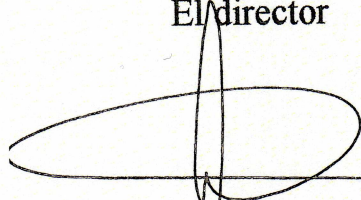


Caracterització del degradoma d'ADAM17: Paper de l'endocitosis en el control de l'activitat de proTGF- α i identificació de nous substrats de la metal·loproteasa

Memòria presentada per **Joan Josep Bech Serra** per optar al grau de
Doctor en Biologia.

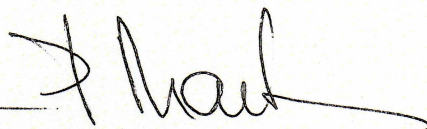
Aquest treball ha estat realitzat en el laboratori de Recerca Oncològica de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón i dins del programa de Recerca en Oncologia Mèdica, sota la direcció del Dr. Joaquín Arribas.

El director



Dr. Joaquín Arribas

La tutora



Dra. Paz Martínez

L'interessat



Joan Josep Bech Serra

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

Setembre, 2006

Pels meus pares,

Pel meu germà,

Per la Carme,

A Rafa,

A Fernando,

La frase més excitant que es pot sentir en ciència, la que anuncia nous descobriments, no és “Eureka” sinó “És estrany...”.

Isaac Asimov (1920-1992)
Bioquímic i escriptor nord-americà.

Ouch!

Isaac Newton (1642-1727)
Físic, matemàtic i filòsof anglès.

“El ser humano individual actúa de modo imprevisible, pero, según descubrió Seldon, las reacciones de las masas humanas podían ser tratadas estadísticamente. Cuanto mayor es la masa, mayor es la exactitud de la predicción. Y el volumen de las masas con que trabajó Seldon fue nada menos que el de la población completa de la Galaxia, que en su tiempo se calculaba en trillones de personas”.

Isaac Asimov (1920-1992)

Fragment extret del pròleg a l'edició en castellà del llibre “Second Foundation”.

Vull agrair al Joaquín Arribas, director d'aquest treball, el fet d'haver pogut formar part del seu grup de recerca i d'haver-me permès desenvolupar aquest treball a dins de la seva línia d'investigació. Gràcies per la confiança!

També vull agrair molt sincerament a tots els meus companys de laboratori la seva ajuda i consell per dur tot això endavant. Vull destacar també a totes les persones que incondicionalment han confiat en mi i molt especialment als meus pares i a tu, Carme, que en el dia a dia m'has ajudat, suportat i animat quan més ho necessitava i sense esperar res a canvi. Una vegada més, moltes gràcies ja que sense vosaltres ara no estaria aquí.

Índex

I. ABREVIATURES.....	1
II. INTRODUCCIÓ.....	7
1.- <i>LA FAMÍLIA ADAM.....</i>	9
2.- <i>PAPER FISIOLÒGIC DE LES ADAMs.....</i>	10
2.1.- <i>Les ADAMs en organismes inferiors.....</i>	10
2.2.- <i>Activitat catalítica del domini metal-loproteasa.....</i>	13
2.2.1.- <i>Regulació del shedding i selecció de substrats.....</i>	13
2.2.2.- <i>Processos biològics regulats per les ADAM:</i>	
I) <i>Shedding de les efrines.....</i>	17
II) <i>La via de senyalització de Notch.....</i>	18
III) <i>La via de senyalització d'EGFR.....</i>	19
2.2.3.- <i>Paper de les ADAMs en la connexió entre diferents vies de senyalització.....</i>	22
2.3.- <i>Interacció ADAMs-integrines: paper del domini desintegrina.....</i>	23
2.3.1.- <i>Requeriments estructurals i especificitat de la interacció ADAMs-integrines.....</i>	25
2.3.2.- <i>Aspectes funcionals de la interacció ADAMs-integrines.....</i>	25
3.- <i>EXPRESSIÓ DE LES ADAMs EN TUMORS.....</i>	28
3.1.- <i>Paper individual de les ADAMs.....</i>	30
4.- <i>PAPER D'ADAM17 EN LA FORMACIÓ DE TUMORS.....</i>	31
4.1.- <i>El degradoma d'ADAM17.....</i>	31
4.1.1.- <i>El factor de creixement transformant alfa (proTGF-α).....</i>	33
4.1.1.1.- <i>L'endocitosi: un mecanisme regulador de l'activitat de proteïnes de la superfície cel·lular.....</i>	35
4.1.2.- <i>Identificació de nous substrats d'ADAM17.....</i>	38
4.1.2.1.- <i>Paper de la proteòmica en la identificació de nous substrats d'ADAM17.....</i>	39

