

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR



INTERACCION DE LEUCOCITOS HUMANOS CON LA
PROTEINA DE MATRIZ EXTRACELULAR FIBRONECTINA.
REGULACION Y FUNCION DE LA INTEGRINA $\alpha 4 \beta 1$

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Aparicio', enclosed within a large, loopy oval shape.

TESIS DOCTORAL
PALOMA SANCHEZ APARICIO
1994



La Dra. Angeles García Pardo, Investigadora Científica del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, certifica:

que **Paloma Sánchez Aparicio**, con DNI 50822313 y licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo: "Interacción de leucocitos humanos con la proteína de matriz extracelular fibronectina. Regulación y función de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ ". Y para que así conste, y a efectos de la presentación del mismo para optar al Título de Doctor, firmo la presente certificación.

Madrid, 30 de Septiembre de 1994

A handwritten signature in black ink, reading "Angeles Garcia Pardo". The signature is fluid and cursive, with the first name "Angeles" and last name "Pardo" being more prominent than the middle name "Garcia".

Fdo: Dra. Angeles García Pardo

Investigadora Científica

Centro de Investigaciones Biológicas

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A todos mis amigos, por su cariño.

A mis compañeros por su apoyo, ayuda y comprensión.

A mi buena amiga y compañera Carmen, por su ayuda incondicional.

Al grupo de Antonio de la Hera, ellos saben por qué.

A Javier Rey por escucharme siempre y mucho más.

A Santiago Rodríguez de Córdoba, por tenderme su mano.

A Angeles García Pardo por enseñarme cómo se deben hacer las cosas y cómo nunca se deben hacer las cosas.

Y a mi buena amiga y compañera Carmen, siempre gracias.

INDICE

INDICE

ABREVIATURAS.....	
1.- INTRODUCCION.....	1-18
1.1.- La matriz extracelular: composición y función en adhesión celular.	1-2
1.2.- Estructura y función de la fibronectina (Fn).....	2-7
1.3.- Moléculas de adhesión de superficie celular.....	8
1.4.- Familia de las integrinas.....	8-12
1.5.- Integrina $\alpha 4\beta 1$	13-15
1.6.- Regulación funcional de las integrinas.....	16-17
1.7.- Transmisión de señales a través de las integrinas	17-18
2.- OBJETIVOS.....	19
3.- MATERIALES Y METODOS.....	20-26
3.1.- Proteínas de matriz extracelular:	
3.1.1.- Fibronectina, fragmentos de Fn y péptidos sintéticos.....	20-21
3.1.2.- Laminina, colágeno tipo I y vitronectina.....	21
3.2.- Anticuerpos.....	21-22
3.3.- Células y cultivos celulares.....	22-23
3.4.- Ensayos de adhesión celular	24
3.5.- Ensayos de ELISA y Western Blot.....	24-25
3.6.- Estudios de inmunofluorescencia.....	25
3.7.- Inmunoprecipitación y electroforesis.....	26
3.8.- Reactivos.....	26
4.- RESULTADOS.....	27-70
4.1.- Análisis de los fragmentos de fibronectina:	
4.1.1.- Fragmentos que contienen la región C-terminal de Fn.....	28-29
4.1.2.- Fragmentos que contienen la región central de Fn.....	29-30
4.1.3.- Otros fragmentos de Fn.....	30
4.2.- Estudio de la interacción de leucocitos con la región carboxilo-terminal de Fn; estudio de nuevos sitios adherentes, sus receptores en leucocitos humanos y su regulación:	
4.2.1.- Obtención de dos nuevos Acms anti-fibronectina, P1F11 y P3D4. Identificación de los sitios de unión.....	30-35
4.2.2.- Reconocimiento del dominio Hep II por la integrina $\alpha 4\beta 1$ en distintas poblaciones celulares.....	35-38

4.2.3.- Efecto de la diferenciación y la activación celular en el reconocimiento del dominio Hep II.....	38-41
4.2.4.- Regulación del reconocimiento del dominio Hep II a través de la subunidad $\beta 1$	42-46
4.2.5.- Efecto del catión divalente Mn^{2+} en la interacción con el dominio Hep II.....	47
4.3.- Estudio de la interacción de leucocitos humanos con la región central de Fn. Análisis de nuevos ligandos de baja afinidad:	
4.3.1.- Reconocimiento del fragmento de Fn de 80 kDa por algunas células linfoides B negativas para $\alpha 5\beta 1$	48-50
4.3.2.- Efecto del PMA en el reconocimiento del fragmento de Fn de 80 kDa en distintas células linfoides B.....	51-52
4.3.3.- Identificación del receptor celular implicado en el reconocimiento del fragmento 80 kDa. Análisis del sitio activo de este fragmento.	52-57
4.3.4.- Análisis de la especificidad de la interacción $\alpha 4\beta 1$ -FN80.	58-59
4.4.- Estudio de las implicaciones celulares en leucocitos subsiguientes a la interacción $\alpha 4\beta 1$-Fn:	
4.4.1.- Análisis de la reorganización del citoesqueleto tras la interacción de células linfoides B con Fn.....	59-67
4.4.2.- Identificación de los sitios activos dentro de Fn implicados en procesos de fosforilación después de la interacción linfocito-Fn...	67-70
5.- DISCUSION.....	71-81
6.- CONCLUSIONES.....	82-83
7.- BIBLIOGRAFIA.....	84-94
8.- ANEXO: Publicaciones.....	95

ABREVIATURAS

Ac(s)	anticuerpo(s)
Acm(s)	anticuerpo(s) monoclonal(es)
BSA	albúmina sérica bovina
CNBr	bromuro de cianógeno
COL	colágeno
DMSO	dimetilsulfóxido
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Fn	fibronectina
FN38	fragmento de fibronectina de 38 kDa
FN58	fragmento de fibronectina de 58 kDa
FN80	fragmento de fibronectina de 80 kDa
Ig(s)	Inmunoglobulina(s)
kDa	kilodalton
LN	laminina
OPD	1,2-phenylenediamine
PBL	linfocitos de sangre periférica
PBS	tampón salino con fosfato
PG	proteoglicanos
PMA	forbol miristato acetato
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
TCR	receptor de células T
TSP	trombospondina
VCAM-1	vascular cell-adhesion molecule 1
VLA	very late antigen
VN	vitronectina

1.- INTRODUCCION

INTRODUCCION

1.1.- La matriz extracelular: composición y función en adhesión celular

La matriz extracelular (MEC) es un entramado de macromoléculas que junto al componente celular constituye los tejidos. La MEC está formada por una serie de polisacáridos y proteínas secretadas localmente. La gran diversidad de formas que puede presentar la MEC, cada una totalmente adaptada al requerimiento funcional de cada tejido en particular, viene dada por variaciones en las cantidades relativas y la forma de organización de sus componentes. Actualmente, se considera que la MEC no sólo actúa como soporte de la estructura física de los tejidos sino que tiene un papel dinámico en la regulación del comportamiento de las células que interaccionan con ella, influyendo en su desarrollo, migración y proliferación.

La MEC está formada por tres tipos principales de macromoléculas:

- **Proteoglicanos (PG):** son un grupo heterogéneo de macromoléculas con una proteína central a la que se asocian cadenas de polisacáridos no ramificados formados por repeticiones de unidades de disacáridos denominados glicosaminoglicanos (GAG). Los GAG se reúnen en cuatro grupos en base a sus características comunes, esto es, ácido hialurónico, condroitín sulfato y dermatán sulfato, heparán sulfato y heparina, y queratán sulfato. Los proteoglicanos contienen un 90% de carbohidratos y se clasifican en PG de superficie celular, de gránulos intracelulares y de MEC.

- **Colágenos:** son una familia de proteínas fibrilares secretadas fundamentalmente por células del tejido conjuntivo. Las moléculas de colágeno se caracterizan por presentar una estructura rígida de triple hélice formada por tres cadenas α . Se han descrito hasta 13 tipos de colágenos diferentes (tipos I-XIII).

En algunos tejidos existe un componente adicional de MEC que es la **elastina**. Las moléculas de elastina (proteínas no glicosiladas) son secretadas a la MEC como filamentos interconectados entre ellos que dan lugar a una matriz que es capaz de contraerse y relajarse dependiendo de las necesidades del tejido.

- **Glicoproteínas:** son un grupo de moléculas con función adhesiva, entre las que destacan la laminina y la fibronectina por ser mayoritarias. La **laminina (LN)** está formada por tres subunidades diferentes, una de 400 kDa (A) y dos de 200 kDa (B1 y B2), y forma parte de la membrana basal (Chung et al. 1979). La **fibronectina (Fn)** es uno de los principales componentes de MEC capaz de mediar adhesión celular y se le dedica un capítulo aparte por ser tema central de esta tesis. Además existen otras glicoproteínas en la MEC y en el plasma capaces de interaccionar con células, como por ejemplo la vitronectina (VN), la trombospondina (TSP) y la tenascina (Hayman et al. 1985; Lawler, 1986)

En definitiva, en la MEC, las moléculas de proteoglicanos formarían una especie de gel en el que se sumergirían las glicoproteínas. Este entramado molecular permitiría la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células de los tejidos. Las fibras de colágeno darían rigidez y ayudarían a organizar la matriz extracelular, mientras que moléculas como la fibronectina y la laminina mediarían adhesión celular.

Por otra parte, los componentes de la MEC, a través de las interacciones celulares, juegan un importante papel en morfogénesis, reparación y regeneración de tejidos y metástasis. Durante estos procesos, las células alteran constantemente su morfología y su capacidad adhesiva a los componentes de MEC. La regulación específica de un tipo celular, de la expresión de los muchos componentes de MEC, así como de sus receptores de membrana, proporcionan un poderoso mecanismo para el apropiado control del comportamiento celular durante estos procesos. Además de establecer una serie de contactos determinados con la MEC, las células podrían modificar estos contactos de una forma estrechamente regulada; la regulación de las cantidades de ligandos y receptores presentes, la alteración de la afinidad receptor-ligando y la proteólisis de ligandos o receptores podrían estar implicadas en los procesos de migración, invasión y reparación de tejidos. Además de en estos procesos, las interacciones célula-MEC tienen un papel fundamental en las funciones del sistema inmune; son especialmente importantes para la migración, localización en tejidos y función general de los leucocitos (Springer, 1990).

1.2.- Estructura y función de la fibronectina

Uno de los principales componentes de matriz extracelular que funciona como mediador de adhesión celular es la glicoproteína Fn. La Fn no sólo está presente en la MEC, sino también en la superficie de gran variedad de células, en el plasma (300 µg /ml) y en otros fluidos biológicos. Existen distintas formas de Fn, al menos se han descrito 20 variantes en humanos; todas ellas son dímeros o polímeros de dos cadenas polipeptídicas -A y B- unidas por dos puentes disulfuro y contienen alrededor de un 5% de carbohidratos.

La Fn se compone de dominios estructurales alineados a lo largo de la molécula que contienen los sitios de unión a las diferentes macromoléculas que interaccionan con ella, así como los sitios de interacción con células (Fig.1). En general existen varios sitios de unión para un mismo ligando, que están situados en diferentes dominios de Fn. El dominio amino-terminal contiene sitios de unión a fibrina (Fib I), a heparina (Hep I), así como a otras proteínas (Staph A, actina, factor XIIIa). Esta región es además responsable de la polimerización de moléculas de Fn que tiene lugar en la matriz extracelular. El siguiente dominio contiene el sitio de unión a colágeno/gelatina y al componente del complemento C1q. La región central que viene a continuación contiene un sitio de unión a heparina de baja afinidad (Hep III) así como el sitio de interacción con células

tipificado por la secuencia RGD (arginina-glicina-aspartico). La región carboxilo-terminal contiene sitios de unión a heparina de alta afinidad (Hep II), de interacción con células (Hep II y III/CS, ver a continuación), así como de unión a fibrina (Fib II) y al componente P del amiloide. Adyacente al dominio Fib II y en el extremo C-terminal está la región implicada en la formación de los dos puentes disulfuro que unen las cadenas A y B de Fn (Fig.1).

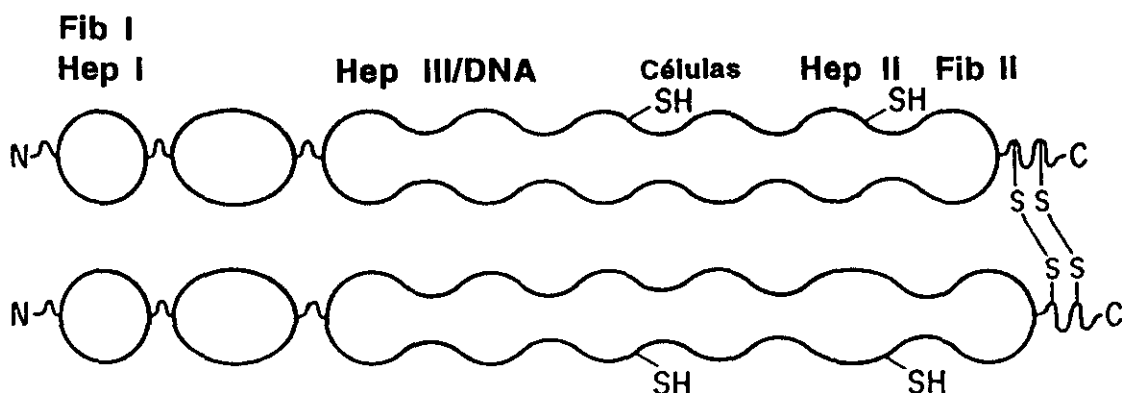


Fig.1.- Dominios estructurales de la molécula de Fn. Adaptado de Hynes,1990.

Las regiones peptídicas situadas entre los dominios globulares de Fn son muy sensibles a la degradación proteolítica. Esto ha permitido obtener fragmentos de Fn que contienen uno o varios dominios prácticamente intactos y que conservan su funcionalidad. Así la digestión parcial de Fn plasmática con tripsina permite obtener fragmentos de 38, 58 y 80 kDa, entre otros, que se han utilizado a lo largo de esta tesis.

El análisis de la secuencia de la Fn muestra la existencia de regiones repetidas, que son de tres tipos de homología diferentes: I, II, III (Fig.2). Los dominios de unión a fibrina (Fib I y Fib II) están formados por repeticiones de secuencias homólogas de 45 aa (tipo I) que se dispone formando un par de lazos unidos por puentes disulfuro. La secuencia de homología tipo I se repite 12 veces a lo largo de la molécula de Fn; 5 veces en el dominio N-terminal (Fib I), 3 en el dominio C-terminal (Fib II) y 4 en el dominio de unión a gelatina (Fig.2). Este último contiene también repeticiones tipo II. La homología tipo II consiste en repeticiones de 60 aa y es por tanto diferente a la homología tipo I, aunque también contiene dos puentes disulfuro intracatenarios. Por último, el segmento central de la molécula contiene repeticiones tipo III que carecen de puentes disulfuro y poseen una longitud aproximada de 90 residuos.

La secuencia de la Fn está altamente conservada entre especies -hay menos de un 10% de divergencia entre secuencias de diferentes mamíferos y la mayoría son cambios conservativos-. El alto grado de conservación indica una fuerte presión selectiva sobre la función de gran parte de la molécula de Fn. Es probable que cada tipo de homología se corresponda con una función específica: la homología tipo I mediaría unión a fibrina, la II unión a colágeno y la III interaccionaría con células y/u otros ligandos.

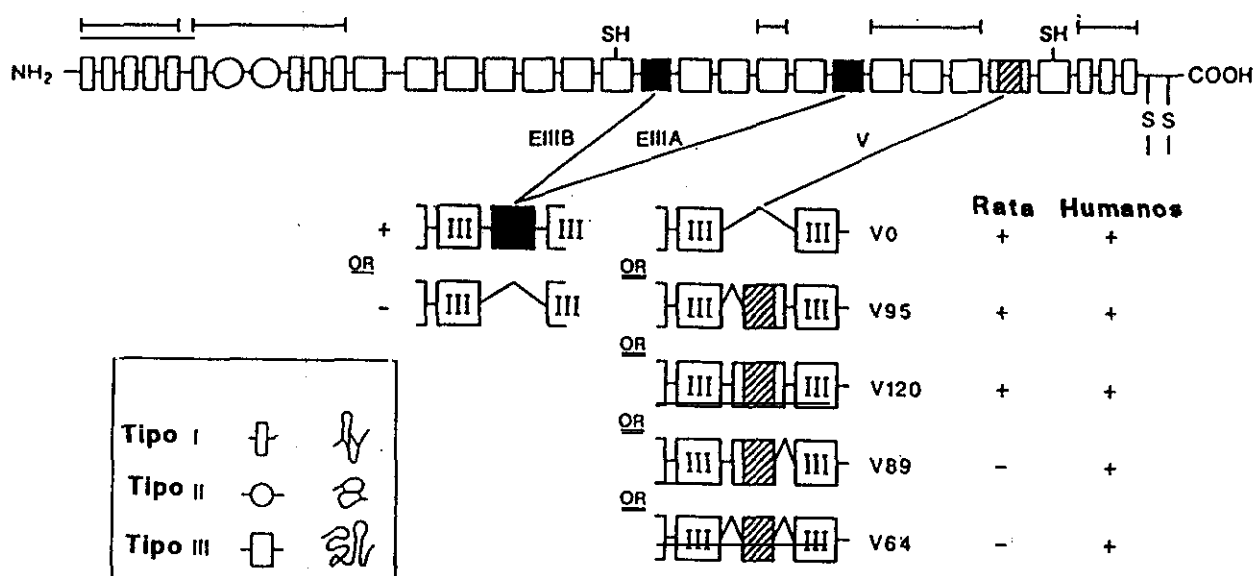


Fig. 2.- Esquema de la secuencia primaria de las diferentes formas de Fn. La secuencia está formada por repeticiones de tres tipos (Hynes, 1990).

Todas las formas de Fn conocidas están codificadas por un sólo gen que en humanos se sitúa en el cromosoma 2. Todas las unidades estructurales que se repiten en la molécula de Fn están codificadas a nivel génico por unidades genómicas discretas (uno o dos exones); cada secuencia de repetición está separada por un intrón. El análisis de la estructura del gen de Fn permitió determinar que las distintas formas de Fn se originan por mecanismos de "splicing" alternativo. En la Figura 2 se puede ver una representación esquemática de las distintas formas de Fn que aparecen por tales mecanismos. Las regiones EIIIA (ED-A) y EIIIB (ED-B) pueden ser excluidas o no durante el procesamiento del RNA; mientras que IIICS (*type III connecting segment*) puede ser incluida total o parcialmente, o excluida totalmente. Las posibles combinaciones son numerosas. El modelo de "splicing" está sujeto a una compleja regulación y es específico del tipo celular. La Fn plasmática es sintetizada fundamentalmente por hepatocitos y está

compuesta de dos cadenas polipeptídicas A y B unidas por dos puentes disulfuro; ambas cadenas carecen de los segmentos EIIIA y EIIIB, y sólo la cadena A contiene la región IIICS. Por el contrario, la Fn celular presenta EIIIA y/o EIIIB y el segmento IIICS en ambas cadenas (A y B). La Fn celular puede formar, a partir de estos dímeros, agregados o polímeros.

Parece razonable cuestionarse el por qué de la existencia de estas variantes de Fn. En principio cabría pensar que la presencia o ausencia de estos segmentos confiere propiedades funcionales específicas a las distintas isoformas de Fn; por ejemplo, la región IIICS tiene capacidad de mediar adhesión (ver a continuación) y está presente en la Fn plasmática, pero sólo en la cadena A, mientras que en la Fn celular aparece en ambas cadenas sugiriendo una funcionalidad diferencial; por el contrario, los segmentos EIIIA y EIIIB sólo están presentes en Fn celular, lo que sugiere también funciones específicas de la Fn celular. Además de estas diferencias en secuencia, entre las distintas variantes de Fn hay que sumar las diferencias que presumiblemente deben existir en los procesos de glicosilación, fosforilación y sulfatación posteriores a la síntesis proteica.

La multiplicidad de sitios de unión y la existencia de varias formas de Fn confieren a esta proteína las siguientes funciones:

1.- Organización del citoesqueleto: Hay evidencias que correlacionan la organización de microfilamentos con los niveles de Fn extracelular, parece que existe una relación recíproca entre el grado de organización del citoesqueleto y el de las fibrillas de Fn en la MEC. Asimismo, se ha demostrado la colocación de filamentos de actina y fibras de Fn indicando que existe un efecto transmembrana de la Fn exógena; otras proteínas como vinculina, talina y α -actinina también se asocian con Fn, estas proteínas se localizan en los contactos focales.

2.- Migración celular: Se ha demostrado que la Fn purificada, tanto plasmática como celular, promueve la migración celular de fibroblastos, células musculares lisas, células de la cresta neural, queratinocitos, células de Schwann, astrocitos, células de melanoma, etc. En cambio, inhibe la migración de células del epitelio del hígado, y no promueve migración de neutrófilos. La Fn se puede considerar entre las moléculas que intervienen en fenómenos de haptotaxis, es decir, fenómenos que implican migración en respuesta a un gradiente de adhesividad en el sustrato; la región responsable de este efecto se localiza en la zona central de la molécula.

3.- Desarrollo y diferenciación: La Fn participa en fenómenos de migración, adhesión y cambios de morfología celular, así como en fenómenos de morfogénesis, es decir, de polarización, plegamiento y organización de hojas embrionarias. Además, los procesos finales de la diferenciación celular pueden estar afectados por el tipo de matriz al que se encuentran expuestas las células; por ejemplo, la Fn juega un papel importante en la diferenciación del linaje eritropoyético.

4.- Transformación oncogénica: Existe correlación entre transformación, tumorigenicidad y malignidad con la disminución de los niveles de Fn en superficie celular. La pérdida de Fn tiene consecuencias en el cambio del fenotipo celular; algunas células transformadas muestran una menor síntesis de Fn y, otras, mayores niveles de enzimas proteolíticas, que podrían actuar sobre la Fn o sus receptores, debilitando así la interacción célula-MEC. Estos fenómenos conducirían a un fenotipo transformado que se caracteriza por una adhesión reducida, una morfología mas redondeada y un citoesqueleto desorganizado.

5.- Trombosis y hemostasis: La Fn reacciona con fibrina quedando incorporada a los coágulos. Además, también participa en la agregación plaquetaria que se produce durante la coagulación. De hecho, las plaquetas en reposo no presentan Fn en superficie, sólo aparece tras la activación.

6.- Curación de heridas y fibrosis: Los depósitos de Fn y fibrina son importantes durante los fenómenos de curación de heridas, pues sirven como sustrato para la adhesión y migración de las células que reparan el daño tisular. En ocasiones, esta matriz es sustituida por otra formada por colágeno y Fn que no resulta siempre apropiada, caso en el que se origina una fibrosis. Además, en las heridas se ha detectado Fn cubriendo desechos celulares que después son fagocitados por los macrófagos. Así pues, la Fn participaría en la reparación del daño tisular y en la eliminación de los desechos originados por el mismo.

7.- Fagocitosis e interacción con microorganismos patógenos: Existen evidencias que indican que la Fn aumenta la fagocitosis, que está mediada por otros receptores presentes en monocitos, macrófagos o neutrófilos. Los receptores de factores del complemento y de la región Fc de Ig parecen activarse para la fagocitosis cuando se ocupa el receptor de Fn. Se ha especulado con la posibilidad de que la Fn pudiera funcionar "in vivo" como una opsonina no específica, capaz de promover la eliminación de diferentes materiales de la circulación. La Fn se puede unir a distintos microorganismos (bacterias y levaduras), y existen indicaciones de que esta unión pudiera tener importancia fisiológica.

8.- Adhesión celular: La función principal de la Fn es mediar adhesión celular. Se ha demostrado que la Fn adherida a sustrato media mejor adhesión que la Fn soluble; esto podría ser debido a un cambio conformacional durante el proceso de adhesión al sustrato, o bien sería un reflejo de la baja afinidad de las células por las moléculas de Fn aisladas, que se ve aumentada al inmovilizarse la proteína sobre el sustrato (fenómeno de polivalencia). La unión a Fn inmovilizada requiere la presencia de cationes divalentes y un metabolismo activo, aunque no se requiere la síntesis de proteínas.

Como se ha mencionado previamente, las secuencias responsables de esta interacción están situadas en las regiones central y carboxilo-terminal de la Fn respectivamente. En la región central la secuencia mediadora de adhesión es RGD aunque existen sitios sinérgicos que son necesarios para una adhesión celular estable (Yamada,

1991). En la región carboxilo-terminal se han identificado secuencias activas en el dominio Hep II (I, II, III, IV, V, H1) y en la región IIICS (Tabla I y Fig.3). Dentro de IIICS se han identificado dos sitios mediadores de adhesión: CS-1 (25 primeros aminoácidos) y CS-5 (residuos 90-109) (Humphries et al. 1987). Ambas regiones están reguladas por "splicing" alternativo. CS-1 es el sitio de mayor afinidad. Los receptores celulares que reconocen algunas de estas secuencias pertenecen a la familia de las Integrinas (ver a continuación).

TABLA I

<u>Sitios activos en Hep II</u>	<u>Secuencias</u>
III	YRVRVTPKEKTGPMKE
IV	SPRRRARVT
H1	IDAPS
V	WQPPRARI
I	YEKPGSPPREVVPRPRPGV
II	KNNQKSEPLIGRKKKT

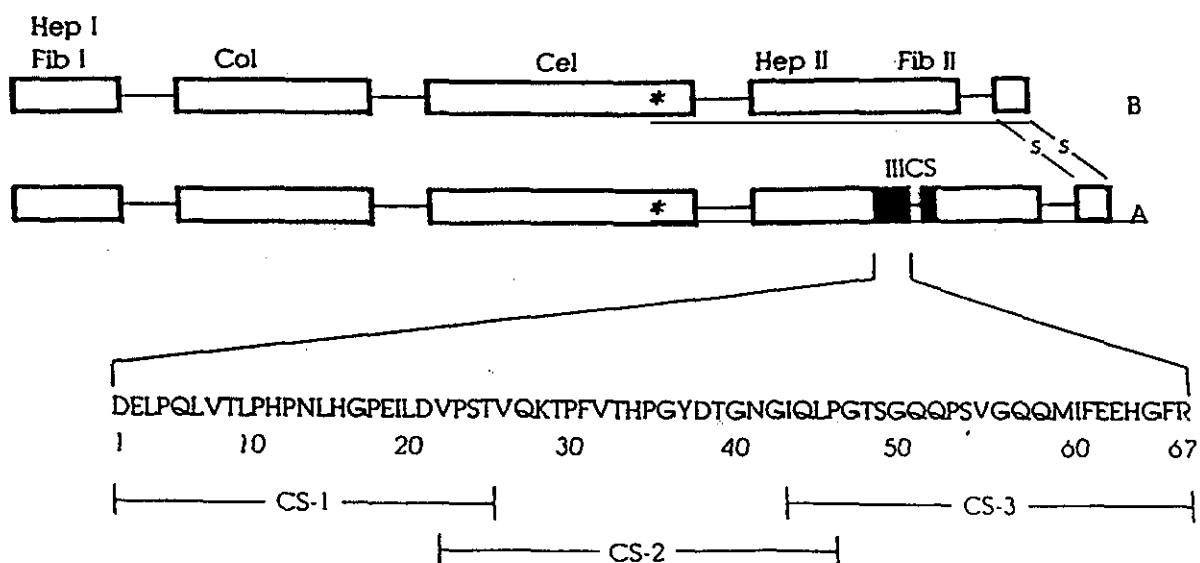


Fig.3.- Representación esquemática de la Fn plasmática. La posición de la secuencia RGD aparece indicada por el asterisco (*) dentro del dominio de unión celular; los sitios sinérgicos no están indicados. El dominio Hep II está presente en ambas cadenas. Sin embargo, la región IIICS sólo aparece en la cadena A de Fn; la secuencia CS-5 no figura porque no se ha detectado en cantidades apreciables en Fn plasmática.

1.3.- Moléculas de adhesión de superficie celular

Como ya se ha mencionado, las interacciones célula-MEC o célula-célula son importantes en migración y en el reconocimiento célula-célula y participan en numerosos procesos biológicos. Por ejemplo, las funciones de los linfocitos T en la respuesta inmune dependen de su contacto directo con otras células, y la extravasación y migración a los tejidos de los leucocitos se hace mediante la adhesión específica a determinados tipos celulares. La transición rápida entre estados adherentes y no adherentes tiene una importancia capital durante los fenómenos de vigilancia inmunológica. Estos mecanismos de adhesión se llevan a cabo por moléculas accesorias del sistema inmune.

Principalmente son tres las familias de moléculas de superficie celular que regulan la migración de los leucocitos y las interacciones entre células activadas durante la respuesta inmune:

- La superfamilia de las **Inmunoglobulinas**. Sus miembros poseen al menos un dominio de tipo inmunoglobulina, compuesto por 90-100 aa dispuestos en estructura de sandwich constituida por dos láminas formadas por cadenas β antiparalelas, estabilizada por un puente disulfuro. Esta familia incluye las moléculas siguientes: LFA-2, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, TCR, CD3, CD4, CD8 y moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

- La familia de las **Selectinas**. Son muy importantes en la interacción de leucocitos con el endotelio vascular; tienen en su estructura un dominio de tipo lectina (117-120 aa) en posición N-terminal, un dominio similar al EGF (*epidermal growth factor*) de 30-40 aa y varios dominios repetidos similares a los que existen en proteínas que regulan el complemento (SCR ó *short consensus repeat*). Esta familia incluye la L-selectina (Mel-14 o LAM-1), la E-selectina (CD62E o ELAM-1) y la P-selectina (PADGEM, CD2P o GMP-140); se expresan en leucocitos, endotelio, y endotelio y plaquetas, respectivamente.

- La familia de las **Integrinas**. Hasta el momento se han identificado 22 moléculas diferentes cuyas características más relevantes veremos en el siguiente capítulo.

1.4.- Familia de las Integrinas

Los miembros de esta familia de moléculas de adhesión "integran" el medio extracelular con el interior de la célula y están implicados en procesos de adhesión célula-célula y célula-MEC; juegan un importante papel a lo largo del desarrollo y la vida adulta y están ampliamente distribuidas -la mayoría de las integrinas se expresan en gran variedad de células y la mayoría de las células expresan varias integrinas- (Hynes, 1992)

Las integrinas son glicoproteínas de membrana; cada una es un heterodímero formado por una subunidad α (120-180 kDa) y una subunidad β (90-110 kDa) unidas de forma no covalente. Presentan un dominio extracelular que interacciona con su ligando específico, una región transmembrana y una cola citoplasmática (Fig.4).

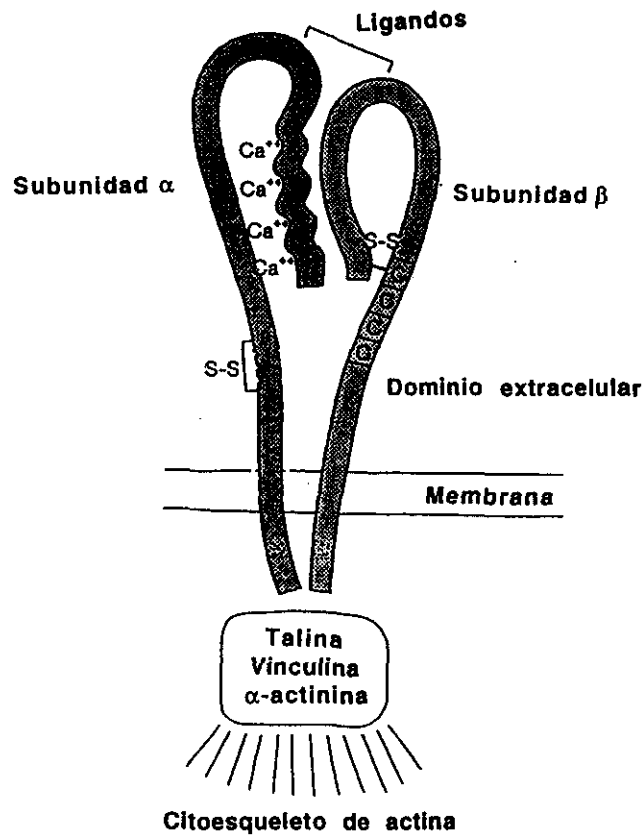


Fig. 4.- Modelo de la estructura de las integrinas. (Adaptado de McDonald, J.A. and Mechan, R.P. 1991).

En la actualidad se han descrito hasta 14 subunidades α y 8 subunidades β (Tabla II), y aunque teóricamente se podrían asociar dando lugar a más de 100 combinaciones $\alpha\beta$, la diversidad parece estar restringida. Tradicionalmente se han definido tres subfamilias según la cadena β que comparten ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$), aunque algunas subunidades α pueden asociarse con más de una subunidad β ; αv es particularmente promiscua en este sentido. Además, la existencia de variantes reguladas por "splicing alternativo" añade un nivel más de complejidad; este tipo de regulación se ha descrito para el dominio citoplasmático de las subunidades $\beta 1, \beta 3, \beta 4, \alpha 3$ y $\alpha 6$ (Sonnenberg, 1993) y para el dominio extracelular de αM . La Tabla II muestra el nombre común de los distintos heterodímeros, así como sus respectivos ligandos; puede observarse que una integrina, a menudo, une más de un ligando y cada ligando puede ser reconocido por más de una integrina.

TABLA II**RECEPTORES DE LA FAMILIA DE LAS INTEGRINAS**

Subunidades		Nombres	Ligandos
$\beta 1$	$\alpha 1$	VLA-1, CD49a/CD29	LN, COL
	$\alpha 2$	VLA-2, CD49b/CD29	LN, COL, FN
	$\alpha 3$	VLA-3, CD49c/CD29	LN, COL, FN, EPN
	$\alpha 4$	VLA-4, CD49d/CD29	FN, VCAM-1, TSP, IVN
	$\alpha 5$	VLA-5, CD49e/CD29	FN, TSP
	$\alpha 6$	VLA-6, CD49f/CD29	LN, FN
	$\alpha 7$	VLA-7	LN
	$\alpha 8$	VLA-8	
	$\alpha 9$	VLA-9	
	αV		FN, VN, COL, FG, vWF
$\beta 2$	αL	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	αM	MAC-1, CD11b/CD18	ICAM-1, FG, C3bi, F. X
	αX	p150/95, CD11c/CD18	C3bi, FG
$\beta 3$	αIIb	gpIIb/IIIa, CD41a	FN, FB, vWF, VN
	αV	VNR, CD51	VN, vWF, FB, FN, TSP
$\beta 4$	$\alpha 6$	VLA-6alt	LN
$\beta 5$	αV	VNRalt	VN
$\beta 6$	αV		FN
$\beta 7$	$\alpha 4$	LPAM-1	FN, VCAM-1, MadCAM-1
	αE	$\alpha IEL\beta 7$	
$\beta 8$	αV		

LN (laminina), COL (colágeno), FN (fibronectina), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), TSP (trombospondina), FG (fibrinógeno), vWF (factor von Willebrand), ICAMs (*intercellular adhesion molecules*), C3bi (factor del Complemento), VN

(vitronectina), EPN (epilegrina), MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*), INV (invasin).

Las subfamilias $\beta 1$ y $\beta 3$ están principalmente implicadas en el reconocimiento de proteínas de matriz extracelular (LN, COL, VN, TSP, Fn). La **subfamilia $\beta 1$** también se conoce como familia VLA (*very late after activation antigens*) ya que los dos primeros miembros descritos, $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$, aparecían en la superficie de los linfocitos de 2 a 4 semanas después de la activación "in vitro" con el antígeno. La Tabla II resume los miembros que actualmente forman esta subfamilia: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ son receptores prototipo de colágeno, fibronectina y laminina respectivamente; otros, como $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$, pueden unir más de un componente de MEC; $\alpha 4\beta 1$ es un miembro excepcional ya que está implicado en interacciones célula-célula y célula-MEC. A esta integrina se dedica el apartado siguiente por ser tema central de esta tesis. Los miembros de la **subfamilia $\beta 3$** también se conocen como citoadhesinas: $\alpha \text{IIb}\beta 3$ se considera como el receptor prototipo de esta familia y se expresa sólo en plaquetas y megacariocitos; $\alpha \text{v}\beta 3$ es otro miembro de esta familia y aparece ampliamente distribuido.

La **subfamilia $\beta 2$** está implicada en procesos de interacción célula-célula fundamentalmente. Los miembros de esta subfamilia se expresan exclusivamente en leucocitos, aunque el nivel de expresión varía según el tipo celular, el nivel de activación y el grado de diferenciación celular; tienen un papel importante en la extravasación de los leucocitos. De hecho, la patología LAD (*leucocyte adhesion deficiency*), en la cual existe una expresión defectuosa de la cadena $\beta 2$, se caracteriza por la falta de extravasación de neutrófilos y monocitos.

La región de unión al ligando de las integrinas está en la zona extracelular y esta formada tanto por la cadena α como por la β , la interacción requiere cationes divalentes en el medio.

Por otro lado, las integrinas interaccionan en su zona citoplasmática con proteínas del citoesqueleto (Fig.4) jugando así un importante papel en la conexión del citoesqueleto con la membrana plasmática. Los filamentos de actina están anclados en la membrana plasmática en los llamados contactos focales o placas de adhesión que además de las integrinas contienen varias proteínas citoplasmáticas como por ejemplo vinculina, talina, y α -actinina (Burridge et al. 1988). Se sabe que el dominio citoplasmático de la subunidad $\beta 1$ interacciona con talina y α -actinina. La secuencia de uniones sería: talina-vinculina- α -actinina-actina, aunque también podría interaccionar con α -actinina directamente (Otey et al. 1990). Los contactos focales contienen otras proteínas como paxilina, tensina y zyxin (Sonnenberg, 1993). A pesar de que las integrinas $\beta 1$ contienen todos los sitios para la interacción con los componentes del citoesqueleto, no se localizan en los contactos focales a menos que se hayan unido a sus ligandos extracelulares. Así $\alpha 5\beta 1$ se localiza en los contactos focales sobre Fn mientras que $\alpha 2\beta 1$ se localiza en los contactos focales cuando

las células crecen sobre COL tipo I. No existen evidencias de la interacción directa de la cadena α con proteínas de citoesqueleto. Parece que hasta que la integrina se piensa que la integrina no está unida a sus ligandos, la subunidad α previene la asociación de la subunidad β con los componentes del citoesqueleto. Su función podría ser regular los tipos de interacción de la cadena β con el citoesqueleto (Sonenberg, 1993).

De esta forma, tras la unión a las proteínas de MEC, las integrinas interaccionan con el citoesqueleto e inducen su reorganización. El patrón de citoesqueleto generado es función de la información extracelular y del sistema de lectura intracelular que comienza con la interacción específica entre los dominios citoplasmáticos de las subunidades α y β , u otros receptores de adhesión, y proteínas intracelulares. El proceso de reorganización de citoesqueleto que se ha estudiado más extensivamente es la formación de contactos focales que tiene lugar tras la adhesión de fibroblastos a fibronectina y vitronectina via $\alpha 5 \beta 1$ (Sonenberg, 1993). El patrón de citoesqueleto formado influye en la adhesividad, en la forma celular y en la movilidad, y también podría influir en la propagación de señales reguladoras mediadas por integrinas (Damsky and Werb, 1992; Humpries et al. 1993)

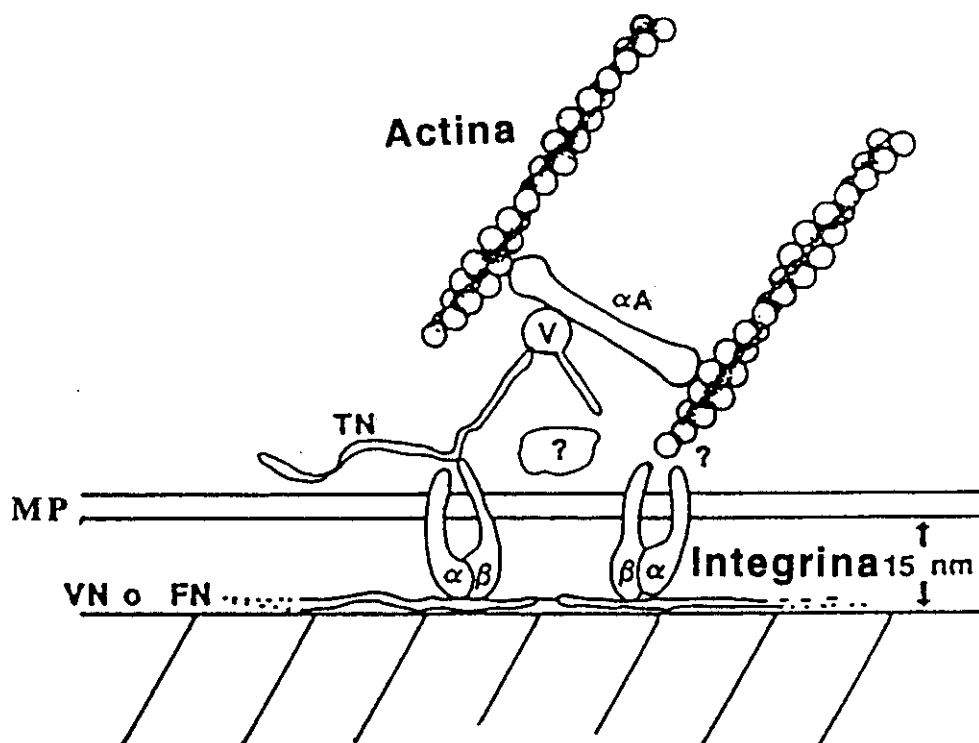


Fig. 5.- Representación esquemática de la interacción de las integrinas con las proteínas del citoesqueleto.

1.5.- Integrina $\alpha 4\beta 1$

El heterodímero $\alpha 4\beta 1$ está compuesto por una cadena de 150 kDa ($\alpha 4$) unida no covalentemente a una cadena de 130 kDa ($\beta 1$). La asociación de ambas cadenas es necesaria para la expresión del heterodímero en la superficie celular. La subunidad $\beta 1$, común para las proteínas VLA, se ha clonado y secuenciado (Hemler et al. 1987). De igual modo, la estructura primaria de la subunidad $\alpha 4$, presumiblemente responsable de determinar la especificidad de ligando del complejo $\alpha 4\beta 1$, también se ha determinado (Takada et al. 1989).

La subunidad $\alpha 4$ está codificada por un sólo gen localizado en el brazo largo del cromosoma 2 y presenta un 17-24% de similitud con otras cadenas α . Consta de 7 dominios homólogos de 30-41 aa repetidos en el extremo N-terminal de la molécula. Dentro de los dominios V, VI y VII aparecen tres sitios de unión de cationes divalentes. La subunidad $\alpha 4$ contiene 12 sitios de N-glicosilación y 24 cisteínas. Además, no presenta el dominio I, tan característico de otras subunidades α , insertado en la porción N-terminal de la molécula, ni cadenas cortas asociadas en la porción C-terminal. Otra característica que diferencia $\alpha 4$ de otras subunidades α es la presencia de un punto de rotura aproximadamente en la mitad de la secuencia, que es el responsable de la aparición de dos fragmentos de la cadena de $\alpha 4$. Las técnicas de marcaje e inmunoprecipitación usando Acm anti- $\alpha 4$ o anti- $\beta 1$ se han utilizado para estudiar la estructura molecular de $\alpha 4\beta 1$. Así se han identificado las siguientes formas de esta subunidad: una forma intacta de 150 kDa y una forma rota conteniendo dos fragmentos de 80 kDa (N-terminal) y 70 kDa (C-terminal) respectivamente (Fig.6). Además de estas dos formas, se ha identificado otra forma de 180 kDa.

La cadena $\beta 1$ presenta un 44% de similitud con otras subunidades β y un 82-90% de identidad con subunidades $\beta 1$ de otras especies. Estos datos indican que $\beta 1$ es una molécula altamente conservada que presumiblemente posee importantes funciones. Es una proteína de 778 aa; su cola citoplasmática consta de 47 residuos e interacciona con proteínas de citoesqueleto como talina y α -actinina. La cola citoplasmática puede sufrir fosforilación, lo cual puede afectar a la asociación de la integrina con el citoesqueleto así como su localización en los contactos focales. $\alpha 4$ además de asociarse con la subunidad $\beta 1$, también puede hacerlo con la subunidad $\beta 7$; $\alpha 4\beta 7$ se identificó como receptor de "homing" para la Placas de Peyer (Holzman et al. 1989) y se expresa en células T CD4+ en reposo, linfocitos T de sangre periférica activados con PMA, linfocitos B de sangre periférica, líneas celulares B y células premonocíticas U937 activadas con PMA. $\alpha 4\beta 7$ reconoce como ligando principal MadCAM-1. Además, como muestra la Tabla II reconoce también la Fn (sitio CS-1) y VCAM-1.

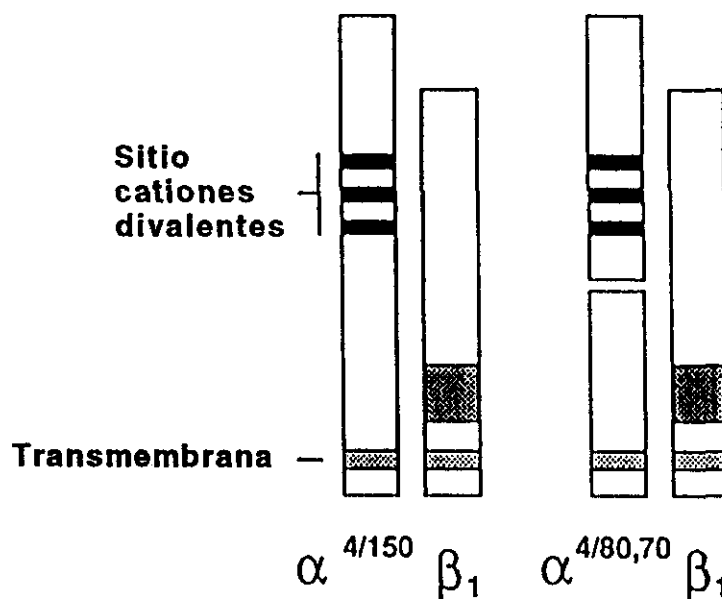


Fig.6.- Representación esquemática de la integrina $\alpha 4 \beta 1$. (Adaptado de Teixido and Sánchez-Madrid, 1993).

La integrina $\alpha 4 \beta 1$, se expresa en la superficie de linfocitos B y T, monocitos, basófilos, eosinófilos, mastocitos maduros y precursores de médula ósea (Teixido and Sánchez-Madrid, 1993). De entre las células originarias de la médula ósea, sólo los neutrófilos, plaquetas y eritrocitos no expresan $\alpha 4 \beta 1$.

Las poblaciones de linfocitos T (LT) vírgenes y de memoria difieren en la expresión de $\alpha 4 \beta 1$; en el primer caso la expresión es homogénea y baja y en el segundo caso es heterogénea y más alta (Picker et al. 1990; Horgan et al. 1992). La población de timocitos dobles negativos expresan mayores niveles de $\alpha 4 \beta 1$ que la población de timocitos dobles positivos y simples positivos (Sawada et al. 1992). Asimismo, los linfocitos T activados presentan mayores niveles de expresión de $\alpha 4 \beta 1$ y otras integrinas (Sánchez-Madrid et al. 1986; Hemler et al. 1990).

En los linfocitos B la expresión de $\alpha 4$ varía en los procesos de diferenciación y activación (Postigo et al. 1991). Las líneas celulares linfoides y mieloides son positivas para $\alpha 4 \beta 1$, mientras que los tipos celulares adherentes tales como fibroblastos y células epiteliales expresan muy débilmente o en absoluto $\alpha 4 \beta 1$. Ciertas líneas celulares de melanoma y carcinoma también expresan $\alpha 4 \beta 1$.

Como ya se ha mencionado, la integrina $\alpha 4 \beta 1$ es un miembro excepcional de la subfamilia $\beta 1$ ya que está implicada en interacciones célula-célula y célula-MEC. Como muestra la Tabla II los ligandos descritos de $\alpha 4 \beta 1$ son Fn, VCAM-1, TSP, e invasin.

1.- En la Tabla III se muestran las secuencias activas de la región carboxilo-terminal de Fn capaces de interaccionar con $\alpha 4 \beta 1$

TABLA III

<u>Sitios activos</u>	<u>Secuencias</u>
H1	IDAPS
I	YEKPGSPPREVVPRPRPGV
II	KNNQKSEPLIGRKKT
CS-1	DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST
CS-5	GEEQIQIHIPREDVDYHLYP

Las secuencias H1, I y II, pertenecen al dominio Hep II y se describieron como sitios capaces de interaccionar con $\alpha 4\beta 1$ en células de melanoma (McCarthy et al., 1988; Mould and Humphries, 1991b; Iida et al., 1992). Los sitios CS-1 y CS-5 también son ligandos de $\alpha 4\beta 1$ (Wayner et al. 1989; Ferreira et al. 1990; García-Pardo et al. 1990; Mould et al 1990; Guan et al. 1990), pertenecen a la región IIICS y las secuencias mínimas capaces de mediar adhesión se indican en negrita (Mould et al. 1991a; Komoriya et al., 1991; Wayner et al. 1992). Estudios recientes, incluyendo los de nuestro laboratorio, parecen indicar que el reconocimiento de unas u otras secuencias por parte de $\alpha 4\beta 1$ dependería del tipo celular, esto es, linfocitos T, B y monocitos, así como del estado de activación del receptor.

2.- VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) (Elices et al.1990) es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa en células endoteliales activadas (Polte et al.1990; Cybulsky et al. 1991a). Existen diferentes formas de VCAM-1 reguladas por "splicing" alternativo; varían en el número de dominios de Ig. La forma predominante en células endoteliales contiene 7 dominios de Ig (VCAM-1 7D) (Cybulsky et al. 1991a, 1991b; Hession et al. 1991), y difiere de la forma originalmente descrita, VCAM-1 6D en un dominio de Ig adicional entre el tercer y el cuarto dominio. Tanto VCAM-1 7D como 6D median adhesión via $\alpha 4\beta 1$. Mediante experimentos de adhesión se ha demostrado que los dominios homólogos 1 y 4 de VCAM-1 se requieren para la interacción con $\alpha 4\beta 1$.

Además, $\alpha 4\beta 1$ es el receptor de trombospondina (TSP) que es una glicoproteína presente en plasma (Yabkowitz et al. 1993) y de la proteína bacteriana invasín (Ennis et al. 1993). Por otra parte se ha descrito también como mediadora de agregación celular homotípica a través de un mecanismo LFA-1/ICAM-1 independiente, sugiriéndose la existencia de otro ligando celular para $\alpha 4\beta 1$ aún no identificado (Campanero et al. 1990; Bednarczyk 1990; Caixia et al. 1991).

