104.
- 231.** Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem J*. **351 Pt 2**, 289-305.
- 232.** Cadena, D. L. & Gill, G. N. (1992) Receptor tyrosine kinases, *Faseb J*. **6**, 2332-7.
- 233.** Schlessinger, J. (1994) SH2/SH3 signaling proteins, *Curr Opin Genet Dev*. **4**, 25-30.
- 234.** Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J. & Karin, M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway, *Cell*. **78**, 949-61.
- 235.** Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. (1995) Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation, *Embo J*. **14**, 3136-45.
- 236.** Dent, P., Reardon, D. B., Morrison, D. K. & Sturgill, T. W. (1995) Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro, *Mol Cell Biol*. **15**, 4125-35.
- 237.** Fabian, J. R., Daar, I. O. & Morrison, D. K. (1993) Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase, *Mol Cell Biol*. **13**, 7170-9.
- 238.** Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A., Vincent, L. A., Roberts, T. M. & Sturgill, T. W. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro, *Science*. **257**, 1404-7.
- 239.** Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. & Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase, *Nature*. **358**, 417-21.
- 240.** Ahn, N. G., Seger, R. & Krebs, E. G. (1992) The mitogen-activated protein kinase activator, *Curr Opin Cell Biol*. **4**, 992-9.
- 241.** Marais, R., Wynne, J. & Treisman, R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain, *Cell*. **73**, 381-93.
- 242.** Brunet, A., Pages, G. & Pouyssegur, J. (1994) Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1), *FEBS Lett*. **346**, 299-303.
- 243.** Buday, L., Warne, P. H. & Downward, J. (1995) Downregulation of the Ras activation pathway by MAP kinase phosphorylation of Sos, *Oncogene*. **11**, 1327-31.
- 244.** Waters, S. B., Holt, K. H., Ross, S. E., Syu, L. J., Guan, K. L., Saltiel, A. R., Koretzky, G. A. & Pessin, J. E. (1995) Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex, *J Biol Chem*. **270**, 20883-6.
- 245.** Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F. & Ahn, N. G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase, *Science*. **265**, 966-70.
- 246.** Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P. & Cheresch, D. A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase, *J Cell Biol*. **137**, 481-92.
- 247.** Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. & Greenberg, M. E. (1995) Opposing

- effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science*. **270**, 1326-31.
- 248.** Sakata, N., Patel, H. R., Terada, N., Aruffo, A., Johnson, G. L. & Gelfand, E. W. (1995) Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells, *J Biol Chem*. **270**, 30823-8.
- 249.** Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E. & Giancotti, F. G. (1996) The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression, *Cell*. **87**, 733-743.
- 250.** Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C. & Giancotti, F. G. (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth, *Cell*. **94**, 625-34.
- 251.** Giancotti, F. G. (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression, *Current Op. Cell Biol*. **9**, 691-700.
- 252.** Oktay, M., Wary, K. K., Dans, M., Birge, R. B. & Giancotti, F. G. (1999) Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle, *J Cell Biol*. **145**, 1461-9.
- 253.** Parsons, J. T. (1996) Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins, *Curr Opin Cell Biol*. **8**, 146-52.
- 254.** Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S. & Ruoslahti, E. (1996) Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases, *Mol Cell Biol*. **16**, 2606-13.
- 255.** Igishi, T., Fukuhara, S., Patel, V., Katz, B. Z., Yamada, K. M. & Gutkind, J. S. (1999) Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen- activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c- Jun NH(2)-terminal kinase activation, *J Biol Chem*. **274**, 30738-46.
- 256.** Angelisova, P., Vlcek, C., Stefanova, I., Lipoldova, M. & Horejsi, V. (1990) The human leucocyte surface antigen CD53 is a protein structurally similar to the CD37 and MRC OX44 antigens, *Immunogenetics*. **32**, 281-285.
- 257.** Pandey, A., Podtelejnikov, A. V., Blagoev, B., Bustelo, X. R., Mann, M. & Lodish, H. F. (2000) Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 179-84.
- 258.** Bazin, H., Pear, W. S. & Sumegi, J. (1988) Louvain rat immunocytomas, *Adv Cancer Res*. **50**, 279-310.
- 259.** Marinissen, M. J., Chiariello, M., Pallante, M. & Gutkind, J. S. (1999) A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5, *Mol Cell Biol*. **19**, 4289-301.