5.-CONCLUSIÓ.....	40
III. OBJECTIUS.....	41
IV. RESULTATS (I).....	45
1.-CARACTERITZACIÓ DELS MECANISMES QUE INTERVENEN EN L'ENDOCITOSI DE <i>proTGF-α</i>	47
1.1.- <i>proTGF-α</i> és eficientment endocitat des de la superfície cel·lular.....	48
1.2.-L'endocitosi de <i>proTGF-α</i> és dependent de vesícules de clatrina.....	50
1.3.-El <i>proTGF-α</i> internalitzat s'escapa de la via de degradació lisosomal i és reciclat a la superfície cel·lular.....	51
1.4.-La deleció del domini citoplasmàtic de <i>proTGF-α</i> bloqueja l'endocitosi del factor de creixement i n'incrementa la seva expressió a la membrana plasmàtica.....	54
1.5.-Activació de l'EGFR per part de <i>proTGF-α</i> Δ CT-PDZ.....	58
V. DISCUSSIÓ (I).....	59
1.- CARACTERITZACIÓ DELS MECANISMES QUE INTERVENEN EN L'ENDOCITOSI DE <i>proTGF-α</i>	61
VI. CONCLUSIONS (I).....	65
VII. RESULTATS (II).....	69
1.-IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL <i>shedding</i> DE NOUS SUBSTRATS D'ADAM17 MITJANÇANT L'APLICACIÓ DE LA TÈCNICA PROTEÒMICA DEL DIGE (<i>Difference Gel Electrophoresis</i>).....	71
1.1.-Validació de TfnR, ALCAM i Dsg-2 com a substrats de <i>shedding</i>	74
1.2.-Anàlisi del <i>shedding</i> d'ALCAM i Dsg-2 en cèl·lules funcionalment deficients per ADAM17.....	80
1.3.-Anàlisi del <i>shedding</i> de Dsg-2 en cèl·lules deficients per ADAM10.....	82
1.4.-Identificació d'una nova forma de Dsg-2 (P100 Dsg-2) en cèl·lules deficients per ADAM10.....	84
1.5.-Factors que intervenen en la regulació del <i>shedding</i> d'ALCAM i Dsg-2:	
I) La confluència cel·lular incrementa el <i>shedding</i> d'ALCAM.....	88

II) <i>El factor de creixement EGF concomitantment incrementa els nivells de la forma activa d'ADAM17 i el shedding de Dsg-2</i>	89
VIII. DISCUSSIÓ (II)	91
1.- <i>IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL shedding DE NOUS SUBSTRATS D'ADAM17 MITJANÇANT L'APLICACIÓ DE LA TÈCNICA PROTEÒMICA DEL DIGE (Difference Gel Electrophoresis)</i>	93
1.1.- <i>Caracterització d'una nova forma de Dsg-2: P100 Dsg-2</i>	95
1.2.- <i>Mecanismes de regulació i paper del shedding d'ALCAM i Dsg-2</i>	99
IX. CONCLUSIONS (II)	103
X. MATERIALS I MÈTODES	107
1.- <i>CARACTERITZACIÓ DELS MECANISMES QUE INTERVENEN EN L'ENDOCITOSI DE proTGF-α</i>	109
1.1.- <i>Materials</i>	109
1.1.1.- <i>Construccions utilitzades</i>	109
1.1.2.- <i>Anticossos</i>	109
1.1.3.- <i>Reactius</i>	110
1.1.4.- <i>Línies cel·lulars i transfeccions</i>	110
1.2.- <i>Mètodes</i>	111
1.2.1.- <i>Marcatge metabòlic i immunoprecipitació</i>	111
1.2.2.- <i>Anàlisi mitjançant citometria de flux</i>	112
1.2.3.- <i>Immunofluorescències</i>	113
1.2.4.- <i>Assajos d'internalització de proTGF-α</i>	113
1.2.5.- <i>Assaig de reciclatge de proTGF-α</i>	113
1.2.6.- <i>Assaig d'activació de l'EGFR</i>	114