1.6.- Regulación funcional de las integrinas

Las células pueden variar sus propiedades adhesivas por medio de la expresión selectiva de las distintas integrinas que existen, e incluso pueden modular la capacidad adhesiva de los receptores que están expresando -una misma integrina que esté presente en distintos tipos celulares puede no reconocer los mismos ligandos-. La expresión superficial de una integrina no implica su funcionalidad como molécula capaz de mediar adhesión.

La afinidad de las integrinas por sus ligandos no es siempre constante, esto es, las integrinas existen en varios estados de activación. Hay numerosos ejemplos descritos que muestran cómo la avidéz puede ser modulada de forma rápida y reversible -fenómenos de activación y desactivación-. La naturaleza transitoria de estos fenómenos es probablemente un importante mecanismo para liberar los linfocitos de otras células y permitir de forma repetida la unión/liberación celular (Teixido and Sánchez-Madrid, 1993).

La activación de plaquetas, neutrófilos y linfocitos por diferentes estímulos aumentan la avidéz de las integrinas $\beta 3$, $\beta 2$ y $\beta 1$ por sus ligandos (Springer, 1990; Hemler, 1990; Hynes, 1992). Los mecanismos de adhesión dependientes de activación se han descrito para $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ en células T (Shimizu et al 1990). También las células B activadas se unen con mayor avidéz a VCAM-1 y Fn, vía $\alpha 4\beta 1$, que las células B en reposo (Freedman et al. 1990; Postigo et al. 1991; Koopman et al. 1991). Un efecto regulador similar se ha descrito para $\alpha 4\beta 7$ en células T y B activadas. Además, esta regulación ocurre "in vivo", como han demostrado algunos estudios sobre la función de $\alpha 4\beta 1$ en células T aisladas de sinovio inflamado en pacientes con artritis reumatoide (Laffón et al. 1991; Postigo et al. 1992). Los mecanismos moleculares que conducen a los procesos de activación de integrinas no se conocen totalmente. Es posible que la activación de integrinas dependa de un cambio conformacional en los sitios de unión a ligandos. Estos cambios podrían ser señalizados por los dominios citoplasmáticos de las integrinas, quizá debido a interacciones con otras proteínas del citoesqueleto. Parece que la actividad de unión de una integrina depende del dominio citoplasmático de la subunidad β mientras su función podría ser regulada por el dominio citoplasmático de la subunidad α (Sonnenberg, 1993). Se ha demostrado la existencia de cambios conformacionales en integrinas solubles cuya afinidad puede ser modulada por Acm, así como por ligandos fisiológicos (O'Toole et al. 1990; Du X et al. 1991; Arroyo et al. 1993). En este contexto, la cadena $\beta 1$ regula la afinidad de diferentes heterodímeros $\alpha\beta 1$, incluyendo $\alpha 4\beta 1$ (Arroyo et al. 1992; Kovach et al. 1992; Faull et al. 1993; Masumoto et al. 1993). Todos estos datos parecen indicar que la interacción de las integrinas $\beta 1$ con sus ligandos puede ser regulada por el cambio entre conformaciones diferencialmente activas de los receptores $\alpha\beta 1$.

Para algunas integrinas se ha sugerido una relación entre fosforilación y su función como receptor de adhesión (Sonnenberg, 1993). Una cuestión a resolver es si la fosforilación juega un papel importante en la interacción de las integrinas con componentes citoplasmáticos. Aunque se ha publicado la fosforilación de las proteínas talina, vinculina y paxilina en células tratadas con PMA, no está claro si la asociación de integrinas realmente depende de la fosforilación de talina u otros componentes del citoesqueleto. También se tienen datos sobre ciertos lípidos que pueden regular la actividad de las integrinas (Sonnenberg, 1993).

La estimulación con PMA, puede producir la activación de las integrinas pudiendo entonces unirse a sus ligandos. Distintos trabajos han documentado que la unión de las integrinas a sus ligandos conduce a un cambio conformacional en el dominio extracelular del receptor. Estos cambios resultarían en la expresión de nuevos epítomos capaces de ser detectados por Acms. Se podría pensar que la unión a ligandos también podría inducir un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de la subunidad β o incluso en la subunidad α . Otras proteínas citoplasmáticas podrían, de esta forma, interaccionar con la subunidad β estableciéndose así la unión con el citoesqueleto.

También se han descrito mecanismos de activación independientes de PMA que incluyen tratamientos de integrinas con ciertos cationes divalente como Mn^{2+} , Ac contra distintas subunidades, o con péptidos que contienen secuencias activas de los ligandos (Sonnenberg, 1993). La activación inducida por estos agentes podría mimetizar el cambio conformacional de las integrinas.

1.7.- Transmisión de señales a través de las integrinas.

La adhesión a la MEC conduce a cambios en la morfología celular y la organización del citoesqueleto y afecta a funciones celulares como proliferación y diferenciación. Aunque durante un tiempo se consideró que las interacciones celulares con la MEC eran puramente mecánicas, actualmente existen evidencias de la implicación en la señalización desde el exterior al interior celular.

Las primeras evidencias mostraron que la expresión génica se modificaba tras la adhesión a proteínas de MEC o tratamientos celulares con Ac anti-integrinas. (Eiermen et al. 1989; Werb et al. 1989; Haskill, 1991; Juliano and Haskill, 1993). Aunque las rutas de señalización que conducen a estos eventos se están estudiando, aún se desconocen los mecanismos precisos por los que se transmiten señales vía integrinas. Entre los ejemplos descritos de control de la expresión génica a través de interacciones adhesivas con la MEC se puede citar la inducción de expresión de genes de metaloproteasas subsiguiente a la adhesión de células fibroblásticas a fragmentos de Fn y Ac anti- $\alpha 5$. Sin embargo, el caso más dramático de inducción génica a través de interacciones adhesivas con MEC sucede en monocitos; estas células sufren un cambio rápido en el patrón de expresión

génica tras la adhesión a proteínas de MEC (Juliano and Haskill, 1993). La interacción de $\alpha 5 \beta 1$ con Fn en células T induce el factor de transcripción AP-1 (Yamada et al. 1991). $\alpha 4 \beta 1$ en monocitos actúa como una primera molécula produciendo una señal capaz de regular la expresión de genes de citoquinas inflamatorias (Yurochko et al. 1992).

Como ya se ha mencionado, el dominio citoplasmático de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas interacciona con elementos del citoesqueleto en los contactos focales. Otras proteínas con funciones reguladoras o enzimáticas se localizan también en los contactos focales y podrían ser importantes en la transducción de señales mediadas por adhesión. Estas proteínas incluyen isoformas específicas de pKC, pp60^{scr}, así como otras tirosina quinasas. Estas probablemente sean activas en los contactos focales por el alto nivel de proteínas fosforiladas en tirosina que se detectan en estos sitios (Defilipi et al. 1994).

Además, las rutas de señalización identificadas mediadas por integrinas incluyen la regulación de la bomba Na^+/H^+ , el flujo de Ca^{2+} , estimulación de la síntesis de lípidos y fosforilación en tirosina de una proteína de 130 kDa que se denominó pp125^{fak} y se localiza especialmente en los contactos focales (Teixido and Sánchez-Madrid, 1993).

2.- OBJETIVOS

OBJETIVOS

Las interacciones de los leucocitos con la matriz extracelular (MEC) son fundamentales para su migración y localización en tejidos, así como para el desarrollo y la función general de estas células.

La interacción de los leucocitos con el componente de MEC Fn está principalmente mediada por las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, que reconocen la secuencia RGD en la región central y los sitios CS1/Hep II en la región carboxilo-terminal de Fn respectivamente.

Sin embargo, se desconocen otros muchos aspectos sobre la interacción leucocitaria con Fn mediada por $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, por ejemplo los sitios adherentes adicionales implicados, regulación funcional de estos receptores y consecuencias intracelulares de estas interacciones.

Así, nos planteamos profundizar en el estudio de la interacción leucocito-Fn vía dichas integrinas y en este contexto nuestros objetivos concretos fueron:

1.- Estudio de la interacción de los leucocitos humanos con la región carboxilo-terminal de Fn:

- a.- Caracterización de nuevos Acm anti-Fn como instrumentos de trabajo en el estudio de interacciones celulares con Fn.
- b.- Estudio del reconocimiento del dominio Hep II de Fn a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ expresada en distintas poblaciones hematopoyéticas; análisis de la regulación funcional.

2.- Estudio de la interacción de los leucocitos humanos con la región central de fibronectina:

- a.- Identificación de nuevos ligandos en la molécula de Fn.
- b.- Análisis de los receptores celulares implicados y su regulación.

3.- Estudio de las consecuencias biológicas de la interacción de la integrina $\alpha 4\beta 1$ con sus ligandos en Fn:

- a.- Reorganización de las proteínas del citoesqueleto tras la interacción del receptor con distintos ligandos de Fn.
- b.- Análisis de los eventos de fosforilación posteriores a las interacciones citadas.

3.- MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

3.1.- Proteínas de matriz extracelular (MEC)

3.1.1.- Fibronectina, fragmentos de fibronectina y péptidos sintéticos

La **fibronectina** plasmática humana, donada por los Drs. B. Horowitz y R. Shulman (New York Blood Center, New York, NY), se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de gelatina-Sepharosa (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden). El eluido (fracción Urea 4 M) se dializó a 4°C frente a una solución Tris 25 mM, ClNa 50 mM, EDTANa₂ 0.5 mM pH 7,6 (en adelante solución Tris 25 mM) y se utilizó para obtener distintos fragmentos de Fn por digestión enzimática.

Los **fragmentos de 200, 190, 31 y 29 kDa** se obtuvieron por digestión suave de la Fn con tripsina (1:1000 w/w, 15 min, temperatura ambiente) y posterior purificación con una columna de gelatina-Sepharosa equilibrada en una solución Tris 25 mM. Los fragmentos unidos a dicha columna -200 y 190 kDa- se eluyeron con una solución Tris 25 mM, Urea 4 M y se purificaron posteriormente con una columna de Sephacryl S-200 (Pharmacia); los fragmentos no unidos a la columna de gelatina -Sepharosa -29 y 31 kDa- se separaron, a continuación, con una columna de heparina-Sepharosa (Pharmacia) (el fragmento de 31 kDa aparece en la fracción no unida y el fragmento de 29 kDa en la fracción eluida con ClNa 0.15 M). Por último, una columna de DEAE-Sephacel permitió la purificación final del fragmento de 31 kDa.

Los fragmentos de Fn de **80, 58 y 38 kDa** se obtuvieron a partir de digestiones más exhaustivas de Fn con tripsina (1:200 w/w, 90 min, a 37°C). La aplicación del digerido por cromatografía de afinidad en columnas de heparina-Sepharosa permitió eluir:

- los fragmentos de 80 kDa en la fracción de ClNa 0.1 M.
- los fragmentos de 38 y 58 kDa en la fracción de ClNa 0.5 M.

Posteriormente, el fragmento de 80 kDa se purificó utilizando una columna de gelatina-Sepharosa y otra columna de DEAE-Sephacel a continuación (fracción de ClNa 0.2 M); los fragmentos de 38 y 58 kDa se separaron por medio de una columna de DEAE-Sephacel que retiene el fragmento de 58 kDa pero no el de 38 kDa; el fragmento de 58 kDa se eluyó en la fracción de ClNa 0.08 M y se purificó posteriormente por FPLC (Pharmacia). Finalmente, el fragmento de 38 kDa, presente en la fracción no unida de DEAE-Sephacel, se purificó con una matriz de CM-Sephacex (Pharmacia) equilibrada en una solución Tris 10 mM, Urea 2 M, ClNa 50 mM pH 7.0. Tras la eliminación de los materiales no unidos, el fragmento de 38 kDa se separó de otros contaminantes por un gradiente de ClNa (50-300 mM) a través de esta columna.

Además, se han utilizado los fragmentos de **15 y 45 kDa** obtenidos a partir de la digestión del fragmento de 80 kDa con pepsina (1:100 w/w, 37°C, 1h) y posterior

purificación por FPLC utilizando una columna de intercambio iónico Mono Q (Pharmacia) equilibrada en Tris 10 mM pH 7.0 (buffer A). Los fragmentos unidos se eluyeron a partir de un gradiente de 45 min desde 100% A hasta 40%A-60%B (Tris 10 mM, ClNa 0.5 M pH 7.0). La concentración final de ClNa era 0.3 M.

Finalmente, los fragmentos purificados se dializaron frente a PBS, se concentraron en algunos casos y se almacenaron en alícuotas a -70°C. La caracterización y el control de la pureza de los fragmentos así obtenidos, se llevó a cabo por técnicas de SDS-PAGE, Western blots, ELISA, y secuenciación de la región N-terminal. Los términos FN38 /FN58 /FN80 o fragmentos de Fn de 38 kDa, 58 kDa y 80 kDa se utilizarán indistintamente a lo largo del texto.

Los **péptidos sintéticos** citados a continuación se utilizaron a lo largo del desarrollo de esta tesis y se encargaron a Bio-Synthesis D&I (Madrid, España):

- 1.- GRGDSPC
- 2.- GRGES
- 3.- DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPSTC (CS-1)
- 4.- PSTVQKTPFVTHPGYDTGNGIQLPG (CS-2)
- 5.- CIQLPGTSGQQPSVGQQMIFEEHGFR (CS-3)
- 6.- CGEEIQIGHIPREDVDYHLYP (CS-5)
- 7.- IDAPS (H1)

La secuencia GRGDSPC está incluida en la región central de Fn siendo capaz de mediar adhesión celular; la secuencia GRGES es una secuencia control. Los péptidos CS-1, CS-2, CS-3 y CS-5 están contenidos en la región IIICS de Fn (ver figura) y la secuencia IDAPS es un sitio activo incluido en el dominio Hep II.

3.1.2.- Laminina, Colágeno tipo I y Vitronectina

A lo largo del desarrollo de esta tesis se han utilizado otras proteínas de MEC como laminina y colágeno tipo I -en adelante LM y COL respectivamente- de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA). Además, se ha utilizado la proteína vitronectina (VN), donación de la Dra. Dejana (Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milán)

3.2.- Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales anti-Fn , P1F11 y P3D4, fueron producidos por inmunización de ratones RBJ/DnJ con el péptido sintético CS-1 (DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST) (Humphries et al. 1987) acoplado a hemocianina de Keyhole Limpet - KLH -, o con el fragmento de 38 kDa respectivamente, utilizando

técnicas previamente descritas (Wayner et al. 1989). Los anticuerpos policlonales frente al fragmento de 38 kDa se obtuvieron por inyección subcutánea de conejos New Zealand White con el fragmento purificado.

A continuación, la Tabla I resume otros Acm anti-Fn utilizados en esta tesis así como Acm anti-integrinas y otros no incluidos en los dos grupos anteriores.

TABLA I

ANTICUERPOS MONOCLONALES

<u>Anti-integrinas</u>	<u>Especificidad</u>	<u>Origen</u>
IIF5	$\alpha 3$	Dr. M. Hemler
P1B5	$\alpha 3$	Dra. E. Wayner
HP1/1	$\alpha 4$ (epitopo A)	Dr. F. Sánchez-Madrid
HP1/2	$\alpha 4$ (epitopo B1)	Dr. F. Sánchez-Madrid
HP2/1	$\alpha 4$ (epitopo B1)	Dr. F. Sánchez-Madrid
HP2/4	$\alpha 4$ (epitopo B2)	Dr. F. Sánchez-Madrid
B5G10	$\alpha 4$ (epitopo C)	Dr. M. Hemler
P1D6	$\alpha 5$	Dra. E. Wayner
LM609	$\alpha v \beta 3$	Dr. D. Cheresh
TS2/16	$\beta 1$	Dr. F. Sánchez-Madrid
Alex1/4	$\beta 1$	Dr. F. Sánchez-Madrid
HC1/1	CD11c	Dr. C. Bernabeu
<u>Anti-Fn</u>		
N-295	fragmento 15 kDa (RGD+)	Chemicon y Dr. J. McDonald
N-296	región carboxi-terminal	Chemicon
N-288	N-terminal	Chemicon
<u>Otros</u>		
D3/9	CD45	Dr. C. Bernabeu

3.3.- Células y cultivos celulares

Se han utilizado tanto líneas celulares establecidas como células obtenidas de sangre periférica de donantes sanos. Todas las líneas celulares han sido cultivadas en medio RPMI 1640, 10 % STF descomplementado (Gibco Life Technologies, Middlesex, UK), 2

mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina (Antibióticos S.A., Madrid, España), y 24 mg/ml gentamicina (Llorente, Madrid, España). Las células THP-1 se mantuvieron en el mismo medio suplementado con 50 mM 2-ME. La Tabla II muestra las líneas celulares utilizadas a lo largo del desarrollo de esta tesis indicando su origen. Los experimentos de inducción de diferenciación con PMA se realizaron en frascos de Teflon (Pierce, Rockford, IL); 5×10^5 células/ml se incubaron con 10 ng/ml de PMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 48 h. Los cambios morfológicos característicos (formación de agregados) y la expresión incrementada de la molécula CD11c se emplearon como control de la eficacia del tratamiento con PMA en la inducción de diferenciación celular.

Los linfocitos y monocitos de sangre periférica se obtuvieron de la sangre de donantes sanos; después de la centrifugación en gradiente de densidad en Lymphoprep (Nycomed), las células mononucleares se depleccionaron de células adherentes por incubación (2 h a 37°C) en frascos de plástico previamente tapizados con suero. Los linfocitos T se obtuvieron a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) utilizando columnas de lana de nylon.

TABLA II

LINEAS CELULARES

<u>Denominación</u>	<u>Origen</u>
Ramos	linfoide B
HUT-78	linfoide T
U937	promonocítica
HL-60	promonocítica
THP-1	promonocítica
Daudi	linfoide B
JY	linfoide B
RPMI8866	linfoide B
A375	melanoma
K562	eritroleucemia
Jurkat	linfoide T

3.4.- Ensayos de adhesión celular

Los ensayos de adhesión celular se llevaron a cabo con células después de cuatro días del último pase utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano (ICN Biomedicals Ltd, Bucks, UK en algunos casos, y en otros Costar Co., Cambridge, MA, USA). Las placas de 96 pocillos se incubaron con las diluciones apropiadas (100 µl / pocillo) de Fn o sus fragmentos, u otras proteínas de MEC, durante 2 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS, las placas se incubaron con 1% BSA en PBS al menos 1 h a 37°C, y se lavaron nuevamente con PBS-iones (Cl_2Ca 0.9 mM, Cl_2Mg 0.5 mM) antes de añadir 100 µl de la suspensión celular apropiada - 0.5×10^6 células / ml en RPMI, 1% BSA, 10 mM Hepes-. Las placas se incubaron durante 30 min en estufa a 37°C y después de dos lavados con RPMI, 10 mM Hepes, las células adheridas se fijaron con glutaraldehído (1,25%) durante toda la noche. La absorbancia de las células teñidas durante 4 h con azul de toluidina - 0,1% - se midió a 492 nm con un lector MRPA 4 (Eurogenetics, Bélgica) en los primeros experimentos y a 620 nm con un lector Multiskan Biochromatic (Labsystems, Helsinki, Finland) en el resto de los casos. La cuantificación de las células adheridas se realizó a partir de la DO a 492 nm ó 620 nm, según los casos, utilizando curvas de calibración para cada tipo celular. La relación "numero de células / DO" resultó ser lineal en el rango celular 0.5×10^3 - 2.5×10^4 para las líneas celulares -con mínimos cambios entre ellas- y en el rango 3.2×10^3 - 2×10^4 para los linfocitos T de sangre periférica. Todos los ensayos se realizaron en triplicado.

La activación de integrinas a través de la subunidad $\beta 1$ se llevo a cabo por incubación celular previa con una dilución 1:10 de los sobrenadantes de hibridomas Acm(s) anti- $\beta 1$, 15-20 min a 37°C, antes de los ensayos de adhesión celular. Para los experimentos de inhibición con Acm(s) anti-Fn, los pocillos previamente tapizados con Fn se incubaron 30 min a temperatura ambiente con 50 µl de la dilución adecuada de los Acm correspondientes antes de añadir las células. Para el resto de ensayos de inhibición las células se incubaron previamente con Acm anti-integrinas (15 min, 37°C), péptidos sintéticos o fragmentos de Fn (30 min, temperatura ambiente) antes de añadirse a los pocillos tapizados con los distintos sustratos.

3.5.- Ensayos de ELISA y Western Blot

Las placas de 96 pocillos (Corning Glass Works, New York, USA ó Costar Co.) se tapizaron con Fn (5 µg/pocillo), 58 kDa (2 µg/pocillo) o 38 KDa (1 µg/pocillo) en PBS o borato sódico, según los casos, a 4° durante toda la noche. Las placas se lavaron repetidas veces con PBS, 0.05% Tween 20, y se incubaron con PBS, 1% BSA 1 h a

37°C. A continuación, se lavaron y se incubaron con las diluciones adecuadas de los distintos anticuerpos. Tras 1h a temperatura ambiente, las placas se lavaron nuevamente con PBS /Tween y se incubaron otra hora con una dilución 1:1000 de Anticuerpo anti-Igs de ratón marcado con peroxidasa (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark). Las placas se lavaron y se revelaron con 1,2-Phenylendiamine dihydrochloride (OPD) en una solución de ácido cítrico 0.1 M pH 5; después de 15 min, se midió la absorbancia a 492 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

3.6.- Estudios de inmunofluorescencia

Para análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo, una cantidad de 5×10^5 células se incubó durante 30 min a 4°C con 100 µl de la dilución apropiada de cada anticuerpo. Las células se lavaron con una solución fría de PBS, 1% BSA, 10 mM Azida Sódica y se incubaron con 100 µl de una dilución 1/100 del segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína - fragmentos $F(ab')_2$ de IgG de conejo anti-ratón - (Dakopatts). Después de 30 min a 4°C, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS y finalmente se analizaron por citometría de flujo en un contador EPICS-CS (Coulter Científica, Móstoles, Spain)

Los análisis con microscopia de fluorescencia se realizaron preincubando cubres circulares de 12 mm de diametro (Chance Propper, Smethwich, Warley, England) con distintos fragmentos de Fn durante toda la noche a 4°C; los cubres se lavaron con PBS y se incubaron con 1% BSA en PBS (1h a 37°C). Después de 2 lavados con PBS las células, resuspendidas en RPMI 1% BSA 10 mM Hepes, se añadieron sobre los cubres tapizados de fragmentos de Fn y se incubaron durante distintos tiempos a 37°C. Las células se fijaron con formaldehído 3.7% en PBS y se permeabilizaron, sólo en algunos casos, con 0.5% Triton X100 en PBS. Las células, teñidas con distintos Acms primarios diluídos en PBS-azida 1% BSA durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS, y se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína y/o Phalloidin-Rodamina durante 30 min a 37°C. Finalmente, los cubres se lavaron con PBS y se montaron utilizando mowiol 4-88 (Aldrich). Las células se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot equipado con una lampara de mercurio de 100 W y filtros para luz ultravioleta, verde y roja, se utilizaron carretes de 400 ASA Kodak Ektacrome. Los experimentos de inhibición se realizaron preincubando los cubres tapizados con fragmentos de Fn con los distintos anticuerpos anti-Fn.

3.7.- Inmunoprecipitación y electroforesis

Para el marcaje de superficie con ^{125}I las células previamente lavadas con RPMI se resuspendieron en PBS, PMSF 0.2 mM a una dilución de 1×10^6 células /ml; se añadieron 200 μl de lactoperoxidasa (1 mg /ml en PBS), 1 mCi de ^{125}I y 20 μl de H_2O_2 , y se incubó 5 min en hielo.

Las células marcadas se lavaron con PBS /PMSF y se lisaron con solución de lisis en condiciones de asociación (PBS pH 7.4, 1% triton, 3 mM PMSF, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1% BSA, aprotinin, leupeptin, pepstatin) y disociación (PBS pH 7.4, 2% triton, 3 mM PMSF, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1% BSA, aprotinin, leupeptin, pepstatin) del heterodímero $\alpha\beta$ (30 min a 4°C); los sobrenadantes se preincubaron con complejos de anticuerpos irrelevantes unidos a proteína A y posteriormente con complejos "proteína A -IgG -Ac específico" durante toda la noche a 4°C . Finalmente, los inmunoprecipitados se analizaron por SDS-PAGE y autoradiografía.

3.8.- Reactivos

A continuación, se citan los reactivos empleados así como la empresa que los comercializa: Acido Acético (Merck 62), Acido Cítrico (Merck 244), Acrilamida (BIO-RAD 161-0101), Aprotinina (Sigma A-1153), Azul de toluidina (Sigma T-3260), Azul Coomassie (BIO-RAD 6104-59-2), BSA (Sigma A-4503), Cl_2Ca (Merck 2382), ClH (Merck 317), Cl_2Mg (Merck 5833), Cl_2Mn (Merck 5934) CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia 17-0430-01), CM Sephadex C-50 (Pharmacia), Colágeno Tipo I (Sigma C-9791), DEAE Sephacel (Pharmacia 17-0500-03), 3-3'-Diaminobenzidina-Tetrahidro-Clorhidrico (Fluca 32750), DMSO (Merck 2951), EDTA (Boehringer 808261), Etanol (Merck 987), Gelatin-Sepharosa 4B (Pharmacia 17-0900-93), Glicina (BIO-RAD 161-0718), Glutaraldehido (Merck 820603), Heparina-Sepharosa CL6B (Pharmacia 17-0467-01), Hepes Buffer (Flow 88449), Immuno-Precipitin (BRL 9321SA), Lactoperoxidasa (Boehringer 107174), Laminina (Sigma), Metanol (Merck 6009), OPD (Dako S-200), Pepsina (Merck 7192), Persulfato Amónico (BIO-RAD 161-0700), Phalloidin-TRITC (Sigma P-5157), PMA (Sigma P-8139) PMSF (Sigma P-7626), SDS-PAGE Standards (BIO-RAD 161-0309).

4.- RESULTADOS

RESULTADOS

4.1.- Análisis de los fragmentos de fibronectina

Como ya se ha señalado en el capítulo de materiales y métodos, los fragmentos de fibronectina utilizados a lo largo del desarrollo de esta tesis (fig.4.1) se han obtenido a partir de la digestión de Fn plasmática bajo distintas condiciones de tratamiento enzimático. Estos fragmentos se han sometido a riguroso control de pureza por técnicas de ELISA, "Western blots" y secuenciación de aminoácidos. Los tres subapartados siguientes se dedican a la descripción detallada de todos los fragmentos empleados en este trabajo.

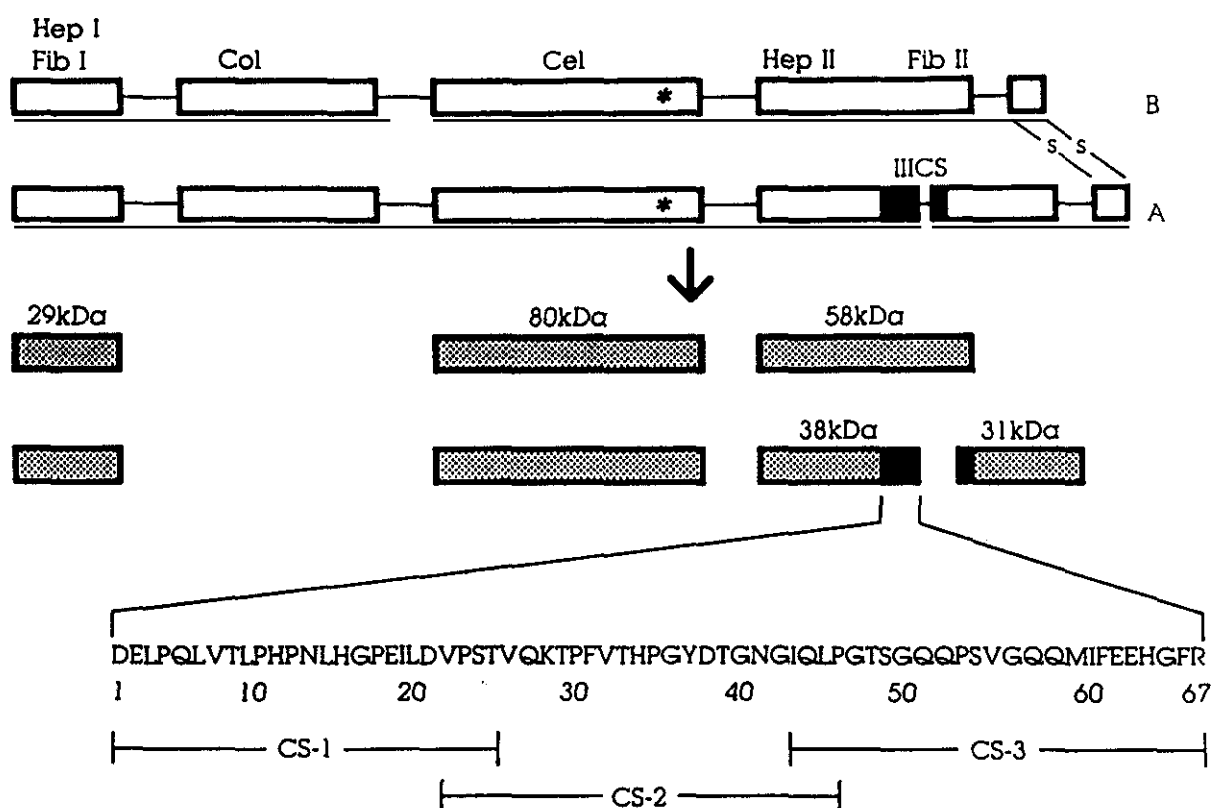


Fig.4.1.- Representación esquemática de la Fn plasmática y los fragmentos obtenidos por digestión con tripsina. Se muestran las dos cadenas A y B que constituyen la Fn, así como los dominios biológicamente activos; ambas cadenas difieren en la región IIICS (en negrita) que está sólo presente en la cadena A. La flecha indica los fragmentos de 29, 80, 58, 38 y 31 kDa (en punteado) utilizados en este trabajo. Además se indican las secuencias CS1, CS2, y CS3 que pertenecen a la región IIICS contenida en el fragmento de 38 kDa.

4.1.1.- Fragmentos que contienen la región carboxilo-terminal de Fn (fragmentos 38 kDa y 58 kDa).

Los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa (Fig.4.2) obtenidos como se menciona en el capítulo de materiales y métodos por digestión con tripsina y posterior purificación, proceden de la región carboxilo-terminal de Fn.

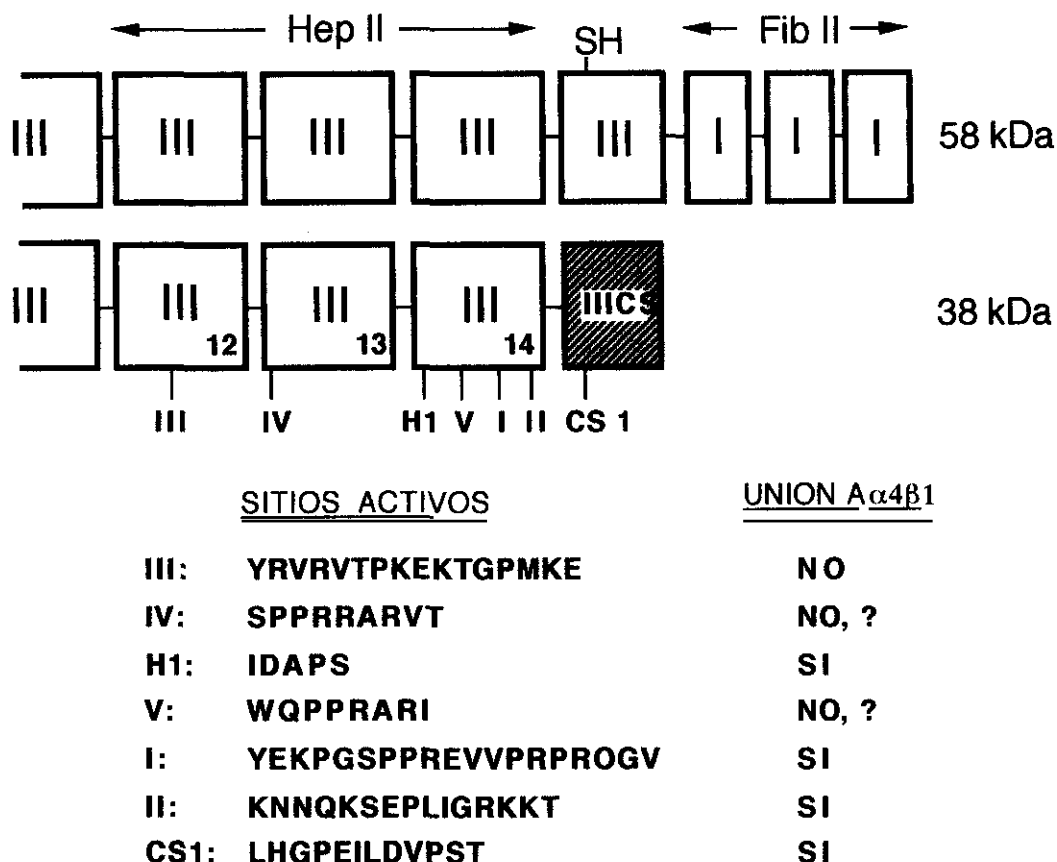


Fig.4.2.- Representación esquemática de los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa. Se indican las unidades de homología tipo III que constituyen ambos fragmentos así como la numeración correspondiente a cada una de ellas; las unidades de tipo I sólo aparecen en el fragmento de 58 kDa (Hynes, 1990). Los fragmentos de 38 y 58 kDa proceden de la cadena A y B de la Fn respectivamente. El fragmento de 58 kDa contiene, entre los dominio Hep II y Fib II, una unidad de homología tipo III con un grupo sulfidrilo libre. El fragmento de 38 kDa contiene el dominio Hep II y parte de la secuencia III CS. También se indica la posición y la secuencia de los sitios activos descritos para el dominio Hep II y parte de la región III CS, así como la capacidad de interaccionar con la integrina α 4 β 1. CS-1 sólo está presente en el fragmento de 38 kDa mientras los sitios H1, I, II, III, IV y V están en ambos fragmentos.

Ambos fragmentos contienen el dominio Hep II de Fn y presentan la misma secuencia N-terminal: TAGPDQTEMTIECS. El fragmento de 38 kDa además contiene los primeros 67 aminoácidos de la región IIICS, incluyendo la secuencia CS-1 que es un ligando de $\alpha 4\beta 1$ (García-Pardo et al. 1987). Nuestros datos, (ver apartado 4.2 de los resultados) demostraron claramente que el fragmento de 38 kDa procede de la cadena A y que el fragmento de 58 kDa carece de la región IIICS y por tanto procede de la cadena B de Fn. Hasta entonces la asignación de los fragmentos de 38 y 58 kDa a las cadenas A y B de Fn respectivamente, se basaba en datos indirectos como los pesos moleculares y la especificidad de la tripsina en la digestión de la molécula de Fn (Wayner et al. 1989; Ferreira et al. 1990; García-Pardo et al. 1990). Así, el fragmento de 38 kDa contiene los sitios activos Hep II y CS-1 capaces de mediar adhesión: Hep II y CS-1, mientras que el fragmento de 58 kDa contiene sólo uno: Hep II (fig.4.2). La localización de las secuencias conocidas dentro del dominio Hep II de Fn descritas como mediadoras de adhesión celular (Humphries et al. 1987; McCarthy et al. 1988; Mould et al. 1991; Iida et al. 1992) se muestra en la figura 4.2. Sólo H1, I y II interaccionan con la integrina $\alpha 4\beta 1$.

4.1.2.- Fragmentos que contienen la región central de Fn (fragmento de 80 kDa).

Al igual que los fragmentos de 38 y 58 kDa, el fragmento de 80 kDa procede de la Fn plasmática por digestión enzimática con tripsina y posterior purificación. El fragmento de 80 kDa procede de la región central de las cadenas A y B de Fn, y ocupa una posición contigua a los fragmentos de 38 y 58 kDa en la molécula de Fn. Como se puede apreciar en la figura 4.3 el fragmento de 80 kDa contiene un dominio de unión a heparina y DNA, así como la región de unión celular que contiene los sitios sinérgicos dependientes de RGD y la secuencia RGD (Yamada, 1991).

La digestión con pepsina del fragmento de 80 kDa nos permitió obtener fragmentos de 40/45 y 15 kDa (fig.4.3), muy útiles en el estudio de la interacción celular con la región central de Fn; sólo el fragmento de 15 kDa contenía la secuencia RGD, como pudimos comprobar por ELISA y "Western Blot" utilizando el Acm N-295 dirigido contra esta región de Fn (McDonald et al. 1987). El fragmento de 15 kDa presentaba la secuencia N-terminal: IGQQ, correspondiente al final de la unidad de repetición III9. Los fragmentos de 40/45 kDa presentaban las secuencias:

- 1.- VLV(R)WTPP, correspondiente a la unidad III5, empezando en el residuo 18.
- 2.- IQVLRDGQ, que corresponde al final de la unidad III-6.

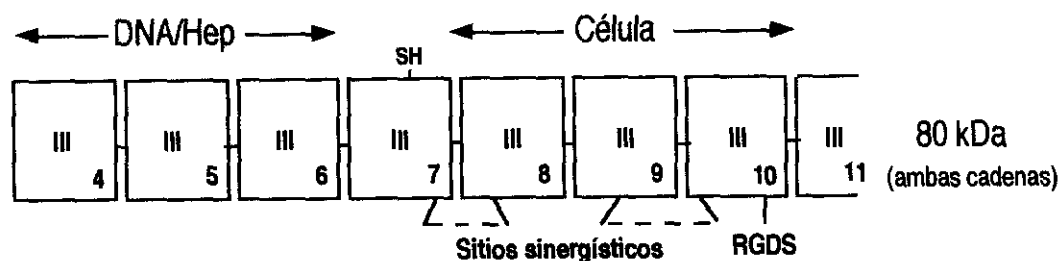


Fig.4.3.- Representación esquemática del fragmento de Fn 80 kDa.

En la figura se indican, las unidades de homología tipo III numeradas, que constituyen este fragmento. También se muestran los dominios de unión DNA/Heparina y el dominio de unión celular que contiene la secuencia RGD y los sitios sinérgicos. Las flechas horizontales inferiores indican el comienzo y el final de los fragmentos de 40/45 y 15 kDa; sólo el fragmento de 15 kDa contiene la secuencia RGD.

4.1.3.- Otros fragmentos de Fn.

Además de los fragmentos mencionados se han utilizado los fragmentos de Fn de 200 y 190 kDa y los fragmentos de 29 y 31 kDa.

Los fragmentos de 200 y 190 kDa se obtienen por digestión suave con tripsina de la Fn plasmática y corresponden a la cadena A y B respectivamente menos los dominios N-terminal y C-terminal de 6 kDa (García-Pardo et al. 1987).

Los fragmentos de 29 y 31 kDa se obtienen por digestión suave con tripsina a partir de la Fn plasmática (ver materiales y métodos) y proceden de las regiones N-terminal y C-terminal respectivamente (Fig.4.1). La secuencia N-terminal del fragmento de 29 kDa es: <EAQQMVQPQSP, y del fragmento de 31 kDa es: HRPRPYPPNV.

4.2.- Estudio de la interacción de leucocitos con la región carboxilo-terminal de Fn; estudio de nuevos sitios adherentes, sus receptores en leucocitos humanos y su regulación

4.2.1- Obtención de dos nuevos Acms anti-fibronectina, P1F11 y P3D4. Identificación de los sitios de unión

De acuerdo con los objetivos últimos de esta tesis y como primera aproximación para abordar el estudio de la interacción leucocito-Fn se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales anti-Fn. Estos Acms, denominados P1F11 y P3D4, están dirigidos contra la región carboxilo-terminal de la fibronectina y se han utilizado como herramientas de trabajo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Los Acms P1F11 y P3D4 se obtuvieron utilizando los protocolos de inmunización habituales previamente descritos (Wayner et al.1989). El P1F11 se obtuvo por inmunización con CS-1 y el P3D4 por inmunización con el fragmento de 38 kDa. Para determinar la especificidad de estos Acms, se llevaron a cabo ensayos de ELISA con cantidades equimoleculares de los siguientes sustratos: Fn intacta, fragmentos de 80, 58 y 38 kDa de Fn. Los resultados indicaron que:

- el Acm **P3D4** reaccionaba de una forma dosis-dependiente con Fn intacta y los fragmentos de 38 kDa y 58 kDa (Fig.4.5A) pero no reconocía el fragmento de 80 kDa (datos no mostrados).

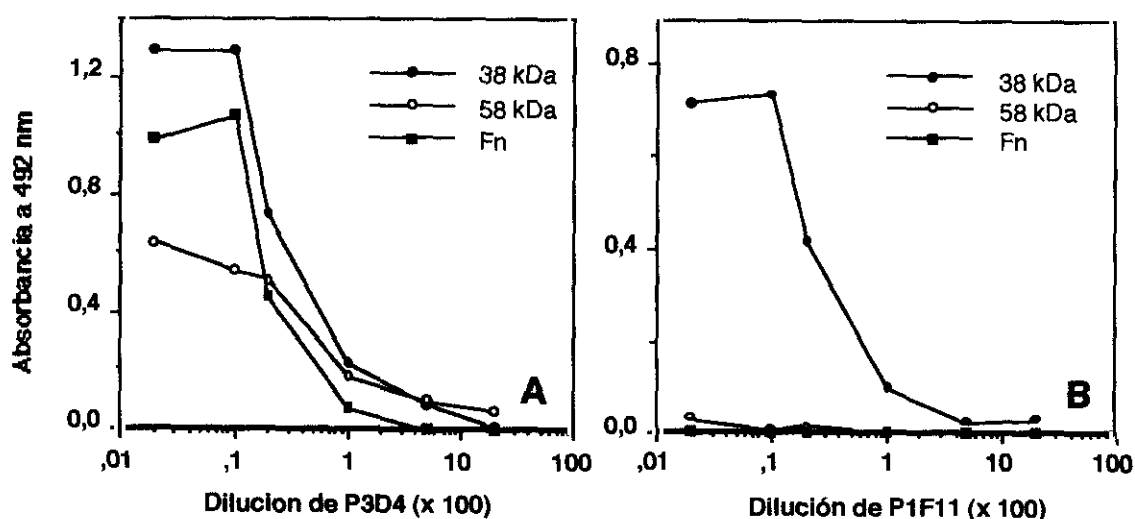


Fig.4.5.- Representación gráfica del análisis por ELISA de la reactividad de los Acms P3D4 (A) y P1F11 (B) con Fn y los fragmentos de 38 y 58 kDa. Los pocillos se tapizaron con las siguientes cantidades de sustrato: 5 μ g de Fn, 2 μ g de 58 kDa y 1 μ g de 38 kDa. A continuación, los pocillos se incubaron con las diluciones de los Acms P3D4 o P1F11 que se indican en la figura. La técnica de cuantificación de estos ensayos de ELISA se indica en el capítulo de materiales y métodos. Los valores representan la media de dos experimentos distintos. Cada experimento se realizó por duplicado.

- el Acm **P1F11** reconoce la secuencia CS-1 inmovilizada (no mostrado) como era de esperar ya que el péptido CS-1 fue el inmunógeno utilizado para la obtención de este Acm. Sin embargo, era importante determinar si este Acm era capaz de reconocer dicha secuencia en la molécula de Fn y sus fragmentos. Como muestra la figura 4.5B, este Acm reacciona con el fragmento de 38 kDa pero no reconoce la Fn intacta. No reacciona con el fragmento de 58 kDa.

Los resultados obtenidos por ELISA se confirmaron por técnicas de "Western blots" utilizando Fn y sus fragmentos (Figuras 4.6 y 4.7):

- el Acm **P3D4** reacciona con los fragmentos de 58 kDa (Fig.4.6, panel derecho, carril 2) y 38 kDa (carril 3), pero no con el fragmento de 80 kDa (carril 1); también reconoce la Fn intacta (panel izquierdo, carril 1) y los dos fragmentos de 200 y 190 kDa (carril 2). Estos resultados evidencian que el Acm P3D4 reconoce un determinante antigénico común a los dos fragmentos que contienen el dominio Hep II (58 y 38 kDa) y a ambas cadenas de Fn (A y B).

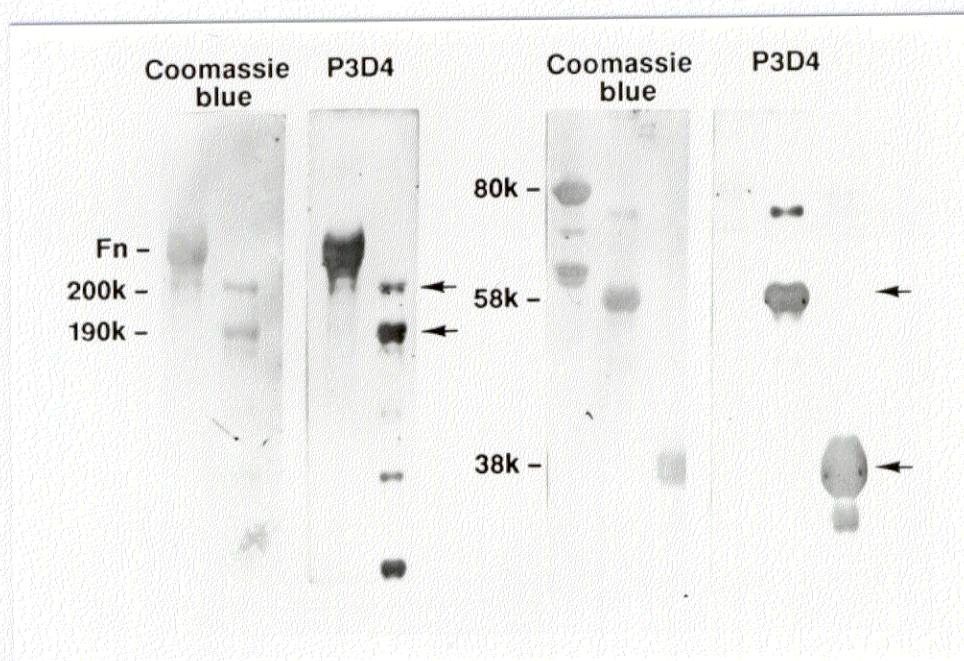


Fig.4.6.- Análisis por "Western blot" de la reactividad del Acm P3D4 con Fn y sus fragmentos. Se utilizaron geles de acrilamida al 10% para los fragmentos de 80 kDa, 58 kDa y 38 kDa (panel derecho, carriles 1-3 respectivamente); y geles de acrilamida al 5% para Fn y fragmentos de 200 kDa + 190 kDa (panel izquierdo, carriles 1-2 respectivamente). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se tiñeron con azul Coomassie o se incubaron con una dilución 1:200 del Acm P3D4. Las membranas incubadas con el Acm P3D4 se revelaron con IgG de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa.

- el Acm **P1F11** reacciona con el fragmento de 38 kDa (Fig.4.7, panel derecho, carril 3) pero no con el fragmento de 58 kDa (carril 2), ni el fragmento de 80 kDa (carril 1). Estos resultados claramente indican que el Acm P1F11 reconoce un sitio presente exclusivamente en el fragmento de 38 kDa. Teniendo en cuenta los pesos moleculares y especificidad de rotura de la tripsina, se había asumido previamente que los fragmentos de 38 kDa y 58 kDa procedían de las cadenas A y B de Fn respectivamente (Wayner et al., 1989; Ferreira et al., 1990; García-Pardo et al., 1990). Si esto fuera correcto, el Acm P1F11 reconocería un sitio antigénico que debiera estar presente en la cadena A de Fn y ausente en la cadena B. Por ello, se estudió la reactividad de P1F11 con los fragmentos de 200 y 190 kDa. Como muestra la figura 4.7, panel izquierdo, P1F11 reacciona con el fragmento de 190 kDa pero no con el fragmento de 200 kDa (carril 2). El Acm P1F11 también reacciona, aunque débilmente, con la Fn intacta (carril 1), probablemente debido a la concentración molar relativa de CS-1 en la Fn comparada con el fragmento de 38 kDa o quizá debido a que CS-1 no se encuentre completamente expuesto cuando está presente en la molécula intacta.

Todos estos resultados demuestran claramente que el Acm P1F11 que se obtuvo frente al péptido CS-1, es capaz de reconocer esta secuencia tanto en el fragmento de 38 kDa como en la cadena A de Fn. Asimismo, estos datos muestran definitivamente que el fragmento de 58 kDa carece de la secuencia CS-1 y confirman que este fragmento procede de la cadena B de Fn.

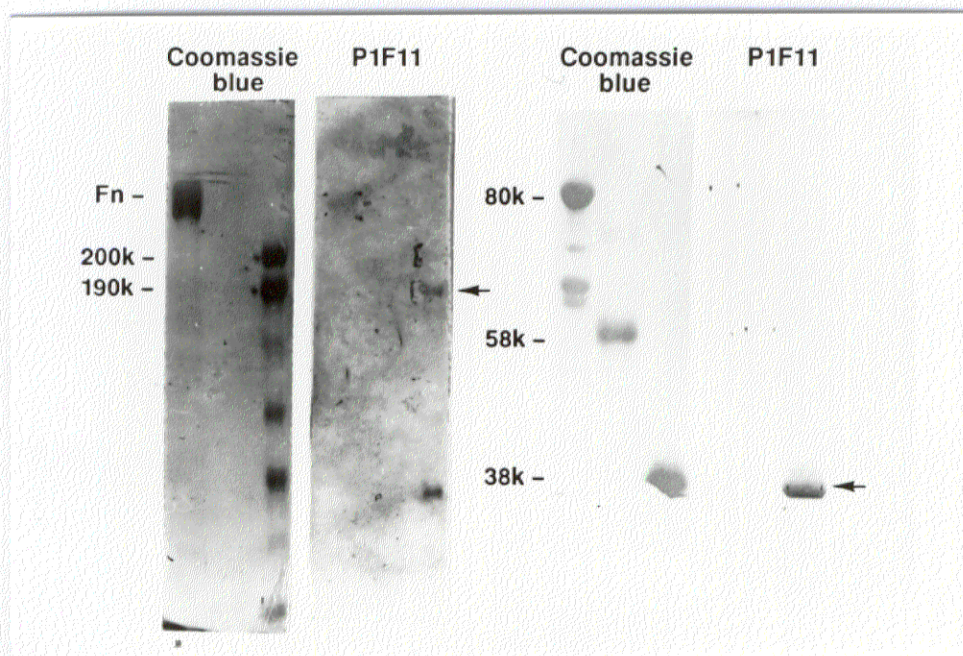


Fig.4.7.- Análisis por "Western blot" de la reactividad del Acm P1F11 con Fn intacta y fragmentos de 200+190 kDa. Se utilizaron geles de acrilamida al 10% para los fragmentos de 80 kDa, 58 kDa y 38 kDa (panel derecho, carriles 1-3 respectivamente); y al 5% para Fn y fragmentos de 200

+190 kDa (panel izquierdo, carriles 1-2 respectivamente). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se tiñeron con azul Coomassie o se incubaron con una dilución 1:500 del Acm P1F11. La técnica de revelado de las membranas incubadas con el Acm P1F11 fue como se indica en la figura 4.6.