- 260.** Karin, M. & Hunter, T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus, *Current Biol*. **5**, 747-757.
- 261.** Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol*. **166**, 557-80.
- 262.** Misra, R. P. (1972) Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving, *Am J Clin Pathol*. **58**, 135-9.
- 263.** Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L. S., Pellicer, A., Cheng, Y. & Axel, R. (1977) Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells, *Cell*. **11**, 223-32.
- 264.** Chan, E. D., Winston, B. W., Uh, S. T., Wynes, M. W., Rose, D. M. & Riches, D. W. (1999) Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinases in the expression of inducible nitric oxide synthase by IFN-gamma and TNF- alpha in mouse macrophages, *J Immunol*. **162**, 415-22.
- 265.** Chan, E. D. & Riches, D. W. (1998) Potential role of the JNK/SAPK signal transduction pathway in the induction of iNOS by TNF-alpha, *Biochem Biophys Res Commun*. **253**, 790-6.
- 266.** Chan, E. D. & Riches, D. W. (2001) IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line, *Am J Physiol Cell Physiol*. **280**, C441-50.
- 267.** Guan, Z., Buckman, S. Y., Springer, L. D. & Morrison, A. R. (1999) Both p38alpha(MAPK) and JNK/SAPK pathways are important for induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1beta in rat glomerular mesangial cells, *J Biol Chem*. **274**, 36200-6.
- 268.** Stonehouse, T. J., Woodhead, V. E., Herridge, P. S., Ashfian, H., George, M., Chain, B. M. & Katz, D. R. (1999) Molecular characterization of U937 dependent T-cell costimulation, *Immunology*. **96**, 35-47.
- 269.** Crespo, P., Bustelo, X. R., Aaronson, D. S., Coso, O. A., Lopez-Barahona, M., Barbacid, M. & Gutkind, J. S. (1996) Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav, *Oncogene*. **13**, 455-60.
- 270.** Bustelo, X. R. (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family, *Mol Cell Biol*. **20**, 1461-77.
- 271.** Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S. & Bustelo, X. R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1

- GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product, *Nature*. **385**, 169-72.
- 272.** Minden, A., Lin, A., Claret, F., Abo, A. & Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and cdc42Hs, *Cell*. **81**, 1147-1157.
- 273.** Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. & Gutkind, J. S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway, *Cell*. **81**, 1137-46.
- 274.** Bustelo, X. R., Ledbetter, J. A. & Barbacid, M. (1992) Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates [see comments], *Nature*. **356**, 68-71.
- 275.** Cantrell, D. (1996) T cell antigen receptor signal transduction pathways, *Annu Rev Immunol*. **14**, 259-74.
- 276.** Campbell, K. S. (1999) Signal transduction from the B cell antigen-receptor, *Curr Opin Immunol*. **11**, 256-64.
- 277.** Van Leeuwen, J. E. & Samelson, L. E. (1999) T cell antigen-receptor signal transduction, *Curr Opin Immunol*. **11**, 242-8.
- 278.** Ghosh Choudhury, G., Jin, D. C., Kim, Y., Celeste, A., Ghosh-Choudhury, N. & Abboud, H. E. (1999) Bone morphogenetic protein-2 inhibits MAPK-dependent Elk-1 transactivation and DNA synthesis induced by EGF in mesangial cells, *Biochem Biophys Res Commun*. **258**, 490-6.
- 279.** Stivala, L. A., Riva, F., Cazzalini, O., Savio, M. & Prosperi, E. (2001) p21(waf1/cip1)-null human fibroblasts are deficient in nucleotide excision repair downstream the recruitment of PCNA to DNA repair sites, *Oncogene*. **20**, 563-70.
- 280.** Hubinger, G., Muller, E., Scheffrahn, I., Schneider, C., Hildt, E., Singer, B. B., Sigg, I., Graf, J. & Bergmann, L. (2001) CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21(CIP1/WAF1) in the anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299, *Oncogene*. **20**, 590-8.
- 281.** Chan, E. D., Winston, B. W., Jarpe, M. B., Wynes, M. W. & Riches, D. W. (1997) Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by TNF alpha, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 13169-74.
- 282.** Sanghera, J. S., Weinstein, S. L., Aluwalia, M., Girn, J. & Pelech, S. L. (1996) Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages, *J Immunol*. **156**, 4457-65.