2.-IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL shedding DE NOUS SUBSTRATS D'ADAM17 MITJANÇANT L'APLICACIÓ DE LA TÈCNICA PROTEÒMICA DEL DIGE (Difference Gel Electrophoresis).....	115
2.1.-Materials.....	115
2.1.1.-Construccions utilitzades.....	115
2.1.2.-Anticossos.....	115
2.1.3.-Reactius.....	116
2.1.4.-Línies cel·lulars i transfeccions.....	116
2.2.-Mètodes.....	117
2.2.1.-Anàlisi del shedding de Dsg-2, ALCAM i TfnR en cèl·lules A431 i A431/ADAM17.....	117
2.2.2.-Anàlisi del shedding de Dsg-2 en cèl·lules CHO i M2.....	118
2.2.3.-Anàlisi del shedding d'ALCAM en cèl·lules CHO, M2 i M2/ADAM17.....	118
2.2.4.-Anàlisi del paper de la confluència cel·lular en el shedding d'ALCAM.....	119
2.2.5.-Anàlisi del shedding de Dsg-2 i P100 Dsg-2 en MEFs silvestres i deficients per ADAM10.....	120
2.2.6.-Obtenció de la fracció microsomal i extracció de proteïnes sense detergents....	120
2.2.7.-Anàlisi del shedding de Dsg-2 i de P100 Dsg-2 en les fraccions solubles i insolubles en triton X-100 procedents de cèl·lules A431.....	121
2.2.8.-Tractaments amb els inhibidors de proteases.....	121
2.2.9.-Western-blotting.....	122
2.2.10.-Difference Gel Electrophoresis (DIGE).....	122
2.2.11.-Identificació de proteïnes mitjançant espectrometria de masses.....	124
XI. BIBLIOGRAFIA.....	125

Abreviatures

I. ABREVIATURES

2D-PAGE: Electroforesi bidimensional en gel de poliacrilamida.

ADAM: Proteasa amb dominis metal·loproteasa i desintegrina.

ADAMTS: Proteasa amb dominis metal·loproteasa i desintegrina i motius de tipus trombospondina.

ALCAM: Molècula d'adhesió cel·lular associada a leucòcits activats.

AP: Proteïnes adaptadores.

APLP2: Proteïna 2 similar a l'APP.

APP: Proteïna precursora del pèptid beta amiloide.

BB-94: Inhibidor no específic de metal·loproteases (Batimastat).

C225: Anticòs monoclonal que reconeix el domini extracel·lular de l'EGFR (cetuximab).

CAR: Seqüència d'unió entre cadherines.

CCV: Vesícules cobertes de clatrina.

cDNA: Cadena d'àcid desoxiribonucleic complementaria a un mRNA.

CHO: Línia cel·lular obtinguda de cèl·lules procedents d'ovari de hàmsster xinès.

CIE: Endocitosi no regulada per vesícules de clatrina.

CME: Endocitosi regulada per vesícules de clatrina.

DIGE: Electroforesi de gel diferenciant.

Dpp: Proteïna *Decapentaplegic*.

Dsg-2: Desmogleïna 2.

DTC: Cèl·lules de l'extremitat distal.

ECM: Matriu extracel·lular.

EGF: Factor de creixement epidèrmic.

EGFR: Receptor del factor de creixement epidèrmic.

Eph: Receptor tipus tirosina quinasa de les efrines.

ER: Reticle endoplasmàtic.

FBL: Fibulina.

FITC: Isotiocianat de fluoresceïna.

GFP: Proteïna verda fluorescent.

GH: Hormona de creixement.

GHR: Receptor de l'hormona de creixement.