A continuación llevamos a cabo estudios funcionales con estos Acms. Como se ha citado, la adhesión de los linfocitos a la región carboxilo-terminal de Fn está mediada por el dominio Hep II y la secuencia CS-1 (Bernardi et al. 1987; McCarthy et al. 1988; Wayner et al. 1989; García-Pardo et al. 1990a, 1990b). Como se ha señalado, el dominio Hep II está presente en los fragmentos de 38 y 58 kDa mientras que la secuencia CS-1 está solamente en el fragmento de 38 kDa. Así el fragmento de 38 kDa es más eficaz que el fragmento de 58 kDa en su capacidad de inducir adhesión celular (Ferreira et al. 1990, García-Pardo et al. 1990). Los resultados anteriores (Fig.4.5,4.6 y 4.7) prueban que los Acms P3D4 y P1F11 reconocen el dominio Hep II y la secuencia CS-1 en Fn respectivamente, de forma que es posible evaluar la contribución de ambos sitios (Hep II/CS-1) en la adhesión de los linfocitos a Fn utilizando estos Acms. Para ello, estudiamos la adhesión a Fn y sus fragmentos en presencia de los Acms P3D4 y P1F11 usando como modelo la línea celular linfoide B Ramos. La figura 4.8 muestra que el Acm **P3D4** inhibe en un 95% la adhesión de las células a Fn o al fragmento de 58 kDa, y en un 70-80% la adhesión al fragmento de 38 kDa. El Acm **P1F11** produce sólo una inhibición parcial (19-20%) de la adhesión celular a Fn o al fragmento de 38 kDa, aunque inhibe completamente la adhesión al péptido sintético CS-1 (no mostrado)

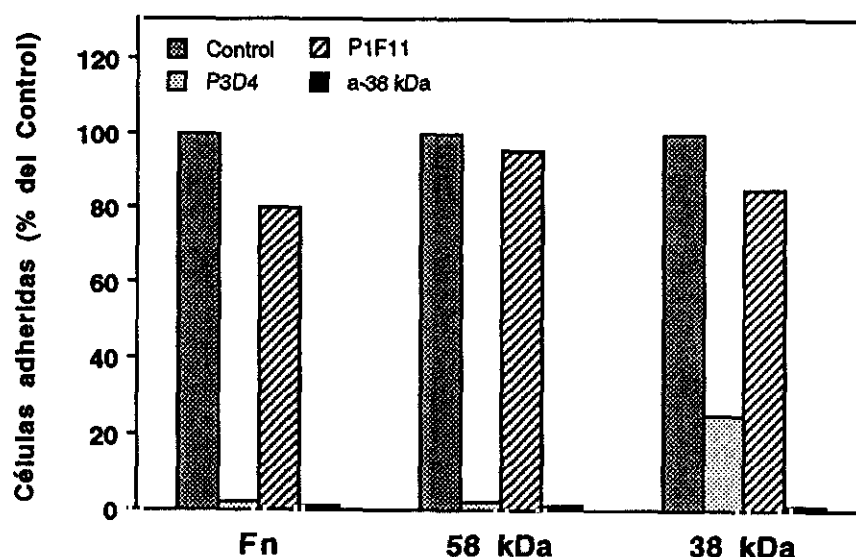


Fig.4.8.- Efecto de los Acms P3D4 y P1F11 en la adhesión de células Ramos a Fn y sus fragmentos. Los pocillos se tapizaron con fragmentos de 38 kDa ($0,15\mu\text{g}/\text{cm}^2$), 58 kDa ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) o Fn ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y se

incubaron con los Acms 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir las células; los pocillos considerados como control (100% adhesión) se incubaron con un Ac irrelevante. Los valores representados corresponden a la media de tres experimentos independientes.

La incubación simultánea de ambos Acms produjo una inhibición del 95% de la adhesión al fragmento de 38 kDa aunque no aparece representado en la gráfica. En estos experimentos se utilizó como control un anticuerpo policlonal anti-38 kDa que inhibió completamente la adhesión a Fn, así como a los fragmentos de 58 y 38 kDa (Fig.4.8).

4.2.2.- Reconocimiento del dominio Hep II por la integrina $\alpha 4\beta 1$ en distintas poblaciones celulares

De acuerdo con lo ya señalado anteriormente, la adhesión de los leucocitos a la región carboxilo-terminal de Fn implica el reconocimiento de la secuencia CS-1 y del dominio Hep II, aunque los sitios activos dentro de este dominio aún no se han identificado plenamente. Tanto los linfocitos T como los B, unen los fragmentos de Fn de 38 kDa que contiene CS-1 y Hep II y 58 kDa que contiene sólo Hep II a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$, siendo CS-1 la secuencia más activa en su capacidad de mediar adhesión (Wayner et al., 1989; García-Pardo et al., 1990a, 1990b). Por el contrario, las células monocíticas unen el fragmento de 38 kDa via $\alpha 4\beta 1$ pero no reconocen el fragmento de 58 kDa (Ferreira et al., 1990), esto es, reconocen la secuencia CS-1 pero no el dominio Hep II.

En este trabajo se ha profundizado en el estudio de la interacción de los leucocitos con estas dos regiones de Fn: Hep II y CS-1. La figura 4.9 muestra el perfil de adhesión de algunas células linfoides y monocíticas a los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa inmovilizados en placas de 96 pocillos. La línea celular T HUT-78 (fig.4.9A), la línea celular B Ramos (fig.4.9B) y la línea premonocítica U937 (fig.4.9C) se unieron al fragmento de 38 kDa de forma dependiente de dosis, confirmando así los datos publicados previamente (Wayner et al., 1989; García-Pardo et al., 1990a, 1990b; Ferreira et al., 1990). Asimismo, las células HUT-78 y Ramos se unieron eficientemente al fragmento de 58 kDa, mientras que las células U937 fueron incapaces de reconocer dicho fragmento de Fn (fig.4.9).

Como puede apreciarse (fig. 4.9) el fragmento de 38 kDa resulta ser un sustrato más eficiente en su capacidad de mediar adhesión que el fragmento de 58 kDa para las líneas celulares estudiadas; experimentos anteriores utilizando fragmentos marcados radiactivamente (García-Pardo et al., 1990a), demostraron que las diferencias cuantitativas observadas respecto a la capacidad de inducir adhesión celular del fragmento de 58 kDa *versus* 38 kDa, así como la incapacidad del fragmento de 58 kDa de mediar

adhesión de células monocíticas no se deben a una adsorción deficiente del fragmento de 58 kDa al plástico.

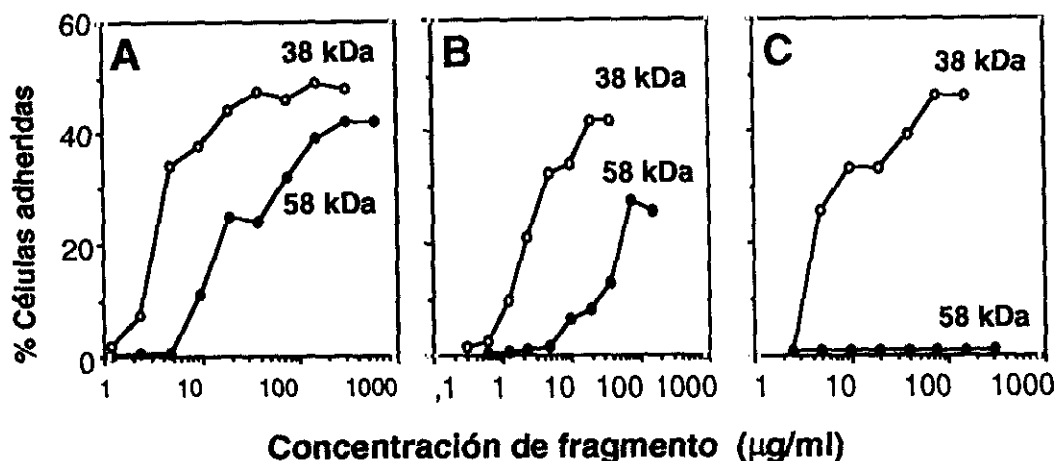


Fig.4.9.- Adhesión de células linfoides y monocíticas a los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa. A: células HUT-78 (línea linfoblástico T), B: células Ramos (linfoblástico B), y C: células U937 (línea premonocítica). Cada pocillo se incubó con 100 μ l de la concentración indicada del fragmento correspondiente y se añadieron 5×10^4 células por pocillo. Después de una incubación de 30 minutos a 37°C, las células unidas al sustrato se tiñeron y cuantificaron según se indica en el capítulo de materiales y métodos. Los valores de la figura 4.9 representan la media de tres experimentos diferentes que se realizaron por duplicado en cada caso. Los valores de las ordenadas indican el porcentaje de células que permanecen adheridas tras los lavados respecto al total de células añadidas por pocillo, habiendo restado el valor de los blancos (pocillos tapizados con BSA).

Se estudiaron también otras líneas celulares como Jurkat (línea T), JY y CESS (líneas B), así como THP-1 y HL-60 (líneas monocíticas). Los resultados de estos ensayos de adhesión fueron los mismos que los que se muestran en la Fig.4.9.

Con relación a los receptores celulares implicados en el reconocimiento de la región carboxilo-terminal de Fn, resultados anteriores obtenidos con Acms dirigidos contra las subunidades α y β indicaban que la integrina $\alpha 4 \beta 1$, como ya se ha mencionado, podría funcionar no sólo como receptor del fragmento de Fn de 38 kDa sino también como receptor del fragmento de 58 kDa (Wayner et al. 1989; García-Pardo et al. 1990a; Wayner et al. 1992). Sin embargo, quedaba por establecer si los epítomos de la subunidad $\alpha 4$ definidos como responsables del reconocimiento del fragmento de 38 kDa estaban también implicados en la interacción con el fragmento de 58 kDa, es decir, si existía una relación epítopo/región de Fn diferencial. Por ello, se llevaron a cabo ensayos

de adhesión celular a los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa, en presencia de Acms(s) contra los distintos epítomos descritos para la subunidad $\alpha 4$. La figura 4.10A muestra los resultados obtenidos con los Acms HP1/1, HP2/1, y HP2/4 dirigidos contra los epítomos A, B1 y B2 de la subunidad $\alpha 4$, respectivamente (Pulido et al. 1991); como puede apreciarse los distintos Acms inhiben de igual modo la adhesión de las células Ramos (y HUT-78 aunque no se muestra en la figura) a los fragmentos de 58 y 38 kDa, esto es, el patrón de inhibición es el mismo ($B1 > B2 > A$).

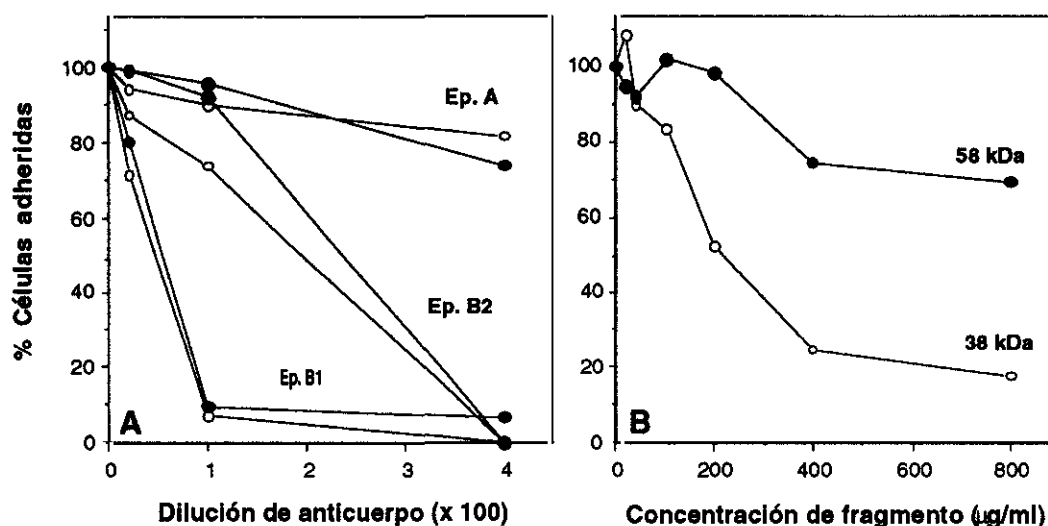


Fig.4.10.- Inhibición de la adhesión de células linfoides a fragmentos de Fn inmovilizados con Acms anti- $\alpha 4$ o fragmentos de Fn solubles. **A:** las células Ramos se preincubaron -1 h a 4°C - con los Acms anti-epítomo A (HP1/1), B16 (HP2/1) y B2 (HP2/4) de la cadena $\alpha 4$, y se añadieron a pocillos previamente tapizados con los fragmentos de 38 kDa ($0,38 \mu\text{g/cm}^2$) (círculos blancos) ó 58 kDa ($5 \mu\text{g/cm}^2$) (círculos negros). **B:** las células HUT-78 se preincubaron -30 min. a temperatura ambiente- con las concentraciones indicadas de los fragmentos de 38 y 58 kDa, y se añadieron a los pocillos tapizados con el fragmento de 58 kDa ($5 \mu\text{g/cm}^2$). En ambos experimentos las células adheridas se cuantificaron según lo descrito en los materiales y métodos. Los valores representados indican el porcentaje de células adheridas respecto al control (sin inhibidores); el valor medio de células adheridas en los controles fué 6.000 (A) y 14.000 (B).

Estos últimos resultados (fig.4.10A) parecían indicar que la secuencia CS-1 (sólo en 38 kDa) y el dominio Hep II (58 kDa) interaccionaban con regiones próximas en la integrina $\alpha 4\beta 1$; además, fragmentos solubles de 38 kDa (contienen CS-1 y Hep II) eran

capaces de inhibir la adhesión celular al fragmento de 58 kDa inmovilizado, confirmando así dicho supuesto. Como puede apreciarse en la figura 4.10B, la preincubación de células HUT-78 (y Ramos, aunque no está representado) con fragmentos solubles de 38 kDa (contiene CS-1 y Hep II) inhiben la adhesión de estas células al fragmento de 58 kDa mientras que el fragmento soluble de 58 kDa (sólo contiene Hep II) inhibe parcialmente (30%) la adhesión.

Todos estos datos sugerían que la integrina $\alpha 4\beta 1$ está presente en células linfoides como una forma capaz de reconocer la secuencia CS-1 y el dominio Hep II, mientras que $\alpha 4\beta 1$ se expresa en células monocíticas como una forma capaz de reconocer sólo el sitio CS-1. Además, como se verá más adelante, nuestros resultados mostraban que las células linfoides T extraídas de sangre periférica de donantes sanos se comportaban igual que las células monocíticas; es decir, no unían de forma constitutiva el fragmento de 58 kDa aunque si unían el fragmento de 38 kDa vía $\alpha 4\beta 1$. Por tanto se puede concluir que el reconocimiento de los distintos sitios de adhesión de Fn es dependiente del tipo celular.

4.2.3.- Efecto de la diferenciación y la activación celular en el reconocimiento del dominio Hep II

Ferreira y col. (1991), habían mostrado que la diferenciación de las células U937 afectaba la expresión superficial de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, así como la unión de estas células a los fragmentos de Fn de 80 kDa -contiene la secuencia RGD- y 38 kDa -contiene el sitio CS-1-. En base a esto, decidimos estudiar si era posible inducir el reconocimiento del dominio Hep II en células monocíticas, es decir, si era posible promover adhesión al fragmento de 58 kDa -sólo contiene Hep II-, y si esta unión tenía lugar a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$. Utilizamos la línea celular promonocítica U937 para determinar si los ésteres de forbol (PMA) que inducen diferenciación y/o activación de estas células tenían algún efecto en la inducción del reconocimiento del dominio Hep II.

Como se muestra en la Fig.4.11 el tratamiento con PMA (5 ng/ml, 48h) indujo la adhesión de las células U937 al fragmento de 58 kDa de forma dependiente de dosis. Está demostrado que en estas condiciones el PMA induce la diferenciación de células U937 a un estado de maduración similar al de los monocitos.

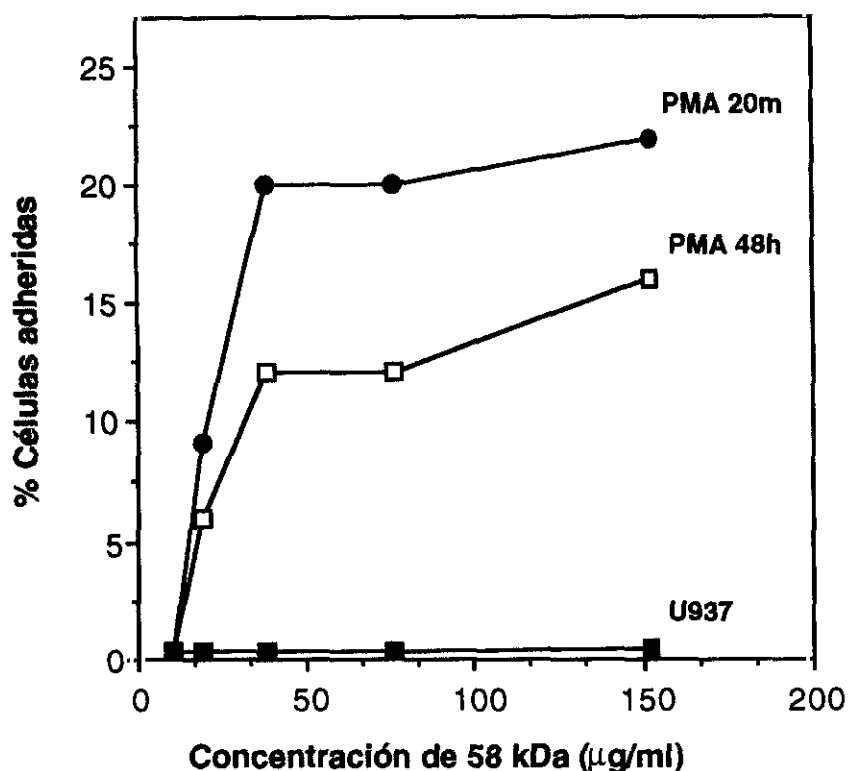


Fig.4.11.- Efecto del tratamiento con PMA sobre la adhesión de células U937 al fragmento de 58 kDa inmovilizado. Las células en reposo -cuadrados negros- o las células tratadas con PMA durante 48h (10 ng/ml) -cuadrados blancos- o 20 min.(50 ng/ml) -círculos negros- se añadieron a pocillos tapizados previamente con 100 µl de las concentraciones indicadas del fragmento de 58 kDa. Tras 30 minutos de incubación, las células adheridas se cuantificaron como ya se ha descrito. Las determinaciones se hicieron por duplicado y los valores que se muestran son la media de tres experimentos separados. Los valores de las ordenadas representan el porcentaje de células adheridas respecto al total de células añadidas por pocillo (5×10^4).

Estos resultados sugerían que la diferenciación de las células U937 se podría asociar a la conversión de $\alpha 4 \beta 1$ en una forma más activa capaz de reconocer el dominio Hep II. Sin embargo, teniendo en cuenta el período de tiempo transcurrido (48 h) y la gran cantidad de cambios que sufren las células U937 durante su proceso de diferenciación (Minta et al. 1985) no resultaba posible, en principio, descartar la contribución de otros factores que pudieran estar afectando a las propiedades de adhesión de estas células. Para eludir este inconveniente se estudió el efecto de tratamientos cortos con PMA (50 ng/ml, 20 min.) sobre la adhesión de las células U937 al dominio Hep II. En estas condiciones el PMA induce activación pero no diferenciación celular. Como se muestra en la Figura 4.11, el efecto de la activación en adhesión celular fue aún mayor

que el obtenido por tratamiento largo con PMA, descartando así la contribución de otros factores que se podrían inducir en el proceso de diferenciación celular. También se estudiaron las líneas celulares monocíticas HL-60 y THP-1, aunque no se muestran en las gráficas, obteniéndose resultados similares en adhesión al fragmento de 58 kDa.

Para confirmar la implicación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en el reconocimiento inducido del dominio Hep II, llevamos a cabo ensayos de adhesión con células U937 tratadas con PMA en presencia de distintos Acms dirigidos contra los ya citados epítomos de la subunidad $\alpha 4$. Los Acms anti- $\alpha 4$ inhibieron de forma eficiente la adhesión celular al fragmento de 58 kDa, obteniéndose un patrón de inhibición para los epítomos A, B1, y B2 de $\alpha 4$ equivalente al observado para la inhibición de la adhesión de las células Ramos a los fragmentos de 38 kDa (CS-1 y Hep II) y 58 kDa (datos no mostrados).

Por otra parte para establecer si el tratamiento con PMA afectaba el patrón de la expresión relativa de los epítomos de $\alpha 4$ (A, B1, B2 y C), se analizaron por inmunofluorescencia las células U937 en reposo y tratadas con PMA (48h), utilizando el panel de Acms descrito previamente. Como se indica en la tabla I no se observó ningún cambio en la expresión relativa de los epítomos de $\alpha 4$ después del tratamiento celular con PMA, sólo una disminución de la expresión de todos ellos. Aunque no se muestra en la tabla, los tratamientos breves con PMA no produjeron ningún cambio en la expresión superficial de $\alpha 4\beta 1$, lo que podría explicar que el aumento de la adhesión al fragmento de 58 kDa es mayor a tiempos cortos de tratamiento (ver Fig.4.11).

TABLA I

Expresión de los epítomos de $\alpha 4$ en células U937 en reposo o tratadas con PMA

Anticuerpos	Intensidad Media de Fluorescencia	
	U937	PMA-U937
HP1/1 (A)	115,2	105,2
HP2/1 (B1)	107,8	94,1
HP2/4 (B2)	125,9	110,5
B-5G10 (C)	128,9	95,8
HC1/1 (CD11c)	34,2	63,0

Estos resultados apoyan el concepto de que el reconocimiento del dominio Hep II por $\alpha 4\beta 1$ es dependiente del estado de activación de esta integrina. Sin embargo, es también concebible que la diferente funcionalidad de $\alpha 4\beta 1$ en células linfoides y monocíticas sea debido además a alguna diferencia bioquímica. Para estudiar esta posibilidad llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación y análisis por SDS-PAGE. Como ya se ha mencionado, la integrina $\alpha 4\beta 1$ está compuesta por la cadena $\alpha 4$ de 150 kDa y la cadena $\beta 1$ de 130 kD asociadas de forma no covalente; sin embargo, "in vivo" la subunidad $\alpha 4$ puede degradarse proteolíticamente lo que produce la aparición de polipéptidos de 80 y 65 kDa en preparaciones puras de $\alpha 4\beta 1$. La figura 4.12 muestra los resultados de las inmunoprecipitaciones utilizando Acms anti- $\beta 1$ y anti- $\alpha 4$ para las células Ramos, U937 y U937 tratadas con PMA (48h). Las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 1$ de las células Ramos y U937 mostraron una movilidad electroforética diferente. Los resultados aquí obtenidos muestran un patrón de rotura de $\alpha 4$ diferente para las distintas líneas celulares: $\alpha 4$ aparece en la forma intacta de 150 kDa (Ramos, línea a) y como una mezcla de las formas $\alpha 4/150$ y $\alpha 4/80,70$ (U937, PMA-U937; líneas b y c). Utilizando Acms anti- $\beta 1$, además de la forma intacta de 150 kDa, la forma infrecuente de 180 kDa se detectó para U937 (línea b) pero no para PMA-U937 (línea c). La forma de 180 kDa no se observó al utilizar Acms anti- $\alpha 4$. Estos resultados podrían sugerir algunas diferencias en $\alpha 4\beta 1$ entre las distintas líneas celulares; sin embargo, resulta difícil interpretarlos puesto que no se ha podido demostrar que estas formas estén directamente relacionadas con el reconocimiento diferencial de distintos ligandos de Fn.

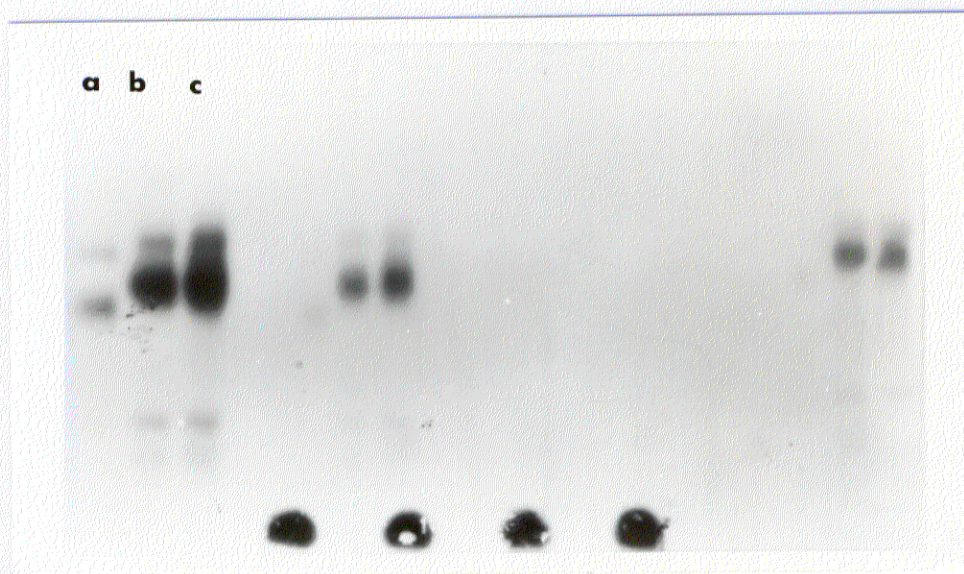
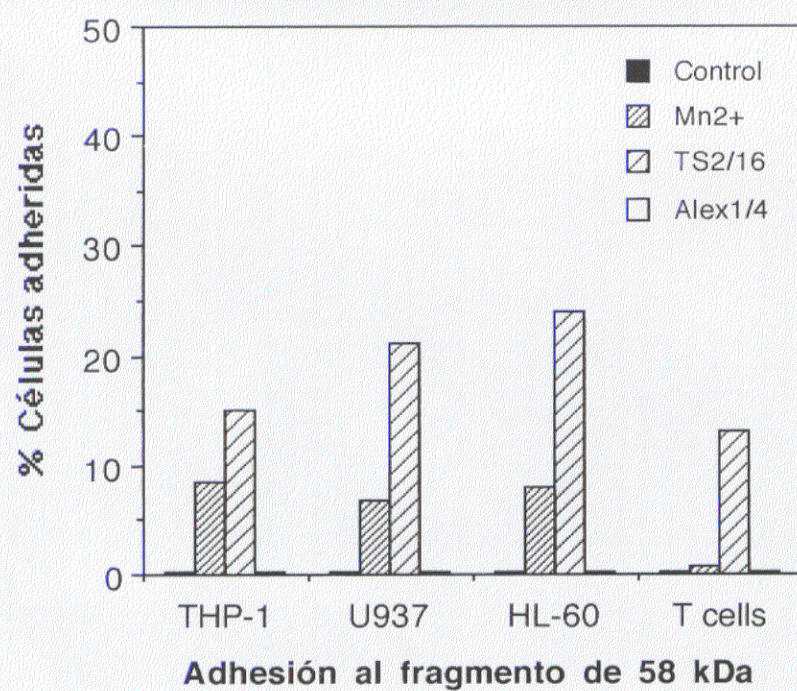
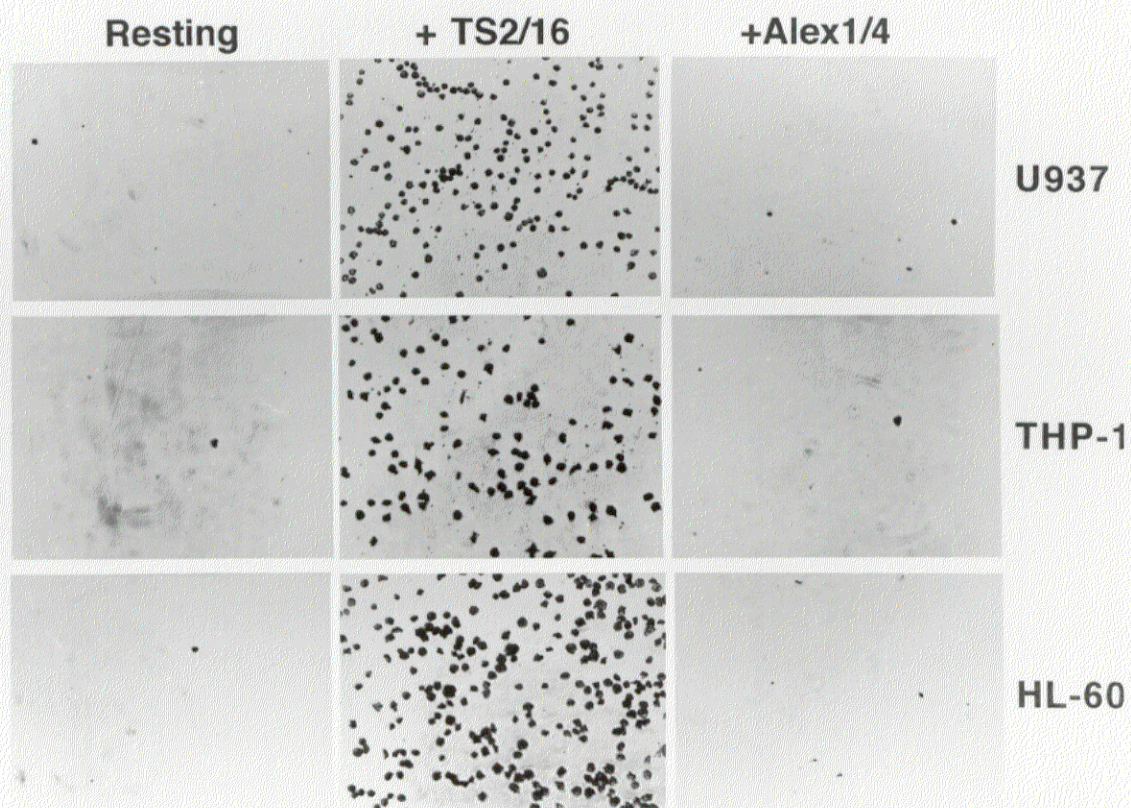


Fig.4.12.- Inmunoprecipitación y análisis por SDS-PAGE de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en células Ramos (línea a), U937 (b) y PMA-U937 (c). Las células marcadas con ^{125}I se lisaron en condiciones de asociación. Los inmunoprecipitados con el Acm anti- $\beta 1$ TS2/16 se analizaron por SDS-PAGE.

4.2.4.- Regulación del reconocimiento del dominio Hep II a través de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas

Recientemente se ha demostrado que ciertos Acm dirigidos contra la subunidad $\beta 1$ son capaces de regular la función de las integrinas de esta familia (Arroyo et al. 1992; Van de Wiel-van Kemenade et al. 1992; Kovach et al. 1992; Wayner et al. 1992). Por tanto decidimos evaluar el efecto de tales Acms en el reconocimiento del dominio Hep II por células monocíticas. Para ello, estudiamos la adhesión al fragmento de 58 kDa de líneas celulares monocíticas tratadas previamente con dichos Acms. Utilizamos los Acms anti- $\beta 1$ TS2/16 y Alex 1/4 (Arroyo et al. 1992); TS2/16 es un Acm activador capaz de aumentar la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos, Alex1/4 es un Acm neutro que no afecta la función de las integrinas. La figura 4.13A muestra la adhesión al fragmento de 58 kDa de las líneas monocíticas THP-1, U937, y HL-60. La cuantificación de este ensayo indicó que el 16-20% de las células inicialmente añadidas se unen específicamente a esa concentración de 58 kDa tratándose de células preincubadas con el Acm TS2/16. Es decir, el Acm TS2/16 induce el reconocimiento del fragmento de 58 kDa que sólo contiene el dominio Hep II. Al comparar las figuras 4.11 y 4.13B se puede observar que los valores de adhesión obtenidos con el Acm TS2/16 y tras el tratamiento celular con PMA de U937 son similares.

Fig.4.13.- (ver página siguiente) A.- Efecto de los Acm(s) TS2/16 y Alex 1/4 sobre la adhesión de las células monocíticas U937, THP-1 y HL-60 al fragmento de 58 kDa. Las células fijadas, se tiñeron con azul de toluidina 0,1% y se fotografiaron. Las células tratadas con TS2/16 se unen eficientemente al fragmento de 58 kDa (Hep II) mientras las células tratadas con Alex 1/4 o en reposo no se unen. **B.- Inducción de adhesión celular al fragmento de Fn de 58 kDa por Acms y cationes divalentes Mn^{2+} para distintas células.** Los pocillos se incubaron con 100 μ l del fragmento de 58 kDa (38 μ g/ml, 0,6 nmol). Las células monocíticas (THP-1, U937, HL-60) y LT de sangre periférica en reposo, pretratados con el Acm TS2/16, el Acm Alex 1/4 o Cl_2Mn 1mM se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 30 min a 37°C. Las células adheridas se cuantificaron como ya se ha mencionado. Los valores representados son la media de dos experimentos cada uno de los cuales se realizó por duplicado y corresponden al porcentaje del total de células añadidas.



Simultáneamente, se realizaron ensayos de adhesión celular al fragmento de Fn de 38 kDa, con el fin de comparar el nivel de adhesión inducida al fragmento de 58 kDa con la adhesión constitutiva al fragmento de 38 kDa. La figura 4.14 muestra que la adhesión constitutiva de las líneas celulares THP-1, U937 y HL-60 también aumenta cuando las células se preincubaban con el Acm TS2/16. El Acm Alex 1/4 no tiene ningún efecto. Estos resultados denotan que el Acm TS2/16 aumenta la adhesión constitutiva de estas células, afectando así la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con sus dos ligandos de Fn (Hep II y CS-1). Resulta interesante comprobar que a la misma concentración molar -0,6 nmol y 0,5 nmol del fragmento de 58 kDa (fig.4.13) y de 38 kDa (fig.4.14), respectivamente- el nivel de adhesión inducida al fragmento de 58 kDa es similar al nivel de adhesión constitutiva al fragmento de 38 kDa para cada línea celular.

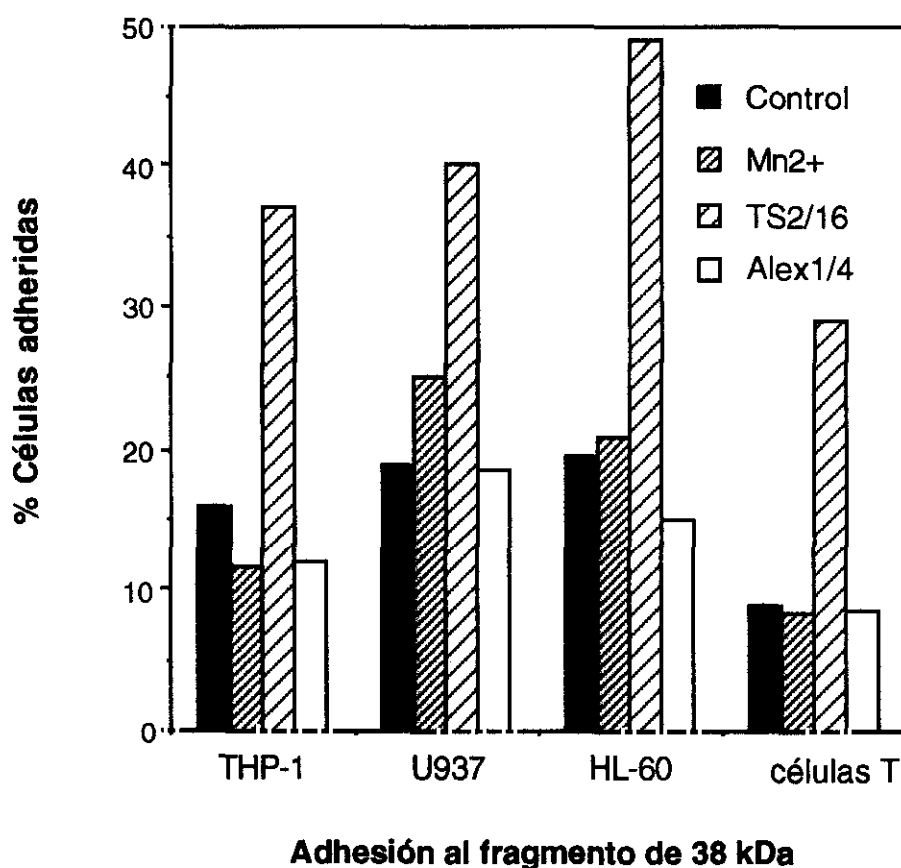


Fig.4.14.- Aumento de la adhesión celular al fragmento de Fn de 38 kDa por Acms y cationes divalentes Mn²⁺ en distintas células. Los pocillos se incubaron con 100 μ l del fragmento de 38 kDa (19 μ g/ml, 0,5 nmol). Las células pretratadas con el Acm TS2/16, el Acm Alex 1/4 o Cl₂Mn 1mM, se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 30 min a 37°C. Las células adheridas se cuantificaron como ya se ha mencionado. Los valores representados son la media de dos experimentos separados realizados por duplicado y se expresan como porcentaje del total de células añadidas por pocillo.

Para confirmar la implicación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la adhesión inducida por el Acm TS2/16 al fragmento de 58 kDa, se realizaron ensayos de inhibición de adhesión celular a este fragmento con Acms anti- $\alpha 4$. Como muestra la figura 4.15 la incubación con el Acm anti- $\alpha 4$ HP2/1 de células monocíticas previamente tratadas con el Acm TS2/16 inhibe totalmente la adhesión de estas células al fragmento de 58 kDa (y de 38 kDa, no representado). El Acm anti- $\alpha 5$ P1D6 no tiene ningún efecto inhibitor, demostrando así la implicación de $\alpha 4\beta 1$ en el reconocimiento del dominio Hep II.

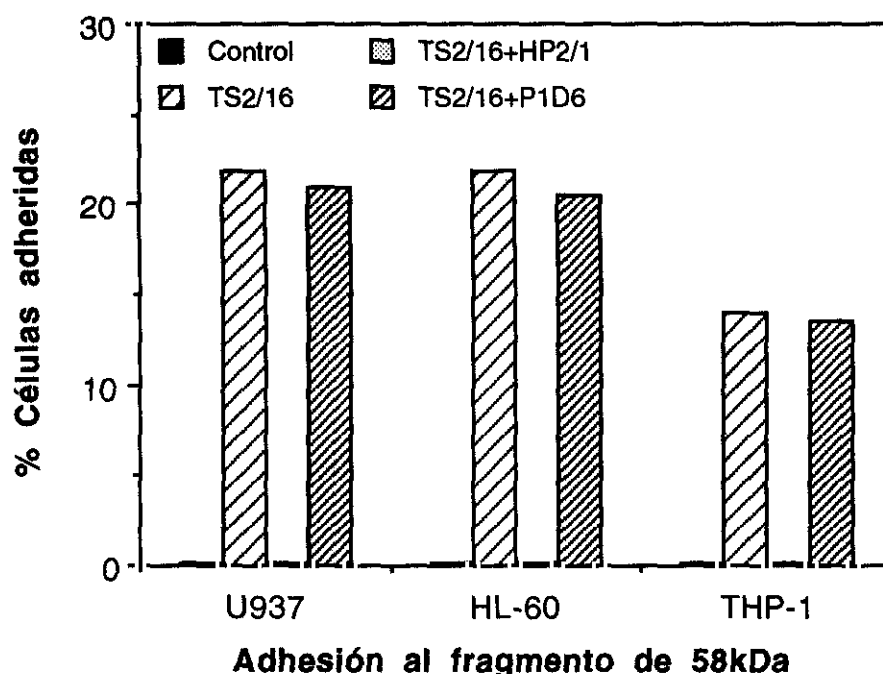


Fig.4.15.- Inhibición con Acms de la adhesión de células monocíticas tratadas con el Acm TS2/16. Las células U937, HL-60 y THP-1 en reposo (control) o preincubadas con el Acm TS2/16, los Acms TS2/16+ HP2/1 (anti- $\alpha 4$), o con los Acms TS2/16 + P1D6 (anti- $\alpha 5$) se añadieron a pocillos tapizados con 100 μ l de una solución del fragmento de 58 kDa (38 μ g/ml). Tras una incubación de 30 min. a 37°C, las células adheridas se cuantificaron como ya se ha descrito. Los valores representados son la media de dos experimentos y se indican como porcentaje del total de células añadidas por pocillo.

Por otra parte, las figuras 4.13B y 4.14 muestran graficamente los resultados obtenidos con linfocitos T (LT) de sangre periférica obtenidos a partir de donantes sanos.

Estos experimentos se realizaron para determinar si la adhesión diferencial a las regiones CS-1 y Hep II de Fn era un fenómeno común a otras células hematopoyéticas distintas de las monocíticas. Las figuras 4.13 y 4.14 muestran la adhesión de células T a los fragmentos de Fn de 58 y 38 kDa respectivamente; los LT son incapaces de reconocer el fragmento de 58 kDa (fig.4.13) pero se unen al fragmento de 38 kDa (fig.4.14), aunque no tan eficientemente como las líneas celulares linfoides en cultivo. La preincubación celular con el Acm TS2/16 produjo la adhesión específica al fragmento de 58 kDa (fig.4.13) e incrementó al menos tres veces la unión al fragmento de 38 kDa (fig.4.14). La figura 4.16 muestra la adhesión de linfocitos T a los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa, para células en reposo y tratadas con TS2/16 o Alex1/4. Al igual que para las células monocíticas, el efecto inducido por el Acm TS2/16 se bloquea totalmente con el Acm anti- $\alpha 4$ HP2/1 (datos no mostrados). Aunque no se muestra gráficamente los tratamientos cortos con PMA (5ng/ml, 20 min.) también indujeron la unión específica de las células T al fragmento de 58 kDa.

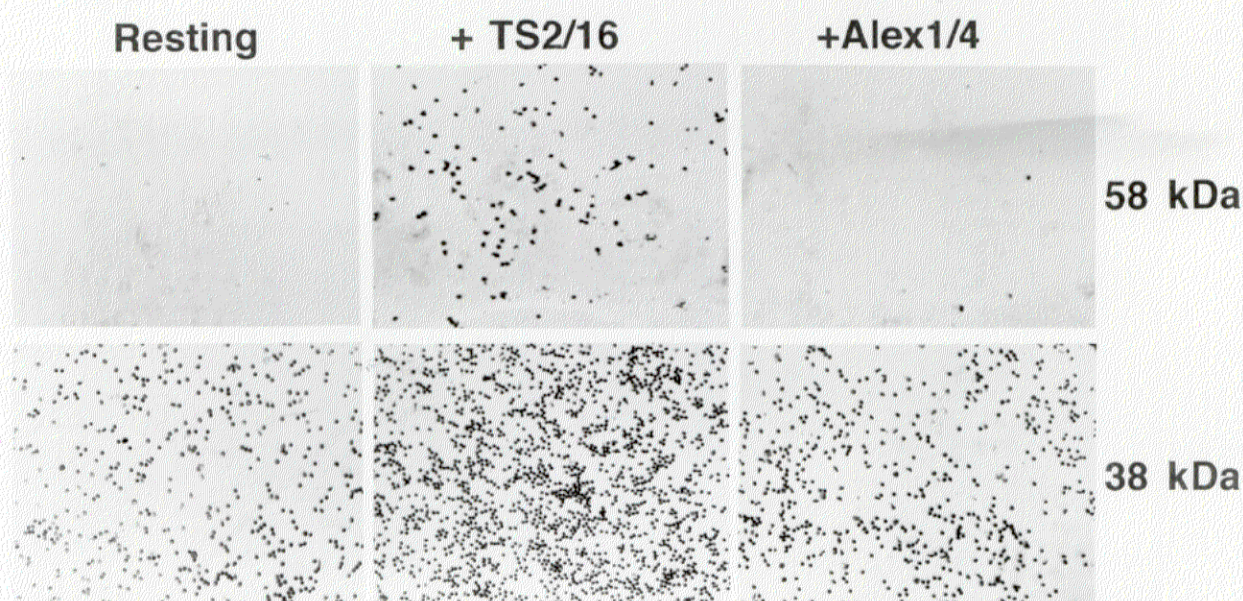


Fig.4.16.- Efecto de los Acms TS2/16 y Alex 1/4 sobre linfocitos T en adhesión a los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa. Los LT en reposo o incubados previamente con los Acms TS2/16 o Alex1/4 se añadieron a pocillos tapizados con los fragmentos de 58 kDa (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) o 38 kDa (2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Las células adheridas se fijaron, se tiñeron con azul de toluidina y se fotografiaron.

4.2.5.- Efecto del cation divalente Mn^{2+} en la interacción celular con el dominio Hep II.

Como se ha mencionado anteriormente, los cationes divalentes afectan la función de las integrinas (Hynes, 1992). En especial, se ha demostrado que el Mn^{2+} es capaz de aumentar la afinidad de la mayoría de las integrinas por sus ligandos.

Para determinar el posible efecto de Mn^{2+} en el reconocimiento del dominio Hep II via $\alpha 4\beta 1$, realizamos algunos ensayos de adhesión celular al fragmento de Fn de 58 kDa en presencia de este catión divalente. Para ello, las células se lavaron dos veces con una solución de Cl_2Mn 1 mM antes de añadirse a los pocillos recubiertos del sustrato correspondiente. Las figuras 4.13B y 4.14 muestran el efecto del Mn^{2+} en la adhesión de las células THP-1, U937 y HL-60 a los fragmentos de 58 y 38 kDa respectivamente. Como puede apreciarse (fig.4.13B) las tres líneas monocíticas reconocen específicamente el fragmento de 58 kDa en presencia de Mn^{2+} . Sin embargo, el efecto del Mn^{2+} no resultó tan eficiente como el Acm TS2/16 en su capacidad de inducir el reconocimiento del dominio Hep II en las células monocíticas y tuvo un efecto mínimo sobre los linfocitos T. En la figura 4.14 se puede ver que el Mn^{2+} también aumentó levemente la unión de las células U937 al fragmento de 38 kDa pero tuvo un efecto insignificante para THP-1, HL-60 o linfocitos T. El Mn^{2+} no ejerció ningún efecto en la unión a pocillos tapizados con BSA, confirmando así la especificidad de la adhesión observada. El tratamiento con Mn^{2+} no afectó a la expresión superficial de $\alpha 4\beta 1$ como se determinó por inmunofluorescencia usando Acm(s) anti- $\alpha 4$ y anti- $\beta 1$ para las distintas líneas celulares estudiadas (datos no mostrados).

4.3.- Estudio de la interacción de leucocitos humanos con la región central de Fn. Análisis de nuevos ligandos de baja afinidad.

Los resultados anteriormente expuestos habían demostrado que $\alpha 4\beta 1$ está presente en diferentes formas de activación en ciertas poblaciones celulares hematopoyéticas. En células monocíticas y LT existe como una forma parcialmente activa capaz de reconocer CS-1 pero no Hep II. El reconocimiento de Hep II se puede inducir por distintos agentes, siendo el Acm anti- $\beta 1$ TS2/16 el más efectivo. Este hecho nos hizo pensar que la activación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ con el Acm TS2/16 podría inducir el reconocimiento de nuevos ligandos no identificados previamente.

Por ello, nos propusimos estudiar la interacción de las células linfoides con otras regiones de Fn distintas de la región carboxilo-terminal, que contiene los ligandos conocidos de $\alpha 4\beta 1$: CS-1 y Hep II. A continuación se exponen estos resultados.

4.3.1.- Reconocimiento del fragmento de Fn de 80 kDa por algunas células linfoides B negativas para $\alpha 5\beta 1$.

Para estudiar la interacción de los linfocitos con la región central de Fn utilizamos el fragmento de Fn de 80 kDa. Como ya hemos mencionado, el fragmento de 80 kDa procede de la región central de Fn que es contigua al dominio Hep II, carece de los ligandos descritos de $\alpha 4\beta 1$ y contiene la secuencia RGD definida como mediadora de adhesión celular vía $\alpha 5\beta 1$ (ver fig.4.3). Como modelo de estudio elegimos las líneas celulares linfoides B Ramos y Daudi porque expresan mayoritariamente la integrina $\alpha 4\beta 1$. La Tabla II muestra la expresión superficial de las integrinas para Ramos, Daudi y otras líneas celulares utilizadas a lo largo de este estudio. Como podemos observar las células Ramos y Daudi expresan $\alpha 4\beta 1$ pero no otras integrinas como $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$, y Daudi además tampoco expresa $\alpha 3\beta 1$. De hecho, ninguna de las líneas que aparecen en la Tabla II expresan $\alpha 5\beta 1$, excepto A375 y K-562 que se utilizaron como controles.

Las líneas celulares Ramos (ver Fig.4.9) y Daudi unen los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa de forma dependiente de dosis; sin embargo, son incapaces de reconocer el fragmento de 80 kDa. Para estudiar si la activación a través de la subunidad $\beta 1$ afectaba la interacción de estas células con la región central de Fn, realizamos ensayos de adhesión celular al fragmento de 80 kDa con células tratadas previamente con el Acm TS2/16 y el Acm control Alex1/4. Como muestra la figura 4.17, la preincubación de las células Ramos (fig.4.17A) y Daudi (fig.4.17B) con el Acm Alex 1/4 no tuvo ningún efecto. Sin embargo, el Acm TS2/16 indujo adhesión celular al fragmento de 80 kDa de forma dependiente de dosis. El nivel de adhesión celular al fragmento de 80 kDa alcanzó el 60% y 40 % de las células añadidas Ramos y Daudi respectivamente.