- 283.** Weiss, L., Whitmarsh, A. J., Yang, D. D., Rincon, M., Davis, R. J. & Flavell, R. A. (2000) Regulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation, *J Exp Med*. **191**, 139-46.
- 284.** Swantek, J. L., Cobb, M. H. & Geppert, T. D. (1997) Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK, *Mol Cell Biol*. **17**, 6274-82.
- 285.** Read, M. A., Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J. & Collins, T. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways, *J Biol Chem*. **272**, 2753-61.
- 286.** Min, W. & Pober, J. S. (1997) TNF initiates E-selectin transcription in human endothelial cells through parallel TRAF-NF-kappa B and TRAF-RAC/CDC42-JNK-c-Jun/ATF2 pathways, *J Immunol*. **159**, 3508-18.
- 287.** Lander, H. M., Jacovina, A. T., Davis, R. J. & Tauras, J. M. (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species, *J Biol Chem*. **271**, 19705-9.
- 288.** Hall, J. P., Merithew, E. & Davis, R. J. (2000) c-Jun N-terminal kinase (JNK) repression during the inflammatory response? Just say NO, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 14022-4.
- 289.** Lander, H. M., Hajjar, D. P., Hempstead, B. L., Mirza, U. A., Chait, B. T., Campbell, S. & Quilliam, L. A. (1997) A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction, *J Biol Chem*. **272**, 4323-6.
- 290.** Park, H. S., Huh, S. H., Kim, M. S., Lee, S. H. & Choi, E. J. (2000) Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 14382-7.
- 291.** Yunta, M., Oliva, J. L., Barcia, R., Horejsi, V., Angelisova, P. & Lazo, P. A. (2002) Transient activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity by ligation of the tetraspan CD53 antigen in different cell types, *Eur J Biochem*. **269**, 1012-1021.
- 292.** Skov, S., Odum, N. & Claesson, M. H. (1995) MHC class I signaling in T cells leads to tyrosine kinase activity and PLC-g1 phosphorylation, *J Immunol*. **154**, 1167-1176.
- 293.** Dasgupta, J. D., Granja, C. B., Yunis, E. J. & Relias, V. (1994) MHC class I antigens regulate CD3-induced tyrosine phosphorylation of proteins in T cells, *Int Immunol*. **6**, 481-9.

294. Tscherning, T. & Claesson, M. H. (1994) Signal transduction via MHC class-I molecules in T cells, *Scand J Immunol.* **39**, 117-21.
295. Skov, S. (1998) Intracellular signal transduction mediated by ligation of MHC class I molecules, *Tissue Antigens.* **51**, 215-23.
296. Amirayan, N. & Machy, P. (1996) MHC class I molecules are implicated in costimulatory signals during TCR/CD3-induced activation, *Cell Immunol.* **168**, 1-12.
297. Skov, S., Klausen, P. & Claesson, M. H. (1997) Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis, *J Cell Biol.* **139**, 1523-31.
298. Spertini, F., Chatila, T. & Geha, R. S. (1992) Engagement of MHC class I molecules induces cell adhesion via both LFA-1-dependent and LFA-1-independent pathways, *J Immunol.* **148**, 2045-9.
299. Curry, R. A., Messner, R. P. & Johnson, G. J. (1984) Inhibition of platelet aggregation by monoclonal antibody reactive with beta 2-microglobulin chain of HLA complex, *Science.* **224**, 509-11.
300. Wagner, N., Engel, P., Vega, M. & Tedder, T. F. (1994) Ligation of MHC class I and class II molecules can lead to heterologous desensitization of signal transduction pathways that regulate homotypic adhesion in human lymphocytes, *J Immunol.* **152**, 5275-87.
301. Inoki, K., Haneda, M., Ishida, T., Mori, H., Maeda, S., Koya, D., Sugimoto, T. & Kikkawa, R. (2000) Role of mitogen-activated protein kinases as downstream effectors of transforming growth factor-beta in mesangial cells, *Kidney Int Suppl.* **77**, S76-80.
302. Isono, M., Cruz, M. C., Chen, S., Hong, S. W. & Ziyadeh, F. N. (2000) Extracellular signal-regulated kinase mediates stimulation of TGF-beta1 and matrix by high glucose in mesangial cells, *J Am Soc Nephrol.* **11**, 2222-30.
303. Hayashida, T., Poncelet, A. C., Hubchak, S. C. & Schnaper, H. W. (1999) TGF-beta1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression, *Kidney Int.* **56**, 1710-20.