GPCR: Receptor acoblat a proteïna G.

- GPIb α** : Glicoproteïna Ib α .
- GTPasa**: Enzim que hidrolitza GTP.
- HER**: Família dels receptors de l'EGF.
- ICAM-1**: Molècula d'adhesió intercel·lular.
- ICPL**: Marcatge de proteïnes mitjançant isòtops.
- ICS**: Seqüència intracel·lular de tipus cadherina.
- IL-15R α** : Receptor de la interleuquina 15.
- IL-1R II**: Receptor de tipus II de la interleuquina-1.
- IL-6R α** : Subunitat alfa del receptor d'interleuquina-6.
- IL-8**: Interleuquina 8.
- kDa**: Kilodalton.
- LDL**: Lipoproteïna de baixa densitat.
- LPS**: Lipopolisacàrid.
- MALDI**: Ionització per làser i assistida per matriu.
- M-CSFR**: Receptor del factor estimulador de macròfags.
- MDC**: Metal·loproteasa / Desintegrina / Domini ric en cisteïnes (nomenclatura alternativa de les ADAMs).
- MDCK**: Línia cel·lular obtinguda de cèl·lules procedents de ronyó de gos Madin-Darby.
- MMP**: Proteasa de matriu extracel·lular.
- mRNA**: Àcid ribonucleic de tipus missatger.
- MT-MMP**: Proteasa de matriu extracel·lular associada a membrana.
- MUC-1**: Mucina 1.
- MVB**: Cossos multivesiculars.
- NCAM**: Molècula d'adhesió cel·lular neuronal.
- NDPasa**: Nucleòsid difosfatasa.
- NO**: Òxid nítric.
- p55 TNF- α RI**: Receptor del TNF- α de 55 kilodaltons.
- p75 TNF- α RII**: Receptor del TNF- α de 75 kilodaltons.
- p75^{NTR}**: Receptor del factor de creixement nerviós.
- PAGE**: Electroforesi en gel de poliacrilamida.
- PCR**: Reacció en cadena de la polimerasa.
- PDZ**: Domini d'interacció a proteïnes.

PIP₂: Fosfatidilinositol bifosfat.

PIPK1 γ : Quinasa del fosfatidilinositol fosfat del tipus I γ .

PKC: Proteïna quinasa C.

PLZF: Proteïna amb dits de zinc associada a la leucèmia promielocítica.

PMA: Forbol 12-miristat-13-acetat

Pref-1: Factor preadipocitari.

proAR: Precursor del lligand de l'EGFR anomenat amfiregulina.

proBTC: Precursor del lligand de l'EGFR anomenat betacelulina.

proEGF: Precursor de l'EGF.

proHB-EGF: Precursor del factor de creixement similar a EGF que uneix heparina.

proNRG α -2C: Precursor de la neuregulina alfa 2C.

proTGF- α : Precursor del factor de creixement transformant alfa.

proTNF- α : Precursor del factor de necrosi tumoral alfa.

RGD: Seqüència d'unió a les integrines formada pels aminoàcids arginina (R), glicina (G) i àcid aspàrtic (D).

RIP: Tall proteolític intramembranal regulat.

R-TGF- β : Receptor del factor de creixement transformant beta.

RTK: Receptor de tipus tirosina quinasa.

SDS: Dodecil sulfat sòdic.

SILAC: Marcatge de proteïnes mitjançant isòtops estables utilitzant aminoàcids en cultiu cel·lular.

TfnR: Receptor de transferrina.

TGF- α : Factor de creixement transformant alfa.

TNF- α : Factor de necrosi tumoral alfa.

TOF: Temps de vol.

TRANCE: Citoquina induïda per l'activació relacionada amb TNF- α .

VCAM: Molècula d'adhesió cel·lular vascular.

WGA: Lectina obtinguda a partir de la llavor del blat.

β 2AR: Receptor beta adrenèrgic.