TABLA II
INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA

Células	Control	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha v\beta 3$	$\beta 1$
Ramos	35	35	45	95	35	36	113
Daudi	40	—	39	96	40	43	76
JY	49	48	47	103	46	71	51
RPMI 8866	43	43	42	107	41	61	50
K562	47	—	45	46	78	56	100
A375	43	89	82	80	68	102	123

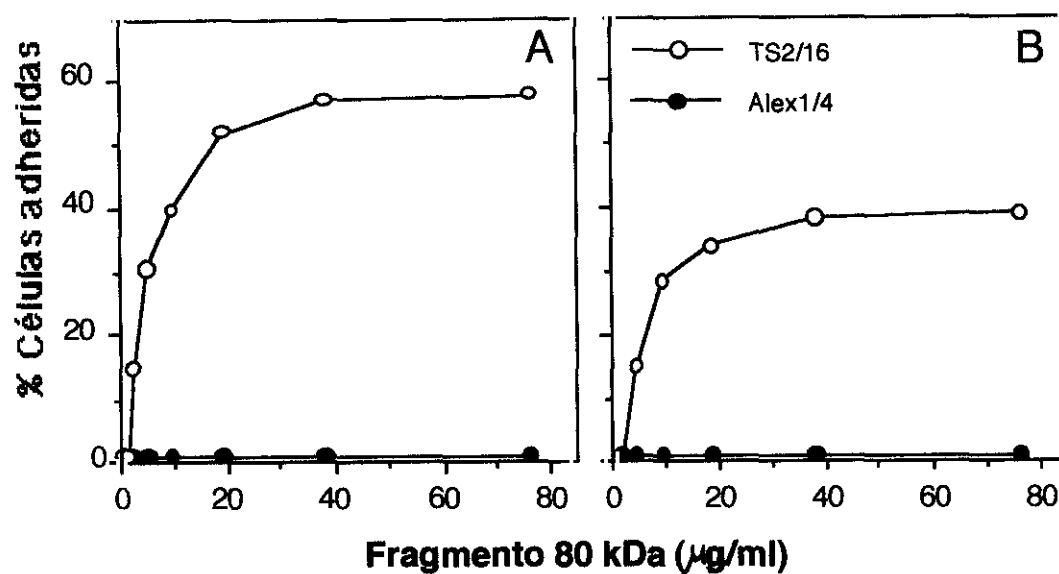


Fig.4.17.- Adhesión al fragmento de 80 kDa de las células linfoides Ramos (A) y Daudi (B). Las células se preincubaron con los Acms Alex1/4 -círculos negros- o TS2/16 -círculos blancos- y se añadieron a los pocillos tapizados con las concentraciones indicadas del fragmento de 80 kDa. La cuantificación de las células adheridas se indica en el capítulo de materiales y métodos. Los valores corresponden a la media de tres experimentos distintos que se hicieron por duplicado en cada caso.

Estos resultados muestran claramente que las células Ramos y Daudi adquieren la capacidad de reconocer el fragmento de 80 kDa después del tratamiento celular con el Acm TS2/16. La mayor adhesión al fragmento de 80 kDa observada para las células Ramos respecto a Daudi probablemente se justifica por la mayor expresión de la subunidad $\beta 1$ en Ramos *versus* Daudi (Tabla II). La expresión superficial de las integrinas $\beta 1$ no se vio afectada tras el tratamiento celular con el Acm TS2/16, de acuerdo con lo observado por otros grupos (Arroyo et al. 1992).

Además se estudiaron los fragmentos de 29 y 31 kDa que proceden de la región N- y C-terminal de Fn respectivamente (ver fig.4.1) y también carecen de los ligandos descritos de $\alpha 4\beta 1$. Realizamos ensayos de adhesión a los fragmentos de Fn de 29 y 31 kDa con células Ramos y Daudi pretratadas con los Acms TS2/16 y Alex1/4. La figura 4.18 muestra el efecto de tales Acm en la adhesión de las células Ramos a los fragmentos de 29, 31 y 80 kDa. Puede apreciarse que el Acm Alex 1/4 no produce efecto en ninguno de los casos y que el Acm TS2/16 tampoco lo hace en la adhesión a los fragmentos de 29 y 31 kDa mientras que induce efectivamente la adhesión al fragmento de 80 kDa, confirmando así la especificidad de esta interacción.

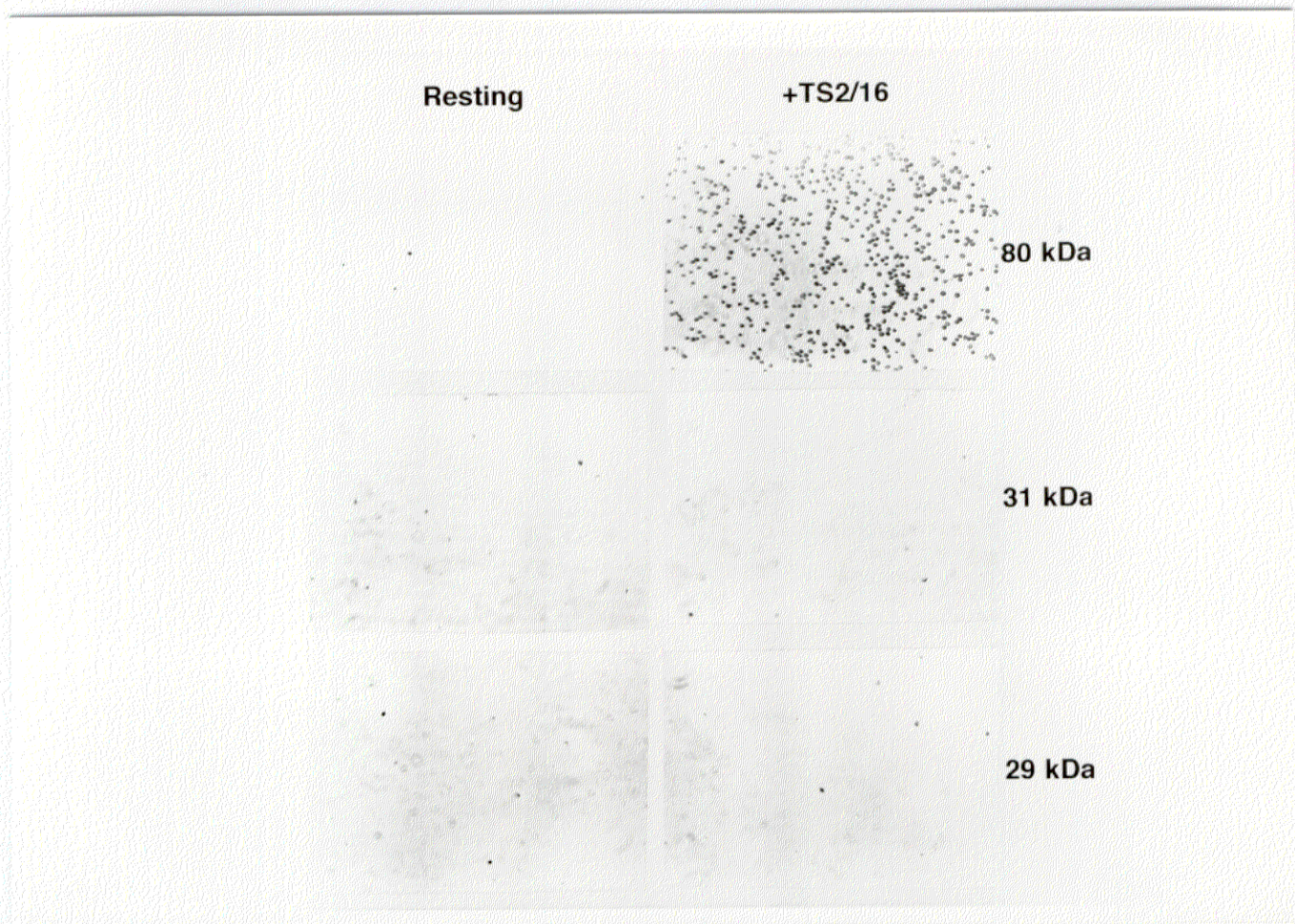


Fig4.18.- Adhesión de las células Ramos a los fragmentos de Fn de 80, 29 y 31 kDa.

Para confirmar la especificidad de la activación a través de la subunidad $\beta 1$, realizamos ensayos de adhesión al fragmento de 80 kDa con las líneas celulares B, JY y RPMI8866. Estas líneas celulares se eligieron porque no expresan la subunidad $\beta 1$ (ver tabla I) (Chan et al. 1992; Stupack et al. 1991; Stupack et al. 1992); en lugar de la subunidad $\beta 1$ expresan la subunidad $\beta 7$ que también se asocia con $\alpha 4$ (Chan et al. 1992; Postigo et al. 1993). Como puede observarse en la figura 4.19 el Acm anti- $\beta 1$ TS2/16 no tuvo ningún efecto en la adhesión de las células JY y RPMI8866 al fragmento de 80 kDa, mientras que en el mismo experimento TS2/16 indujo eficientemente la adhesión de las células Ramos y Daudi a este fragmento; obsérvese como la unión constitutiva de JY al fragmento de 80 kDa no se vio afectada por el Acm TS2/16. El Acm control Alex1/4 no tuvo efecto en ninguno de los casos.

4.3.2.- Efecto del PMA en el reconocimiento del fragmento de Fn de 80 kDa en distintas células linfoides B.

Nuestros resultados habían demostrado que el PMA, al igual que el Acm TS2/16, inducía el reconocimiento del dominio Hep II por parte de algunas células hematopoyéticas (ver fig.4.11). Para establecer si el tratamiento celular con PMA afectaba al reconocimiento del fragmento de 80 kDa por células linfoides B, realizamos ensayos de adhesión celular con células tratadas con PMA. Como muestra la figura 4.19, el tratamiento celular con 50 ng/ml de PMA durante 20 min. no tuvo ningún efecto en la adhesión de las células Ramos y Daudi al fragmento de 80 kDa; en el mismo experimento el Acm TS2/16 produjo el efecto esperado induciendo adhesión celular. El PMA tampoco afectó la unión de las células Ramos y Daudi al fragmento de 38 kDa (datos no mostrados). Por el contrario, el PMA resultó ser un buen activador de la adhesión de las células JY y RPMI 8866 al fragmento de 80 kDa (fig. 4.19); las células JY se unen al fragmento de 80 kDa constitutivamente y el PMA aumenta considerablemente esta adhesión. El PMA también induce adhesión de las células RPMI 8866 al fragmento de 80 kDa. No se observó ningún cambio en la expresión superficial de las integrinas tras dicho tratamiento con PMA (datos no mostrados).

Estos resultados sugerían la implicación de dos receptores diferentes para el fragmento de 80 kDa, uno de ellos regulado por el Acm TS2/16 y el otro por PMA. Stupack et al. (1992) han descrito que la integrina $\alpha v \beta 3$ actúa como un receptor de Fn en células B. Para establecer si $\alpha v \beta 3$ era el receptor para el fragmento de 80 kDa en las células JY y RPMI 8866, llevamos a cabo ensayos de adhesión al fragmento de 80 kDa en presencia del Acm anti- $\alpha v \beta 3$ LM609. Nuestros resultados mostraron que este Acm inhibía completamente (100%) la adhesión de las células JY en reposo y las células RPMI 8866 tratadas con PMA, y parcialmente (45%) la adhesión de las células JY tratadas con PMA. Estos resultados confirmaban la implicación de $\alpha v \beta 3$ en la adhesión de las células B negativas para la subunidad $\beta 1$ al fragmento de 80 kDa, y sugerían la existencia de un receptor de Fn todavía no identificado en las células JY estimuladas con PMA. El Acm LM609 no tuvo ningún efecto en la adhesión de las células Ramos y Daudi al fragmento de 80 kDa (fig.4.20), de acuerdo con la ausencia de expresión de $\alpha v \beta 3$ en estas células (ver Tabla II).

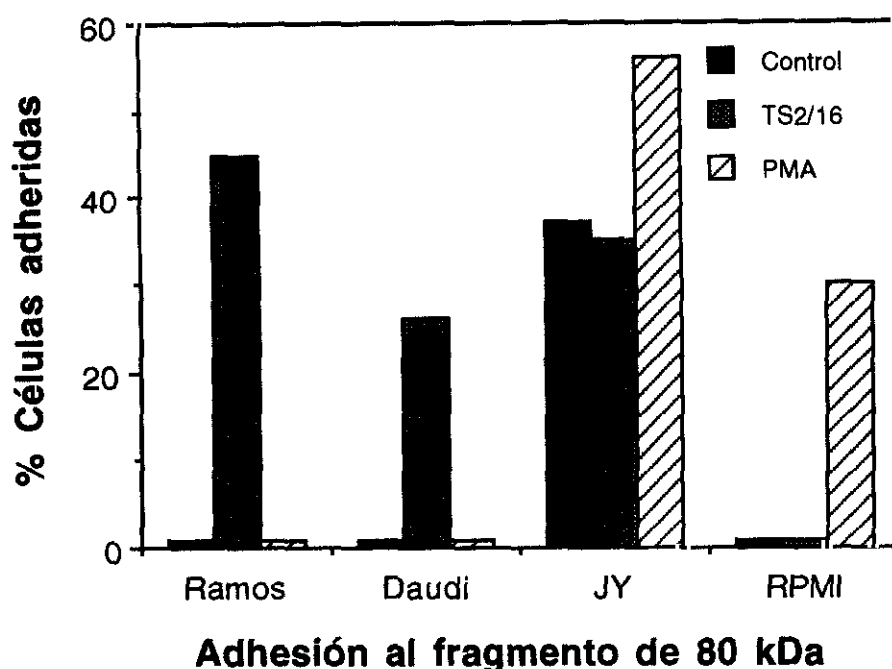


Fig.4.19.- Efecto del PMA y el Acm TS2/16 en la adhesión al fragmento de 80 kDa para distintas líneas linfoides B. Las células se incubaron con medio de cultivo en el caso de las células control (en reposo), con PMA (50 ng/ml, 20 min.), o con una dilución 1: 10 del Acm TS2/16 -15 min. a 37°C- y se añadieron 5×10^4 células por pocillo previamente tapizados con 100 μ l fragmento de 80 kDa (38 μ g/ml). La cuantificación de las células adheridas se describe en el capítulo de materiales y métodos. Los valores representan la media de tres experimentos.

4.3.3.- Identificación del receptor celular implicado en el reconocimiento del fragmento de Fn de 80 kDa. Análisis del sitio activo de este fragmento.

Para identificar el receptor implicado en el reconocimiento del fragmento de 80 kDa de Fn por células Ramos y Daudi tratadas con el Acm TS2/16, llevamos a cabo ensayos de adhesión celular en presencia de distintos Acms anti-integrinas. Los Acms anti- $\alpha 4$ HP1/1 y HP1/2 dirigidos contra los epitopos A y B1 respectivamente, inhibieron la adhesión al fragmento de 80 kDa de las células Ramos (fig.4.20) y Daudi preincubadas con el Acm TS2/16. Los Acms dirigidos contra las subunidades $\alpha 5$ (P1D6), $\alpha 3$ (IIF5), así como los Acms anti- $\alpha v \beta 3$ (LM609) y anti-CD45 (D3/9) no tuvieron ningún efecto en la adhesión

celular al fragmento de 80 kDa (fig.4.20), implicando así a la integrina $\alpha 4\beta 1$ en el reconocimiento de dicho fragmento.

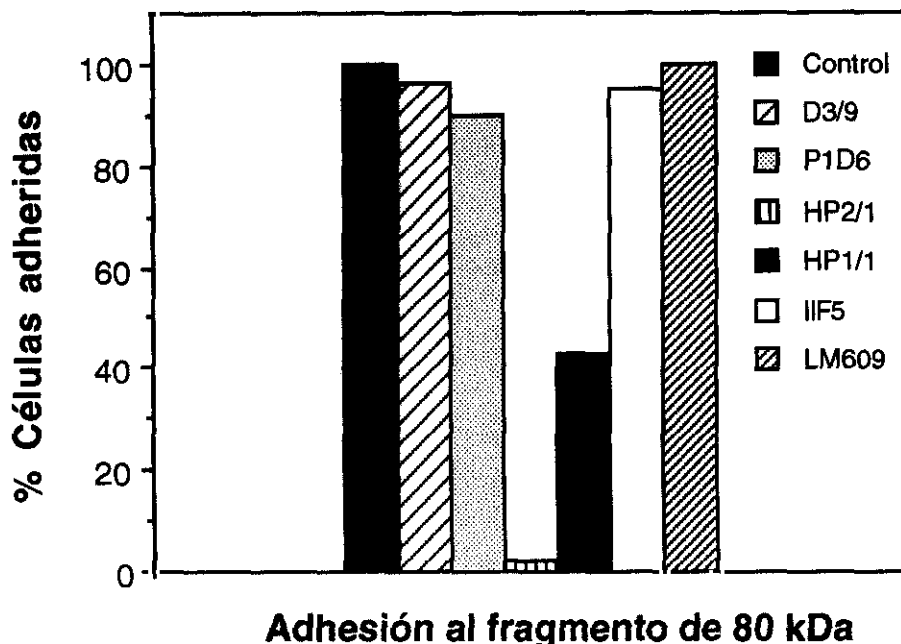


Fig.4.20.- Efecto de distintos Acms en la adhesión de las células Ramos tratadas con el Acm TS2/16 al fragmento de 80 kDa. Las células se trataron -15 min., 37°C- con el Acm TS 2/16, y a continuación se incubaron con el Acm indicado durante 15 min. Los sobrenadantes de hibridomas: D3/9, P1D6, HP2/1 y HP1/1 se analizaron a una concentración 1:10, y los líquidos ascíticos IIF5 y LM609 a 1:500. Las células se añadieron (5×10^4 /pocillo) a los pocillos previamente tapizados con 100 μ l del fragmento de 80 kDa (38 μ g/ml) y después de 30 min. a 37 °C, las células adheridas se cuantificaron como se indica en los materiales y métodos. Los valores representan el porcentaje de células adheridas respecto al número de células control, que en este caso son células preincubadas sólo con el Acm TS2/16 sin inhibidor. Los valores representan la media de dos experimentos diferentes.

Para confirmar la implicación de $\alpha 4\beta 1$ en el reconocimiento del fragmento de 80 kDa, estudiamos el efecto de distintos péptidos sintéticos en adhesión celular. Como muestra la figura 4.21 los péptidos sintéticos CS-1 e IDAPS inhibieron en un 100% la adhesión de células Ramos tratadas con TS2/16 al fragmento de 80 kDa, confirmando así la implicación de $\alpha 4\beta 1$ dado que ambos péptidos son ligandos de esta integrina. Los

péptidos control CS-2 (fig.4.21) y CS-3 (no mostrado) no tuvieron ningún efecto en estos experimentos mientras que CS-5 inhibió la adhesión celular en un 65% (no mostrado). Sorprendentemente, el péptido GRGDSPC inhibió completamente la adhesión al fragmento de 80 kDa mientras que el control RGES no tuvo ningún efecto (fig.4.21). La concentración de péptido requerida para producir un 50% de inhibición de la adhesión celular al fragmento de 80 kDa fue: 5,45 nM (15 μ g/ml) para CS-1, 104 nM (80 μ g/ml) para GRGDSPC y 400 (220 μ g/ml) para IDAPS. CS-1 resultó ser el inhibidor más eficiente y el péptido GRGDSPC era mejor inhibidor que la secuencia IDAPS.

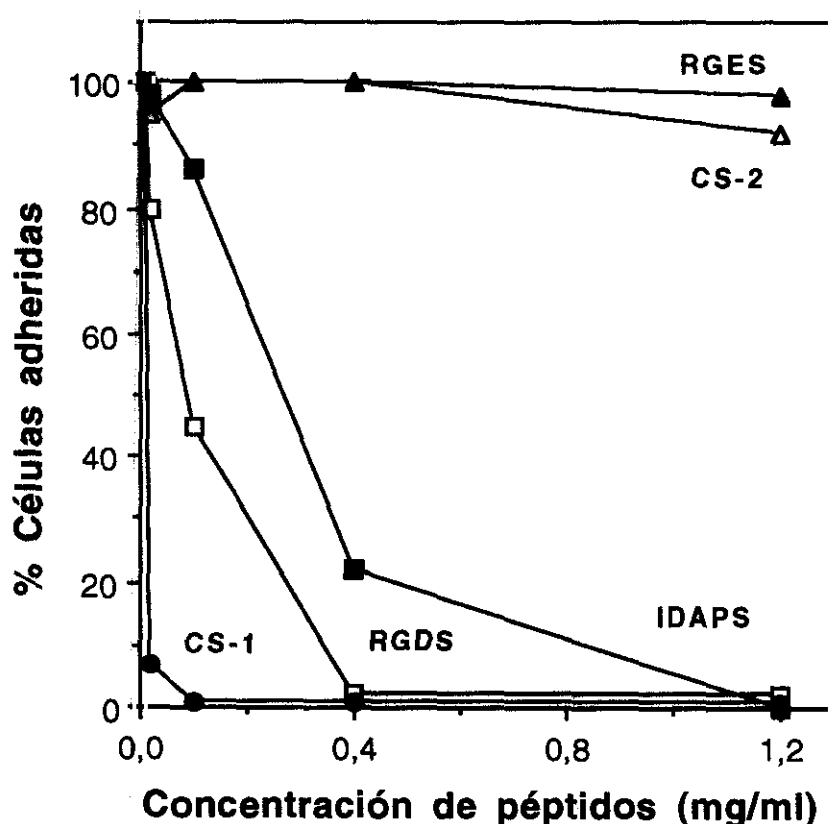


Fig.4.21.- Inhibición de la adhesión de las células Ramos al fragmento de 80 kDa con péptidos sintéticos. Las células se trataron con el Acm TS2/16 -15 min.,37°C- y se incubaron -30 min. a temperatura ambiente- con diferentes concentraciones de los péptidos sintéticos que se indican en la figura. Las células se añadieron a los pocillos tapizados con el fragmento de 80 kDa (19 μ g/ml) y se procedió como se describe en el capítulo de materiales y métodos. Los valores indicados representan el porcentaje de células adheridas respecto al control, que en este caso son pocillos con células preincubadas con TS2/16, sin inhibidor. Estos valores corresponden a la media de tres experimentos.

El resultado de estos experimentos confirma la implicación de $\alpha 4\beta 1$ en esta interacción. El patrón de inhibición con los Acms anti- $\alpha 4$ (fig.4.20) (B1>A) es parecido al obtenido para los fragmentos de 58 y 38 kDa (ver fig. 4.10) sugiriendo que la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con estos fragmentos se produce en regiones próximas de la integrina. Esto se confirma, además, por el hecho de que las secuencias CS-1 e IDAPS inhiben eficientemente la adhesión al fragmento de 80 kDa.

Nuestros resultados indicaban que la activación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ por el Acm TS2/16 inducía el reconocimiento de la secuencia RGD. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la adhesión de las células Ramos al fragmento de 38 kDa es independiente de RGD. Decidimos comparar, por tanto, el efecto del péptido sintético RGD en la adhesión de células en reposo o tratadas con TS2/16 al fragmento de Fn de 38 kDa. La figura 4.22 muestra estos resultados. Este péptido, a 0,5 mg/ml no tuvo ningún efecto cuando las células estaban en reposo, de acuerdo con los datos publicados previamente (García-Pardo et al. 1990) mientras que inhibió en un 50% la adhesión al fragmento de 38 kDa, cuando las células estaban previamente incubadas con el Acm TS2/16. Como esperábamos, el péptido sintético CS-1, que se utilizó como control, resultó ser un buen inhibidor en ambos casos.

Todos estos resultados indican que el péptido sintético RGD es capaz de inhibir el reconocimiento de los ligandos constitutivos de la integrina $\alpha 4\beta 1$, cuando ésta se activa por el Acm TS2/16, y por lo tanto la integrina $\alpha 4\beta 1$ activada -pero no en reposo- es capaz de reconocer la secuencia RGD.

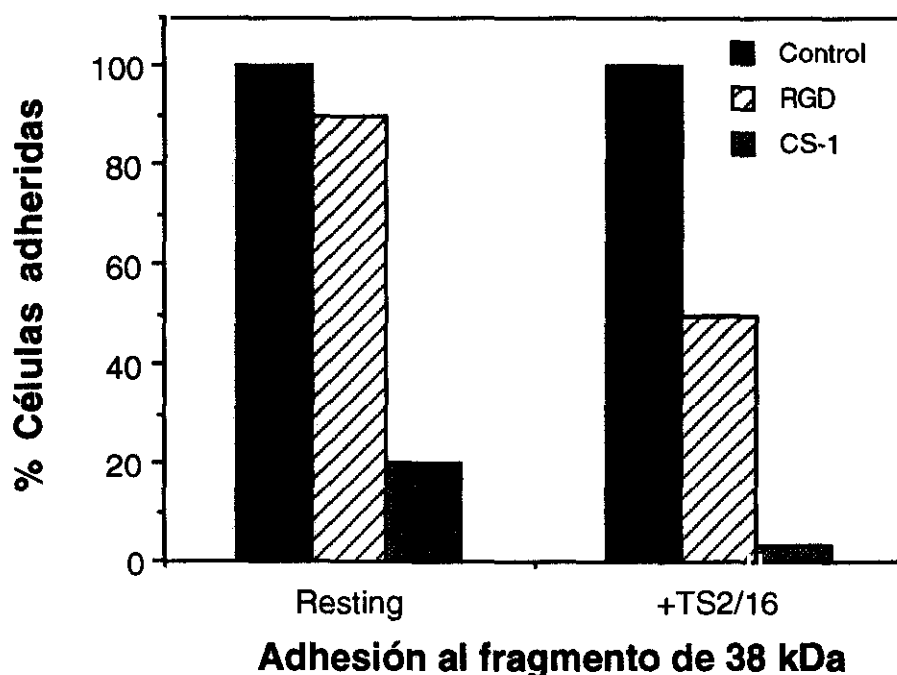


Fig.4.22 (ver página anterior).- Efecto del péptido sintético GRGDSPC en la adhesión de las células Ramos al fragmento de 38 kDa. Tanto las células en reposo como las tratadas con el Acm TS2/16 -15 min., 37°C- se incubaron con 0.5 mg/ml de los péptidos sintéticos GRGDSPC o CS-1 durante durante 30 min. a temperatura ambiente. Las células se añadieron a los pocillos previamente incubados con 100 μ l del fragmento de 38 kDa a una concentración de 0,8 μ g/cm² para las células en reposo ó 0,6 μ g/cm² para las células tratadas con TS2/16. el número de células en los pocillos control (sin inhibidor) fué de 35.000 -en reposo- y de 29.000 -tratadas TS2/16-. Las células adheridas respecto al control se cuantificaron según se indica en materiales y métodos. Estos valores son la media de dos experimentos diferentes.

Con el fin de identificar la secuencia específica implicada en la interacción $\alpha 4\beta 1$ -FN80 llevamos a cabo ensayos de adhesión celular al fragmento de 80 kDa inmovilizado en presencia de distintos fragmentos solubles de Fn y en presencia de Acms anti-Fn.

La Tabla III muestra el efecto de distintos fragmentos solubles de Fn en la adhesión de células tratadas con TS2/16 al fragmento de 80 kDa; los fragmentos solubles de 38 y 80 kDa inhibieron eficientemente la adhesión al fragmento de 80 kDa. Como se describe en el capítulo de materiales y métodos los fragmentos de 15 kDa y 40/45 kDa se obtuvieron a partir del fragmento de 80 kDa por digestión con pepsina. El fragmento de 15 kDa contiene la secuencia RGD mientras el fragmento de 45 kDa carece de esta secuencia; como muestra la tabla III sólo el fragmento de 15 kDa inhibió la adhesión de células Ramos tratadas con TS2/16 al fragmento de 80 kDa mientras los fragmento de 40/45 y el de 31 kDa no produjeron ningún efecto.

La figura 4.23 muestra el efecto de distintos Acms anti-Fn en la adhesión de células Ramos y Daudi preincubadas con TS2/16 a FN80. El Acm N-295 que reconoce un epítipo cerca de la secuencia RGD, inhibió la adhesión al fragmento de 80 kDa en un 80% mientras que los Acms P3D4 y N-296 dirigidos contra el dominio Hep II y la región carboxilo-terminal respectivamente no tuvieron ningún efecto.

Estos resultados confirman la implicación de la secuencia RGD en la interacción de las células Ramos y Daudi, activadas con el Acm TS2/16, con el fragmento de Fn de 80 kDa. Sin embargo, como el Acm N-295 no inhibió la adhesión celular en un 100% la implicación de otra región próxima a la secuencia RGD capaz de actuar de una forma sinérgica con este sitio no puede ser totalmente descartada.

TABLA III

Efecto de distintos fragmentos de Fn en la adhesión de células Ramos tratadas con TS2/16 al fragmento de 80 kDa

		% de Inhibición			
80kDa inmovilizado	80kD	38kD	15kD	45kD	31kD
$\mu\text{g/ml}$	4.5*	3	4.5	1.8	3
19	80	100	85	10	3
38	70	100	50	0	0

* nanomoles usados en la incubación

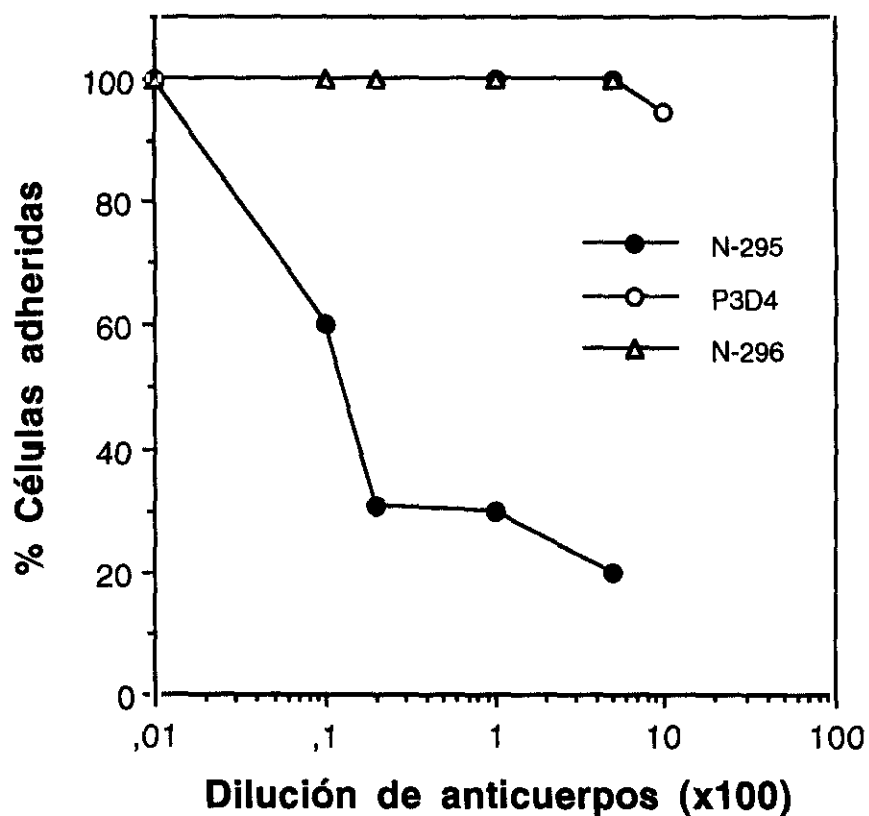


Fig.4.23.- Efecto de Acms anti-Fn en la adhesión de células Ramos tratadas con TS2/16 al fragmento de 80 kDa. A los pocillos previamente incubados con 100 μl del fragmento de 80 kDa (38 $\mu\text{g/ml}$), se añadieron las diluciones indicadas de los Acms: N-295 (anti-RGD), P3D4 (anti-Hep II), o el control N-296 (anti-Fib II) y se incubaron 30 min. a temperatura ambiente. Tras esta incubación se añadieron las células previamente tratadas -15 min., 37°C- con el Acm TS2/16. Las células adheridas se cuantificaron según se indica en materiales y métodos. Los valores se expresan como porcentajes respecto al número de células en el pocillo control (sin inhibidor) y representan la media de dos experimentos.

4.3.4.- Análisis de la especificidad de la interacción $\alpha 4\beta 1$ -FN80

Teniendo en cuenta que el Acm TS2/16 es capaz de inducir el reconocimiento de nuevos ligandos de $\alpha 4\beta 1$ en la molécula de Fn, estudiamos el efecto de este Acm en la adhesión a otras proteínas de MEC no descritas previamente como mediadoras de adhesión celular a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$, como por ejemplo el colágeno (COL) o la laminina (LM). Estas dos proteínas son ligandos conocidos de otras integrinas $\beta 1$ incluyendo $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ (Hynes, 1992)

Como muestra la figura 4.24 la preincubación de las células Ramos con el Acm TS2/16 en ensayos de adhesión a laminina y colágeno no produjo ningún efecto, mientras que las células se unieron eficientemente al fragmento de 80 kDa, en el mismo experimento. Teniendo en cuenta que la integrina mayoritaria en las células Ramos es $\alpha 4\beta 1$ (ver Tabla I), estos resultados indican que el Acm TS2/16 no induce el reconocimiento de laminina y colágeno, a pesar de que estas proteínas de la MEC también tienen la secuencia RGD. Por tanto, el reconocimiento de la secuencia RGD por la integrina $\alpha 4\beta 1$ es específico del entorno de Fn. Para comprobar que habíamos utilizado una concentración suficiente de LM y COL para mediar adhesión celular, utilizamos como control la línea celular de melanoma A375. Las células A375 expresan distintas integrinas $\beta 1$ (Tabla I), entre ellas el receptor de laminina $\alpha 6\beta 1$ (Arroyo et al. 1992). La figura 4.24 muestra que las células A375 se unen constitutivamente al fragmento de 80 kDa, y a laminina y colágeno con menor eficiencia; la preincubación celular con el Acm TS2/16 aumentó la adhesión a los tres sustratos de acuerdo con los datos publicados (Arroyo et al. 1992; Arroyo et al. 1993). Esta adhesión no se debió a un efecto de "cross-linking" de las células a las proteínas de MEC vía el Acm TS2/16 dado que en experimentos control, el Acm TS2/16 no se unió a Fn, LM, o COL. Por el contrario, el incremento de la adhesión de las células A375 a proteínas de MEC es debido a una regulación de la adhesión de las integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, y $\alpha 6\beta 1$ que son receptores del fragmento de Fn de 80 kDa, COL, y LM respectivamente (Arroyo et al. 1992; Arroyo et al. 1993; Chan et al. 1993). Como esperábamos, las células RPMI 8866 y JY, que carecen de la subunidad $\beta 1$, no unen LM o COL en respuesta a la preincubación celular con el Acm TS2/16.

Con el fin de determinar si el cambio de especificidad en el reconocimiento de ligandos es una característica común a otras integrinas, estudiamos el efecto de TS2/16 sobre la adhesión de la línea celular K-562 al fragmento de 38 kDa. Las células K562 expresan $\alpha 5\beta 1$ pero no $\alpha 4\beta 1$ (Tabla I) y por tanto no se unen al fragmento de 38 kDa constitutivamente. El Acm TS2/16 no produjo el reconocimiento del fragmento de 38 kDa aunque aumentó la unión de estas células al fragmento de 80 kDa a través de $\alpha 5\beta 1$ (datos no mostrados). Por tanto, se puede concluir que la capacidad de reconocer nuevos

ligandos después de la activación a través de la subunidad $\beta 1$ podría ser una propiedad intrínseca de la integrina $\alpha 4\beta 1$.

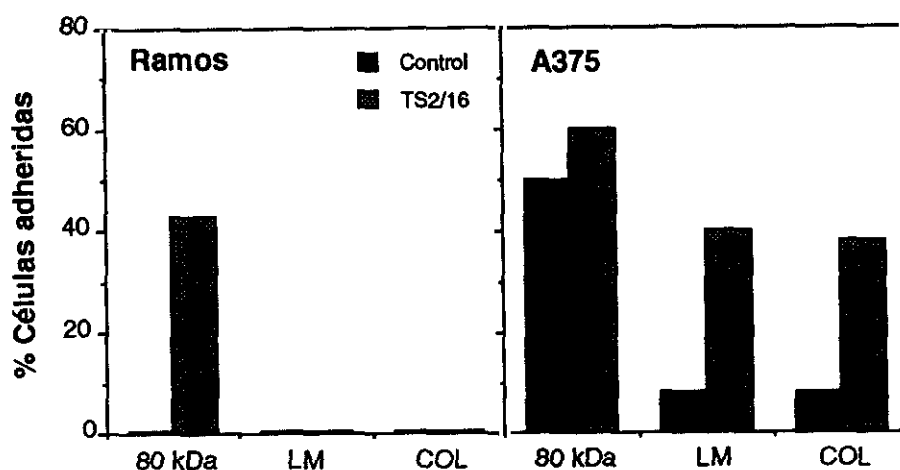


Fig.4.24.- Efecto del Acm TS2/16 en adhesión celular a laminina y colágeno tipo I. Las células Ramos y el control A375 se incubaron con el Acm TS2/16 y se añadieron a pocillos tapizados con 100 μ l del fragmento de Fn de 80 kDa (38 μ g/ml), laminina (LM, 150 μ g/ml), o colágeno tipo I (COL, 150 μ g/ml). Las células se cuantificaron según se especifica en materiales y métodos. Los valores representan el número de células adheridas respecto al total de células añadidas y corresponden a la media de dos experimentos diferentes.

4.4.- Estudio de algunas implicaciones celulares en leucocitos subsiguientes a la interacción $\alpha 4\beta 1$ -Fn.

Los datos presentados anteriormente habían demostrado que $\alpha 4\beta 1$ está presente en distintas poblaciones celulares como diversas formas capaces de reconocer distintos ligandos de Fn según el estado de activación, y que tales estados pueden inducirse por diversos agentes. A continuación se estudian algunas de las consecuencias celulares que sobre los leucocitos tiene la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con estos distintos ligandos de Fn.

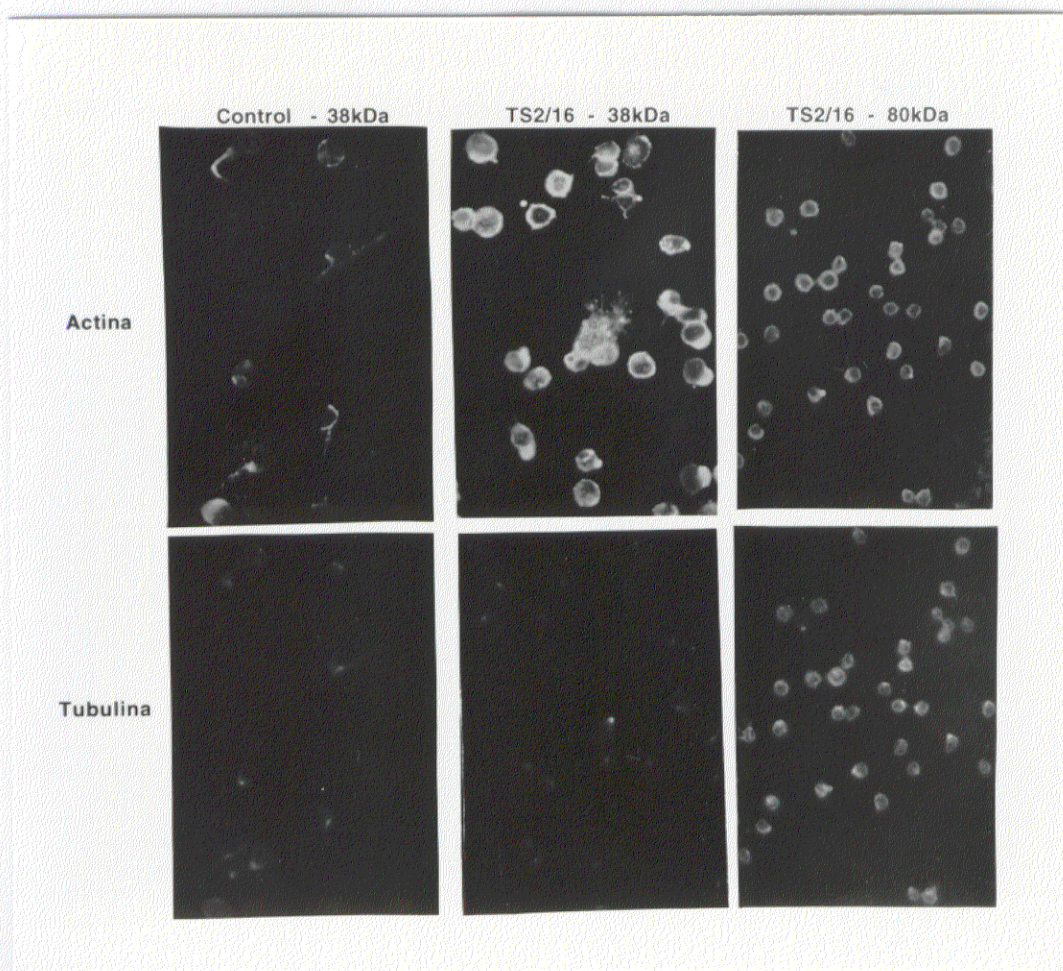
4.4.1.- Análisis de la reorganización del citoesqueleto tras la interacción de células linfoides B con Fn

El hecho de que la integrina $\alpha 4\beta 1$ sea capaz de interaccionar con varios ligandos en Fn podría implicar una reorganización del citoesqueleto en las células B Ramos estudiadas diferente en cada caso. Para analizar esta hipótesis se llevaron a cabo ensayos de

inmunofluorescencia utilizando los fragmentos de Fn de 80 y 38 kDa que proceden de la región central y carboxilo-terminal de Fn respectivamente. De esta forma es posible estudiar las consecuencias intracelulares de la interacción de cada uno de los ligandos de $\alpha 4\beta 1$ en Fn: CS1/Hep II contenidos en la región carboxilo-terminal (38 kDa) y la secuencia RGD presente en la zona central (80 kDa).

La Figura 4.25 muestra el análisis por inmunofluorescencia de la adhesión (3 h) a los fragmentos de 38 y 80 kDa de las células Ramos en reposo y preincubadas con el Acm TS2/16; en este caso se puede observar la distribución del citoesqueleto de actina (A) y de la tubulina (B). Como se puede observar en la Figura 4.25A, las células adheridas al fragmento de 38 kDa muestran abundantes extensiones citoplasmáticas, algunas de las cuáles llegan a constituir auténticas colas de gran longitud, adquiriendo así un fenotipo bastante distinto al de las células linfoides en general. Las células tratadas con TS2/16 sobre el fragmento de 38 kDa adoptan una morfología muy parecida a la anterior aunque con muchas más ramificaciones y menos colas largas. Por el contrario, las células adheridas al fragmento de 80 kDa carecen de tales extensiones y presentan un aspecto bastante más redondeado. En la Figura 4.25B, las células unidas al fragmento de 80 kDa muestran una distribución de tubulina homogénea y polarizada mientras que las células unidas al fragmento de 38 kDa muestran un patrón heterogéneo con distribución central y polarizada. Estos resultados indican que la adhesión celular a los fragmentos de Fn que contienen los distintos ligandos para $\alpha 4\beta 1$ (CS1/Hep II en la zona carboxilo-terminal *versus* RGD en la zona central) no inducen la misma reorganización del citoesqueleto de actina. Sin embargo, la distribución de tubulina para las células unidas a los fragmentos de 38 u 80 kDa muestran un patrón no asociado exclusivamente a cada fragmento.

Fig.-4.25 (ver página siguiente).- Análisis por inmunofluorescencia de la adhesión a los fragmentos de 38 y 80 kDa de células Ramos en reposo o tratadas con el Acm TS2/16. Las células Ramos en reposo o tratadas con TS2/16 se añadieron sobre cubres circulares (12 mm de diámetro) previamente tapizados con los fragmentos de 38 kDa ($3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y 80 kDa ($23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Después de 3 h. de incubación a 37°C , las células adheridas se fijaron y se tiñeron en primer lugar con un Acm anti-tubulina. En segundo lugar las células se incubaron con IgG de conejo anti-ratón marcado con fluoresceína y Phalloidina-RITC. Las muestras teñidas se observaron al microscopio de fluorescencia (objetivo de 40x) y se fotografiaron.



Para determinar si la interacción con el fragmento de 80 kDa requería un periodo de tiempo diferente al del fragmento de 38 kDa para producir el mismo efecto, las células Ramos se incubaron con ambos fragmentos a distintos tiempos. Las células se fijaron y se tiñeron para observar la distribución de actina. En la Figura 4.26 se muestra la cinética de la adhesión a los fragmentos de Fn de 38 y 80 kDa de células Ramos en reposo y tratadas con TS2/16 después de 15 min. (A), 3 h. (B) , y toda la noche (C). A los 15 min. de incubación, para las células Ramos en reposo y tratadas con TS2/16, no se observó la formación de extensiones citoplasmáticas, siendo su aspecto el de células linfoides (redondeadas). Sin embargo, a los 30 min. (no mostrado en la figura) ya se podían observar las extensiones celulares e incluso colas de cierta longitud. A las 3 h. de incubación celular (panel B) se observaron colas de gran longitud que sin embargo llegaron a desaparecer después de toda la noche (panel C). Aunque las células Ramos en reposo o tratadas con el Acm TS2/16 mostraron un patrón morfológico similar, la cinética resultó más lenta para las células en reposo. Después de toda la noche de incubación celular con el fragmento de 38 kDa, las células (en reposo y activadas) mostraban un aspecto muy parecido a las células unidas a 80 kDa para cualquiera de los tiempos de incubación; es decir, presentaban una morfología redondeada.

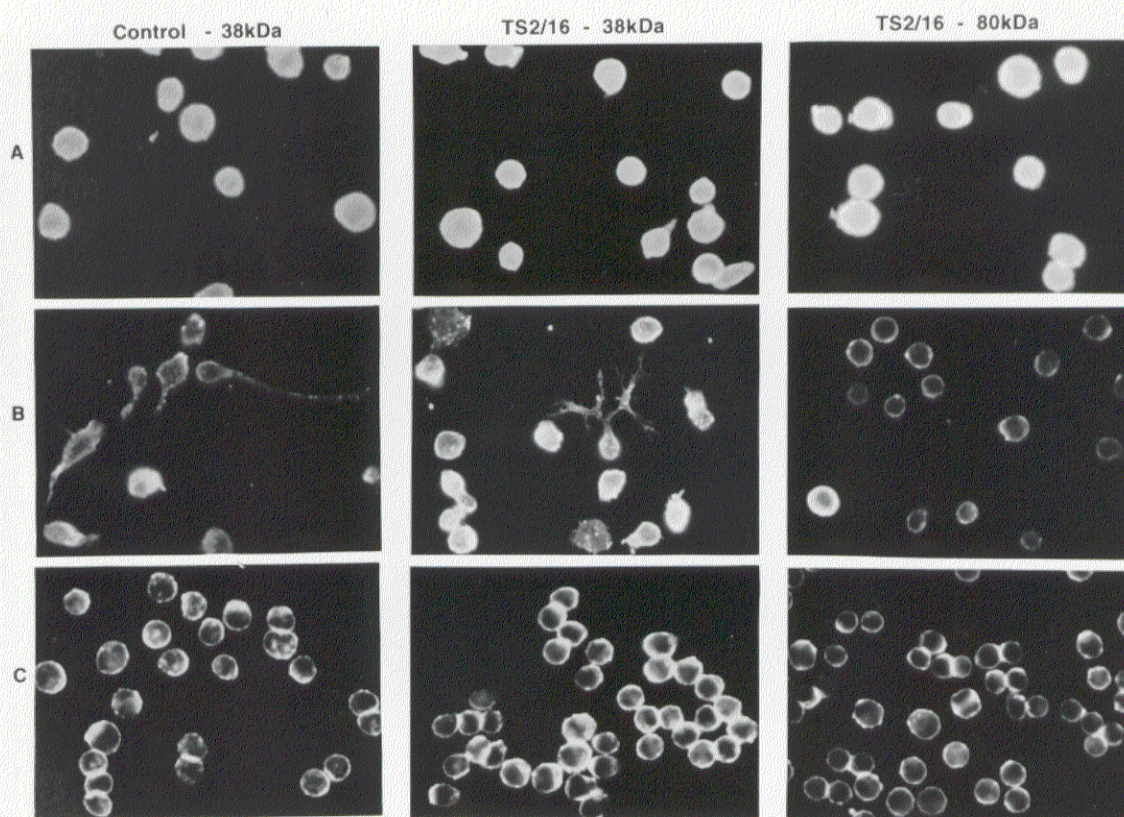


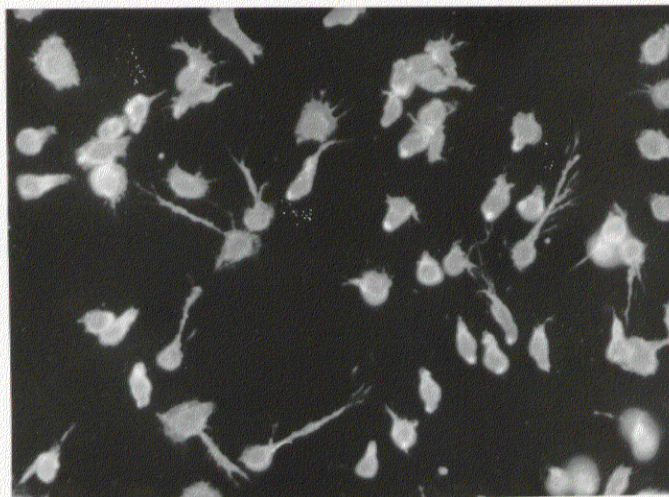
Fig.4.26.- Cinética de la adhesión a los fragmentos de Fn de 38 y 80 kDa de células Ramos en reposo y tratadas con TS2/16. Las células Ramos -4×10^5 - en reposo (primera columna) o tratadas con TS2/16 15 min. a 37°C (segunda y tercera columnas) se añadieron a los cubres tapizados con el fragmento de 38 kDa $-3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - (primera y segunda columnas) o con el de 80 kDa $-23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - (tercera columna) durante 15 min. (A), 3 h. (B) y toda la noche (C). Las células se fijaron, se tiñeron con Phalloidina-RITC, y se fotografiaron al microscopio (objetivo de 40 x)

Nuestros resultados indicaban que la formación de largas extensiones citoplasmáticas celulares era el resultado de la interacción de las células linfoides B Ramos con la región carboxilo-terminal de Fn (fragmento de 38 kDa) que, como ya hemos citado anteriormente, contiene dos sitios activos, CS-1 y Hep II. Para determinar la contribución de los sitios CS-1 y Hep II en la formación de estas prolongaciones, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia con los fragmentos de Fn de 38 y 58 kDa, puesto que éste último fragmento contiene exclusivamente la secuencia Hep II. Como se muestra en la Figura 4.27A, las células Ramos incubadas sobre el fragmento de 58 kDa no formaron largas prolongaciones, tan características del fragmento de 38 kDa.

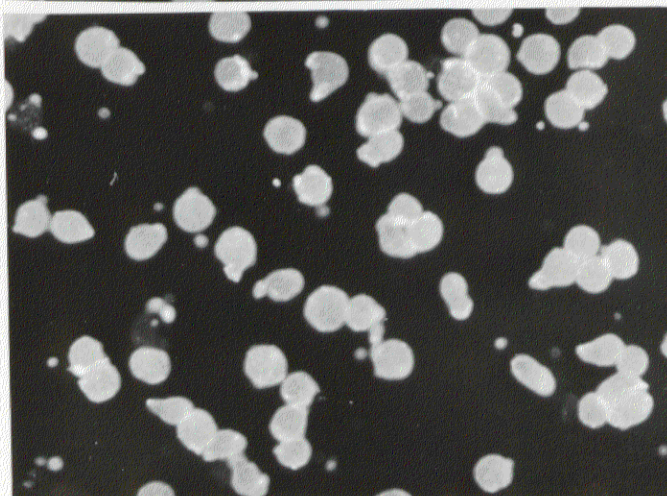
Por otra parte, se estudiaron las interacciones celulares con ambos fragmentos de Fn por microscopía confocal (fig.4.27B). En esta figura se muestran distintas secciones de un mismo campo para la adhesión al fragmento de 38 kDa y 58 kDa. Como puede apreciarse para el fragmento de 38 kDa, en el plano inferior se observa una larga cola totalmente adherida al sustrato, mientras la célula se sitúa en un plano superior, como confirman los distintos planos correspondientes a secciones superiores, apareciendo en el extremo superior una protuberancia que sobresale del resto. Por el contrario, para el fragmento de 58 kDa no se observan prolongaciones en ninguna de la secciones.