304. Parameswaran, N., Nambi, P., Brooks, D. P. & Spielman, W. S. (1999) Regulation of glomerular mesangial cell proliferation in culture by adrenomedullin, *Eur J Pharmacol.* **372**, 85-95.
305. Nakazato, Y., Okada, H., Sato, A., Iwaita, Y., Hayashida, T., Hayashi, M., Suzuki, H. & Saruta, T. (1993) Interleukin 4 downregulates cell growth and prostaglandin release of human mesangial cells, *Biochem Biophys Res Commun.* **197**, 486-93.
306. Chu, F., Wei, M. & Wang, Q. (2000) [Effect of inflammatory factor and yishen huoxue xiezhuo decoction on growth of glomerular mesangial cells in rats], *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* **20**, 132-5.
307. Tateyama, F., Yamabe, H., Osawa, H., Kaizuka, M., Shirato, K. & Okumura, K. (2001) Interleukin-1beta is an autocrine growth factor of rat glomerular epithelial cells in culture, *Nephrol Dial Transplant.* **16**, 1149-55.
308. Izevbogie, E. B., Gutkind, J. S. & Ray, P. E. (2000) Angiotensin II and basic fibroblast growth factor mitogenic pathways in human fetal mesangial cells, *Pediatr Res.* **47**, 614-21.
309. El-Dahr, S. S., Dipp, S. & Baricos, W. H. (1998) Bradykinin stimulates the ERK->Elk-1->Fos/AP-1 pathway in mesangial cells, *Am J Physiol.* **275**, F343-52.
310. Suganami, T., Tanaka, I., Mukoyama, M., Kotani, M., Muro, S., Mori, K., Goto, M., Ishibashi, R., Kasahara, M., Yahata, K., Makino, H., Sugawara, A. & Nakao, K. (2001) Altered growth response to prostaglandin E2 and its receptor signaling in mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *J Hypertens.* **19**, 1095-103.
311. Yoshizumi, M., Kagami, S., Suzaki, Y., Tsuchiya, K., Houchi, H., Hisayama, T., Fukui, H. & Tamaki, T. (2000) Effect of endothelin-1 (1-31) on human mesangial cell proliferation, *Jpn J Pharmacol.* **84**, 146-55.
312. Ishikawa, Y. & Kitamura, M. (1999) Dual potential of extracellular signal-regulated kinase for the control of cell survival, *Biochem Biophys Res Commun.* **264**, 696-701.
313. Omori, S., Fukuzawa, R., Hida, M. & Awazu, M. (2002) Expression of mitogen-activated protein kinases in human renal dysplasia, *Kidney Int.* **61**, 899-906.
314. Dlugosz, J. A., Munk, S., Kapor-Drezgic, J., Goldberg, H. J., Fantus, I. G., Scholey, J. W. & Whiteside, C. I. (2000) Stretch-induced mesangial cell ERK1/ERK2 activation is enhanced in high glucose by decreased dephosphorylation, *Am J Physiol Renal Physiol.* **279**, F688-97.
315. Voehringer, D. W., Hirschberg, D. L., Xiao, J., Lu, Q., Roederer, M., Lock, C. B., Herzenberg, L. A. & Steinman, L. (2000) Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**, 2680-2685.
316. Zhu, N., Ramirez, L. M., Lee, R. L., Magnuson, N. S., Bishop, G. A. & Gold, M. R. (2002) CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway, *J Immunol.* **168**, 744-54.

- 317.** Dadgostar, H., Zarnegar, B., Hoffmann, A., Qin, X. F., Truong, U., Rao, G., Baltimore, D. & Cheng, G. (2002) Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 1497-502.
- 318.** Zamorano, J., Kelly, A. E., Austrian, J., Wang, H. Y. & Keegan, A. D. (2001) Costimulation of resting B lymphocytes alters the IL-4-activated IRS2 signaling pathway in a STAT6 independent manner: implications for cell survival and proliferation, *Cell Res.* **11**, 44-54.
- 319.** Rush, J. S. & Hodgkin, P. D. (2001) B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation, *Eur J Immunol.* **31**, 1150-9.
- 320.** Laabi, Y., Egle, A. & Strasser, A. (2001) TNF cytokine family: More BAFF-ling complexities, *Curr Biol.* **11**, R1013-6.