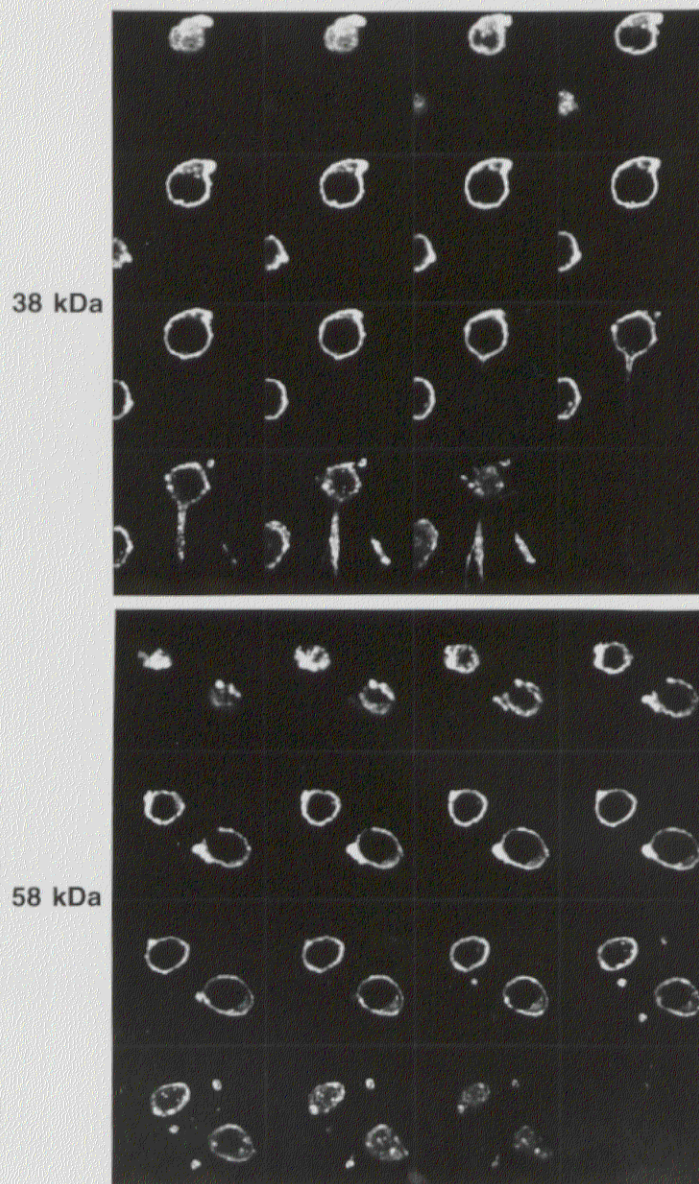
Fig. 4.27 (ver página siguiente).- A. Análisis por inmunofluorescencia de la adhesión a los fragmentos de 38 y 58 kDa de las células Ramos. Las células Ramos (4×10^4) se añadieron sobre cubres previamente incubados con los fragmentos de 38 kDa ($3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y 58 kDa ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Después de 3 h. de incubación a 37°C , las células se fijaron y se tiñeron con Phalloidina-RITC. Las células se observaron al microscopio de fluorescencia y se fotografiaron (objetivo de 40 x). **B. Estudio por microscopía confocal de la adhesión a ambos fragmentos.** Después de la incubación celular de 60 min. con los cubres preincubados con los fragmentos de 38 (B1) y 58 kDa (B2) las células se fijaron y se tiñeron con Phalloidina-RITC. Se muestran distintas secciones de un mismo campo.

38 kDa



58 kDa





Teniendo en cuenta que los fragmentos de 38 y 58 kDa difieren respecto al contenido de la secuencia CS-1, estos resultados sugerían la implicación de la secuencia CS-1 en la formación de las colas citoplasmáticas tan características observadas tras la interacción con el fragmento de 38 kDa.

Para confirmar esta hipótesis se realizaron ensayos de inhibición utilizando Acms anti-Fn previamente descritos. La figura 4.28 muestra el resultado obtenido cuando los cubres previamente tapizados con fragmentos de Fn se incubaron con Acms anti-Fn antes de añadir las células Ramos. Las células incubadas sobre cubres tratados con el Acm anti-

CS1 P1F11 no muestran prolongaciones celulares, son de aspecto redondeado. Sin embargo el Acm anti-80kDa, utilizado como control, no ejerció efecto alguno, de forma que se pueden apreciar las prolongaciones celulares tan características de las células Ramos sobre el fragmento de 38 kDa.

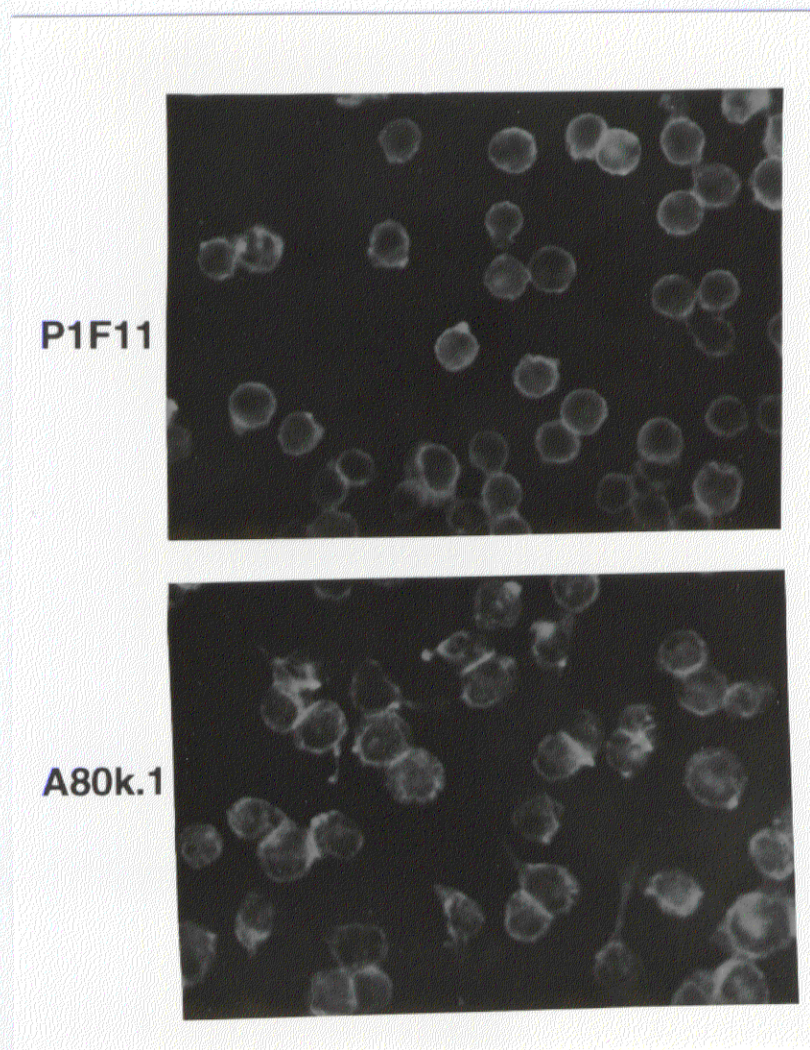


Fig.4.28.- Ensayo de inhibición con Acms anti-Fn. Los cubres circulares preincubados con el fragmento de 38 kDa ($3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) se incubaron a continuación con Acms anti-CS1 P1F11, anti-80 kDa A80k.1 o RPMI (no mostrado en la figura) y después de lavar los cubres dos veces con PBS se añadieron las células Ramos. Tras una incubación de 3 h., las células se fijaron y se tiñeron con Phalloidina-RITC, se observaron al microscopio de fluorescencia (objetivo 40 x) y se fotografiaron.

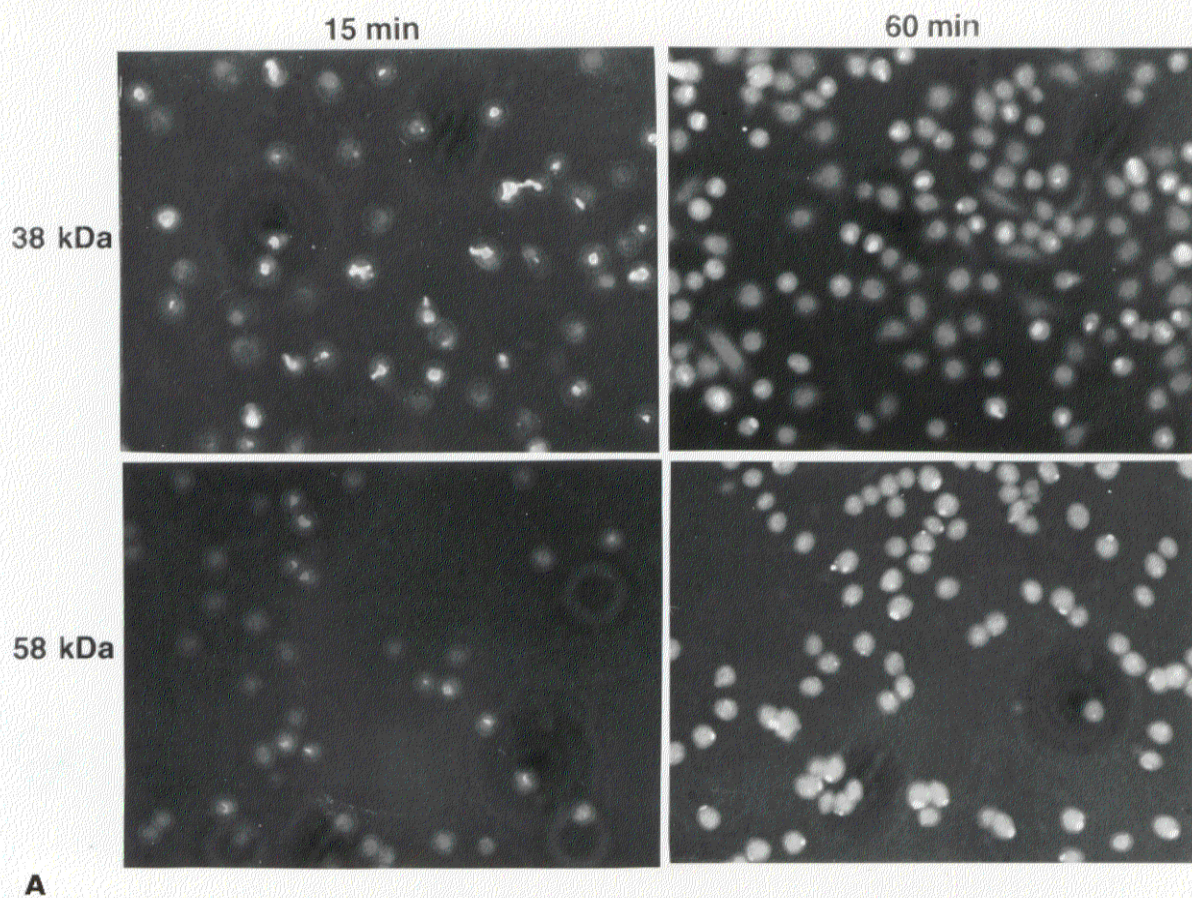
Todos estos resultados indican que la interacción celular con los diferentes ligandos de la integrina $\alpha 4\beta 1$ produce distinta reorganización del citoesqueleto. Por un

lado, la región central no induce grandes cambios en el fenotipo celular, al contrario que la región carboxilo-terminal. De los dos sitios activos contenidos en esta región nuestros resultados indican que la secuencia CS-1 sería la responsable de la formación de las prolongaciones celulares observadas.

4.4.2.- Identificación de los sitios activos dentro de Fn implicados en procesos de fosforilación después de la interacción linfocito-Fn.

Recientemente se ha descrito la fosforilación de una proteína de 110 kDa (pp110) en células linfoides B humanas después de la interacción con el fragmento de 38 kDa de Fn (Freedman et al. 1993). Sin embargo, como este fragmento contiene dos sitios activos (CS1/Hep II), decidimos estudiar la contribución de cada uno de estos sitios, comparando los procesos de fosforilación que tienen lugar tras la interacción de las células Ramos via $\alpha 4\beta 1$ a los fragmentos de 38 kDa o 58 kDa (contiene sólo Hep II). Para ello se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia; como se muestra en la Figura 4.29A los fragmentos de 38 kDa y 58 kDa inducen fosforilación en tirosina después de 15 y 60 min. de incubación. Como puede apreciarse en la figura 4.29B, la distribución muestra un aspecto distinto. En el caso de 38 kDa aparece una ventosa central y para 58 kDa un punteado heterogeneo con algunas concentraciones de morfología irregular. La ventosa basal se aprecia mejor en la composición de distintos planos (Fig. 4.29C).

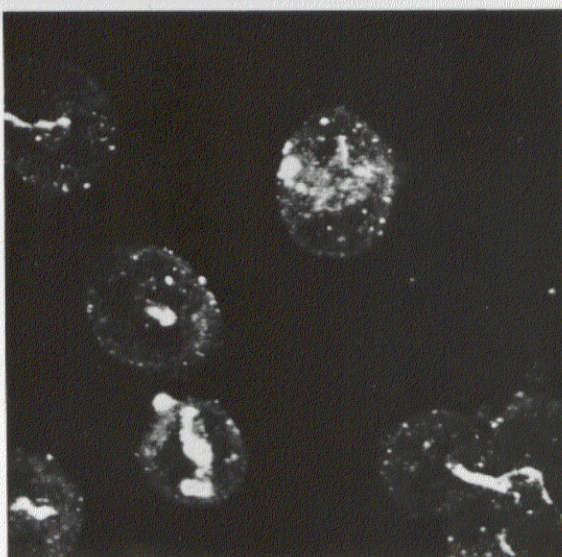
Fig.4.29. A. Análisis por inmunofluorescencia de la fosforilación sobre los fragmentos de 38 y 58 kDa. Las células Ramos se añadieron sobre cubres circulares previamente tapizados con fragmentos de 38 kDa (3,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y 58 kDa (11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Después de 15 y 60 min. de incubación, las células se fijaron y se incubaron con un Acm anti-fosfotirosina marcado con biotina durante 30 min. Después se añadió streptavidina marcada con fluoresceína. Las células se observaron y fotografiaron (objetivo 40x). **B. Estudio por microscopía confocal.** Las mismas muestras se observaron con un microscopio confocal y se fotografiaron. **C. Estudio por microscopía confocal de la muestra de 38 kDa mostrando los diferentes planos.**

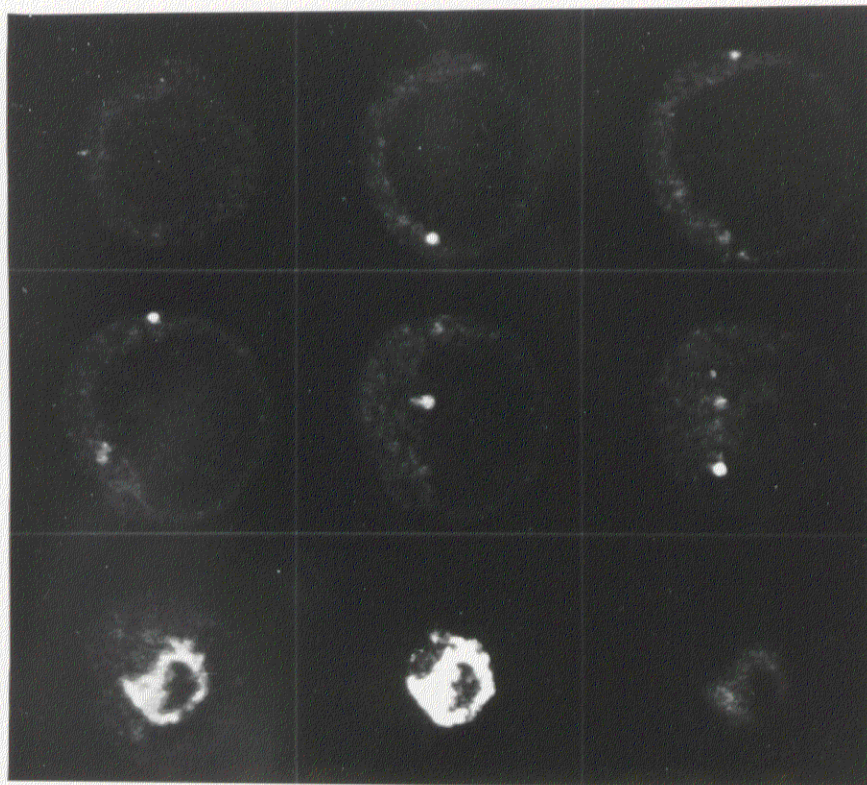


38 kDa



58 kDa

**B**

**c**

5.- DISCUSSION

DISCUSION

La interacción de los leucocitos con la proteína de MEC Fn resulta esencial en la migración, en la localización en tejidos y en la función general de estas células. A nivel molecular esta interacción constituye un proceso complejo que implica tanto a la región carboxilo-terminal como a la región central de la molécula de Fn.

Como primera aproximación al estudio de la interacción de los leucocitos con la región carboxilo-terminal de Fn se obtuvieron dos Acms, P1F11 y P3D4, que reconocen los sitios activos CS-1 y Hep II respectivamente. Estos Acms han resultado muy útiles para determinar el origen exacto de algunos fragmentos de Fn correspondientes a la región carboxilo-terminal y nos han permitido estudiar su efecto en la interacción celular con Fn, puesto que ambos sitios (CS-1 y Hep II) son capaces de mediar adhesión celular.

En base al peso molecular de los fragmentos obtenidos a partir de la digestión de Fn con tripsina, se había asumido que el fragmento de 58 kDa procedía de la cadena B de Fn (McCarthy et al. 1988; Wayner et al. 1989; Ferreira et al. 1990; García-Pardo et al. 1990). Los resultados obtenidos en el presente trabajo con el Acm P1F11 nos permiten afirmar definitivamente que el fragmento de 58 kDa procede de la cadena B de la Fn plasmática. Además, teniendo en cuenta que la presencia de la secuencia CS-1 está regulada por mecanismos de "splicing" alternativo y, por tanto, no siempre está presente en la Fn, el Acm P1F11 resulta muy valioso en el estudio de la existencia de las distintas formas de Fn (con o sin CS-1) en los distintos tejidos.

Por otra parte, la secuencia exacta que reconoce el Acm P3D4 dentro del dominio Hep II de Fn aún no se ha determinado. No obstante, como este Acm inhibe totalmente la adhesión celular a los fragmentos de 38 y 58 kDa, se puede concluir que el sitio que reconoce el Acm P3D4 está directamente implicado en adhesión celular; de hecho, sorprende que este Acm sea tan buen inhibidor de la adhesión al fragmento de 38 kDa, puesto que este fragmento contiene dos sitios activos (Hep II y CS-1) y la secuencia CS-1 es, en principio, un sitio de mayor afinidad que el dominio Hep II (Wayner et al. 1989; García-Pardo et al. 1990a, 1990b). Más interesante aún es que el Acm anti-CS1 P1F11 inhiba tan poco la adhesión al fragmento de 38 kDa. Una posible explicación para este resultado es que el Acm P1F11 no sea capaz de interaccionar con el fragmento de 38 kDa o con la Fn en forma nativa con suficiente afinidad para bloquear la adhesión celular; P1F11 podría tener menor afinidad por CS-1 que el receptor natural. Por otra parte, P1F11 podría estar reconociendo un epítipo de CS-1 que no esté directamente implicado en adhesión. El sitio activo de CS-1 se ha identificado como la secuencia LDV, situada en el extremo carboxilo-terminal del péptido (Komoriya et al. 1991; Wayner et al. 1992). Resultados no publicados parecen indicar que el epítipo reconocido por este Acm está situado en la región central de la secuencia CS-1. Otra posible explicación para la baja inhibición obtenida con P1F11 es que, al contrario de lo que sucede con P3D4, al

bloquear CS-1 con el Acm P1F11 no se impida la unión al dominio Hep II, suficiente para mediar adhesión celular, sugiriendo un papel de "pivot" para el sitio Hep II.

Como ya se ha citado, la interacción de las células linfoides con la región carboxilo-terminal está principalmente mediada por los sitios activos CS-1 y Hep II a través de la integrina $\alpha 4 \beta 1$, esto es, dichas células reconocen los fragmentos de Fn de 38 kDa que contienen CS1 y Hep II y 58 kDa que contienen sólo Hep II. El presente estudio demuestra que las células monocíticas no reconocen el fragmento de 58 kDa incluso a elevadas concentraciones ($>300 \mu\text{g/ml}$), aunque se unen eficientemente al fragmento de 38 kDa a través de la secuencia CS-1. Estos datos confirman algunos resultados preliminares obtenidos por otros autores utilizando las células premonocíticas U937 (Ferreira et al. 1990) y podrían indicar que las células linfoides y monocíticas presentan un comportamiento diferencial respecto a la utilización de las distintas secuencias adhesivas dentro de Fn.

Nuestros resultados muestran que las líneas celulares T y B unen los fragmentos de 38 y 58 kDa, aunque en concentración molar el fragmento de 38 kDa resulta tres veces más efectivo en la capacidad de mediar adhesión celular que el fragmento de 58 kDa. El hecho de que los linfocitos T de sangre periférica, al igual que las células monocíticas, no sean capaces de reconocer el dominio Hep II sugiere que el reconocimiento diferencial de este dominio podría estar determinado por la actividad de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ presente en cada población celular. La existencia de varios estados de activación en $\alpha 4 \beta 1$ está sugerida por los distintos patrones de adhesión observados, incluso entre células que unen los ligandos CS-1 y Hep II; por ejemplo el número de células linfoides T HUT-78 unidas a saturación a los fragmentos de 38 y 58 kDa es similar (49% y 42%), respectivamente, mientras que las células linfoides B Ramos se unen a saturación al fragmento de 38 kDa 1,5 veces más que al fragmento de 58 kDa, a igualdad de concentración molar. Por tanto, parece que existe lo que podríamos definir como un "gradiente de adhesión" al dominio Hep II de Fn, que estaría representado en primer lugar por las líneas celulares T, seguidas de las líneas celulares B, y finalmente las líneas celulares monocíticas junto a los linfocitos T de sangre periférica para las que la adhesión a Hep II es nula.

La diferente capacidad para reconocer el dominio Hep II probablemente viene determinada por la distinta avidéz (alta-intermedia-baja) del receptor presente en estas células. Así, mientras que la forma de avidéz intermedia/alta de $\alpha 4 \beta 1$ sería capaz de unir los ligandos de alta (CS-1) y baja (Hep II) afinidad, la forma de baja avidéz de $\alpha 4 \beta 1$ sólo sería capaz de unir el ligando de alta afinidad (CS-1). Según esto, la eficiencia del proceso de adhesión dependerá del estado de activación del receptor, así como de la disponibilidad y afinidad del ligando. En este sentido, recientemente se ha publicado un estudio sobre la existencia de dos subpoblaciones de timocitos que difieren en los marcadores de estados de diferenciación y expresan $\alpha 4 \beta 1$, pero en un caso $\alpha 4 \beta 1$ es funcional, y por tanto

reconoce sus ligandos constitutivos, mientras que en el otro no reconoce ningún ligando (Salomon et al. 1994).

Por otro lado se han descrito muchos ejemplos de cambios que tienen lugar respecto a la adhesión a Fn tras procesos de diferenciación celular (Bernardi et al. 1987; Shimizu et al. 1990; Verfaillie et al. 1991); para las células premonocíticas U937 se ha publicado que el fenotipo monocítico afecta a la adhesión celular a las secuencias RGD y CS-1 de Fn (Ferreira et al. 1991). Nuestros resultados muestran que las células U937 diferenciadas también adquieren la capacidad de unir el dominio Hep II, y esto se asocia con una ligera disminución de la expresión superficial de $\alpha 4 \beta 1$, lo que es consistente con el trabajo citado. La explicación más probable para el reconocimiento del dominio Hep II por parte de las células U937 tratadas con PMA es la estimulación funcional de $\alpha 4 \beta 1$ tras la diferenciación celular, como es el caso de las integrinas $\beta 1$ en linfocitos (Shimizu et al. 1990). Estos resultados se han intentado comprobar analizando la adhesión de monocitos extraídos de sangre periférica al fragmento de 58 kDa; sin embargo, debido a la elevada adhesión no específica que los monocitos mostraban en estos ensayos, no resultó posible determinar la especificidad de la unión. No obstante, el hecho de que la activación de las células monocíticas y los linfocitos T con dosis altas de PMA induzca la unión celular al dominio Hep II y, más aún, que sea más efectiva que los tratamientos largos con PMA, confirma la explicación de la activación de $\alpha 4 \beta 1$.

Está claramente demostrado que la actividad funcional de las integrinas se puede modular por distintos agentes, que incluyen no sólo los ésteres de forbol, como ya se ha mencionado (Shimizu et al. 1990; Wilkins et al. 1991; Postigo et al. 1991) sino también sus ligandos específicos (Du et al. 1991) y los cationes divalentes (Gailit et al. 1988; Kirchhofer et al. 1990). Algunos trabajos han mostrado que ciertos Acms dirigidos contra la subunidad $\beta 1$ pueden incrementar la avidéz de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos, y apuestan por un cambio conformacional que conduce a una forma activada del receptor (Arroyo et al. 1992; van de Wiel-van Kemenade et al. 1992; Kovach et al. 1992; Wayner et al. 1992). La unión constitutiva de $\alpha 4 \beta 1$ por sus ligandos CS1 y VCAM1 aumenta en estos casos. También se ha publicado que el reconocimiento de la secuencia LDV -secuencia activa contenida en CS-1- también requiere la activación previa de $\alpha 4 \beta 1$ (Wayner et al. 1992). Nosotros encontramos que el Acm TS2/16 (anti- $\beta 1$) induce eficientemente la unión de las células monocíticas y los linfocitos T de sangre periférica al dominio Hep II de Fn, previamente incapaces de unir este dominio.

Además, el reconocimiento del dominio Hep II también se puede observar en presencia del catión divalente Mn^{2+} , aunque el efecto es menor si se compara con el obtenido utilizando el Acm TS2/16. Otros autores habían descrito que este catión aumentaba la afinidad de las integrinas $\alpha 5 \beta 1$ y $\alpha v \beta 3$ por sus ligandos constitutivos (Gailit et al. 1988; Kirchhofer et al. 1990). En nuestros resultados, el efecto que el catión Mn^{2+} tuvo en la adhesión de los linfocitos T extraídos de sangre periférica al fragmento

de 58 kDa fue mínimo comparado con el obtenido para células monocíticas; esto podría indicar que los linfocitos T de sangre periférica expresan $\alpha 4\beta 1$ en un estado que requiere estímulos más fuertes para alcanzar una total activación, como por ejemplo el PMA o los Acms anti- $\beta 1$. Esta explicación está de acuerdo con la hipótesis propuesta sobre la existencia de distintos estados de activación para $\alpha 4\beta 1$ entre distintas poblaciones celulares. Pese a las diferencias observadas en el nivel de activación, se podría pensar que tanto el Mn^{2+} como el Acm TS2/16 inducen un cambio conformacional en $\alpha 4\beta 1$, de manera que aumentara la avidéz por sus ligandos y permitiera la unión al dominio Hep II. Los datos existentes hasta parecen confirmar este mecanismo como el más probable.

La existencia de dos regiones diferentes Hep II y CS-1, tan próximas en la molécula de Fn, capaces de mediar adhesión, así como los estudios funcionales realizados con los Acms P3D4 y P1F11, sugieren una cooperación funcional de los distintos sitios activos que resultaría en una adhesión celular estable. Para las células de melanoma se ha propuesto un modelo que implica la contribución de los sitios activos en Hep II y IIICS, la integrina $\alpha 4\beta 1$, y proteoglicanos (Iida et al. 1992). Basándonos en la diferente capacidad inhibidora de los Acms P3D4 y P1F11 dirigidos contra el dominio Hep II y la secuencia CS-1 respectivamente, podemos postular que la unión de $\alpha 4\beta 1$ al dominio Hep II podría servir para regular y estabilizar la unión a CS-1. Si esto fuera así, sería necesaria la activación de $\alpha 4\beta 1$ antes de que tuviera lugar la unión de algunas células hematopoyéticas al dominio Hep II, proporcionando así un mecanismo para la regulación de la adhesión de leucocitos a Fn en tejidos y sitios de inflamación. Por otra parte, la regulación (constitutiva *versus* inducida) de interacciones fuertes o débiles de $\alpha 4\beta 1$ con sus ligandos en Fn podría tener importantes implicaciones para la migración y función de linfocitos y monocitos. Particularmente, porque el sitio CS-1 no está presente en todas las isoformas de Fn debido a mecanismos de "splicing" alternativo, proporcionando así otro nivel de regulación de adhesión celular y migración, y reforzando el papel de la matriz extracelular en estos procesos.

Los resultados obtenidos respecto al reconocimiento del dominio Hep II por $\alpha 4\beta 1$ sugerían que la activación del receptor apropiado podría ser una buena aproximación para el estudio de las interacciones de baja afinidad o de nuevos ligandos, que de otro modo nunca se detectarían.

Trabajos previos (García-Pardo et al. 1990) habían mostrado de forma concluyente que algunas células linfoides B no expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ y son incapaces de unirse al fragmento de 80 kDa. Este fragmento procede de la región central de Fn y contiene la secuencia RGD, ligando descrito de $\alpha 5\beta 1$. En el presente estudio nosotros encontramos que la incubación de las líneas B negativas para $\alpha 5\beta 1$, como Ramos y Daudi, con el Acm anti- $\beta 1$ TS2/16 induce el reconocimiento del fragmento de 80 kDa de forma específica y eficiente. Los datos presentados muestran claramente que la adhesión de las células B al fragmento de 80 kDa está mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$, esto

es, los Acms anti- $\alpha 4$ y los péptidos sintéticos CS-1 e IDAPS (ligandos descritos de $\alpha 4\beta 1$) *inhiben completamente la adhesión celular al fragmento de 80 kDa*. No obstante, más interesante aún resultó que el péptido sintético GRGDSPC también fuese capaz de inhibir la adhesión de células tratadas con el Acm TS2/16. Según otros trabajos publicados previamente, se había establecido que la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con los fragmentos de Fn de 38 kDa (CS1/Hep II) y 58 kDa (Hep II) no se veía afectada por péptidos que contuvieran la secuencia RGD (Ferreira et al. 1990; García-Pardo et al. 1990a, García-Pardo et al. 1990b;Wayner et al. 1989). Consistente con estos datos, nuestros resultados muestran que la adhesión al fragmento de 38 kDa de las células Ramos (no tratadas o tratadas con el Acm control Alex 1/4) tampoco resulta afectada por el péptido GRGDSPC (ver Fig.4.22).

Además observamos que la secuencia RGD no sólo inhibe la función de las células tratadas en forma soluble, sino que resulta ser el principal sitio que media adhesión al fragmento de 80 kDa, como se puede concluir de la buena inhibición observada por el Acm N-295. Sin embargo, no se puede descartar totalmente la contribución de otras regiones dentro del fragmento de 80 kDa que pudieran actuar de forma sinérgica con la secuencia RGD.

Otros autores habían mostrado previamente que el "spreading" de células de melanoma se podía inhibir por el péptido sintético GRGDSPC y que la integrina $\alpha 4\beta 1$ se podía eluir de una columna de afinidad de CS-1 con dichos péptidos (Mould et al. 1991). En el presente estudio, sin embargo, no se observa el reconocimiento del péptido sintético RGD sin incubación previa de las células con el Acm TS2/16. Aunque no se puede explicar esta discrepancia, se debe tener en cuenta que resulta difícil comparar directamente los resultados obtenidos en ambos casos, por tratarse de distintos tipos celulares y estudiar un fenómeno diferente ("spreading" *versus* adhesión). Una explicación posible es que las células utilizadas en el trabajo de Mould et al. porten una forma constitutivamente activa de $\alpha 4\beta 1$ capaz de reconocer los péptidos que contienen la secuencia RGD. Muy recientemente se ha publicado un trabajo en el que se muestra que el péptido RGD cíclico también inhibe la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ indicando que la manipulación del ligando también induce el reconocimiento (Cardarelli et al. 1994).

Nuestros resultados indican que la activación de $\alpha 4\beta 1$ puede resultar en cambios respecto al reconocimiento de sus ligandos. Para otras integrinas se ha observado la capacidad de reconocer múltiples ligandos en estado activado. Por ejemplo, la integrina $\alpha 2\beta 1$ es sólo receptor de colágeno en plaquetas y fibroblastos, mientras que funciona como receptor de colágeno y también de laminina en otros tipos celulares (Elices et al. 1989; Languino et al. 1989; Kirchhfer et al. 1990). Los trabajos de Chan et al. (1993) muestran que en la misma célula, el Acm TS2/16 puede convertir la forma parcialmente activa de $\alpha 2\beta 1$ que reconoce sólo colágeno en una forma totalmente activa que también une laminina. Los resultados de esta tesis muestran que $\alpha 4\beta 1$ existe en diferentes estados

de activación en distintas células hematopoyéticas. Las células monocíticas y los linfocitos T de sangre periférica expresan una forma parcialmente activa de $\alpha 4\beta 1$ que reconoce CS-1 pero no el dominio Hep II, y el Acm TS2/16 convierte $\alpha 4\beta 1$ en una forma más activa -constitutivamente presente en células linfoides- capaz de reconocer ambos ligandos en Fn. En un trabajo reciente, Masumoto et al. (1993) comparan la unión de $\alpha 4\beta 1$ a CS-1 y VCAM-1; la forma menos activa de la integrina une sólo VCAM-1, mientras que la forma más activada une tanto VCAM-1 como CS-1. Como se muestra en esta tesis, el PMA también puede activar $\alpha 4\beta 1$ expresada en células premonocíticas U937, de forma que reconoce la secuencia CS-1 y el dominio Hep II. Por otra parte, resulta muy interesante que el PMA no induzca adhesión al fragmento de 80 kDa en las células linfoides Ramos y Daudi, y que incluso tampoco afecte a su unión constitutiva al fragmento de 38 kDa, sugiriendo así que la forma de $\alpha 4\beta 1$ presente en las células Ramos y Daudi no es sensible a la activación por ésteres de forbol. De hecho, otros autores (Masumoto et al. 1993) también han observado una diferente regulación de la función de $\alpha 4\beta 1$ en este caso por Acm(s) y Ca^{2+} . Más aún, también se ha publicado que el PMA no tiene efecto, o éste es mínimo, en la unión de $\alpha 2\beta 1$ a colágeno y laminina, mientras que el Acm TS2/16 resultó muy activo en la inducción de dicha unión (Chan et al. 1993). El hecho de que otros autores (Arroyo et al. 1993; Chan et al. 1993) hayan demostrado que el Acm TS2/16 pueda también activar las integrinas solubilizadas está de acuerdo con que no se requiera una ruta de activación intracelular. Todas estas observaciones apoyan la existencia de mecanismos diferentes de regulación de la función de las integrinas. Sin embargo, como el PMA aumenta la función de $\alpha 4\beta 1$ en algunos tipos celulares, es posible que la sensibilidad a un estímulo particular venga determinada o bien por el estado de activación de la integrina, o por el tipo celular, o por ambas cosas.

Todos los estudios anteriores han analizado el efecto de los Acms anti- $\beta 1$ o el PMA en la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con ligandos ya identificados, es decir, CS-1, Hep II y VCAM-1. Asimismo aunque los estudios de Chan et al. (1993) muestran claramente que existen cambios en la especificidad de acuerdo con el estado de activación de la integrina $\alpha 2\beta 1$, hay poblaciones celulares que unen laminina y/o colágeno de forma constitutiva. La novedad de nuestros resultados es que el Acm TS2/16 induce la unión a una región de Fn (fragmento de 80 kDa) no identificada previamente como un ligando de $\alpha 4\beta 1$. De hecho, el fragmento de 80 kDa es ligando de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y está ampliamente documentado que la función de $\alpha 4\beta 1$ en leucocitos es RGD-independiente (Wayner et al. 1989; Ferreira et al. 1990; García-Pardo et al. 1990a, 1990b).

Aunque, en general, una integrina puede unir varios ligandos, $\alpha 4\beta 1$ destaca porque puede unir múltiples secuencias e incluso secuencias aparentemente distintas dentro de la misma o diferentes moléculas. Dentro de Fn las secuencias mínimas que se han identificado como ligandos de $\alpha 4\beta 1$ son LDV, contenida en la secuencia CS-1 (Komoriya et al. 1991, Wayner et al. 1992), REDV, contenida en la secuencia CS-5

(Mould et al. 1991a), e IDAPS, contenida en H1 (Mould et al. 1991b). Se ha propuesto que el aspartato, común en estas secuencias, puede ser un residuo fundamental en el reconocimiento de $\alpha 4\beta 1$ (Mould et al. 1991b). Aunque esta hipótesis pudiera ser cierta, parece claro que otras secuencias podrían ser también ligandos específicos de $\alpha 4\beta 1$. Hay evidencias indirectas de que los péptidos FNC/HI (YIKPGSPPREVVPRPRPGV, aquí llamado sitio I) y FNC/HII (KNNQKSEPLIGRKKKT, llamado sitio II), derivados del dominio Hep II de Fn (McCarthy et al. 1988), podrían también interaccionar con $\alpha 4\beta 1$ (Iida et al. 1992). Todas estas secuencias (CS-1, CS-5, H1, FNC/HI, FNC/HII) están localizadas muy próximas dentro de la molécula de Fn, en la repetición tipo III-14 y en la región IIICS, que es contigua a la anterior (ver fig.1). Como ya se ha mencionado, además de la Fn, $\alpha 4\beta 1$ es también el receptor de VCAM-1 (Elices et al. 1990), de la proteína bacteriana invasín (Ennis et al. 1993), y de la trombospondina (Yabkowitz et al. 1993). Aunque los sitios de unión celular para algunas de estas proteínas no se han identificado todavía, parece claro que la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con VCAM-1 no implica al motivo LDV presente en esta proteína (Osborn et al. 1992, Vonderheide et al. 1992). Nuestros resultados muestran que el hipotético cambio conformacional inducido en $\alpha 4\beta 1$ a través de la subunidad $\beta 1$ permite el reconocimiento de la secuencia RGD de Fn que está localizada en la repetición III-10, de forma que dista bastante de los ligandos previamente descritos para $\alpha 4\beta 1$. En trabajos recientes (Koivunen et al. 1993, 1994) y a partir de una librería de fagos, se han identificado varios péptidos sintéticos cíclicos que carecen de la secuencia RGD y, sin embargo, son capaces de unir la integrina $\alpha 5\beta 1$; uno de estos péptidos corresponde a la secuencia STSDVGG, que es homóloga a la TVSDVPR presente en la repetición III-10 de Fn. En este trabajo se muestra que esta secuencia es también homóloga a EILDVPST, una secuencia presente en CS-1 que interacciona con $\alpha 4\beta 1$ con alta afinidad (Wayner et al. 1989; García-Pardo et al. 1990b; Guan et al. 1990; Mould et al. 1990). Aunque estos autores no demuestran que exista una interacción directa de $\alpha 5\beta 1$ con las dos secuencias homólogas presentes en Fn, sugieren que $\alpha 5\beta 1$ podría tener la capacidad de reconocer otros ligandos presentes en Fn, además de RGD. Los resultados que hemos obtenido en este trabajo están de acuerdo con la posibilidad de que exista un cierto grado de solapamiento en el reconocimiento de ligandos por las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$. Esto también está apoyado por otro trabajo que muestra que un péptido sintético cíclico, distinto de RGD, puede inhibir la función de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ (Nowlin et al. 1993) y que el péptido cíclico RGD inhibe $\alpha 4\beta 1$ (Cardarelli et al., 1994). Aunque la ciclación de péptidos puede proporcionar una conformación del ligando óptima para interacciones de alta afinidad con $\alpha 4\beta 1$ o $\alpha 5\beta 1$, parece claro por nuestros resultados que el Acm TS2/16 no induce el reconocimiento de la secuencia CS-1 de Fn vía $\alpha 5\beta 1$. Por lo tanto, la capacidad de reconocer nuevos ligandos bajo activación supuestamente conformacional podría ser intrínseca a la estructura de $\alpha 4\beta 1$.

En esta tesis se describe un nuevo papel para $\alpha 4\beta 1$ como un receptor para el sitio RGD en Fn. Teniendo en cuenta que la integrina $\alpha 5\beta 1$ es el receptor clásico para el sitio RGD, nosotros hemos intentado estudiar la contribución de $\alpha 4\beta 1$ en la adhesión celular al fragmento de Fn de 80 kDa cuando ambas integrinas están presentes simultáneamente. En experimentos no mostrados, estudiamos si los Acm(s) anti- $\alpha 4$ podían inhibir parcialmente la unión de las células U937 tratadas con TS2/16 al fragmento de 80 kDa. Sin embargo, como el Acm TS2/16 también aumenta la adhesión mediada por $\alpha 5\beta 1$ (Arroyo et al. 1992, 1993 y este trabajo) no pudimos detectar ninguna inhibición con Acm(s) anti- $\alpha 4$. Es posible que cuando $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ se expresan conjuntamente, la función de $\alpha 5\beta 1$ predomine sobre la función de $\alpha 4\beta 1$ en la capacidad de mediar adhesión a Fn. De acuerdo con esto, otros autores han mostrado que el fragmento de 80 kDa o el péptido sintético GRGDSPC inhiben completamente la adhesión de células U937 a Fn, mientras el fragmento de 38 kDa o el péptido CS-1 producen inhibición parcial o ausencia de inhibición (Ferreira et al. 1990).

Sin embargo, todos estos datos no excluyen una cooperación de ambos receptores para lograr una adhesión eficiente a Fn, como se ha propuesto para los linfocitos T (García-Pardo and Ferreira, 1990). Los resultados de esta tesis resultan obviamente importantes para las células que expresan $\alpha 4\beta 1$ como la integrina mayoritaria de superficie; esto incluye las células B (García-Pardo et al. 1990b; Stupack et al. 1991), algunos progenitores de células B (Roldán et al. 1992) y probablemente algunas células tumorales. Incluso hay trabajos mostrando diferentes interacciones con Fn durante el desarrollo de células pre-B (Bernardi et al. 1987; Verfaillie et al. 1991). En las células que expresan $\alpha 5\beta 1$ junto a $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ apropiadamente activado podría servir para cooperar con $\alpha 5\beta 1$ o para reemplazarlo funcionalmente cuando $\alpha 5\beta 1$ esté ocupado.

El hecho de que las integrinas se puedan encontrar en distintas formas de activación "in vivo", como se ha demostrado para $\alpha 4\beta 1$ (Laffón et al. 1991; Salomon et al. 1994), sugiere que los Acms anti- $\beta 1$ activadores (TS2/16 y otros) están mimetizando el efecto de ligandos fisiológicos no identificados todavía. Por otro lado, la multiplicidad de secuencias reconocidas por $\alpha 4\beta 1$ debe tener relevancia fisiológica; por ejemplo, podría servir para proporcionar las interacciones sinérgicas con el receptor resultando en uniones de alta afinidad. Tal sinergia ya se ha mostrado para la interacción de $\alpha 5\beta 1$ con la secuencia RGD en Fn (Yamada, 1991). De forma similar, la activación de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ en plaquetas con trombina resulta en el reconocimiento de una región adicional de Fn (junto a RGD), comprendiendo parte de la repetición III-9 y III-10 (Bowditch et al. 1991, ver fig.1). Una interesante posibilidad es que algunas de las secuencias que interaccionan con $\alpha 4\beta 1$ podrían regular la unión a otros ligandos, como ya se ha mostrado para $\alpha IIb\beta 3$ (Du et al. 1991). Los ligandos de $\alpha 4\beta 1$, incluyendo la secuencia RGD descrita en esta tesis, se unen aparentemente a los mismos sitios o a sitios solapantes en $\alpha 4\beta 1$, puesto que se inhiben unos a otros. Sin embargo, parece posible que

otros ligandos todavía no identificados se unan a $\alpha 4\beta 1$ con baja afinidad o incluso a un sitio diferente, de forma que aumenten en vez de que inhiban la función de $\alpha 4\beta 1$. Apoyando esto, se encuentra el hecho de que dos secuencias que muestran interacción con $\alpha 4\beta 1$, FNC/II y FNCH/II, no interfieren o lo hacen ligeramente con la función adhesiva de $\alpha 4\beta 1$ (Iida et al. 1992). La librería de fagos usada como aproximación para identificar los ligandos de $\alpha 5\beta 1$ (Koivunen et al. 1993, 1994) podría ser útil para identificar nuevos ligandos potenciales de $\alpha 4\beta 1$. Esto también abriría la posibilidad de usar estas secuencias moduladoras con fines terapéuticos. Otra consecuencia de este trabajo es que $\alpha 4\beta 1$ fisiológicamente estimulado podría jugar un papel importante en el reclutamiento de linfocitos en los sitios de inflamación y tejidos donde se producen distintos fragmentos de Fn conteniendo CS-1, Hep II y/o RGD.

La integrina $\alpha 4\beta 1$ es, por tanto, un receptor muy versátil capaz de reconocer múltiples ligandos en Fn. Dado que su afección por CS-1, Hep II y RGD es diferente, la unión a cada uno de estos sitios podría tener diferentes consecuencias celulares. En este sentido, se ha estudiado si la interacción de células B con las regiones central y carboxilo-terminal de Fn afecta al citoesqueleto celular de la misma manera. Nuestros resultados demuestran que la interacción de la línea celular Ramos con la región carboxilo-terminal de Fn produce la aparición de extensiones celulares que, en ocasiones, son auténticas colas de gran longitud. Por el contrario, la interacción con la región central de Fn no induce las prolongaciones citadas sino que el aspecto de las células es redondeado. En este sentido se podrían distinguir un fenómeno de adhesión que permite la inmovilización celular y no induce ningún cambio morfológico aparente de un fenómeno más complejo que implica inmovilización y subsiguientes cambios en el interior celular. Este último caso sería el que promovería la región carboxilo-terminal de Fn resaltando, en principio, su función biológica; se podría especular sobre este fenotipo como el de una célula que estuviera en movimiento lo que resultaría muy importante para el desplazamiento de las células linfoides en los distintos tejidos. Por otra parte la adhesión a través de la región RGD podría ser importante para la inmovilización de las células, tan necesaria en procesos de diferenciación, por ejemplo. Recientemente se ha propuesto un modelo para los timocitos humanos en el que la integrina $\alpha 4\beta 1$ actúa inmovilizando estas células a Fn de forma transitoria permitiendo el proceso de selección tímica en el que participan las moléculas del MHC (Salomon et al. 1994), realzando así la importancia biológica de los fenómenos de adhesión per se.

Como la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con la región carboxilo-terminal está mediada por CS-1 y Hep II, resultaba importante determinar la contribución de ambos sitios en la formación de las extensiones celulares que se producen tras la interacción celular con dicha región, sobre todo si se tiene en cuenta que la presencia de CS-1 esta sujeta a una estrecha regulación por mecanismos de "splicing" alternativo y que el reconocimiento del dominio Hep II también esta regulado pero a nivel del receptor. Nuestros resultados

muestran que la secuencia CS-1 es necesaria para que tenga lugar la aparición de tales colas, como así lo demuestran los ensayos de inhibición con el Acm anti-CS1 P1F11, los resultados con el fragmento de 58 kDa que carece de CS-1 y con los péptidos sintéticos utilizados (datos no mostrados). Aunque las colas citoplasmáticas aparecen también cuando está exclusivamente presente la secuencia CS-1, no se puede descartar una cooperación de ambos sitios activos para la aparición de tales cambios celulares. Estos resultados parecen indicar que la interacción de las células linfoides con la región carboxilo-terminal de Fn está sujeta a un riguroso control que no debe ser gratuito y sugiere la importancia de las consecuencias celulares tras la interacción celular a través de $\alpha 4\beta 1$. Recientemente se ha publicado que las células endoteliales sintetizan y depositan en la parte celular que da a la luz vascular así como en la zona intercelular la isoforma de Fn que presenta la secuencia CS-1 en las dos cadenas (Elices et al 1994). Se podría especular con la posibilidad de que la interacción $\alpha 4\beta 1$ -Fn, en concreto CS-1, estaría implicada en la extravasación celular; si esto fuera así un fenotipo celular como el que muestran nuestros resultados sería muy apropiado para la extravasación no sólo por su morfología sino por tratarse además de un fenómeno transitorio.

Nuestros resultados además muestran otros eventos intracelulares tras la interacción de las células linfoides B con la región carboxilo-terminal, como es el caso de los fenómenos de fosforilación. Recientemente se ha publicado que la interacción de células B con esta región de Fn implica la fosforilación de una proteína de 110 kDa (Freedman et al., 1993). Aunque nosotros no hemos identificado la proteína que se fosforila cuando tiene lugar la interacción celular con el fragmento de Fn de 38 kDa, mostramos los resultados obtenidos por inmunocitoquímica. Los resultados obtenidos a distintos tiempos varían desde los 15 min. de interacción celular con dicho fragmento hasta los 60 min. A los 15 min. aparece una especie de ventosa en la parte inferior, como confirman los datos obtenidos por microscopia confocal, que correspondería a la distribución de las proteínas fosforiladas. Sin embargo a los 15 min. de la interacción de las células linfoides con el fragmento de 38 kDa las células mostraban un aspecto redondeado cuando se incubaban con Phalloidina marcada con rodamina. Tras 60 min. de interacción la ventosa típica de proteínas fosforiladas desaparece casi en su totalidad, observándose una distribución difusa o polarizada de estas proteínas mientras que en este tiempo las células muestran extensiones citoplasmáticas perfectamente diferenciadas. A la vista de estos resultados se podría especular que los fenómenos de fosforilación son previos a los fenómenos de reorganización de proteínas del citoesqueleto.

Por otra parte, dado que el fragmento de Fn de 38 kDa contiene dos sitios activos resultaba interesante determinar qué sitio estaba involucrado en la fosforilación o si lo estaban ambos. Los resultados obtenidos con el fragmento de 58 kDa nos permiten afirmar que el dominio Hep II está implicado en la fosforilación de proteínas subsiguiente a la interacción con este fragmento de Fn. Sin embargo, como muestran las fotografías

tomadas a los 15 min. de la interacción, la distribución de la zona fosforilada es distinta a la obtenida con el fragmento de 38 kDa. En lugar de tener el aspecto de una ventosa, aparece como una mancha alargada. Aunque nosotros no hemos identificado si la secuencia CS-1 induce fosforilación, las diferencias observadas para los fragmentos de 38 kDa y 58 kDa sugieren que CS-1 también está implicado en fosforilación y quizá incluso fosforile otras proteínas distintas. En este sentido, hay que decir que para los linfocitos T se ha publicado recientemente la implicación de la secuencia CS-1 en los eventos de fosforilación posteriores a la interacción de estas células con Fn (Nojima et al., 1992).

En definitiva, y a la vista de nuestros resultados, la integrina $\alpha 4\beta 1$ es un receptor muy flexible capaz de reconocer múltiples ligandos en Fn, dependiendo de su estado de activación, pudiendo implicar estas interacciones eventos intracelulares diferentes en cada caso. Todo ello apoya la importancia de la matriz extracelular, particularmente la Fn en el desarrollo y función de los linfocitos.

6.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis doctoral se citan a continuación:

1.- El fragmento tríptico de 58 kDa proviene de la cadena B de Fn y no contiene el sitio mediador de adhesión celular CS-1.

2.- El mecanismo de adhesión a la región carboxilo-terminal de la Fn implica una cooperatividad de las regiones CS-1 y Hep II; la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con Hep II probablemente modula la posterior interacción con CS-1.

3.- La integrina $\alpha 4\beta 1$ existe en diferentes estados de activación en distintas poblaciones hematopoyéticas.

4.- Las células monocíticas y los linfocitos T de sangre periférica (LT) reconocen constitutivamente en Fn la secuencia CS-1 pero no el dominio Hep II, a diferencia de las células linfoides en cultivo, que reconocen ambos sitios. La integrina $\alpha 4\beta 1$ presente en las células monocíticas y LT, por tanto representa una forma parcialmente activa o de baja afinidad capaz de interaccionar sólo con el ligando más activo CS-1.

5.- La unión de $\alpha 4\beta 1$ al dominio Hep II de Fn se puede inducir por el tratamiento celular con PMA, el catión divalente Mn^{2+} o el Acm TS2/16 dirigido contra la subunidad $\beta 1$.

6.- Las células linfoides B que no expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ y no se unen constitutivamente al fragmento de Fn de 80 kDa, adquieren la capacidad de reconocer éste fragmento si son previamente tratadas con el Acm TS2/16. El receptor celular implicado en la interacción con el fragmento de 80 kDa es la integrina $\alpha 4\beta 1$.

7.- La secuencia RGD es un nuevo ligando para la integrina $\alpha 4\beta 1$ previamente activada a través de la subunidad $\beta 1$. Es decir, el cambio conformacional inducido en $\alpha 4\beta 1$ por el Acm TS2/116 resulta en la capacidad de reconocer RGD.

8.- La integrina $\alpha 4\beta 1$ activada por el Acm TS2/16 reconoce la secuencia RGD de Fn. Por el contrario, $\alpha 4\beta 1$ así activada no reconoce esta secuencia en otras proteínas de MEC como laminina y colágeno tipo I.

9.- La región central y carboxilo-terminal de Fn inducen una reorganización distinta del citoesqueleto de actina después de la interacción de células linfoides B vía

$\alpha 4\beta 1$. La adhesión celular a la región carboxilo-terminal tiene como consecuencia la aparición de extensiones celulares que pueden llegar a ser de gran longitud. La secuencia CS-1 es imprescindible pero no suficiente para la formación de tales prolongaciones, es probable que se requiera la cooperación del dominio Hep II.

10.- La región carboxilo-terminal de Fn induce fosforilación en tirosina después de la interacción con células linfoides B vía $\alpha 4\beta 1$. El dominio Hep II y probablemente la secuencia CS-1 están implicados en dicho fenómeno.

7.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Ed. Garland, New York.

Altruda, F., Cervella, P., Tarone, G., Botta, C., Balzac, F., Stefanuto, G., and Silengo, L. 1990. A human integrin $\beta 1$ subunit with a unique Cytoplasmic domain generated by alternative mRNA processing. *Gene* , 95: 261.

Arroyo, A.G., P. Sánchez-Mateos, M.R. Campanero, J. Martin-Padura, E. Dejana, and F. Sanchez-Madrid. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interaction through the $\beta 1$ subunit. *J. Cell Biol.* 117: 659.

Arroyo, A.G., A. Garcia-Pardo, and F. Sánchez-Madrid. 1993. A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti- $\beta 1$ chain monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 268: 9863.

Bernardi, P., V.P., and Lodish, H. F. 1987. Lymphoid precursor cells adhere to two different sites on fibronectin. *J. Cell Biol.* 105, 489.

Bowditch, R. D., Halloran, C.E., Aota, S-I, Obara, M., Plow, E.F, Yamada, K.M., and Ginsberg, M.H. 1991. Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (platelet GPIIb-IIIa) recognizes multiple sites in fibronectin. *J. Biol. Chem.* 266: 23323.

Bray, P.F., Leung, C.S.I., and Shuman, M.A. 1990. Human platelets and megakaryocytes contain alternatively spliced glycoprotein IIb mRNAs. *J. Biol. Chem.* 265: 9587.

Brown, E.J., and J.L. Goodwin.1988. Fibronectin receptors of phagocytes. Characterization of the Arg-Gly-Asp binding proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 167: 777.

Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C. 1988. Focal adhesions: transmembrane functions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 487.

- Cardarelli, P.M., Cobb, R.R., Nowlin, D.M., Scholz, W., Gorcsan, F., Moscinski, M., Yasuhara, M., Chiang, S-L., and Lobl, T.J. 1994. Cyclic RGD peptide inhibits $\alpha 4\beta 1$ interaction with connecting segment 1 and vascular cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 269: 18668.
- Chan, B. M. C., Elices, M.J., Murphy, E., and Hemler, M. E. 1992. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$ on the human B cell JY. *J. Biol. Chem.* 267: 8366.
- Chan, B. M. C., and Hemler, M. E. 1993. Multiple functional forms of the integrin VLA-2 can be derived from a single cDNA clone: interconversion of forms induced by an anti- $\beta 1$ antibody. *J. Cell Biol.* 120: 537.
- Cybulsky, M.I., Fries, J.W.V., Williams, A. J., Sultan, P., Davis, V.M., Gimbrone Jr, M.A., Collins, T. 1991(a). Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 138: 815.
- Cybulsky, M.I., Fries, J.W.V., Williams, A. J., Sultan, P., Eddy, R., Byers, M., Shows, T., Gimbrone Jr, M.A., Collins, T. 1991(b). Gene structure, chromosomal location, and basis alternative mRNA splicing of the human Vcam-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7859.
- Damsky, C.H., and Werb, Z. 1992. Signal transduccion by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Cur. Op. Cell Biology* 4: 772.
- Du, X., Olow, E.F., Frelinger, A.L., O'Toole, T.E., Loftus, J.C., and Ginsberg, M.H. 1991. Ligands "activate" integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (platelet GPIIb-IIIa). *Cell*, 65: 409.
- Eierman, D.F., Johnson, C.E., Haskill, J.S. 1989. Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates. *J. Immunol.* 142: 1970.
- Elices, M.J., and Hemler, M.E. 1989. The Human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9906.

Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowsky, S., Hemler, M.E., and Lobb, R.R. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, 60: 577.

Elices, M.J., Tsai, V., Strahl, D., Goel, A.S., Tollefson, V., Arrhenius, T., Wayner, E.A., Gaeta, F.C.A., Fikes, J.D., and Firestein, G.S. 1994. Expression and functional significance of alternatively spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. *J. Clin. Invest.* 93: 405.

Ennis, E., Isberg, R.R., Shimizu, Y. 1993. Very late antigen-4-dependent adhesion and costimulation of resting T cells by bacterial $\beta 1$ integrin ligand invasion. *J Exp. Med.* 177: 207.

Faull, R.J., Kovach, N.L., Harlan, J.M., and Ginsberg, M.H. 1993. Affinity modulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J. Cell Biol.* 121: 155.

Ferreira, O.C., García-Pardo, and Bianco, C. 1990. Specific binding of the human monocytic cell line U937 to the alternatively spliced connecting segment (IIICS) of fibronectin. *J. Exp. Med.* 171: 351.

Freedman, A.S., Rhynhart, K., Nojima, Y., Svahn, J., Eliseo, L., Benjamin, C.D., Morimoto, C., and Vivier, E. 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation in human B cells after ligation of the $\beta 1$ integrin VLA-4. *J. Immunol.* 150: 1645.

Garcia-Pardo, A., E. Pearlstein, and B. Frangione. 1983. Primary structure of human plasma fibronectin. The 29,000-Dalton NH₂-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 258: 12670.

Garcia-Pardo, A., E. Pearlstein, and B. Frangione. 1985. Primary structure of human plasma fibronectin characterization of a 31,000-Dalton fragment from the COOH-terminal region containing a free sulfhydryl group and fibrin-binding site. *J. Biol. Chem.* 260: 10320.

Garcia-Pardo, A., A. Rostagno, and B. Frangione. 1987. Primary structure of human plasma fibronectin. Characterization of a 38 kDa domain containing the C-terminal heparin-binding site (Hep III site) and region of molecular heterogeneity. *Biochem. J.* 241: 923.

Garcia-Pardo, A., O.C. Ferreira, J. Valinsky, and C. Bianco. 1989. Fibronectin receptors of mononuclear phagocytes binding characteristic and biochemical isolation. *Exp. Cell Res.* 181: 420.

Garcia-Pardo, A. and O.C., Ferreira. 1990a. Adhesion of human T lymphoid cells to fibronectin is mediated by two different fibronectin domains. *Immunology*, 69: 121.

Garcia-Pardo, A., E.A., Wayner, W.G., Carter and O.C., Ferreira. 1990(b). Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin: the interaction of the $\alpha 4 \beta 1$ integrin with the LHGPEILDVPST sequence of type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. *J. Immunol.* 144: 3361.

Guan, J-L., and Hynes, R.O. 1990. Lymphoid cells recognize an alternative spliced segment of fibronectin via integrin receptor $\alpha 4 \beta 1$. *Cell*, 60: 53.

Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins, S.M., Morris, J.S., Yurichko, D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., Baldwin, A.Jr. 1991. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes IKK-like activity. *Cell*, 65: 1281.

Hayman, E.G, Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. 1985. Dettachment of cells from culture substrate by siluble fibronectin peptides. *J. Cell. Biol.* 100: 1948.

Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. 1985. Dettachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides. *J. Cell Biol.* 100: 1948.

Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Schiffer, S.B., Goff, D., Moy, P., Chi-Rosso, G., Luhowsky, S., Lobb, R., and Osborn, L. 1991. Cloning of an alternate form of vascular molecule VCAM-1. *J. Biol. Chem.* 266: 6682.

Hogervost, F., Kuikman, I., von dem Borne, A.E.G.K., and Sonnenberg, A., 1990. Cloning and sequence analysis of $\beta 4$ -cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kDa cytoplasmic domain. *EMBO J.* 9: 765.

Hogervost, F., Kuikman, I., van Kessel, A.G., and Sonnenberg, A. 1991. Molecular cloning of the human $\alpha 6$ mRNA and chromosomal localization of the $\alpha 6$ and $\beta 4$ genes. *Eur. J. Biochem.* 199: 425.

- Humphries, M.J., A. Komoriya, S.K. Akiyama, K. Olden, K.M. Yamada. 1987. Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type specific adhesion. *J. Biol. Chem.* 262: 6886.
- Humphries, M.J., Mould, A. P., and Tuckwell, D.S. 1993. Dynamic aspects of adhesion receptor function-integrins both twist and shout. *BioEssays*, 15: 391.
- Hynes, R.O. 1990. Fibronectins, Springer-Verlag, New York
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11.
- Iida, J., A.P. N. Skubitz, L.T. Furcht, E.A. Wayner, and J.B. McCarthy. 1992. Coordinate role for cell surface chondroitin sulfate proteoglycan and $\alpha 4 \beta 1$ integrin in mediating melanoma cell adhesion to fibronectin. *J. Cell Biol.* 118: 431.
- Juliano, R.L. and Haskill, S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 120: 577.
- Kassner, P.D., and Hemler, M.E. 1993. Interchangeable α chain cytoplasmic domains play a positive role in control of cell adhesion mediated by VLA-4, a $\beta 1$ integrin. *J. Exp. Med.* 178: 649.
- Kirchofer, D., Languino, L.R., Ruoslahti, E., and Pierschbacher. 1990. $\alpha 2 \beta 1$ integrins from different cell types show different binding specificities. *J. Biol. Chem.* 265: 615.
- Komoriya, A., Green, L. J., Mervic, M., Yamada, K.M., and Humphries, M. J. 1991. The minimal essential sequence for a major cell type specific adhesion site (CS-1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J. Biol. Chem.* 266: 15075.
- Kovach, N.L., Carlos, T.M., Yee, E., and Harlan, J.M. 1992. A monoclonal antibody to $\beta 1$ integrin (CD29) stimulates VLA-4-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *J. Cell Biol.* 116: 499.
- Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680.

- Languino, L.R., Gehlsen, K.R., Wayner, E.A., Carter, W.G., Engvall, E., and Ruoslahti. 1990. Endothelial cells use $\alpha 2\beta 1$ integrin as a laminin receptor. *J. Cell. Biol.* 109: 2455.
- Lawler, J. 1986. The structural and functional properties of trombospondin. *Blood* 67: 1197.
- Liao, N.S., J.St. John, J.B. McCarthy, L.T. Furcht, and H.t. Cheung. 1989. Adhesion of Lymphoid cells to carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin. *Exp. Cell Res.* 181: 348.
- Masumoto, A., and Hemler, M.E. 1993. Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS-1/fibronectin and to vascular adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* 268: 228.
- McCarthy, J. B., Chelberg, M.K., Mickelson, D. J., and Furcht, L. T. 1988. Localization and chemical synthesis of fibronectin peptides with melanoma adhesion and heparin binding activities. *Biochemistry*, 27: 1380.
- McDonald, J.A., Quade, B.J., Broekelmann, T.J., LaChance, R., Forsman, K., Hasegawa, E., and Akiyama, S. 1987. Fibronectin's cell-adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast pericellular matrix. *J. Biol. Chem.* 262: 2957.
- McDonald, J.A., and Mechan, R.P. 1991. Receptors for extracellular matrix, Academic Press, New York.
- Mould, A.P., Wheldon, L.A., Komoriya, A., Wayner, E.A., Yamada, K.M., and Humphries, MJ. 1990. Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin $\alpha 4\beta 1$. *J. Biol. Chem.* 265: 4020.
- Mould, A.P., Komoriya, A., Yamada, K.M., and Humphrie, M.J. 1991a. The CS5 peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognized by the integrin $\alpha 4\beta 1$. Inhibition of $\alpha 4\beta 1$ function by RGD peptide homologues. *J. Biol. Chem.* 266: 3579.

Mould, A.P., and M.J. Humphries. 1991(b). Identification of a novel recognition sequence for the integrin $\alpha 4\beta 1$ in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO J.* 10: 4089.

Nojima, Y., Rothstein, D.M., Sugita, K., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. 1992. Ligation of VLA-4 on T cells stimulates tyrosine phosphorylation of a 105-kD protein. *J. Exp. Med.* 175: 1045.

Nowlin, D.M., Gorcsan, F., Moscinski, M., Chiang, S-L, Lobl, T.J., and Cardarelli. 1993. A novel cyclic pentapeptide inhibits $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 268: 20352.

Osborn, L., Vasallo, C., and Benjamin, D. 1992. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Exp. Med.* 176: 99.

Otey, C.A., Pavalko, F.M. and Burridge, K. 1990. An interaction between α -actinin and the $\beta 1$ integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol.* 111: 721.

O'Toole, T.E., Mandelman, D., Forsyth, J., Shattil, S.J., Plow, E.F., and Ginsberg, M.H. 1991. Modulation of the affinity of $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa) by the cytoplasmic domain of αIIb . *Science*, 254: 845.

O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Du, X.P., Glass, A.A., Ruggeri, Z.M., Shattil, S.J., Plow, E.F., and Ginsberg, M.H. 1991b. Affinity modulation of the $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul.* 1: 883.

Pierschbacher, M.D., Hayman, E.G., Ruoslahti, E. 1981. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell*, 26: 259.

Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. 1984. The cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule *Nature*, 309: 30.

Polte, T., Newman, W., Gopal, T.V., 1990. Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *Nucleic Acid Res.* 18: 5901.

Postigo, A. A., Sánchez-Mateos, P., Lazarovits, A. I., Sánchez-Madrid, F. and Landázuri, M. O. 1993. $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates B cell binding to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1. Expression and function of $\alpha 4$ integrins on human B lymphocytes. *J. Immunol.* 151: 2471.

Pulido, R., M.J. Elices, M.R. Campanero, L.Osborn, S.Schiffer, A.Garcia-Pardo, R. Lobb, M.E. Hemler, and F. Sánchez-Madrid. 1991. Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4. Correlation with distinct $\alpha 4$ epitopes. *J. Biol. Chem.* 266: 10241.

Pytela, R., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. 1981. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell*, 26: 259.

Roldán, E., García-Pardo, A., and Brieva, J.A 1992. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and High immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.* 175: 1739.

Ruoslahti, E., and Pierschbacher.1986. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, 44: 517.

Ruoslahti, E. 1991. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87: 1.

Salomon, D.R., Mojcik, C.F., Chang, A.C., Wadsworth, S., Adams, D.H., Coligan, J.E., and Shevach, E.M. 1994. Constitutive activation of integrin $\alpha 4\beta 1$ defines a unique stage of human thymocyte development. *J. Exp. Med.* 179: 1573.

Schwarzbauer, J.E., Paul, J.I., and Hynes, R.O. 1985. On the origin os species of fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1424.

Sekiguchi, K., and Titani, K. 1989. *Biochemistry*, 28: 3293.

Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Horgan, K. J., and Shaw, S. 1990. Regulated expression and binding of three VLA ($\beta 1$) integrin receptors on T cells. *Nature*, 345: 250.

Shimizu, Y., and Shaw, S. 1991. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J.* 5: 2292.

Sonnabend, A. 1993. Integrins and their ligands. *Current Topics Micro. and Immuno.* 184: 7-35.

Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of immune system *Nature*, 346: 425.

Springer, T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 76: 301.

Stupack, D. G., Stewart, S., Carter, W. G. Wayner, E. A., and Wilkins, J. A. 1991. B lymphocyte fibronectin receptors: expression and utilization. *Scand.J. Immunol.* 34: 761.

Stupack, D. G., Shen, C., and Wilkins, J. A. 1992. Induction of $\alpha v \beta 3$ integrin-mediated attachment to extracellular matrix in $\beta 1$ integrin (CD-29) negative B cell lines. *Exp.Cell Res.* 203: 443.

Suzuki, S., and Naitoh, Y. 1990. Amino acid sequence of a novel integrin $\beta 4$ subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* 9: 757.

Tamura, R.N., Rozzo, C., Starr, I., Chambers, J., Reichardt, L.F., Cooper, H.M., and Quaranta, V. 1990. Epithelial integrin $\alpha 6 \beta 4$: complete primary structure of $\alpha 6$ and variant forms of $\beta 4$. *J. Cell Biol.* 111: 1593.

Tamura, R.N., Cooper, H.M., Collo, G., and Quaranta, V. 1991. Cell type-specific integrin variants with alternative α chain cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10183.

Teixidó and Sánchez-Madrid. 1993. Structure and function of the $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) integrin. In *Lymphocyte Adhesion Molecules*, G. Landes Co. p.54.

Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. natl. Acad.Sci. USA*, 76: 4350.

van de Kuppevelt, T.H.M.S.M., Languino, L.R., Gailit, J.O. Suzuki, S., and Ruoslahti. 1989. An alternative cytoplasmic domain of the integrin $\beta 3$ subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5415.

van de Wiel-van Kemenade, E., van Kooyk, Y., de Boer, A. J., Huijbens, R. J. F., Weder, P., Van de Kastele, W., Meilief, C. J. M., and Fidgor, C. G. 1992. Adhesion of T and B lymphocytes to extracellular matrix and endothelial cells can be regulated through the $\beta 1$ subunit of VLA. *J. Cell Biol.* 117: 461.

Verfaillie, C. M., Mc Carthy, J. B., and Mc Glave, P. B. 1991. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage conogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. *J. Exp. Med.* 174: 693.

Vonderheide, R. H., and Springer, T. A. 1992. Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional $\alpha 4$ integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J. Exp. Med.* 175: 1433.

Wayner, E. A., García-Pardo, A., Humphries, M. E., Mc Donald, J. A., and Carter, W. G. 1989. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* 109: 1321.

Wayner, E. A., and Kovach, N. L. 1992. Activation-dependent recognition by hematopoietic cells of the LDV sequence in the V region of fibronectin. *J. Cell Biol.* 116, 489.

Werb, Z., Tremble, P.M., Behrendtsen, O., Crowley, E., Damsky, C.H. 1989. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell Biol.* 109: 877.

Wilkins, J. A., Stupack, D., Stewart, S., Caixia, S. $\beta 1$ integrin-mediated lymphocyte adherence to extracellular matrix is enhanced by phorbol ester treatment. *Eur. J. Immunol.* 21: 517.

Yabkowitz, R., Dixit, V. M., Guo, N., Roberts, D. D., and Shimizu, Y. 1993. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) integrins. *J. Immunol.* 151: 149.

Yamada, A., Nikaido, T., Nojima, Y., Schlossman, S.F., Marimoto, C. Activation of human CD4 T lymphocytes. 1991. Interaction of fibronectin with VLA-5 receptor in CD4 cells induces the AP-1 transcription factor. *J. Immunol.* 146: 53.

Yamada, K.M. 1989. Fibronectin domains and receptors. *In* Fibronectin. D.F. Mosher, editor. Academic Press, New York. 47- 121.

Yamada, K. M. 1991. Adhesive recognition sequences. *J. Biol. Chem.* 266: 12809.

Yurochko, A.D., Liu Dy, Eirmen D., Haskill, S. 1992. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9034.

ANEXO

ANEXO

El trabajo de esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- 1.- García-Pardo, A., Sánchez-Aparicio, P., and Wayner, E.A. (1992). Two novel monoclonal antibodies to fibronectin that recognize the Hep II and CS-1 regions respectively. Their differential effect on lymphocyte adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186: 135-142.
- 2.- Sánchez-Aparicio, P., Ferreira, O.C.Jr., and García-Pardo, A. (1993). $\alpha 4\beta 1$ recognition of the Hep II domain of fibronectin is constitutive on some hematopoietic cells but requires activation on others. *Journal of Immunology*, 150: 3506-3514.
- 3.- Sánchez-Aparicio, P., Dominguez-Jiménez, C., and García-Pardo, A. (1994). Activation of the $\alpha 4\beta 1$ integrin through the $\beta 1$ subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *The Journal of Cell Biology*, 126: 271-279.
- 4.- Sánchez-Aparicio, P., Dominguez-Jiménez, C., and García-Pardo, A. The $\alpha 4\beta 1$ fibronectin ligands Hep II, CS-1 and RGD induce different events upon interaction on B lymphoid cells. 1994. Manuscrito en preparaci[on].

TWO NOVEL MONOCLONAL ANTIBODIES TO FIBRONECTIN THAT
RECOGNIZE THE HEP II AND CS-1 REGIONS RESPECTIVELY: THEIR
DIFFERENTIAL EFFECT ON LYMPHOCYTE ADHESION

Angeles Garcia-Pardo^{1*}, Paloma Sánchez-Aparicio¹ and Elizabeth A. Wayner²

¹Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain

²University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN

Received May 5, 1992

SUMMARY: We have obtained two new mAbs to the carboxy-terminal region of fibronectin, namely P3D4 and P1F11, and have studied their binding sites and their ability to block lymphocyte adhesion to fibronectin. ELISA and Western blot analyses showed that P3D4 reacts with both fibronectin chains and both Hep II-containing fragments (58 kDa and 38 kDa). P1F11, raised against the synthetic peptide CS-1, reacted with the 38 kDa fragment and with a 190 kDa fragment derived from the A chain of fibronectin. P1F11 did not react with the 58 kDa fragment thus clearly establishing that 58 kDa comes from the B chain of fibronectin and lacks the CS-1 sequence. mAbs P3D4 and P1F11 were used to evaluate the contribution of the Hep II and CS-1 sites in cell attachment to fibronectin. P3D4 effectively inhibited B cell adhesion to 38 kDa, 58 kDa and fibronectin; P1F11 however produced only limited inhibition, suggesting that lymphocyte interaction with Hep II may modulate further binding to the CS-1 site.

© 1992 Academic Press, Inc.

We (1-3) and others (4) have previously shown that lymphocyte interaction with fibronectin (Fn) involves multiple sites located in the central and carboxy-terminal regions of Fn. These sites can be isolated within tryptic fragments of 80 kDa (RGD sequence), 58 kDa and 38 kDa (Hep II domain), which promote cell adhesion efficiently (1-3). The 38 kDa fragment also contains the CS-1 adhesive sequence (5, 6) of the alternatively spliced III₁CS region of Fn, and is derived from the A chain of Fn. Based on enzyme specificity and on the molecular weight of the resulting Fn fragments, it has been assumed that the 58 kDa fragment is derived from the B chain of Fn (1-3). However the origin of this fragment has not been clearly established yet.

* To whom correspondence should be addressed at Centro de Investigaciones Biológicas, Velázquez 144, 28006 Madrid, Spain. Fax: 34-1-564 4567.

Abbreviations: Fn, fibronectin; mAbs, monoclonal antibodies.

The existence of two adhesive sites (Hep II and CS-1) in close proximity within Fn, may suggest a functional cooperation between both sites that results in an efficient cell attachment. Using a panel of monoclonal antibodies (mAbs) selected for their ability to inhibit lymphocyte adhesion to Fn, we have identified the $\alpha 4\beta 1$ integrin as the receptor for both sites, Hep II and CS-1 (1, 3). In the present study we have obtained two novel mAbs to Fn, which specifically recognize these adhesive sites. We have used these mAbs to clearly establish that the 58 kDa fragment lacks CS-1 and is derived from the B chain of Fn. We have also studied the contribution of both sites (Hep II and CS-1) to cell attachment by testing the effect of these mAbs on lymphocyte adhesion to Fn and its fragments.

MATERIALS AND METHODS

Fibronectin and fibronectin fragments. Human plasma Fn was the generous gift of Drs. B. Horowitz and R. Shulman (New York Blood Center, New York, NY). Tryptic fragments of 200 and 190 kDa representing the B and A chains of Fn respectively, minus the 29 kDa N-terminal and the 6 kDa C-terminal domains were obtained as described (6). Tryptic fragments of 38 kDa, 58 kDa, and 80 kDa were produced as previously reported (1-3, 6). Briefly, these fragments are isolated by heparin-Sepharose affinity chromatography of the Fn digests and eluted in the 0.1 M NaCl fraction (80 kDa), or 0.5 M NaCl fraction (38 and 58 kDa) from this column. The 38 and 58 kDa fragments are further resolved by DEAE-Sepharose, which retains the 58 kDa but not the 38 kDa fragment. Further purification of the 38 kDa fragment was achieved by a CM-Sephadex matrix equilibrated in 10 mM Tris, 2 M urea, 50 mM NaCl pH 7.0. After removal of unbound materials with this buffer, the 38 kDa fragment was separated from other contaminants by running a NaCl gradient (50-300 mM) through this column. Fragments were finally dialyzed against PBS, concentrated and stored in aliquots at -70° C.

Antibodies. mAbs to Fn were produced by immunizing RBF/DnJ mice with the previously described synthetic peptide CS-1 (DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST) (5) coupled to keyhole limpet hemacyanin (KLH), or with the 38 kDa Fn fragment, using previously reported protocols (1). Polyclonal antibodies to the 38 kDa fragment were obtained by subcutaneous injection of New Zealand White rabbits with the purified fragment.

Cell attachment assays. The human B cell line Ramos was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and expanded in RPMI, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco Life Technologies, Middlesex, UK) as reported (3). 4-day cell cultures were used for attachment assays which were performed exactly as described (2, 3) using 96-well Linbro plates with flat bottoms (ICN Biomedicals Ltd, Bucks, UK). Attached cells were fixed with 1.25% glutaraldehyde, stained with 0.1% Toluidine blue and the absorbance at 492 nm was determined using an automatic microplate reader MRPA 4 (Eurogenetics, Belgium). For inhibition experiments, coated wells were incubated at room temperature for 30 min with 50 μ l of appropriate dilutions of P3D4 or P1F11 mAbs prior to adding the cells.

ELISA assays. 96-well plates (Corning Glass Works, New York, USA) were coated with Fn (5 μ g/well), 58 kDa (2 μ g/well) or 38 kDa (1 μ g/well) in PBS at 4° C overnight. Plates were rinsed with PBS, 0.05% Tween 20, and incubated with appropriate dilutions of mAbs. After 1 h at 37° C, the plates were rinsed with PBS/Tween and incubated for an additional hour with a 1:1000 dilution of peroxidase-conjugated goat IgG anti-mouse Igs (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark). The plates were washed and developed by addition of 1,2-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) in 0.1 M citric acid-phosphate buffer, pH 5.). After 30 min, the absorbance at 492 nm was determined using a microplate reader .

RESULTS

Biochemical characterization of mAbs P3D4 and P1F11 binding sites in fibronectin

To determine the specificity of the mAbs obtained using the immunization protocols described above, we performed ELISA assays with equal molar quantities of Fn, 80 kDa, 58 kDa, or 38 kDa fragments as substrata. Two mAbs termed P3D4 and P1F11 showed to be positive by this method. mAb P3D4 reacted in a dose dependent manner with fragments 38 and 58 kDa as well as with intact Fn (Fig. 1, left); P3D4 did not react with the 80 kDa fragment (not shown). mAb P1F11 was produced by immunizing with the synthetic peptide CS-1 and thus its reactivity with this peptide was not surprising (data not shown); however, it was important to determine whether this mAb recognized the CS-1 segment when present within Fn or Fn fragments. As shown in Fig. 1 (right), P1F11 recognized the 38 kDa fragment but not the 58 kDa fragment or intact Fn.

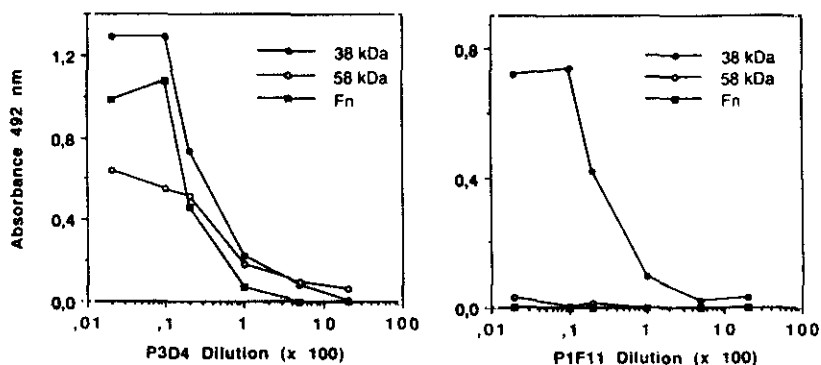


Figure 1. ELISA analysis of the reactivity of mAbs P3D4 and P1F11 with Fn and the 58 kDa and 38 kDa fragments. Wells were coated with Fn (5 μ g), 58 kDa (2 μ g) or 38 kDa (1 μ g) and incubated with the indicated dilutions of mAb P3D4 (left panel) or P1F11 (right panel). Quantitation of the reaction was done as described in Materials and Methods. Each determination was done in duplicate and values represent the average of two different experiments.

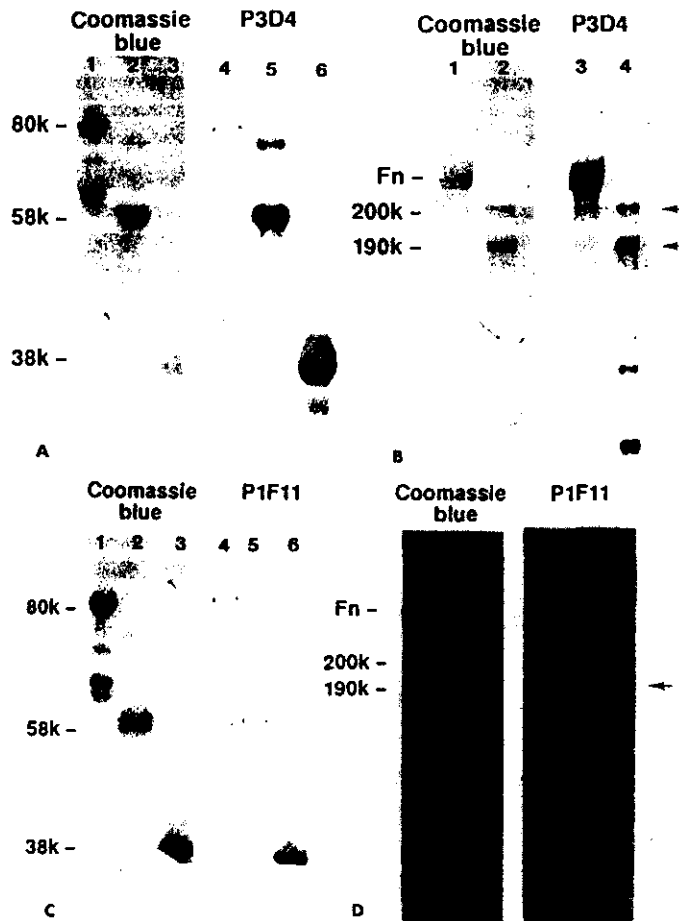


Figure 2. Western blot analysis of the reactivity of mAbs P3D4 and P1F11 with Fn and fragments. **Panels A and C:** nitrocellulose membrane transfers of a 10% acrylamide gel containing 80 kDa (lanes 1 and 4), 58 kDa (lanes 2 and 5), and 38 kDa (lanes 3 and 6) fragments. Membranes were stained with Coomassie blue (left panel) or incubated with either P3D4 (1:200 dilution, A) or P1F11 (1:500 dilution, C) (right panel); blots were developed with a peroxidase-labeled goat IgG anti-mouse Igs. **Panels B and D:** nitrocellulose membrane transfers of a 5% acrylamide gel containing Fn (lanes 1 and 3), and 200 kDa+190 kDa fragments (lanes 2 and 4). Membranes were stained with Coomassie blue (left) or incubated with mAbs (right) P3D4 (B) or P1F11 (D) and developed as above.

The results obtained by ELISA were confirmed by Western blots analyses of Fn and its fragments. As shown in Figure 2A, mAb P3D4 reacted with the 58 kDa (lane 5) and 38 kDa (lane 6) fragments, but not with the 80 kDa fragment (lane 4). P3D4 also reacted with intact Fn (Fig. 2B, lane 3) and with the two large tryptic fragments of 200 and 190 kDa (Fig. 2B, lane 4). These results indicate that mAb P3D4 recognizes an antigenic determinant common to both Hep II-containing fragments (58 and 38 kDa) and to both Fn chains (A and B). In contrast, mAb P1F11 (Fig. 2C) reacted with the 38 kDa fragment (lane 6), but failed to recognize

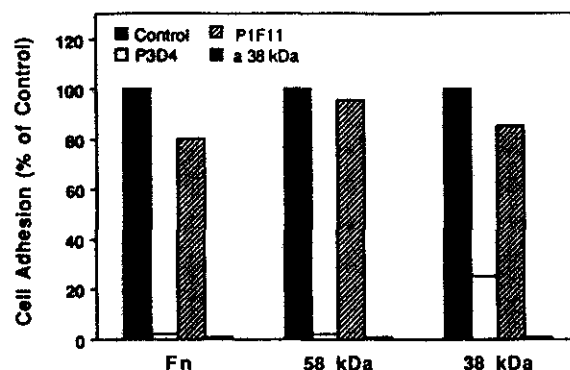


Figure 3. Effect of mAbs P3D4 and P1F11 on Ramos cell attachment to Fn or fragments. Wells were coated with 38 kDa (0.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), 58 kDa (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), or Fn (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and incubated with P3D4 or P1F11 supernatants for 30 min, prior to adding the cells. Control wells (100% adhesion) are coated wells incubated with an irrelevant hybridoma supernatant. Attached cells were quantitated as previously described. Values are the average of three separate experiments.

the 58 kDa (lane 5) or 80 kDa (lane 4) fragments. These results clearly indicate that P1F11 recognizes a site present exclusively on the 38 kDa fragment. Based on molecular weights and specificity of trypsin cleavage, it was previously assumed that the 38 kDa and 58 kDa fragments are derived from the A and B chains of Fn respectively (1-3). If this is correct, the antigenic site recognized by P1F11 must be present in the A chain of Fn and absent from the B chain. To confirm this, we tested the reactivity of mAb P1F11 with the 200 and 190 kDa fragments. As shown in Figure 2D, P1F11 reacted with the 190 kDa but not with the 200 kDa fragment (lane 4). mAb P1F11 gave a very faint reaction with intact Fn (lane 3), perhaps due to the relative molar quantity of the CS-1 segment in Fn as compared to the 38 kDa fragment. Another possible explanation is that CS-1 is not fully available when present in the intact molecule. Altogether these results clearly show that mAb P1F11 raised against the synthetic peptide CS-1, is able to recognize this site within the 38 kDa fragment and the A chain of Fn, and that the 58 kDa fragment lacks the CS-1 site and is derived from the B chain of Fn.

Functional properties of mAbs P3D4 and P1F11

We (1-3) and others (4, 7) have previously shown that the Hep II domain (contained in the 38 and 58 kDa fragments) and the CS-1 segment (contained in the 38 kDa fragment) of Fn support cell adhesion. We have also shown that the 38 kDa fragment is a more efficient substrate for lymphocyte attachment than the 58 kDa fragment (2, 3). The preceding results (Figs. 1-2) mapped the binding sites of mAbs P3D4 and P1F11 to the Hep II domain and the CS-1 site of Fn respectively. To further evaluate the contribution of both sites to lymphocyte attachment to Fn, we studied the adhesion of the B cell line Ramos to Fn and Fn fragments in the presence of mAbs P3D4 and P1F11. As shown in Figure 3, mAb

P3D4 efficiently inhibited (>95%) cell attachment to Fn or the 58 kDa fragment, and produced substantial inhibition (70-80%) of adhesion to the 38 kDa fragment. mAb P1F11 however produced only limited inhibition (10-20%) of adhesion to Fn or 38 kDa fragment (Fig. 3). mAb P1F11 completely inhibited cell attachment to the synthetic peptide CS-1 (not shown). Incubation with both mAbs simultaneously produced 95% inhibition of cell attachment to the 38 kDa fragment (not shown). For comparison, a polyclonal antibody anti-38 kDa fragment completely inhibited adhesion to Fn, 58 kDa and 38 kDa fragments (Fig. 3).

DISCUSSION

In this study we have obtained two new mAbs which recognize the Hep II and CS-1 sites in the carboxy-terminal region of Fn. We have used these mAbs to clarify the origin of Fn fragments derived from this region; since these two sites (Hep II and CS-1) are involved in cell attachment, we have also studied the effect of these mAbs on lymphocyte adhesion to Fn.

mAbs which specifically recognize the CS-1 site in Fn have not been previously reported. Two research groups have successfully obtained polyclonal antibodies to the IIICS region of Fn, using as immunogens a fusion protein containing a 95 amino acid residue stretch of IIICS (8), or a synthetic peptide comprising the last 31 residues of IIICS (9). Both of these segments (95 and 31 residues) are outside the CS-1 region studied here which comprises the first 25 amino acid residues of IIICS (3, 5). The results obtained with mAb P1F11 clearly show that the 58 kDa fragment is derived from the B chain of Fn. This was previously assumed (1-3, 7) based on the molecular weight of fragments derived from this region of Fn but can be definitely established now. Because the CS-1 segment is regulated by alternative splicing mechanisms, the availability of mAb P1F11 may be very useful to study the presence of the various Fn isoforms (with and without CS-1) in different tissues, particularly during development.

Although the precise site in Hep II recognized by mAb P3D4 was not mapped, the fact that this mAb efficiently inhibits cell adhesion to both 58 kDa and 38 kDa fragments and to Fn, suggests that the antigenic site recognized by P3D4 is directly involved (or in close proximity) in cell attachment. The finding that P3D4 is a good inhibitor of cell adhesion to the 38 kDa fragment was somewhat surprising, since this fragment contains two adhesion promoting sites (Hep II and CS-1) and CS-1 is apparently of higher affinity than Hep II (1-3). It is interesting

that mAb P1F11 (anti-CS-1) is a poor inhibitor of cell adhesion to the 38 kDa fragment of Fn. An explanation for this is that P1F11 does not bind native 38 kDa fragment (or Fn) with sufficient affinity to block cell attachment. Alternatively, P1F11 may bind to an epitope of CS-1 which is not directly involved in adhesion. In this regard, splitting CS-1 into the previously described A13 and B12 subpeptides (3) abolishes further binding to P1F11 (E. A. Wayner, unpublished), suggesting that the epitope recognized by this mAb is located in the middle of CS-1. It was recently shown (10, 11) that the active adhesive sequence within CS-1 is the tripeptide LDV located in the carboxy-terminal half of the peptide (within B12). A more likely explanation for the lack of inhibition of mAb P1F11 is that, contrary to the effect of P3D4, blocking CS-1 does not preclude cell binding to Hep II. The different functional properties of mAbs P3D4 and P1F11 suggest that the Hep II and CS-1 sites, may act in a cooperative manner to promote lymphocyte attachment to Fn. This suggestion is supported by the fact that both regions interact with the same cell receptor, the $\alpha 4 \beta 1$ integrin (1, 3). It is therefore possible that interaction with Hep II is the first step in the process of cell adhesion to the carboxy-terminal region of Fn, and that this interaction regulates (and strengthen) binding to CS-1. While this mechanism awaits confirmation, the availability of the two novel mAbs described here would be very useful to fully understand the molecular bases and regulation of lymphocyte interaction with Fn.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ana Gutiérrez for her expert technical assistance. This work was supported by grant no. SAL91-0785 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Madrid. P. Sánchez-Aparicio is the recipient of a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid, Spain.

REFERENCES

1. Wayner, E. A., García-Pardo, A., Humphries, M. J., McDonald, J. A., and Carter, W. G. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 1321-1330.
2. Ferreira, O. C., and García-Pardo, A. (1990) *Immunology*, 69, 121-126.
3. García-Pardo, A., Wayner, E. A., Carter, W. G., and Ferreira, O. C. (1990) *J. Immunol.* 144, 3361-3366.
4. Bernardi, P., Patel, V. P., and Lodish, H. F. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 489 - 498.
5. Humphries, M. J., Komoriya, A., Akiyama, S. K., Olden, K., and Yamada, K. M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6886 - 6892.
6. García-Pardo, A., Rostagno, A., and Frangione, B. (1987) *Biochem. J.* 241, 923 - 928.

7. McCarthy, J. B., Chelberg, M. K., Mickelson, D. J., and Furcht, L. T. (1988) *Biochemistry*, 27, 1380 - 1388.
8. Schwarzbauer, J. E., Paul, J. I., and Hynes, R. O. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1424 - 1428.
9. Sekiguchi, K., and Titani, K. (1989) *Biochemistry*, 28, 3293 - 3298.
10. Komoriya, A., Green, L. J., Mervic, M., Yamada, S., Yamada, K. M., and Humphries, M. J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15075 - 15079.
11. Wayner, E. A., and Kovach, N. L. (1992) *J. Cell Biol.* 116, 489 - 497.

$\alpha 4\beta 1$ Recognition of the Hep II Domain of Fibronectin Is Constitutive on Some Hemopoietic Cells but Requires Activation on Others¹

Paloma Sánchez-Aparicio,* Orlando C. Ferreira, Jr.,[†] and Angeles Garcia-Pardo^{2*}

*Unidad de Inmunología, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain; and the [†]Serviço de Hematologia e Hemoterapia, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT. Leukocyte adhesion to the carboxyl-terminal region of fibronectin, a major component of extracellular matrices, involves recognition of the CS-1 site and the Hep II domain. We have previously shown that cultured T and B lymphoid cells constitutively attach via the $\alpha 4\beta 1$ integrin to a 38-kDa fibronectin fragment that contains CS-1 and Hep II, and to a 58-kDa fragment that contains Hep II only. In this report we have studied the adhesion of other hemopoietic cells to the CS-1 and Hep II regions of fibronectin. Cultured monocytic cells and peripheral blood T lymphocytes constitutively bound to the 38-kDa fragment indicating that $\alpha 4\beta 1$ was functional. These cells, however, were unable to bind to the 58-kDa fragment. On lymphoid cells both fragments were shown to bind to very close regions of $\alpha 4\beta 1$ as indicated by the inhibition pattern of mAb to various $\alpha 4$ epitopes, and by the good inhibitory capacity of soluble 38-kDa fragment on cell adhesion to 58-kDa fragment. These results suggested that $\alpha 4\beta 1$ is present on certain cell populations as a partially active form able to recognize the "high affinity" ligand CS-1 but not the "low affinity" ligand Hep II. Binding of monocytic cells and peripheral blood T lymphocytes to the Hep II domain could be induced by several agents: first, long (48-h) and short (20-min) treatment with phorbol esters; second, cell incubation with the divalent cation Mn^{2+} ; third, and most effective, cell incubation with the mAb TS2/16, which is directed to the $\beta 1$ integrin subunit. Binding to the 58-kDa fragment in all three cases was completely inhibited by mAb anti- $\alpha 4$, thus confirming the involvement of $\alpha 4\beta 1$ in the recognition of the Hep II domain. No major changes on $\alpha 4\beta 1$ surface expression were observed after these treatments as determined by immunofluorescence analyses. Our results indicate that hemopoietic cells may differentially bind the CS-1 and Hep II ligands in fibronectin depending on the activation state of $\alpha 4\beta 1$, a fact that may be relevant for the migration and function of leukocytes. *Journal of Immunology*, 1993, 150: 3506.

Lymphocyte interactions with extracellular matrix components such as Fn³ are essential to their proper migration and localization in lymphoid tissues and inflammatory sites as well as to their function

(reviewed in References 1 and 2). Lymphocyte attachment to Fn is mediated by multiple adhesive sites located in the central and carboxyl-terminal regions of Fn (3–7). The central cell-binding domain contains the RGD sequence and two synergistic sites that cooperate with RGD (8). The carboxyl-terminal cell-binding region of Fn comprises the

Received for publication August 28, 1992. Accepted for publication January 19, 1993.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grant SAL91-0785 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain. P. Sánchez-Aparicio is the recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid, Spain.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Angeles Garcia-Pardo, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, 28006 Madrid, Spain.

³ Abbreviations used in this paper: Fn, fibronectin; IIICS, type III connecting segment.

Hep II domain and the IIICS. The most active cell-binding site within IIICS corresponds to residues 1–25 and is known as CS-1 (9). At least four distinct sites within the Hep II domain termed H1, FN-C/H I, FN-C/H II, and FN-C/H III (see Fig. 1) have been shown to mediate adhesion of some cell types, including murine and human melanoma cells to Fn (10–12). It is not known whether lymphocytes recognize any of these sequences in the Hep II domain.

We have previously shown that cultured T and B lymphoid cells efficiently attach to a 38-kDa fragment derived from the A chain of Fn, which contains the Hep II domain and part of IIICS including CS-1 (5–7, 13). Lymphoid cells also constitutively attach to another fragment of 58 kDa derived from the B chain of Fn, that contains the Hep II domain but lacks IIICS (5–7, 14). The lymphocyte receptor that interacts with both fragments is the $\alpha 4 \beta 1$ integrin, which binds CS-1 and sequences of the Hep II domain not yet identified. A recent report (10) has shown that the H1 sequence of Fn constitutes a ligand for $\alpha 4 \beta 1$ in melanoma cells.

Although cultured lymphoid cells constitutively attach to the 58-kDa and 38-kDa fragments we have observed that the contribution of the Hep II and CS-1 sites to cell attachment may vary among different cell populations. This is evidenced by the fact that the synthetic peptide CS-1 completely inhibits adhesion of the B cell line Ramos to Fn or 38-kDa fragment (7), but produces only partial inhibition of attachment of T lymphoid cells to these substrata (5, 6). Because both regions Hep II and CS-1 are ligands of $\alpha 4 \beta 1$, these findings suggest that the preferential recognition of either Hep II or CS-1 may be regulated by the ligand itself (the CS-1 sequence is regulated by alternative splicing and it is not present in all Fn isoforms), and/or by the $\alpha 4 \beta 1$ receptor present at a particular cell population. In this regard, it has been recently demonstrated that the constitutive binding of $\beta 1$ integrins to extracellular matrix proteins and activated endothelium can be up-regulated by certain mAb directed to the $\beta 1$ subunit (15–18).

In this report we have extended our previous studies to further understand the molecular mechanisms and the regulation of leukocyte interaction with the carboxyl-terminal region of Fn. We show that monocytic cells and peripheral blood T lymphocytes constitutively bind to the 38-kDa fragment (CS-1) via $\alpha 4 \beta 1$, but are unable to attach to the 58-kDa fragment (Hep II). Therefore, $\alpha 4 \beta 1$ on these cells differs from the previously described $\alpha 4 \beta 1$ present on cultured T and B cells, which constitutively binds Hep II and CS-1 (5–7). We show that conversion to the fully activated $\alpha 4 \beta 1$ with capacity to recognize Hep II can be achieved by cell treatment with either PMA or the divalent cation Mn^{2+} . Furthermore, we show that recognition of the Hep II domain of Fn is regulated through the $\beta 1$ subunit of $\alpha 4 \beta 1$.

Materials and Methods

Fn and Fn fragments

Human plasma Fn was the generous gift of Drs. B. Horowitz and R. Shulman (New York Blood Center, New York, NY). The 38-kDa and 58-kDa fragments derived from the A and B chains of Fn, respectively (see Fig. 1), were obtained by trypsin digestion (1/200, 37°C, 90 min) and purified as previously described (5–7, 14). Purified 58-kDa fragment was always analyzed by Western blotting with mAb P1F11 (14) (see below) to confirm the absence of the CS-1 sequence.

mAb

mAb P1F11 reactive with the CS-1 sequence of Fn was produced and characterized as reported (14). mAb to the $\alpha 4$ integrin subunit HP1/1 (epitope A), HP2/1 (epitope B1), and HP2/4 (epitope B2) (19), and mAb Alex 1/4 and TS2/16 specific for the $\beta 1$ subunit were obtained from Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain. mAb B-5G10 (anti- $\alpha 4$, epitope C) (19) was obtained from Dr. Martin Hemler (Dana Farber Cancer Institute, Boston). mAb P1D6 (anti- $\alpha 5$) was obtained from Dr. Elizabeth Wayner (University of Minnesota, Minneapolis, MN). mAb HC 1/1 (anti-CD11c) was obtained from Dr. Carmelo Bernabeu (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain).

Cells and cell culture

The human cell lines U-937, HL-60, and THP-1 (monocytic), Ramos and CESS (B lymphoblastoid), and HUT-78 (T lymphoblastoid) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Jurkat (T lymphoblastoid) and JY (B lymphoblastoid) cells were obtained from Dr. C. Bernabeu. Cells were expanded in RPMI 1640, supplemented with 10% heat-inactivated FCS (GIBCO, Mid-dlesex, UK), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin (Antibióticos, Madrid, Spain), and 24 μ g/ml gentamicin (Llorente, Madrid, Spain). THP-1 cells were grown in the same medium supplemented with 50 μ M 2-ME. In general, 4-day cultures were used for assays. For induction of differentiation, U937 cells (5×10^5 /ml) were transferred to Teflon vials (Pierce, Rockford, IL) and incubated with 10 ng/ml of PMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 48 h. Effectiveness of PMA treatment was assessed by visual examination of morphologic changes characterized by the formation of cell aggregates, and by increased expression of the CD11c Ag.

Peripheral blood lymphocytes and monocytes were obtained from venous blood of normal voluntary donors treated with sodium citrate. After Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) density gradient centrifugation, peripheral

mononuclear cells were depleted of adherent cells by incubation in plastic flasks precoated with serum at 37°C for 2 h. T cells were purified by passage through a nylon wool column. T cell-enriched population contained >90% CD3⁺ and <3% CD21⁺ and CD11c⁺. Adherent cells were harvested with HBSS containing 5 mM Na₂EDTA. The phenotype of the adherent population was >95% CD11b⁺, CD31⁺, and <1.9% CD3⁺.

Cell attachment assays

These assays were performed exactly as described (6, 7) using flat bottom, 96-well Linbro plates (ICN Biomedicals, High Wycombe, Bucks, UK) coated with appropriate concentrations of Fn or Fn fragments. The plates were washed with PBS and incubated at 37°C with heated (85°C, 10 min) 1.5% BSA. After rinsing with PBS containing 0.9 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂, 100 µl of a 5 to 6 × 10⁵/ml cell suspension was added to each coated well and adhesion was assessed after 30 min at 37°C. For T lymphocyte experiments a 10⁶/ml cell suspension was used. Nonadherent cells were removed by two gentle washes with RPMI 1640 and attached cells were fixed overnight with 1.25% glutaraldehyde, washed, and stained with 0.1% toluidine blue. After 4 h at room temperature, the absorbance at 492 nm was determined using an automatic microplate reader MRPA 4 (Eurogenetics Teffenderlo, Belgium). For inhibition experiments cells were incubated with appropriate mAb for 1 h at 4°C before adding to the coated wells. Assays in the presence of Mn²⁺ were performed with cells previously washed twice with 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, and the plates were washed with the same solution. For anti-β1 mAb assays, cells were preincubated with a 1/10 dilution of these mAb for 20 min at 37°C before the attachment assay.

Quantitation of cell attachment was done based on the OD at 492 nm using calibration curves for each cell line or T cells as described (15). OD was found to be a linear function of the number of cells attached in the range 0.5 × 10³ – 2.5 × 10⁴ cells (with minor changes for each cell line) and 3.2 × 10³ – 2 × 10⁴ for peripheral blood T lymphocytes. All assays were performed in triplicate.

Immunofluorescence analyses

Cells (5 × 10⁵) were incubated for 30 min at 4°C with 100 µl of culture supernatants containing the appropriate mAb. Cells were washed twice with cold PBS containing 1% BSA and resuspended in 100 µl of a 1/100 dilution of fluorescein-conjugated F(ab')₂ fragments of rabbit antibodies to mouse IgG (Dakopatts, Glostrup, Denmark). After 30 min at 4°C the cells were washed twice, resuspended in PBS, and analyzed by flow cytometry on an EPICS-CS (Coulter Cintentifica, Móstoles, Spain).

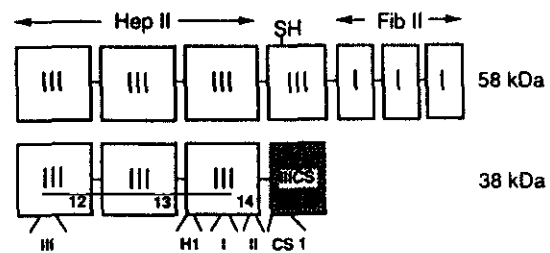


FIGURE 1. Schematic drawing of the 58-kDa and 38-kDa tryptic fragments of Fn used in this study. Types I and III homology repeats of Fn corresponding to these fragments are indicated and numbered (31). The 58-kDa fragment is derived from the B chain of Fn and contains the Hep II and Fib II domains linked by a type III homology unit that contains a free sulfhydryl group (13, 14). The 38-kDa fragment is derived from the A chain of Fn and contains the Hep II domain and part of the IIICS segment (13). The position of the known adhesive sequences within Hep II and IIICS is indicated (9, 10–12). CS-1 is only present on the 38-kDa fragment, whereas H1, I, II, and III are common to both fragments.

Results

Fn fragments that contain the Hep II domain

The Fn fragments of 58-kDa and 38-kDa used in this study (Fig. 1) have been previously described (5–7). Both fragments contain the entire Hep II domain of Fn and have identical N-terminal amino acid sequence. The 38-kDa fragment also contains the first 67-amino acid residues of the IIICS region, including the CS-1 site (13), and is derived from the A chain of Fn. The 58-kDa fragment lacks the entire IIICS region (14) and is therefore derived from the B chain of Fn. Consequently, the 38-kDa fragment contains two cell binding regions: Hep II and CS-1; the 58-kDa fragment contains only one: Hep II. The 58-kDa fragment also comprises the Fib II domain of Fn (A. Garcia-Pardo, unpublished observations) (Fig. 1). The position of the known adhesive sequences within the Hep II domain of Fn (9–12) is also shown in Figure 1.

Differential adhesion of lymphoid and monocytic cells to the Hep II domain of Fn

We have previously reported that T and B lymphoid cells and U937 monocytic cells efficiently attach to the 38-kDa Fn fragment via the α4β1 integrin and that the CS-1 sequence of Fn is the primary ligand in this interaction (5–7, 20). However, T and B lymphocytes also recognize other adhesive sites in the Hep II domain of Fn not yet identified (5–7). In the present study we attempted to further clarify the interaction of hemopoietic cells with both regions of Fn: Hep II and CS-1. Figure 2 shows the profiles of adhesion of lymphoid and monocytic cells to the 38-kDa and 58-kDa fragments of Fn. As can be observed and as previously reported (5–7, 20), the T cell line HUT-78 (and Jurkat, not shown), the B cell line Ramos (and JY, CESS, not shown)

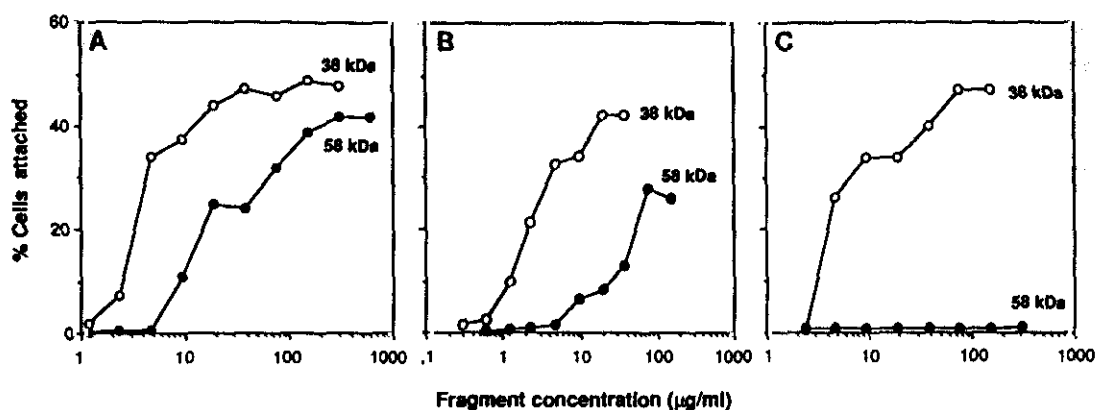


FIGURE 2. Attachment of lymphoid and monocytic cells to the 38-kDa (open circles) and 58-kDa (closed circles) fibronectin fragments. *A*, HUT-78 (T lymphoblastoid), *B* Ramos (B lymphoblastoid), and *C*, U937 (monocytic) cells. Microtiter wells were coated with 100 μ l of the indicated concentration of either fragment and 5×10^4 cells were added. After 30 min at 37°C, attached cells were stained and quantitated by OD as described in *Materials and Methods*. Each determination was done in duplicate and values represent the means of three different experiments. Values on the ordinate indicate the percentage of cells that remained attached after washing relative to the total input of cells (5×10^4 /well) after subtracting blanks. Maximal adhesion values of 40 to 50% in all three cases represent cell saturation of wells.

and the monocytic cell line U937 (and THP-1, HL-60, not shown) efficiently adhered to the 38-kDa fragment in a dose-dependent manner. All T and B cell lines studied also constitutively attached to the 58-kDa fragment, which lacks the CS-1 site (shown in Figs. 2*A* and 2*B* for HUT-78 and Ramos, respectively). In contrast, U937 monocytic cells (and THP-1, HL-60, not shown), which constitutively attached to the 38-kDa fragment (47% of cells bound at saturation), were unable to bind to the 58-kDa fragment (Fig. 2*C*). The total number of HUT-78 cells attached at saturation represented 49% and 42% of total cell input for 38-kDa and 58-kDa fragments, respectively (Fig. 2*A*). In the case of Ramos, these values were 42% and 28%, respectively (Fig. 2*B*). As shown in these figures and as previously reported (6, 7), the 38-kDa fragment was a more efficient substrate for cell adhesion than the 58-kDa fragment. This quantitative difference in the capacity to support cell attachment as well as the lack of adhesion of monocytic cells to the 58-kDa fragment (Fig. 2*C*) were not caused by a poorer adsorption of 58-kDa to plastic surfaces because we have previously shown in quantitative experiments using ^3H -labeled fragments that equivalent amounts of 38-kDa and 58-kDa fragments bind to these plates (6, 7, 20).

Using two mAb directed to the α and β subunits, respectively, of the $\alpha_4\beta_1$ integrin, we (5, 7) and others (18) previously showed that $\alpha_4\beta_1$ could also function as the receptor for the 58-kDa Fn fragment. To establish whether the same $\alpha_4\beta_1$ epitopes were involved in the recognition of the 38-kDa and 58-kDa fragments, we performed attachment assays in the presence of a panel of anti- α_4 mAb. As shown in Figure 3*A*, mAb HP1/1, HP2/1, and HP2/4, previously mapped to epitopes A, B1, and B2 of the α_4 subunit, respectively (19), inhibited Ramos cell adhesion (and HUT-78, not shown) to the 58-kDa and 38-kDa frag-

ments with an identical pattern ($B1 > B2 > A$). These results clearly show that the CS-1 site (38-kDa) and the Hep II sites (58-kDa) interact with very close regions in $\alpha_4\beta_1$. This conclusion was further confirmed by the capacity of soluble 38-kDa fragment to inhibit cell adhesion to 58-kDa coated wells. As shown in Figure 3*B*, preincubation of HUT-78 cells (and Ramos, not shown) with soluble 38-kDa fragment resulted in 80% inhibition of attachment to the 58-kDa fragment. Cell preincubation with soluble 58-kDa fragment had limited effect (30% inhibition) in agreement with previous observations on the different binding affinities of both fragments (5–7). Altogether these results suggest that monocytic cells bear a partially functional form of $\alpha_4\beta_1$ which differs from that present in cultured lymphoid cells in the ability to interact with Hep II in Fn.

Recognition of the Hep II domain of Fn is induced after monocytic cell differentiation and activation

We have recently shown that differentiation of U937 cells affects the constitutive binding of these cells to the 80-kDa (RGD site) and 38-kDa (CS-1 site) fragments of Fn (21). We now studied whether differentiated U937 cells acquired the capacity to recognize the 58-kDa fragment (Hep II sites). As shown in Figure 4, U937 cells that had been cultured in the presence of low doses (10 ng/ml) of PMA for 48 h, specifically adhered to the 58-kDa fragment in a dose-dependent manner. This result suggests that differentiation of U937 cells is accompanied by the conversion of $\alpha_4\beta_1$ to a fully active form capable of interacting with the Hep II domain. It can be argued that given the length of time involved and the overall changes undergone by U937 cells during differentiation (22), the contribution of other factors that may affect the adhesion properties of these cells cannot

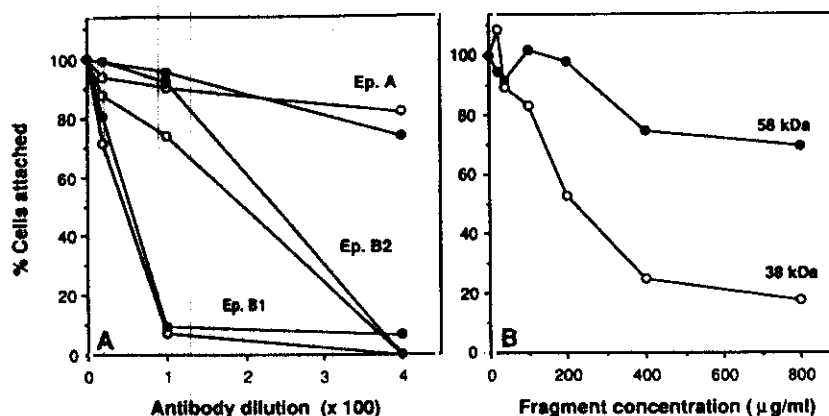


FIGURE 3. Inhibition of cell adhesion to the 58-kDa fragment by mAb to $\alpha 4$ (A) or by soluble 38-kDa and 58-kDa fragments (B). A, Ramos cells were incubated with anti- $\alpha 4$ mAb HP1/1 (epitope A), HP2/1 (epitope B1), or HP2/4 (epitope B2) for 1 h at 4°C and added to wells coated with 38-kDa (1.2 $\mu\text{g/ml}$) (open circles) or 58-kDa (19 $\mu\text{g/ml}$) (closed circles) fragments. B, HUT-78 cells were incubated with the indicated concentrations of 38-kDa or 58-kDa fragment for 30 min at room temperature; cells were added to 58-kDa-coated wells (19 $\mu\text{g/ml}$ or 1.9 $\mu\text{g/well}$). Attached cells in both experiments were quantitated as described. Values are expressed as percentage of the number of cells attached in control wells (no inhibitor). The average number of attached cells in control wells was: A, 6,000; B, 14,000.

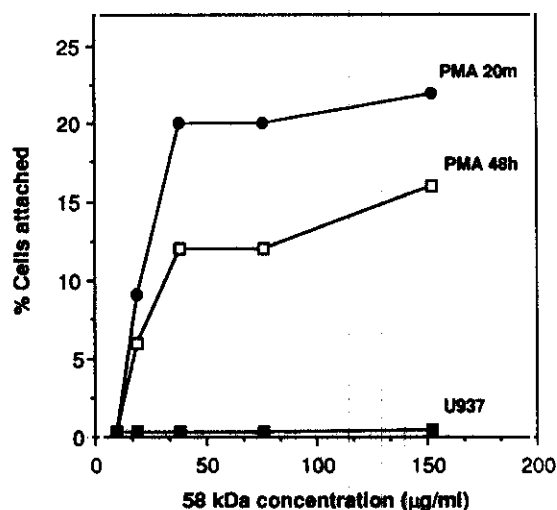


FIGURE 4. Effect of long (10 ng/ml, 48 h) (open squares) and short (50 ng/ml, 20 min) (closed circles) PMA treatment on the adhesion of U937 cells to the 58-kDa fragment. Resting (closed squares) or PMA-treated U937 cells were added to wells coated with 100 μl of the indicated concentrations of 58-kDa fragment. After 30-min incubation attached cells were quantitated as described. Determinations were done in duplicate and are the average of three separate experiments. Values on the ordinate represent the percentage of attached cells relative to the total cell input ($5 \times 10^4/\text{well}$).

be completely ruled out. To overcome these problems, we studied the effect of acute activation of U937 cells (without induction of differentiation) on adhesion to the Hep II domain. As shown in Figure 4, treatment of U937 cells with 50 ng/ml of PMA for 20 min resulted in an even more efficient attachment to the 58-kDa fragment. Similar patterns of adhesion to the 58-kDa fragment were obtained for HL-60 and THP-1 cells (results not shown). These results

are in agreement with previous reports showing increased lymphocyte adhesion to Fn after short term activation with PMA (15, 16, 23, 24). U937 cell binding to the 58-kDa fragment was mediated by the $\alpha 4\beta 1$ integrin because it was inhibited by mAb to the $\alpha 4$ subunit (not shown).

To establish whether PMA treatment affected the relative pattern of expression of $\alpha 4$ epitopes A, B1, B2, and C, resting and PMA-treated U937 cells were analyzed by immunofluorescence using the panel of anti- $\alpha 4$ mAb mentioned above. As shown in Table I, there was a consistent decrease in the expression of all four epitopes although no major relative changes were observed among them. No changes in $\alpha 4\beta 1$ surface expression were detected after short PMA treatment (not shown).

Recognition of the Hep II domain of Fn by monocytic cells is regulated through the $\beta 1$ subunit

It was recently reported that the function of several $\beta 1$ integrins including $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ can be up-regulated through certain mAb specific for the $\beta 1$ subunit (15–18). To study whether such mAb affected the interaction of $\alpha 4\beta 1$ with its Hep II ligands, we performed cell attachment assays to the 58-kDa fragment in the presence of two anti- $\beta 1$ mAb, TS2/16 and Alex 1/4. As shown in Figure 5A, preincubation of U937, THP-1, and HL-60 monocytic cells with the activating mAb TS2/16 resulted in specific attachment to the 58-kDa fragment. The level of cell attachment to this concentration of 58-kDa fragment reached 16 to 20% of total cell input and was similar to that obtained after cell treatment with PMA (compare Fig. 5A with Fig. 4) with slight variations among the various cell lines. Cell preincubation with the control mAb Alex 1/4 had no effect (Fig. 5A).

Table 1
Expression of $\alpha 4$ epitopes on resting and PMA-stimulated U937 cells

Antibody	Mean Fluorescence Intensity	
	U937	PMA-U937
HP1/1 (A)	115.2	105.2
HP2/1 (B1)	107.8	94.1
HP2/4 (B2)	125.9	110.5
B-5G10 (C)	128.9	95.8
HC1/1 (CD11c)	34.2	63.0

mAb TS2/16 also enhanced the constitutive binding of monocytic cells to the 38-kDa fragment and thus affected the interaction of $\alpha 4\beta 1$ with its two Fn ligands (Hep II and CS-1). As shown in Figure 5B, resting THP-1, U937, and HL-60 cells bound efficiently (16 to 20% of total cell input) to 38-kDa fragment-coated wells. mAb TS2/16 enhanced this constitutive binding by more than twofold to saturation levels (40 to 50% of total cell input), whereas the control mAb Alex 1/4 had no effect (Fig. 5B). Interestingly, at the equivalent molar concentrations shown in Figure 5 (0.6 nmol of 58-kDa and 0.5 nmol of 38-kDa fragment), the induced level of adhesion to the 58-kDa fragment was similar to the constitutive binding of the corresponding cell line to the 38-kDa fragment (Figs. 5A and 5B). The effect exerted by mAb TS2/16 involved the $\alpha 4\beta 1$ integrin because preincubation with anti- $\alpha 4$ mAb HP2/1 completely inhibited adhesion of all cells to the 58-kDa fragment (Fig. 6) and to the 38-kDa fragment (not shown) whereas the anti- $\alpha 5$ mAb P1D6 used as control had no inhibitory effect.

mAb TS2/16 induces recognition of the Hep II domain by peripheral blood T lymphocytes

To establish whether the differential adhesion to the CS-1 and Hep II regions of Fn also occurred on other hemopoietic cells besides those of monocytic lineage, we studied the adhesion of T cells to the 38-kDa and 58-kDa fragments. As shown in Figure 5A, freshly isolated T lymphocytes were unable to attach to the 58-kDa fragment. These cells however constitutively bound to the 38-kDa fragment (Fig. 5B) although not as efficiently as cultured lymphoid cells. Preincubation with mAb TS2/16 induced the specific attachment of T lymphocytes to the 58-kDa fragment (Fig. 5A) and enhanced by more than threefold their constitutive binding to the 38-kDa fragment (Fig. 5B). As for monocytic cells, the effect of mAb TS2/16 was completely blocked by anti- $\alpha 4$ mAb HP2/1 (not shown). The constitutive binding of the B cell line Ramos to the 58-kDa fragment was also enhanced by mAb TS2/16 (not shown). Short treatment with 50 ng/ml of PMA also induced specific binding of T cells to the 58-kDa fragment (data not shown).

The divalent cation Mn^{2+} induces cell binding to the Hep II domain of Fn

It is now well established that integrin function can be modulated by divalent cations (2). In particular Mn^{2+} has been shown to enhance the affinity of the $\alpha 5\beta 1$ integrin for its ligand, the RGD sequence of Fn (25). In the present study we tested the possibility that Mn^{2+} could mimic the effect of mAb TS2/16 and induce cell binding to the 58-kDa fragment. As shown in Figure 5A, inclusion of Mn^{2+} in the attachment assays and prewashing the cells in the presence of this cation resulted in specific adhesion of the three monocytic cell lines tested to the 58-kDa fragment. Mn^{2+} , however, was not as efficient as mAb TS2/16 in inducing monocytic cell binding to the Hep II sites and had minimal effect on T cells (Fig. 5A). As shown in Figure 5B, Mn^{2+} also increased the constitutive binding of U937 cells to the 38-kDa fragment but had no significant effect on THP-1, HL-60, or T cells. Mn^{2+} did not affect cell binding to BSA-coated surfaces thus confirming the specificity of the effect. Treatment with Mn^{2+} did not affect cell surface expression of $\alpha 4\beta 1$ as determined by immunofluorescence using anti- $\alpha 4$ and anti- $\beta 1$ mAb (data not shown).

Discussion

In this report we have extended our previous studies on leukocyte adhesion to Fn and we show that 1) monocytic cells and peripheral blood T lymphocytes constitutively recognize the CS-1 site present on the 38-kDa fragment of Fn but are unable to bind to the 58-kDa fragment that contains only the Hep II sites; 2) both 38-kDa and 58-kDa fragments bind to very close regions of the $\alpha 4\beta 1$ integrin; 3) $\alpha 4\beta 1$ on these cells is therefore present as a partially active or low avidity form that is able to interact with the more active ligand CS-1 but not with the less active ligand Hep II; 4) binding to Hep II can be induced by cell treatment with either PMA, the divalent cation Mn^{2+} or, most effectively, with mAb TS2/16 directed to the $\beta 1$ integrin subunit.

The three monocytic cell lines used in the present studies failed to adhere to the 58-kDa fragment of Fn even at high concentrations of $>300 \mu\text{g/ml}$, although they efficiently bound to the 38-kDa fragment through the CS-1 site. This confirms our preliminary results using U937 cells (20) and may indicate that lymphoid and monocytic cells behave differently with respect to the utilization of the various adhesive sites in Fn. As we have previously shown, cultured T and B lymphoid cells constitutively bind to both 38-kDa and 58-kDa fragments of Fn although, on molar bases, the 38-kDa fragment was about threefold more effective than the 58-kDa fragment in supporting cell adhesion (5–7). The fact that freshly isolated peripheral blood T cells are also unable to bind to the Hep II domain of Fn (this report) suggests that the differential recognition of the Hep II do-

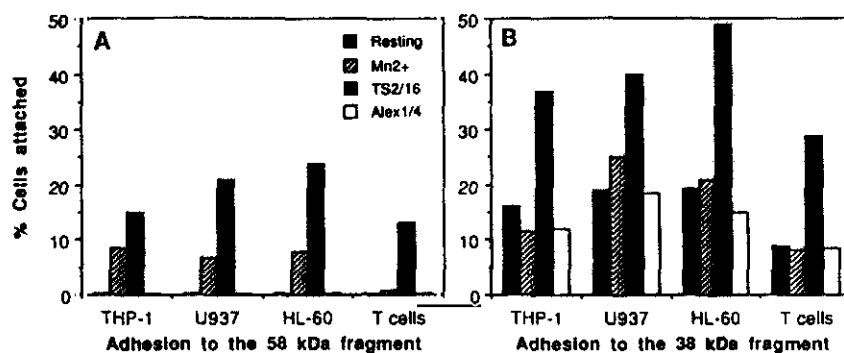


FIGURE 5. Induction of cell adhesion to the 58-kDa fragment (A) and enhancement of cell adhesion to the 38-kDa fragment (B) by anti- β 1 mAb TS2/16 and by the divalent cation Mn^{2+} . Wells were coated with 100 μ l of 58-kDa (38 μ g/ml, 0.6 nmol) or 38-kDa (19 μ g/ml, 0.5 nmol) fragments as described. Monocytic cells (U937, THP-1, HL-60) and peripheral blood T cells either untreated (resting) or previously incubated with mAb TS2/16, mAb Alex 1/4, or 1 mM Mn^{2+} were added to the wells and incubated for 30 min at 37°C. Attached cells were quantitated as described. Values are the means of two separate experiments and are expressed as percentage of total cell input.

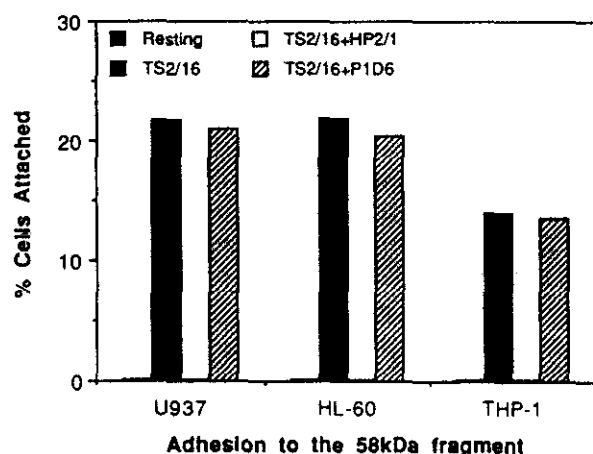


FIGURE 6. Inhibition of mAb TS2/16-induced monocytic cell adhesion to the 58-kDa fragment by anti- α 4 mAb. Resting U937, HL-60, and THP-1 cells or cells previously incubated with either mAb TS2/16, mAb TS2/16 + HP2/1 (anti- α 4), or mAb TS2/16 + P1D6 (anti- α 5) were added to 58-kDa coated wells (38 μ g/ml). After 30 min at 37°C attached cells were quantitated as described. Values are the means of two separate experiments and are expressed as percentage of total cell input.

main may be determined by the activity of the α 4 β 1 integrin receptor present on a particular cell population. The existence of various states of activation in α 4 β 1 is evidenced by the different patterns of adhesion observed even among cells that constitutively bind both ligands. As shown in the present report, the number of HUT-78 cells attached at saturation is similar for both 38- and 58-kDa fragments (49 and 42%, respectively), whereas in the case of Ramos more cells (1.5-fold) attach at saturation to the 38-kDa fragment than to the 58-kDa fragment when equivalent molar concentrations are compared. Therefore, it appears to be a "gradient of adhesion" to the Hep II domain of Fn represented by cultured T cells, cultured B cells, and monocytic/peripheral blood T cells, respectively. The different ability

to recognize Hep II is probably determined by the avidity (high-intermediate-low) of the receptor present on those cells. Consequently, the high/intermediate avidity form of α 4 β 1 would be able to bind "high" (CS-1) and "low" (Hep II) affinity ligands, whereas the low avidity form of α 4 β 1 would bind only the stronger ligand CS-1. In this context, an efficient cell adhesion will depend on the state of activation of the receptor and on the availability and affinity of the ligand. As we show in the present report, several stimuli can convert the low avidity form of the receptor to the intermediate/high avidity form thus further supporting the above explanation on different activation forms of α 4 β 1.

Changes in adhesion to Fn after cell differentiation have been reported for several cell types including lymphocytes (3, 23, 26). For U937 monocytic cells we have recently shown that induction of the monocyte-like phenotype affects cell attachment to the RGD and CS-1 sites of Fn (21). The present results show that differentiated U937 cells also acquire the ability to bind to the Hep II domain and this correlates with a slight down-regulation of surface expression of α 4 β 1, consistent with our previous report (21). The most likely explanation for the recognition of Hep II by PMA-treated U937 cells is the functional up-regulation of α 4 β 1 after differentiation, as previously reported for this and other β 1 integrins on lymphocytes (23). We have attempted to further confirm these results by testing the adhesion of freshly isolated peripheral blood monocytes to the 58-kDa fragment. However, because of the high nonspecific adherence of monocytes on these assays, it was not possible to ascertain the specificity of the binding. The fact that short term activation of monocytic and T cells with high doses of PMA induces cell binding to the Hep II domain and is even more effective than long treatments, strongly supports the explanation of the activation of α 4 β 1.

It is now well established that the functional activity of

integrins can be modulated by several agents including phorbol esters (23, 24, 27), specific ligands (28), and divalent cations (25, 29). Recent reports have shown that certain mAb directed to the $\beta 1$ subunit can increase the avidity of $\beta 1$ integrins for their ligands, presumably by inducing a conformational change that leads to an activated form of the receptor (15–18). The constitutive binding of $\alpha 4\beta 1$ to two of its ligands, CS-1, and VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) has been shown to be up-regulated in this fashion. A recent report has shown that the recognition of the tripeptide LDV, an active sequence derived from CS-1, also requires activation of $\alpha 4\beta 1$ (18). In the present study, we show for the first time that anti- $\beta 1$ mAb TS2/16 effectively induces binding of monocytic cells and peripheral blood T lymphocytes to the Hep II domain of Fn, which was not previously recognized by resting cells. These results suggest that activation of the appropriate receptor may be a useful way to study low affinity interactions or novel ligands otherwise not detected.

A similar although less dramatic effect, was observed in the presence of the divalent cation Mn^{2+} . This cation has been shown to increase the affinity of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrins for their respective ligands (25, 29). Although Mn^{2+} induced some binding of peripheral blood T lymphocytes to the 58-kDa fragment, the effect was minimal when compared with monocytic cells. This might indicate that $\alpha 4\beta 1$ on T lymphocytes requires a stronger stimulus (PMA, anti- $\beta 1$ mAb) for full activation. Such explanation would be in accordance with the proposed existence of several $\alpha 4\beta 1$ activation forms among different cell populations. In spite of differences on the level of activation, it is likely that both Mn^{2+} and TS2/16 mAb induce a conformational change in $\alpha 4\beta 1$ which increases the avidity for its ligands and allows binding to the Hep II domain. However, until this mechanism of $\alpha 4\beta 1$ activation is confirmed, other alternative explanations such as intracellular signaling and/or receptor reorganization at the cell surface should also be considered.

As we and others have shown, cell adhesion to the carboxyl terminal region of Fn is a complex process that involves several adhesive sequences in the Hep II domain and in the IIICS region of Fn (5–7, 9–12). Some of these sequences are ligands for the $\alpha 4\beta 1$ integrin (5, 7, 10) and some interact with proteoglycans (11, 12, 30) at the cell surface. Although in the present report we did not identify the specific sequences involved in cell attachment to the Hep II domain, the finding that mAb to $\alpha 4\beta 1$ can completely inhibit (100%) adhesion to the 58-kDa (and 38-kDa) fragment indicates that the predominant interaction of leukocytes with the Hep II and CSI sites in Fn is mediated by the $\alpha 4\beta 1$ integrin. This conclusion is further supported by the results concerning the regulation of adhesion to these sites through the $\beta 1$ integrin subunit and the divalent cation Mn^{2+} . Regardless of the type of receptor involved, the ex-

istence of two adhesive regions (Hep II and CS-1) in close proximity within Fn may suggest a functional cooperation of the various active sites that results in a stable cell attachment. A model depicting the contribution of adhesive sites in Hep II and IIICS, the $\alpha 4\beta 1$ integrin, and proteoglycans has recently been proposed for melanoma cell adhesion to Fn (12). Based on the different inhibiting capacity of two mAb directed to the Hep II domain and the CS-1 sequence, respectively, we have recently postulated that lymphocyte binding to Hep II may serve to regulate and strengthen binding to CS-1 (14). If this is the case, the requirement for $\alpha 4\beta 1$ activation before binding of some hemopoietic cells to the Hep II domain may provide a mechanism for the regulation of leukocyte adhesion to Fn in tissues and inflammatory sites.

The present results therefore add another level of complexity to the already intricate process of cell adhesion to the carboxyl-terminal region of Fn because we present evidence for the existence of cell populations that constitutively bind the CS-1 ligand but require further $\alpha 4\beta 1$ activation to bind the Hep II ligand. The finding that certain hemopoietic cells may differentially bind either one or two ligands in Fn and that binding to both ligands is regulated by the activation state of $\alpha 4\beta 1$ supports the notion that cell adhesion to the CS-1 or/and Hep II regions may deliver different intracellular signals. On the other hand, the regulation (constitutive vs induced) of strong and weak interactions of $\alpha 4\beta 1$ with its ligands in Fn may have important implications for the migration and function of lymphocytes and monocytes, particularly because the CS-1 site is not present in all Fn isoforms resulting from alternative splicing mechanisms, thus providing another level of regulating cell adhesion and migration and reinforcing the role of the extracellular matrix on these processes.

Acknowledgments

We thank Dr. Francisco Sánchez-Madrid for critical reading of this manuscript and for the generous supply of mAb; Drs. M. E. Hemler, E. A. Wayner, and C. Bernabeu for mAb; Ana Gutiérrez for excellent technical assistance; and Pedro Lastres for help with the flow cytometry analyses.

References

1. Springer, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425.
2. Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11.
3. Bernardi, P., V. P. Patel, and H. Lodish. 1987. Lymphoid precursor cells adhere to two different sites on fibronectin. *J. Cell Biol.* 105:489.
4. Liao, N. S., J. St. John, J. B. McCarthy, L. T. Furcht, and H. T. Cheung. 1989. Adhesion of lymphoid cells to the carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin. *Exp. Cell Res.* 181:348.
5. Wayner, E. A., A. Garcia-Pardo, M. E. Humphries, J. A. McDonald, and W. G. Carter. 1989. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an

- alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* 109:1321.
6. Garcia-Pardo, A., and O. C. Ferreira. 1990. Adhesion of human T lymphoid cells to fibronectin is mediated by two different fibronectin domains. *Immunology* 69:121.
 7. Garcia-Pardo, A., E. A. Wayner, W. G. Carter, and O. C. Ferreira. 1990. Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin: the interaction of the $\alpha 4 \beta 1$ integrin with the LHGPEILDVPST sequence of the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. *J. Immunol.* 144:3361.
 8. Yamada, K. M. 1991. Adhesive recognition sequences. *J. Biol. Chem.* 266:12809.
 9. Humphries, M. J., A. Komoriya, S. K. Akiyama, K. Olden, K. M. Yamada. 1987. Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type specific adhesion. *J. Biol. Chem.* 262:6886.
 10. Mould, A. P., and M. J. Humphries. 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin $\alpha 4 \beta 1$ in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO J.* 10:4089.
 11. McCarthy, J. B., M. K. Chelberg, D. J. Mikelson, and L. T. Furcht. 1988. Localization and chemical synthesis of fibronectin peptides with melanoma adhesion and heparin binding activities. *Biochemistry* 27:1380.
 12. Iida, J., A. P. N. Skubitz, L. T. Furcht, E. A. Wayner, and J. B. McCarthy. 1992. Coordinate role for cell surface chondroitin sulfate proteoglycan and $\alpha 4 \beta 1$ integrin in mediating melanoma cell adhesion to fibronectin. *J. Cell Biol.* 118:431.
 13. Garcia-Pardo, A., A. Rostagno, and B. Frangione. 1987. Primary structure of human plasma fibronectin. Characterization of a 38 kDa domain containing the C-terminal heparin binding site (Hep III site) and a region of molecular heterogeneity. *Biochem. J.* 241:923.
 14. Garcia-Pardo, A., P. Sánchez-Aparicio, and E. A. Wayner. 1992. Two novel monoclonal antibodies to fibronectin that recognize the Hep II and CS-1 regions respectively: their differential effect on lymphocyte adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:135.
 15. Arroyo, A. G., P. Sánchez-Mateos, M. R. Campanero, I. Martín-Padura, E. Dejana, and F. Sánchez-Madrid. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the $\beta 1$ subunit. *J. Cell Biol.* 117:659.
 16. Van de Wiel-van Kemenade, E., Y. van Kooyk, A. J. de Boer, R. J. F. Huijbens, P. Weder, W. van de Kastele, C. J. M. Melief, and C. G. Figdor. 1992. Adhesion of T and B lymphocytes to extracellular matrix and endothelial cells can be regulated through the β subunit of VLA. *J. Cell Biol.* 117:461.
 17. Kovach, N. L., T. M. Carlos, E. Yee, and J. M. Harlan. 1992. A monoclonal antibody to $\beta 1$ integrin (CD29) stimulates VLA-4-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *J. Cell Biol.* 116:499.
 18. Wayner, E. A., and N. L. Kovach. 1992. Activation-dependent recognition by hematopoietic cells of the LDV sequence in the V region of fibronectin. *J. Cell Biol.* 116:489.
 19. Pulido, R., M. J. Elices, M. R. Campanero, L. Osborn, S. Schiffer, A. Garcia-Pardo, R. Lobb, M. E. Hemler, and F. Sanchez-Madrid. 1991. Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4: correlation with distinct $\alpha 4$ epitopes. *J. Biol. Chem.* 266:10241.
 20. Ferreira, O. C. Jr., A. Garcia-Pardo, and C. Bianco. 1990. Specific binding of the human monocytic cell line U937 to the alternatively spliced connecting segment (IIICS) of fibronectin. *J. Exp. Med.* 171:351.
 21. Ferreira, O. C. Jr., J. E. Valinsky, K. Sheridan, E. A. Wayner, C. Bianco, and A. Garcia-Pardo. 1991. Phorbol ester-induced differentiation of U937 cells enhances attachment to fibronectin and distinctly modulates the $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 1$ fibronectin receptors. *Exp. Cell Res.* 193:20.
 22. Minta, J. O., and L. Pambrun. 1985. In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U937 with phorbol myristate acetate. *Am. J. Pathol.* 119:111.
 23. Shimizu, Y., G. A. van Seventer, K. J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA ($\beta 1$) integrin receptors on T cells. *Nature* 345:250.
 24. Wilkins, J. A., D. Stupack, S. Stewart, and S. Caixia. 1991. $\beta 1$ integrin-mediated lymphocyte adherence to extracellular matrix is enhanced by phorbol ester treatment. *Eur. J. Immunol.* 21:319.
 25. Gailit, J., and E. Ruoslahti. 1988. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J. Biol. Chem.* 263:12927.
 26. Verfaillie, C. M., J. B. McCarthy, and P. B. McGlave. 1991. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. *J. Exp. Med.* 174:693.
 27. Postigo, A. A., R. Pulido, M. R. Campanero, A. Acevedo, A. Garcia-Pardo, A. L. Corbi, F. Sánchez-Madrid, and M. O. de Landázuri. 1991. Differential expression of VLA-4 integrin by resident and peripheral blood B lymphocytes: acquisition of functionally active $\alpha 4 \beta 1$ fibronectin receptors upon B cell activation. *Eur. J. Immunol.* 21:2437.
 28. Du, X., E. F. Plow, A. L. Frelinger, III, T. E. O'Toole, J. C. Loftus, and M. H. Ginsberg. 1991. Ligands "activate" integrin $\alpha IIb \beta 3$ (platelet GPIIb-IIIa). *Cell* 65:409.
 29. Kirchhofer, D., J. Gailit, E. Ruoslahti, J. Grzesiak, and M. D. Pierschbacher. 1990. Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor $gPIIb/IIIa$. *J. Biol. Chem.* 265:18525.
 30. Jalkanen, S., and M. Jalkanen. 1992. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.* 116:817.
 31. Hynes, R. O. 1990. Structure of fibronectins. In *Fibronectins*. A. Rich, ed. Springer-Verlag, New York. p.113

Activation of the $\alpha 4\beta 1$ Integrin through the $\beta 1$ Subunit Induces Recognition of the RGDS Sequence in Fibronectin

Paloma Sánchez-Aparicio, Carmen Dominguez-Jiménez, and Angeles Garcia-Pardo

Departamento de Inmunología, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid, Spain

Abstract. Lymphocyte attachment to fibronectin is mainly mediated by the interaction of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ integrins with the RGD and CS-1/Hep II sites, respectively. We have recently shown that the anti- $\beta 1$ mAb TS2/16 can convert the partly active $\alpha 4\beta 1$ present on certain hemopoietic cells that recognizes CS-1 but not Hep II, to a high avidity form that binds both ligands. In this report we have studied whether mAb TS2/16 also affects $\alpha 4\beta 1$ ligand specificity. Incubation of the B cell lines Ramos and Daudi (which lack $\alpha 5\beta 1$) with mAb TS2/16 induced specific attachment to an 80-kD fragment which lacks CS-1 and Hep II and contains the RGD sequence. mAbs anti- $\alpha 4$ and the synthetic peptides CS-1 and IDAPS inhibited adhesion to the 80-kD fragment thus implying $\alpha 4\beta 1$ as the receptor for this fragment. Interestingly, the synthetic peptide GRGDSPC and a 15-kD peptic fibronectin fragment

containing the RGD sequence also inhibited B cell adhesion to the 80-kD fragment. Because we have previously shown that RGD peptides do not affect the constitutive function of $\alpha 4\beta 1$, we tested whether TS2/16-activated $\alpha 4\beta 1$ acquired the capacity to recognize RGD. Indeed RGD peptides inhibited TS2/16-treated B cell adhesion to a 38-kD fragment containing CS-1 and Hep II but did not affect binding of untreated cells to this fragment. An anti-fibronectin mAb reactive with an epitope on or near the RGD sequence also efficiently inhibited cell adhesion to the 80-kD fragment, indicating that the RGD sequence is a novel adhesive ligand for activated $\alpha 4\beta 1$. These results emphasize the role of $\alpha 4\beta 1$ as a receptor with different ligand specificities according to the activation state, a fact that may be important for lymphocyte migration, localization, and function.

LYMPHOCYTE interactions with fibronectin (Fn)¹ are important for their differentiation, migration, activation, and biological function (reviewed in 20, 46). The specific sequences in Fn that mediate cell attachment are located within two main regions of the molecule: the central cell-binding domain contains the RGD site which acts in synergy with at least two other regions within this domain (56). The carboxy-terminal region of Fn comprises the Hep II domain and the IIIICS region. Within the Hep II domain the following sites have been shown to support melanoma cell adhesion: H1 (35), FNC/H I, and FNC/H II (21, 31). Two active sites have been identified within IIIICS, namely CS-1 (residues 1–25) and CS-5 (residues 90–109) (19). Both CS-1 and CS-5 are regulated by alternative splicing and are not present in all Fn isoforms. While CS-1 and the entire Hep II domain clearly mediate lymphocyte adhesion to Fn (15, 16, 52) it is not known if these cells recognize the specific sequences contained in H1, FNC/H I, FNC/H II, and CS-5.

Lymphocytes interact with Fn mainly via two main receptors which belong to the integrin family: the $\alpha 5\beta 1$ integrin is the receptor for the RGD and synergistic sites (42). The $\alpha 4\beta 1$ integrin is the receptor for H1 (35), Hep II, and CS-1 (16, 18, 33, 52) and CS-5 (34).

The functional activity of most integrins can be regulated intracellularly by phorbol esters (45, 54) or by the cytoplasmic domain of some α and β chains (22, 39) as well as extracellularly. Among these external factors certain mAb directed to the β subunit have been shown to upregulate the function of most $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$ integrins (reviewed in 20). These mAb most likely induce a conformational change on the receptor which increases the affinity/avidity for its ligands. Indeed, we and others have been able to measure this increase in the affinity of $\alpha 5\beta 1$ for an 80-kD Fn fragment containing the RGD sequence (2) or for intact Fn (11). The high avidity state can also be induced on solubilized integrins and thus acquisition of the activated form is an intrinsic property of the receptor (2, 6, 38). The existence of low and high affinity interactions with the extracellular matrix may play a crucial role for the migration and localization of lymphocytes.

Using one of these activating anti- $\beta 1$ mAb (TS2/16), we have recently shown that the $\alpha 4\beta 1$ integrin also exist on several states of activation among different hemopoietic cells

Address all correspondence to Dr. Angeles Garcia-Pardo, Centro de Investigaciones Biológicas, Velázquez 144, 28006 Madrid, Spain.

1. *Abbreviations used in this paper:* ECM, extracellular matrix; Fn, fibronectin; PMA, phorbol myristate acetate; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

(44). The more active form, present on cultured lymphoid cells, was able to bind two fragments of 38 kD (contains CS-1 and Hep II) (13) and 58 kD (contains Hep II) (15–17) derived from the A and B chains of Fn, respectively. The less active form, present on monocytic cells and peripheral blood T lymphocytes, bound only the 38-kD fragment and thus recognized CS-1 but not Hep II. mAb TS2/16 converted this $\alpha 4\beta 1$ form to a more active one able to recognize both sites. These previous observations therefore indicate that there are cell populations which constitutively express a low or intermediate avidity $\alpha 4\beta 1$ form unable to recognize some of its ligands. In view of these results it was conceivable that activation of the receptor would lead to the recognition of new low affinity ligands not previously identified.

In the present report we have studied whether $\alpha 4\beta 1$ activation via the $\beta 1$ subunit affects the ligand specificity of this receptor. We show that $\alpha 5\beta 1$ -negative B lymphoid cells that do not bind constitutively to the 80-kD Fn fragment, efficiently attach to this fragment upon incubation with mAb TS2/16. We have identified the $\alpha 4\beta 1$ integrin as the receptor that mediates adhesion to the 80-kD fragment and we show that the RGD sequence in Fn is a novel ligand for activated $\alpha 4\beta 1$.

Materials and Methods

ECM Proteins, Fragments, and Synthetic Peptides

Human plasma Fn was the generous gift of Drs. B. Horowitz and R. Shulman (New York Blood Center, New York). Fragments of 80, 58, 38, 31, and 29 kD (see Fig. 1) were obtained from tryptic digestions of Fn and purified exactly as previously described (13–15). Purity of the 80-kD fragment was assessed by SDS-PAGE, Western blots, ELISA, and NH_2 -terminal amino acid sequencing. Amino acid sequence analyses were performed by Mr. Javier Varela at the Protein Chemistry Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, Spain), using a 477A liquid-phase sequencer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). The 80-kD fragment was cleaved with pepsin (1:100 wt/wt, 37°C, 1 h) as described (40). Peptic digests were resolved by fast protein liquid chromatography (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) using a Mono Q ion exchange column (Pharmacia LKB Biotechnology) equilibrated in 10 mM Tris pH 7.0, buffer (A). Bound fragments were eluted by applying a 45-min gradient from 100% A to 40% A–60% B (10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.0). Characterization of peptic fragments was achieved by SDS-PAGE, Western blots, ELISA, and NH_2 -terminal amino acid sequencing. Purified fragments were dialyzed versus PBS and stored at -70°C . The following synthetic peptides were purchased from Bio-Synthesis D&I (Madrid, Spain): GRGDSPC and GRGES, containing sequences from the central cell-binding domain; DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPSTC (CS-1), PSTVQKTPFVTHPGYDTGNGIQLPG (CS-2), and, CIQLPGTSGQQPSVGGQMIFEEHGFR (CS-3), containing sequences from the IIICS region, and IDAPS containing an active sequence present in the Hep II domain (35). Laminin and collagen type I were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO).

Monoclonal Antibodies

Fn-specific mAbs P1F11 (anti-CS-1) and P3D4 (anti-Hep II domain) were produced as reported (17). mAbs N-295 and N-296 were originally purchased from Mallinckrodt Specialty Chemicals (Maryland Heights, MO) and are now available through Chemicon International, Inc. (MAB1934 and MAB1935, respectively; Temecula, CA). mAb N-295 reacts with the 11-kD fragment that contains the RGD sequence of fibronectin (40) and partially inhibits cell adhesion (32). mAb N-296 reacts with a carboxy-terminal fragment that contains the Fib II domain and does not affect cell adhesion (32). mAbs to the $\alpha 4$ integrin subunit HPI/1 (epitope A), HP2/1 (epitope B1), and mAbs Alex 1/4 and TS2/16 specific for the $\beta 1$ subunit were obtained from Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). mAbs PID6 (anti- $\alpha 5$) and PIB5 (anti- $\alpha 3$) were obtained from Dr. E. A.

Wayner (University of Minnesota, Minneapolis, MN). mAb LM609 (anti- $\alpha 5\beta 3$) was obtained from Dr. D. Cheresch (Scripps Clinic, San Diego, CA). mAb IIF5 (anti- $\alpha 3$) was obtained from Dr. M. Hemler (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA). mAb D3/9 (anti-CD45) was obtained from Dr. C. Bernabeu (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain).

Cells and Cell Culture

The human cell lines Daudi, RPMI 8866, JY (B lymphoblastoid), and K562 (erythroleukemia) were obtained from Drs. F. Sánchez-Madrid and C. Bernabeu. The melanoma cell line A375 was obtained from Dr. J. Teixidó (Centro de Investigaciones Biológicas). The B cell line Ramos and the monocytic cell line U937 were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were expanded in RPMI 1640, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco, Middlesex, UK), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin (Antibióticos, Madrid, Spain), and 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin (Llorente, Madrid, Spain). In general, three/four-day cultures were used for assays.

Cell Attachment Assays

These assays were performed exactly as described (44) using flat bottom, high binding, 96-well plates (Costar Corp., Cambridge, MA). Quantitation of cell attachment was done by determining the absorbance at 620 nm on a Multiskan Bichromatic plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland) and using calibration curves as described (44). Integrin activation through the $\beta 1$ subunit was performed by incubating the cells with a 1:10 dilution of supernatant containing anti- $\beta 1$ mAbs for 15–20 min at 37°C prior to the attachment assay. For inhibition experiments cells were incubated with anti-integrin antibodies (15 min, 37°C) or synthetic peptides or fragments (30 min, room temperature) prior to adding to substrate-coated wells. Inhibition of cellular attachment by antibodies to Fn was determined after incubation of 80- or 38-kD-coated wells with 50 μl of appropriate antibody dilutions for 30 min at room temperature; 50 μl of cell suspension was then added and the assay continued as described above.

Immunofluorescence Analyses

Cells (5×10^5) were incubated for 30 min at 4°C with 100 μl of culture supernatants (1:2 dilution) or ascites (1:500 dilution) containing the appropriate mAb. Cells were washed twice with cold PBS-1% BSA and resuspended in 100 μl of a 1/100 dilution of fluorescein-conjugated F(ab')₂ fragments of rabbit antibodies to mouse IgG (Dakopatts, Glostrup, Denmark). After 30 min at 4°C cells were washed twice, resuspended in PBS, and analyzed by flow cytometry on an EPICS-CS (Coulter Científica, Móstoles, Spain).

ELISA Assays

These assays were performed as described (17) with the following modifications to improve background: Fn fragments used for coating wells were in 0.1 M sodium borate, pH 8.5 (instead of PBS); plates were washed with 0.1% Tween 20 (instead of 0.05%); incubation with antibodies was done at room temperature (instead of 37°C). Absorbance at 492 nm was determined after 10 and 30 min using a microplate reader.

Results

Fibronectin Fragments That Contain the Central (RGD-dependent) or Carboxy-terminal (RGD-independent) Cell-binding Domains

The Fn tryptic fragments of 38 and 80 kD used in the present study have been previously characterized and are schematically shown in Fig. 1. The 38-kD fragment, derived from the carboxy-terminal region of the A chain of Fn, contains the Hep II domain and part of the IIICS region including the CS-1 site (13, 15, 17). The 80-kD fragment, derived from the central region of both chains of Fn, contains a low-affinity heparin and DNA-binding domain, the RGD sequence and the RGD-dependent synergistic sites (56). Both fragments are contiguous in the Fn sequence.

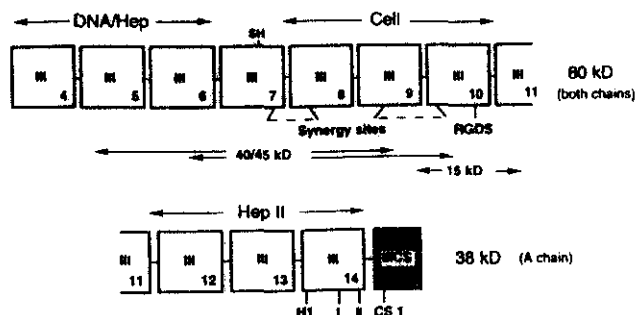


Figure 1. Schematic drawing of the 38- and 80-kD Fn tryptic fragments used in this study. Fibronectin type III homology repeats contained in these fragments are indicated and numbered. The 80-kD fragment contains a DNA/heparin-binding domain and a cell-binding domain composed of the RGD sequence and the synergistic regions. The location of the peptic fragments 40/45 and 15 kD is indicated. The 38-kD fragment is derived from the A chain of Fn and contains the HepII domain and part of the IIICS region. The location of the active sites within these regions is indicated. The CS-5 site (see Introduction) is not contained in the 38-kD fragment. Both fragments are contiguous in the Fn sequence.

Analysis of the 80-kD fragment rendered the NH₂-terminal sequence SDVPTS. Further characterization of this fragment was achieved using two recently developed mAbs with specificity for the Hep II (P3D4) and CS-1 (PIF11) regions, respectively (17) as well as a commercial mAb (N-295) which reacts with a site near the RGD sequence in Fn (32). As shown in Fig. 2, using an ELISA assay, mAb N-295 reacted strongly with the 80-kD fragment while mAbs P3D4 and PIF11 were negative. These two mAbs also failed to recognize the 80-kD fragment on Western blots (17). mAbs P3D4 and PIF11 did react with the 38-kD fragment used as control while mAb N-295 did not (Fig. 2). Altogether these results clearly show that the 80-kD fragment contains the RGD sequence and that there are no contaminants containing the $\alpha 4 \beta 1$ ligands Hep II and CS-1 in the 80-kD fragment preparation.

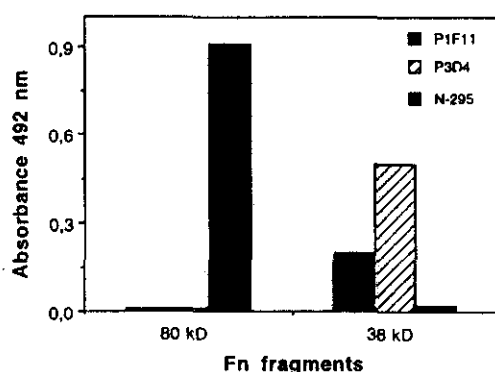


Figure 2. ELISA analysis of the reactivity of mAb PIF11 (anti-CS-1), P3D4 (anti-HepII), and N-295 (anti-RGD) with purified 80- and 38-kD Fn fragments. Wells were coated with 80 (4 μ g) or 38 kD (2 μ g) overnight and incubated with mAb PIF11 (no dilution), P3D4 (1:5 dilution), or N-295 (1:250 dilution). Quantitation of the reaction was done by measuring the absorbance at 492 nm. All determinations were done in duplicates.

Pepsin digestion of the 80-kD fragment rendered two fragments of interest (Fig. 1): a 15-kD fragment that was positive on Western blots and ELISA with mAb N-295 (not shown) and thus contained the RGD sequence. The 15-kD fragment had the NH₂-terminal sequence: IGQQ (end of repeat III-9); a 40/45-kD fragment that rendered two sequences: VLV(R)WTPP (beginning at residue 18 in repeat III-5) and IQVLRDGG (end of repeat III-6). The 40/45-kD fragment did not react with mAb N-295 (not shown) and thus did not contain the RGD sequence.

Adhesion of $\alpha 5 \beta 1$ -negative B Cell Lines to the 80-kD Fn Fragment Following Incubation with Anti- $\beta 1$ mAb TS2/16

The following experiments were undertaken to determine whether mAb TS2/16 affects not only the affinity of the receptor(s) but also its specificity thus resulting in the recognition of novel ligands. To this purpose we performed attachment assays using several Fn fragments not previously shown to support B lymphoid cell adhesion. These include the 80-kD fragment shown in Fig. 1 and two fragments of 29 and 31 kD derived from the amino- and carboxy-terminal regions of Fn, respectively (not shown in Fig. 1). The various cell populations used in these studies and their pattern of integrin expression are listed in Table I. As can be observed none of the four B cell lines studied expressed the $\alpha 5$ integrin subunit on their surface in agreement with previous reports (5, 16, 47). As shown in Fig. 3, resting Ramos or Daudi cells or cells incubated with the control anti- $\beta 1$ mAb Alex1/4 did not attach to the 80-kD fragment. However, preincubation of Ramos or Daudi cells with mAb TS2/16 resulted in a dose-response attachment to the 80-kD fragment (Fig. 3). Incubation of Ramos cells with mAb TS2/16 always resulted in a more efficient adhesion (60%) to the 80-kD fragment than incubation of Daudi cells (40%), a result consistent with the higher $\beta 1$ expression on Ramos cells (Table I). The surface expression of $\beta 1$ integrins did not change upon treatment with mAb TS2/16 (1, 2, and this report, not shown). mAb TS2/16 did not induce binding of Ramos or Daudi cells to

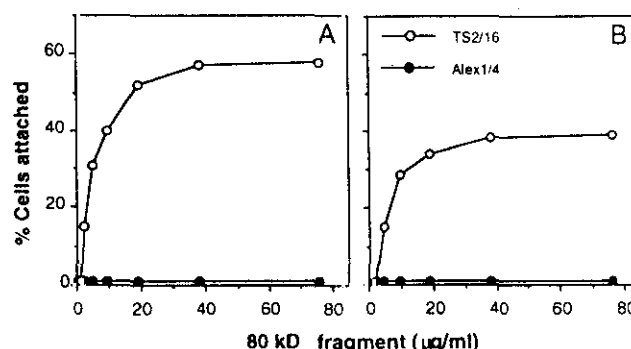


Figure 3. Adhesion of Ramos (A) and Daudi (B) B lymphoid cells to the 80-kD fragment. Cells were preincubated with either mAb Alex1/4 (closed circles) or mAb TS2/16 (open circles) and added to wells coated with the indicated concentrations of 80-kD fragment (5×10^4 cells/well). After 30 min at 37°C, attached cells were stained with 0.1% toluidine blue and quantitated as described in Materials and Methods. Each determination was done in duplicate and values represent the average of three different experiments.

Table 1. Expression of Integrin Subunits on the Cell Lines Studied

Cells	Mean fluorescence intensity						
	Control	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha V\beta 3$	$\beta 1$
Ramos	35	35	45	95	35	36	113
Daudi	40	ND	39	96	40	43	76
JY	49	48	47	103	46	71	51
RPMI 8866	43	43	42	107	41	61	50
K562	47	ND	45	46	78	56	100
A375	43	89	82	80	68	102	123

the 29- or 31-kD fragments at any of the concentrations tested (not shown).

To confirm the specificity of the effect of mAb TS2/16 and the involvement of $\beta 1$ integrins on the recognition of the 80-kD fragment, we studied the adhesion of the B cell lines JY and RPMI 8866 to this fragment. These cells were chosen because they do not express surface $\beta 1$ integrin subunit (Table I and reference 5, 47, 48). Instead JY and RPMI 8866 cells express an alternative β chain called $\beta 7$, which is associated with the $\alpha 4$ subunit (5, 41). As shown in Fig. 4, mAb TS2/16 did not induce adhesion of JY or RPMI 8866 cells to the 80-kD fragment. JY cells constitutively attached to the 80-kD fragment and mAb TS2/16 did not affect this constitutive binding (Fig. 4).

Effect of PMA on Adhesion of B Cells to the 80-kD Fragment: Involvement of Two Different Receptors

To determine whether phorbol myristate acetate (PMA) could reproduce the effect of mAb TS2/16, cells were incubated with 50 ng/ml of PMA for 20 min and tested for adhesion to 80-kD coated wells. As shown in Fig. 4, PMA did not induce attachment of either Ramos or Daudi cells to the 80-kD fragment while on the same experiment mAb TS2/16 was an effective inducer (Fig. 4). PMA did not affect either the constitutive adhesion of these cells to the 38-kD fragment (not shown). In contrast to these results, PMA was

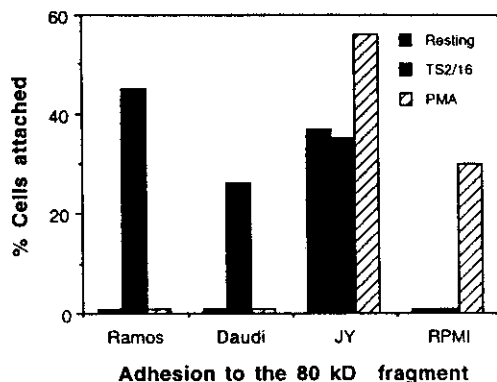


Figure 4. Effect of PMA and mAb TS2/16 on the attachment of several B cell lines to the 80-kD fragment. Cells were incubated with either cell culture medium (*resting*), PMA (50 ng/ml), or mAb TS2/16 (1:10 dilution of supernatant) for 15 min at 37°C and added to 80-kD coated wells (38 μ g/ml, 5×10^4 cells/well). After 30 min at 37°C, attached cells were quantitated as described. Values are the average of three different experiments.

an effective activator of JY and RPMI 8866 cells. As shown in Fig. 4, PMA induced *de novo* adhesion of RPMI 8866 cells to the 80-kD fragment and increased the constitutive binding of JY cells to this fragment. No changes on integrin surface expression were detected after PMA treatment (not shown).

These results suggested the involvement of two different B cell receptors for the 80-kD fragment, one of them being regulated by mAb TS2/16 and the other by PMA. It was recently demonstrated that the $\alpha V\beta 3$ integrin functions as a Fn receptor on some B lymphoid cells (48). To establish whether $\alpha V\beta 3$ was the receptor for the 80-kD fragment on JY and RPMI 8866 cells, we performed attachment assays to this fragment in the presence of anti- $\alpha V\beta 3$ mAb LM609. In results not shown, mAb LM609 completely inhibited (100%) the adhesion of resting JY and PMA-treated RPMI 8866 cells to the 80-kD fragment, and partially inhibited (45%) the attachment of PMA-treated JY cells to this fragment. These results therefore confirm the involvement of $\alpha V\beta 3$ on adhesion of $\beta 1$ -negative B cells to the 80-kD fragment and suggest a role for yet another nonidentified receptor on PMA-stimulated JY cells. mAb LM609 had no effect on the adhesion of Ramos or Daudi cells to the 80-kD fragment (Fig. 5) in agreement with the lack of expression of $\alpha V\beta 3$ on these cells (Table I).

Identification of the $\alpha 4\beta 1$ Integrin as a New Receptor for the 80-kD Fragment

The preceding results clearly indicate that adhesion of Ramos and Daudi cells to the 80-kD fragment is regulated through the $\beta 1$ subunit. To identify the receptor involved in adhesion to this fragment, cell attachment assays were carried out in the presence of several anti-integrin mAbs. As shown in Fig. 5, two anti- $\alpha 4$ mAbs, HP2/1 and HP1/1, inhibited TS2/16-treated Ramos (and TS2/16-treated Daudi, not shown) cell adhesion to the 80-kD fragment. mAbs P1D6

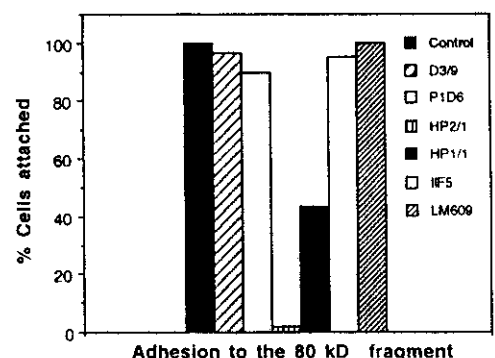


Figure 5. Effect of several anti-integrin or control mAb on attachment of TS2/16-treated Ramos cells to the 80-kD fragment. Cells were incubated with mAb TS2/16 (15 min at 37°C) followed by incubation with the indicated mAb for another 15 min. The dilutions used were 1:10 for mAb used as culture supernatants (D3/9, P1D6, HP2/1, and HP1/1) and 1:500 for those used as ascitic fluid (IIF5 and LM609). Cells (5×10^4 /well) were added to 80-kD coated wells (38 μ g/ml) and after 30 min at 37°C, attached cells were quantitated as described. Values on the ordinate represent the percentage of attached cells relative to the number of cells on control wells (TS2/16, no inhibitor). Values are the means of two different experiments.

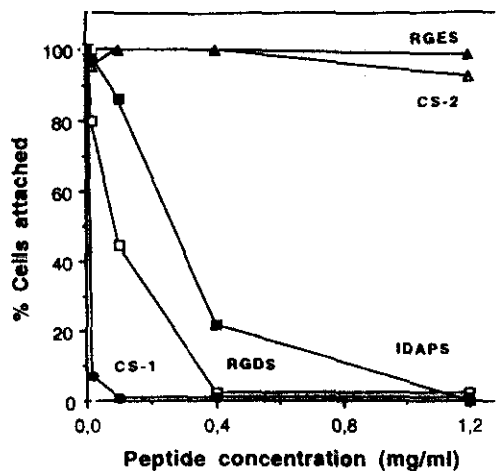


Figure 6. Inhibition of Ramos cell attachment to the 80-kD fragment by synthetic peptides. Cells were incubated with mAb TS2/16 15 min at 37°C followed by 30-min incubation at room temperature with the indicated dilutions of synthetic peptides. Cells (5×10^4 /well) were added to 80-kD coated wells (19 μ g/well) and attached cells were quantitated after 30 min at 37°C. Values on the ordinate are expressed as percentage of attached cells relative to the number of cells on control wells (TS2/16, no inhibitor). Values are the means of three different experiments.

(anti- $\alpha 5$), IIF5 (anti- $\alpha 3$), LM609 (anti- $\alpha V\beta 3$), or the control D3/9 (anti-CD45) had no effect on these assays (Fig. 5).

The effect of the synthetic peptides CS-1 and IDAPS on TS2/16-treated Ramos cell adhesion to the 80-kD fragment was also tested. As shown in Fig. 6, CS-1 or IDAPS peptides produced a dose-dependent inhibition of cell attachment to the 80-kD fragment, while the control peptides CS-2 (Fig. 6) and CS-3 (not shown) had no effect. Interestingly, the synthetic peptide GRGDSPC was also completely inhibitory in these assays while the control GRGES peptide had no effect (Fig. 6). The calculated concentration (nM) of peptide required to produce 50% inhibition of cell attachment to the 80-kD fragment was 5.45 (CS-1, 15 μ g/ml), 104 (GRGDSPC, 80 μ g/ml), and 400 (IDAPS, 220 μ g/ml). Thus, CS-1 was the most effective inhibitor and the RGD-containing peptide was a better inhibitor than the reported $\alpha 4\beta 1$ ligand IDAPS.

The RGD Sequence is a Ligand for TS2/16-activated $\alpha 4\beta 1$ Integrin

The above results therefore suggested that the conformational change induced in $\alpha 4\beta 1$ by mAb TS2/16 results in the ability to recognize the RGD sequence. To prove this, we tested the capacity of the GRGDSPC synthetic peptide to inhibit the adhesion of resting and TS2/16-activated Ramos cells to the 38-kD fragment. As shown in Fig. 7, resting Ramos cell adhesion to the 38-kD fragment was not affected (90% specific adhesion) by the GRGDSPC peptide (0.5 mg/ml) in agreement with our previous report (16). However upon incubation with mAb TS2/16, the GRGDSPC peptide (0.5 mg/ml) inhibited cell adhesion to the 38-kD fragment by 50% (Fig. 7). As expected, the CS-1 peptide used as control was a good inhibitor in both cases. These results clearly show that soluble RGD-containing peptides can effectively

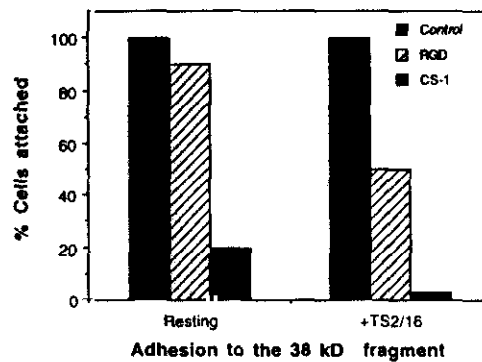


Figure 7. Effect of the GRGDSPC synthetic peptide on Ramos cell attachment to the 38-kD fragment. Cells were either untreated (Resting) or treated with mAb TS2/16 (15 min, 37°C) and incubated 30 min at room temperature with 0.5 mg/ml of GRGDSPC or CS-1 peptides. Cells were added to wells coated with 0.8 μ g/ml (Resting) or 0.6 μ g/ml (TS2/16 activated) of 38-kD fragment. The number of cells on control wells (no inhibitor) were 35,000 (Resting) and 29,000 (TS2/16 treated). The number of attached cells relative to control wells was quantitated as described. Values are the means of two different experiments.

inhibit the function of activated $\alpha 4\beta 1$ and that activated $\alpha 4\beta 1$ (but not resting $\alpha 4\beta 1$) acquires the capacity to recognize the RGD sequence.

As shown in Table II, adhesion of TS2/16-treated Ramos cells to the 80-kD fragment was also inhibited by soluble 80-, 38-, and 15-kD (RGD site) fragments. It was poorly inhibited by the 40/45-kD fragment (no RGD). Direct binding to the 15-kD fragment however could not be demonstrated probably due to the low affinity displayed by this fragment when used as substrate. To further confirm that there was a specific ligand for $\alpha 4\beta 1$ within the 80-kD fragment, we carried out cell attachment assays in the presence of a panel of anti-Fn mAbs. As shown in Fig. 8, mAb N-295 which recognizes an epitope near the RGD sequence, inhibited (80%) Ramos cell adhesion to the 80-kD fragment while mAb N-296 (anti-Fib II) and P3D4 (anti-Hep II) had no effect. These results together with the data shown in Fig. 7, indicate that $\alpha 4\beta 1$ interaction with the 80-kD fragment is primarily mediated by the RGD sequence. Because inhibition by mAb N-295 was not complete (Fig. 8), a small contribution from other sites in the 80-kD fragment cannot be completely ruled out.

mAb TS2/16-induced Recognition of New Ligands May Be Specific for Fn and for the $\alpha 4\beta 1$ Integrin

We next tested whether mAb TS2/16 could induce the recog-

Table II. Effect of Fn Fragments on Adhesion of TS2/16-treated Ramos Cells to the 80-kD Fragment

80 kD Coating concentration μ g/ml	% Inhibition				
	80 kD 4.5*	38 kD 3	15 kD 4.5	45 kD 1.8	31 kD 3
19	80	100	85	10	2
38	70	100	50	0	0

* Nanomoles of fragments used in the incubation mixture.

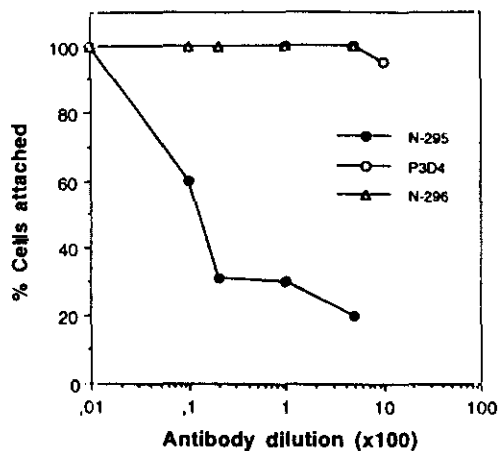


Figure 8. Effect of anti-Fn antibodies on TS2/16-treated Ramos cell adhesion to the 80-kD fragment. The indicated dilutions of N-295 (anti-RGD), P3D4 (anti-Hep II), or N-296 (anti-Fib II site, control) were added to 80-kD fragment coated wells (38 μ g/ml) and incubated for 30 min at room temperature. Cells previously incubated with mAb TS2/16 (15 min at 37°C) were added and attachment was quantitated as described. Values are expressed as percentage relative to the number of cells on control wells (no inhibitor) and are the average of two different experiments.

nition of other extracellular matrix (ECM) proteins not previously known to interact with $\alpha 4\beta 1$. To this purpose, we performed cell attachment assays using collagen and laminin as substrata. These two proteins are known ligands for other $\beta 1$ integrins including $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, and $\alpha 6\beta 1$ (20). As shown in Fig. 9, incubation of Ramos cells with mAb TS2/16 did not result in adhesion to either laminin or collagen. Because $\alpha 4\beta 1$ is the main integrin expressed on Ramos cells (Table I) these results indicate that mAb TS2/16 does not induce $\alpha 4\beta 1$ recognition of laminin or collagen. To confirm that it was enough substrata on the plates to support cell attachment we used the melanoma cell line A375 as control. A375 cells express several $\beta 1$ integrins (Table I) including the laminin receptor $\alpha 6\beta 1$ (1). As shown in Fig. 9, A375 cells constitu-

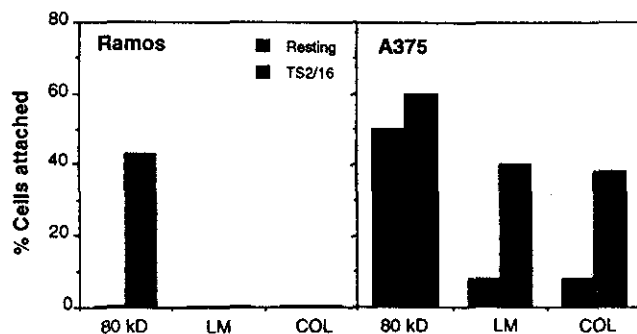


Figure 9. Effect of mAb TS2/16 on cell adhesion to laminin and collagen type I. Ramos or control A375 melanoma cells were incubated with mAb TS2/16 prior to adding to 80 kD (38 μ g/ml), laminin (LM, 150 μ g/ml), or type I collagen (COL, 150 μ g/ml) coated wells. After 30 min at 37°C attached cells were quantitated as described. Values on the ordinate represent the number of attached cells relative to the total cell input (5×10^4 /well) and are the means of two different experiments.

tively bound to the 80-kD fragment and showed low constitutive binding to laminin and collagen. Preincubation with mAb TS2/16 effectively increased A375 cell adhesion to all three substrata (Fig. 9) in agreement with previous reports (1, 2). This effect was not due to cross-linking of cells to ECM proteins via the TS2/16 antibody because in control experiments mAb TS2/16 did not bind to either Fn, laminin, or collagen (results not shown). Increased adhesion of A375 cells to ECM proteins was rather due to the upregulation of $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, and $\alpha 6\beta 1$ integrins which are receptors for the 80-kD Fn fragment, collagen, and laminin, respectively (1, 2, 6). As expected, RPMI 8866 and JY cells, which lack $\beta 1$, did not bind to laminin or collagen in response to incubation with mAb TS2/16 (not shown).

To determine whether the effect of mAb TS2/16 on $\alpha 4\beta 1$ was also observed on other integrins such as $\alpha 5\beta 1$, K562 cells were incubated with this mAb and tested for adhesion to the 38-kD fragment. K562 cells do not express $\alpha 4\beta 1$ (Table I) and consequently they do not bind to the 38-kD fragment constitutively. mAb TS2/16 did not induce adhesion of K562 cells to the 38-kD fragment although this mAb effectively enhanced their constitutive binding to the 80-kD fragment via $\alpha 5\beta 1$ (results not shown). Thus the capacity to recognize new ligands upon activation via $\beta 1$ may be an intrinsic property of the $\alpha 4\beta 1$ integrin.

Discussion

The major conclusions of this report are: (a) $\alpha 5\beta 1$ -negative human B lymphoid cells, which do not bind constitutively to the 80-kD fragment of Fn, acquire the capacity to attach to this fragment upon incubation with anti- $\beta 1$ mAb TS2/16; (b) the B lymphoid cell receptor that interacts with the 80-kD fragment is the $\alpha 4\beta 1$ integrin; (c) the RGD sequence is a ligand for TS2/16-activated $\alpha 4\beta 1$ integrin, this indicates that the conformational change induced on $\alpha 4\beta 1$ by mAb TS2/16 results in the ability to recognize RGD; and (d) $\alpha 4\beta 1$ on B lymphoid cells can be induced to recognize novel ligands in Fn but not in laminin or type I collagen.

Our previous work has definitely established that some B lymphoid cells do not express the $\alpha 5\beta 1$ integrin and are unable to attach to the 80-kD fragment containing the RGD site (16). In the present study we show that incubation of the $\alpha 5\beta 1$ -negative B cell lines Ramos and Daudi with anti- $\beta 1$ mAb TS2/16 results in an efficient and specific attachment to the 80-kD fragment. Our results clearly show that adhesion of B cells to the 80-kD fragment is mediated by the $\alpha 4\beta 1$ integrin. This was demonstrated by the ability of mAbs anti- $\alpha 4$ and the synthetic peptides CS-1 and IDAPS to inhibit cell attachment to the 80-kD fragment. Interestingly, the GRGDSPC synthetic peptide was also a good inhibitor of TS2/16-treated $\alpha 4\beta 1$ function. We have conclusively shown in previous work that the interaction of $\alpha 4\beta 1$ with its ligands, the 38- and 58-kD Fn fragments, is not affected by RGD-containing peptides (12, 15, 16, 52). Consistent with this Ramos (untreated or treated with a control mAb) cell attachment to the 38-kD fragment was not affected by the GRGDSPC peptide (this report, Fig. 7). As shown in the present studies, the RGD sequence not only inhibited TS2/16-treated $\alpha 4\beta 1$ function in soluble form but was also the primary site that mediated attachment to the 80-kD fragment, as suggested by the good inhibition attained by N-295

mAb. However the contribution of other regions of the 80-kD which may act synergistically with RGD cannot be completely disregarded.

In a previous report (34) Mould et al., showed that $\alpha 4 \beta 1$ -mediated spreading of melanoma cells can be inhibited by RGD synthetic peptides and that these peptides may elute the $\alpha 4 \beta 1$ integrin complex from a CS-1 affinity column. In contrast with these findings, we did not observe $\alpha 4 \beta 1$ recognition of RGD-synthetic peptides unless previous incubation of B cells with mAb TS2/16. Although we cannot explain this discrepancy with the available data, it should be considered that a direct comparison between the work by Mould et al., and ours is difficult because of the different cell types and phenomena studied (spreading versus adhesion). Alternatively, it is possible that the melanoma cells used in reference 34 bear a constitutively activated form of $\alpha 4 \beta 1$ sensitive to RGD-containing peptides.

Several studies have shown that certain anti- $\beta 1$ mAbs enhance the function of some $\beta 1$ integrins by inducing a conformational change which results in an activated form of the receptor with higher avidity/affinity for its ligands (1, 27, 49, 53). The activated form of the receptor may display broader ligand specificity than the resting form. For example, $\alpha 2 \beta 1$ is a collagen receptor on platelets and fibroblasts and a collagen and laminin receptor on other cell types (8, 23, 29). A recent report has shown that, on the same cell, mAb TS2/16 can convert the partly active form of $\alpha 2 \beta 1$ which recognizes only collagen to a fully active form that also binds laminin (6).

We and others have recently shown that $\alpha 4 \beta 1$ also exists in several states of activation among different hemopoietic cells. Monocytic cells and PBL bear a partly active form of $\alpha 4 \beta 1$ which recognizes CS-1 but not Hep II; mAb TS2/16 converted $\alpha 4 \beta 1$ to a more active form (constitutively present on cultured lymphoid cells) able to recognize both ligands in Fn (44). In another study that compares the binding to CS-1 and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), the less active form of $\alpha 4 \beta 1$ bound only VCAM-1 while the TS2/16-activated form bound VCAM-1 and CS-1 (30). The phorbol ester PMA can also activate $\alpha 4 \beta 1$ on U937 cells or PBL (44). It is interesting that in the present studies PMA did not induce Ramos or Daudi cell attachment to the 80-kD fragment. PMA did not enhance either the constitutive binding of these cells to the 38-kD fragment thus suggesting that the $\alpha 4 \beta 1$ form present on Ramos and Daudi cells cannot be further activated by phorbol esters. A different regulation of $\alpha 4 \beta 1$ function by anti- $\beta 1$ mAbs and Ca^{2+} has already been observed (30). It has also been reported that PMA has no (or minimal) effect on the binding of $\alpha 2 \beta 1$ to collagen or laminin while mAb TS2/16 was highly stimulatory (6). The fact that mAb TS2/16 can also activate solubilized $\beta 1$ integrins (2, 6) is in accordance with the lack of requirement for an intracellular activation pathway. These observations support the existence of distinct mechanistic ways of regulating integrin function. Because PMA does increase $\alpha 4 \beta 1$ function on some cells, it is possible that the sensitivity to a particular stimulus is determined by the activation state of the integrin or by the cell type or both.

These previous studies have analyzed the effect of anti- $\beta 1$ mAbs or PMA on the interaction of $\alpha 4 \beta 1$ with its already identified ligands (CS-1, Hep II, and VCAM-1). Similarly, although the study by Chan and Hemler (6) clearly shows

changes in specificity according to the activation state of $\alpha 2 \beta 1$, there are cell populations that bind laminin or/and collagen constitutively. The novelty of the present results is that mAb TS2/16 induces binding to a region of Fn (80-kD fragment) not previously identified as an $\alpha 4 \beta 1$ ligand. In fact, the 80-kD fragment is a well described ligand for the $\alpha 5 \beta 1$ integrin and we have extensively documented that the constitutive function of $\alpha 4 \beta 1$ on leukocytes is RGD independent (12, 15, 16, 52). The activated form of $\alpha 4 \beta 1$ described here not only binds CS-1 and Hep II with high avidity, but also recognizes RGD.

Although in general a single integrin binds several ligands, $\alpha 4 \beta 1$ can bind multiple and apparently quite distinct sequences within the same or different molecules. Within Fn the minimal sequences shown to be $\alpha 4 \beta 1$ ligands are LDV (contained in CS-1 [26, 53]), REDV (contained in CS-5 [34]), and IDAPS (contained in H1 [35]). It has been proposed that the common aspartate residue on these sequences is important for $\alpha 4 \beta 1$ recognition (35). While this may be true, it is clear that other sequences may also be specific $\alpha 4 \beta 1$ ligands. There is indirect evidence that the FNC/H I (YIKPGSPPREVVPRPRPGV) and FNC/H II (KNNQKS-EPLIGRKKT) peptides derived from the Hep II Fn domain (31) may also interact with $\alpha 4 \beta 1$ (21). All these sequences (CS1, CS5, H1, FNC/H I, and FNC/H II) are located in close proximity within the type III-14 repeat and the contiguous IIICS region of Fn (see Fig. 1). Besides Fn, $\alpha 4 \beta 1$ is also the receptor for VCAM-1 (9), the bacterial protein invasins (10), and thrombospondin (55). Although the cell-binding site(s) for some of these proteins has not been identified, it seems clear that the interaction of $\alpha 4 \beta 1$ with VCAM-1 does not involve the LDV motif present on this protein (37, 51).

The present results show that the conformational change induced in $\alpha 4 \beta 1$ through the $\beta 1$ subunit allows recognition of the Fn RGD sequence which is located in repeat III-10 and thus distant from the previously described $\alpha 4 \beta 1$ ligands. Interestingly, Koivunen et al. (24, 25), using a phage display library, have recently identified several cyclic synthetic peptides which bind the $\alpha 5 \beta 1$ integrin and do not contain the RGD motif. One of these peptides corresponds to the sequence STSDVGG which is homologous to the TVSDVPR sequence present in repeat III-10 of Fn. As noticed in that report, there is also some degree of homology with EILDVPST, a sequence present in CS-1 which we and others have shown to be a high affinity ligand for $\alpha 4 \beta 1$ (16, 18, 33, 52). Although these authors did not show direct interaction of $\alpha 5 \beta 1$ with either of the two homologous sequences present in Fn, their work suggests that $\alpha 5 \beta 1$ has the potential to recognize other ligands in Fn besides RGD. Our present results are in agreement with a certain degree of overlapping in ligand recognition by the $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. This is also supported by another report that shows that a synthetic cyclic peptide, distinct from RGD, can inhibit the function of $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins (36). While peptide cyclation may provide an optimal ligand conformation for high affinity interactions with either $\alpha 4 \beta 1$ or $\alpha 5 \beta 1$, it is clear from our present study that mAb TS2/16 does not induce $\alpha 5 \beta 1$ binding to the CS-1 sequence of Fn. Therefore the ability to recognize new ligands upon conformational activation may be intrinsic to the $\alpha 4 \beta 1$ structure.

The present report therefore describes a novel role for $\alpha 4 \beta 1$ as a receptor for the RGD site in Fn. Because $\alpha 5 \beta 1$

is the classical receptor for this site we have attempted to study the contribution of $\alpha 4 \beta 1$ to cell adhesion to the 80-kD Fn fragment when both integrins are expressed together. In experiments not shown, we tested whether anti- $\alpha 4$ mAbs could partially inhibit the binding of TS2/16-treated U937 cells to the 80-kD fragment. However, because mAb TS2/16 also effectively upregulates the adhesion mediated by $\alpha 5 \beta 1$ (1, 2, and this study), we could not detect any inhibition with mAbs anti- $\alpha 4$. It is possible that when $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 1$ are present together, $\alpha 5 \beta 1$ function predominates over $\alpha 4 \beta 1$ function in mediating adhesion to Fn. In support of this, the 80-kD fragment or the GRGD synthetic peptide completely inhibit U937 cell adhesion to Fn while the 38-kD fragment or the CS-1 peptide produce partial or no inhibition (12). These results do not rule out a cooperation of both receptors for an efficient attachment to Fn as we have previously proposed for T lymphoid cells (15). The results reported here are obviously important for cells which express $\alpha 4 \beta 1$ as the major surface integrin. These include B cells (16, 47), some B cell progenitors (43), and probably some tumor cells. Furthermore, there are reports showing different interactions with Fn during pre-B cell development (3, 50). On cells that express $\alpha 5 \beta 1$ besides $\alpha 4 \beta 1$, properly activated $\alpha 4 \beta 1$ may serve to cooperate with $\alpha 5 \beta 1$ or to functionally replace it when $\alpha 5 \beta 1$ is already engaged.

It is now well documented that integrins undergo transitions among different states of activation (20) and that these transitions are induced by several agents including some mAbs as shown in the present report. The fact that the various integrin activation forms are also found in vivo, as clearly shown for $\alpha 4 \beta 1$ for example (28), suggests that activating anti- $\beta 1$ mAbs (TS2/16 and others) are mimicking the effect of physiological ligands not yet identified. On the other hand, the multiplicity of sequences recognized by $\alpha 4 \beta 1$ must have physiological relevance. For example, it may serve to drive synergistic interactions with the receptor resulting in high affinity binding. Such synergy has already been shown for $\alpha 5 \beta 1$ interaction with the RGD sequence in Fn (56). Similarly, activation of the platelet integrin $\alpha IIb \beta 3$ with thrombin results in recognition of an additional Fn region (besides RGD) comprising part of homology repeats III-9 and III-10 (4, see Fig. 1). An interesting possibility is that some of the sequences that interact with $\alpha 4 \beta 1$ may regulate $\alpha 4 \beta 1$ binding to other ligands, as already shown for $\alpha IIb \beta 3$ (7). The $\alpha 4 \beta 1$ ligands described so far, including the RGD site identified in this report, apparently bind to identical or overlapping sites on $\alpha 4 \beta 1$ because they are cross-inhibitory. However, it seems possible that other not yet identified ligands bind $\alpha 4 \beta 1$ with low affinity or at a different site, and upregulate rather than inhibit the function of $\alpha 4 \beta 1$. In support of this is the fact that two Fn sequences shown to interact with $\alpha 4 \beta 1$, FNC/H I, and FNC/H II, do not (or slightly) interfere with $\alpha 4 \beta 1$ adhesive function (21, 31). The phage display library approach used for identification of ligands for $\alpha 5 \beta 1$ (24, 25) may be a useful one to identify new potential ligands for $\alpha 4 \beta 1$. This would also open the possibility of using these modulatory sequences for therapeutic purposes. Moreover, because the avidity of $\alpha 4 \beta 1$ for CS-1, Hep II, and RGD is different, binding to each of these sites may have different cellular consequences. Another implication of the present study is that physiologically stimulated $\alpha 4 \beta 1$ may play an important role for the recruitment of lymphocytes at

inflammatory sites and tissues where Fn fragments containing CS-1, Hep II, or/and RGD are produced. While these possibilities require further study, our results highlight the role of $\alpha 4 \beta 1$ as a flexible receptor able to recognize multiple ligands and support the importance of the extracellular matrix, particularly Fn, on lymphocyte development and function.

We thank Drs. C. Bernabeu, D. Cheresh, M. Hemler, F. Sánchez-Madrid, J. Teixidó, and E. A. Wayner, for providing cells and mAbs; Ana Gutiérrez for excellent technical assistance; and Pedro Lastres for performing the flow cytometry analyses.

This work was supported by Grants SAL91-0785 from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and 133/92 from Comunidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, and BMH1-CT92-0376 from the European Economic Community, Biomed 1 Program. P. Sánchez-Aparicio is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid; C. Domínguez-Jiménez is the recipient of a fellowship from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

Received for publication 28 January 1994 and in revised form 25 March 1994.

References

- Arroyo, A. G., P. Sánchez-Mateos, M. R. Campanero, J. Martín-Padura, E. Dejana, and F. Sánchez-Madrid. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interaction through the $\beta 1$ subunit. *J. Cell Biol.* 117: 659-670.
- Arroyo, A. G., A. García-Pardo, and F. Sánchez-Madrid. 1993. A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti- $\beta 1$ chain monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 268:9863-9868.
- Bernardi, P., V. P. Patel, and H. Lodish. 1987. Lymphoid precursor cells adhere to two different sites on fibronectin. *J. Cell Biol.* 105:489-498.
- Bowditch, R. D., C. E. Halloran, S.-I. Aota, M. Obara, E. F. Plow, K. M. Yamada, and M. H. Ginsberg. 1991. Integrin $\alpha IIb \beta 3$ (platelet GPIIb-IIIa) recognizes multiple sites in fibronectin. *J. Biol. Chem.* 266:23323-23328.
- Chan, B. M. C., M. J. Elices, E. Murphy, and M. E. Hemler. 1992. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 7$ on the human B cell line JY. *J. Biol. Chem.* 267: 8366-8370.
- Chan, B. M. C., and M. E. Hemler. 1993. Multiple functional forms of the integrin VLA-2 can be derived from a single α^2 cDNA clone: interconversion of forms induced by an anti- $\beta 1$ antibody. *J. Cell Biol.* 120: 537-543.
- Du, X., E. F. Plow, A. L. Frelinger, III, T. E. O'Toole, J. C. Lofthus, and M. H. Ginsberg. 1991. Ligands "activate" integrin $\alpha IIb \beta 3$ (platelet GPIIb-IIIa). *Cell.* 65:409-416.
- Elices, M. J., and M. E. Hemler. 1989. The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:9906-9910.
- Elices, M. J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhnowsky, M. E. Hemler, and R. R. Lobb. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell.* 60:577-584.
- Ennis, E., R. R. Isberg, and Y. Shimizu. 1993. Very late antigen-4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial $\beta 1$ integrin ligand invasin. *J. Exp. Med.* 177:207-212.
- Faull, R. J., N. L. Kovach, J. M. Harlan, and M. H. Ginsberg. 1993. Affinity modulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J. Cell Biol.* 121:155-162.
- Ferreira, O. C. Jr., A. García-Pardo, and C. Bianco. 1990. Specific binding of the human monocytic cell line U937 to the alternatively spliced connecting segment (IIICS) of fibronectin. *J. Exp. Med.* 171:351-356.
- García-Pardo, A., A. Rostagno, and B. Frangione. 1987. Primary structure of human plasma fibronectin. Characterization of a 38 kDa domain containing the C-terminal heparin-binding site (Hep III site) and a region of molecular heterogeneity. *Biochem. J.* 241:923-928.
- García-Pardo, A., O. C. Ferreira, J. E. Valinsky, and C. Bianco. 1989. Fibronectin receptors of mononuclear phagocytes: binding characteristics and biochemical isolation. *Exp. Cell Res.* 181:420-431.
- García-Pardo, A., and O. C. Ferreira, Jr. 1990. Adhesion of human T lymphoid cells to fibronectin is mediated by two different fibronectin domains. *Immunology.* 69:121-126.
- García-Pardo, A., E. A. Wayner, W. G. Carter, and O. C. Ferreira. 1990. Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin: the interaction of the $\alpha 4 \beta 1$ integrin with the LRGPEILDV-

- PST sequence of the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. *J. Immunol.* 144:3361-3366.
17. García-Pardo, A., P. Sánchez-Aparicio, and E. A. Wayner. 1992. Two novel monoclonal antibodies to fibronectin that recognize the Hep II and CS-1 regions respectively: their differential effect on lymphocyte adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:135-142.
 18. Guan, J.-L., and R. O. Hynes. 1990. Lymphoid cells recognize an alternative spliced segment of fibronectin via the integrin receptor $\alpha 4 \beta 1$. *Cell* 60:53-61.
 19. Humphries, M. J., A. Komoriya, S. K. Akiyama, K. Olden, K. M. Yamada. 1987. Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type specific adhesion. *J. Biol. Chem.* 262:6886-6892.
 20. Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
 21. Iida, J., A. P. N. Skubitz, L. T. Furcht, E. A. Wayner, and J. B. McCarthy. 1992. Coordinate role for cell surface chondroitin sulfate proteoglycan and $\alpha 4 \beta 1$ integrin in mediating melanoma cell adhesion to fibronectin. *J. Cell Biol.* 118:431-444.
 22. Kassner, P. D., and M. E. Hemler. 1993. Interchangeable α chain cytoplasmic domains play a positive role in control of cell adhesion mediated by VLA-4, a $\beta 1$ integrin. *J. Exp. Med.* 178:649-660.
 23. Kirchhofer, D., L. R. Languino, E. Ruoslahti, and M. D. Pierschbacher. 1990. $\alpha 2 \beta 1$ integrins from different cell types show different binding specificities. *J. Biol. Chem.* 265:615-618.
 24. Koivunen, E., D. A. Gay, and E. Ruoslahti. 1993. Selection of peptides binding to the $\alpha 5 \beta 1$ integrin from phage display library. *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210.
 25. Koivunen, E., B. Wang, and E. Ruoslahti. 1994. Isolation of a highly specific ligand for the $\alpha \beta 1$ integrin from a phage display library. *J. Cell Biol.* 124:373-380.
 26. Komoriya, A., L. J. Green, M. Mervic, S. S. Yamada, K. M. Yamada, and M. J. Humphries. 1991. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J. Biol. Chem.* 266:15075-15079.
 27. Kovach, N. L., T. M. Carlos, E. Yee, and J. M. Harlan. 1992. A monoclonal antibody to $\beta 1$ integrin (CD29) stimulates VLA-4-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *J. Cell Biol.* 116:499-509.
 28. Laffón, A., R. García-Vicuña, A. Humberá, A. A. Postigo, A. L. Corbí, M. O. de Landázuri, and F. Sánchez-Madrid. 1991. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptor on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 88:546-552.
 29. Languino, L. R., K. R. Gehlsen, E. A. Wayner, W. G. Carter, E. Engvall, and E. Ruoslahti. 1989. Endothelial cells use $\alpha 2 \beta 1$ integrin as a laminin receptor. *J. Cell Biol.* 109:2455-2462.
 30. Masumoto, A., and M. E. Hemler. 1993. Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* 268:228-234.
 31. McCarthy, J. B., M. K. Chelberg, D. J. Mikelson, and L. T. Furcht. 1988. Localization and chemical synthesis of fibronectin peptides with melanoma adhesion and heparin binding activities. *Biochemistry*. 27:1380-1388.
 32. McDonald, J. A., B. J. Quade, T. J. Broekelmann, R. LaChance, K. Forsman, E. Hasegawa, and S. Akiyama. 1987. Fibronectin's cell-adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast pericellular matrix. *J. Biol. Chem.* 262:2957-2967.
 33. Mould, A. P., L. A. Wheldon, A. Komoriya, E. A. Wayner, K. M. Yamada, and M. J. Humphries. 1990. Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin $\alpha 4 \beta 1$. *J. Biol. Chem.* 265:4020-4024.
 34. Mould, A. P., A. Komoriya, K. M. Yamada, and M. J. Humphries. 1991. The CSS peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognized by the integrin $\alpha 4 \beta 1$. Inhibition of $\alpha 4 \beta 1$ function by RGD peptide homologues. *J. Biol. Chem.* 266:3579-3585.
 35. Mould, A. P., and M. J. Humphries. 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin $\alpha 4 \beta 1$ in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 10:4089-4095.
 36. Nowlin, D. M., F. Gorcsan, M. Moscinski, S.-L. Chiang, T. J. Lobl, and P. M. Cardarelli. 1993. A novel cyclic pentapeptide inhibits $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 268:20352-20359.
 37. Osborn, L., C. Vassallo, and C. D. Benjamin. 1992. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Exp. Med.* 176:99-107.
 38. O'Toole, T. E., J. C. Loftus, X. P. Du, A. A. Glass, Z. M. Ruggeri, S. J. Shattil, E. F. Plow, and M. H. Ginsberg. 1991b. Affinity modulation of the $\alpha \text{IIb} \beta 3$ (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul.* 1:883-893.
 39. O'Toole, T. E., D. Mandelman, J. Forsyth, S. J. Shattil, E. F. Plow, and M. H. Ginsberg. 1991. Modulation of the affinity of integrin $\alpha \text{IIb} \beta 3$ (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of αIIb . *Science (Wash. DC)* 254:845-847.
 40. Pierschbacher, M. D., E. G. Hayman, and E. Ruoslahti. 1981. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell* 26:259-267.
 41. Postigo, A. A., P. Sánchez-Mateos, A. I. Lazarovits, F. Sánchez-Madrid, and M. O. de Landázuri. 1993. $\alpha 4 \beta 1$ integrin mediates B cell binding to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1. Expression and function of $\alpha 4$ integrins on human B lymphocytes. *J. Immunol.* 151:2471-2483.
 42. Pytela, R., M. D. Pierschbacher, and E. Ruoslahti. 1985. Identification and isolation of a 140 kD cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40:191-198.
 43. Roldán, E., A. García-Pardo, and J. A. Brieva. 1992. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.* 175:1739-1747.
 44. Sánchez-Aparicio, P., O. C. Ferreira, and A. García-Pardo. 1993. $\alpha 4 \beta 1$ recognition of the Hep II domain of fibronectin is constitutive on some hematopoietic cells but requires activation on others. *J. Immunol.* 150:3506-3514.
 45. Shimizu, Y., G. A. van Seventer, K. J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA ($\beta 1$) integrin receptors on T cells. *Nature (Lond.)* 345:250-253.
 46. Shimizu, Y., and S. Shaw. 1991. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.* 5:2292-2299.
 47. Stupack, D. G., S. Stewart, W. G. Carter, E. A. Wayner, and J. A. Wilkins. 1991. B lymphocyte fibronectin receptors: expression and utilization. *Scand. J. Immunol.* 34:761-769.
 48. Stupack, D. G., C. Shen, and J. A. Wilkins. 1992. Induction of $\alpha \text{v} \beta 3$ integrin-mediated attachment to extracellular matrix in $\beta 1$ integrin (CD-29) negative B cell lines. *Exp. Cell Res.* 203:443-448.
 49. Van de Wiel-van Kemenade, E., Y. van Kooyk, A. J. de Boer, R. J. F. Huijbens, P. Weder, W. Van de Kastele, C. J. M. Melief, and C. G. Figdor. 1992. Adhesion of T and B lymphocytes to extracellular matrix and endothelial cells can be regulated through the β subunit of VLA-4. *J. Cell Biol.* 117:461-470.
 50. Verfaillie, C. M., J. B. McCarthy, and P. B. McGlave. 1991. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. *J. Exp. Med.* 174:693-703.
 51. Vonderheide, R. H., and T. A. Springer. 1992. Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional $\alpha 4$ integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J. Exp. Med.* 175:1433-1442.
 52. Wayner, E. A., A. García-Pardo, M. E. Humphries, J. A. McDonald, and W. G. Carter. 1989. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* 109:1321-1330.
 53. Wayner, E. A., and N. L. Kovach. 1992. Activation-dependent recognition by hematopoietic cells of the LDV sequence in the V region of fibronectin. *J. Cell Biol.* 116:489-497.
 54. Wilkins, J. A., D. Stupack, S. Stewart, and S. Caixia. 1991. $\beta 1$ integrin-mediated lymphocyte adherence to extracellular matrix is enhanced by phorbol ester treatment. *Eur. J. Immunol.* 21:517-522.
 55. Yabkowitz, R., V. M. Dixit, N. Guo, D. D. Roberts, and Y. Shimizu. 1993. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) and $\alpha 5 \beta 1$ (VLA-5) integrins. *J. Immunol.* 151:149-158.
 56. Yamada, K. M. 1991. Adhesive recognition sequences. *J. Biol. Chem.* 266:12809-12812.