Introducció

II. INTRODUCCIÓ

1.-LA FAMÍLIA ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease domain*)

L'activitat d'un gran número de proteïnes de la superfície cel·lular està regulada per un mecanisme molt especialitzat consistent en un tall proteolític que allibera el seu domini extracel·lular (Arribas et al., 2002; Blobel, 2002; Moss et al., 2002). Aquest fenomen, anomenat també *shedding*, és bàsicament responsabilitat de la superfamília de metal·loproteases dependents de zinc anomenada metzincina, la qual inclou les metal·loproteases de matriu extracel·lular (*Matrix Metalloproteases*; MMPs) i les ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease domain*) (Bode et al., 1996). Aquestes últimes, anomenades també metal·loproteases desintegrina o MDC (en anglès, *Metalloprotease / Disintegrin / Cysteine-rich*), són proteïnes modulares que contenen un pèptid senyal, un prodomini, un domini metal·loproteasa a on es localitza la seqüència HEXXH que coordina l'àtom de Zn necessari per a la seva activitat, un domini desintegrina, un domini ric en cisteïnes, un domini semblant a EGF (*EGF-like*), la regió transmembrana i, finalment, un domini citoplasmàtic (figura 1). Fins ara s'han identificat 23 ADAMs en el genoma humà de les quals ADAM9, 10, 12, 15, 17 i 19 tenen un patró d'expressió general mentre que la resta estan restringides a determinats teixits (una llista actualitzada de les ADAMs es pot trobar a http://www.people.virginia.edu/%7Ejw7g/Table_of_the_ADAMs.html).

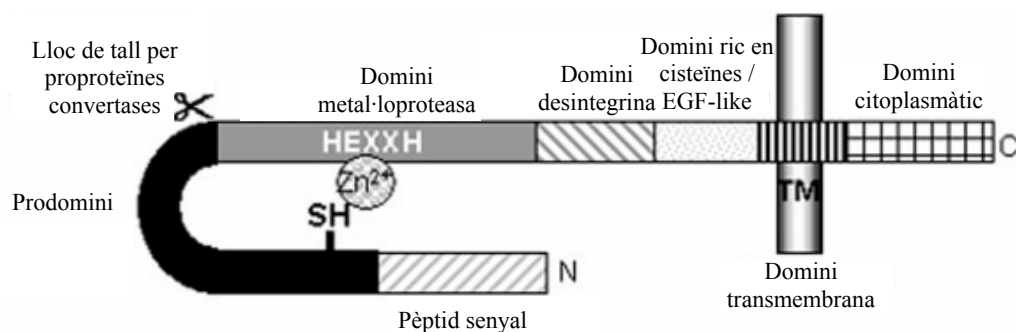


Figura 1. Estructura típica en dominis d'una metal·loproteasa de la família ADAM. Els dominis consten d'un pèptid senyal a la regió amino-terminal, un prodomini amb un residu cisteïna (SH) seguit d'un lloc de tall per serín proteases del tipus furina (RVKR ↓ R), un domini catalític que conté la seqüència HEXXH, un domini desintegrina, un domini ric en cisteïnes, un domini semblant a l'EGF (EGF-like), un domini transmembrana hidrofòbic i un domini citoplasmàtic (adaptat de (Allinson et al., 2003)).

2.-PAPER FISIOLÒGIC DE LES ADAMs

El fet que els membres d'aquesta família posseeixin un domini metal·loproteasa i un domini desintegrina suggereix que poden intervenir tant en processos biològics regulats per proteòlisi com en els relacionats amb l'adhesió cel·lular (Stone et al., 1999). Per altra banda, són proteïnes que es detecten en el transcurs de tota l'escala evolutiva, des de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) i *Drosophila* fins a l'*Homo sapiens*, la qual cosa indica que intervien en la regulació de processos molt conservats evolutivament i, per tant, probablement crucials per la viabilitat dels éssers vius.

2.1.-Les ADAMs en organismes inferiors

Aquesta família de proteases és clau pel desenvolupament d'organismes com *C. elegans* ja que intervé, entre altres, en la regulació de la migració cel·lular, un procés complex que també s'ha relacionat amb metàstasi, una de les principals causes de mort en pacients de càncer. Un clar exemple de la importància que tenen les ADAMs en la migració cel·lular el trobem en el procés de desenvolupament de les gònades de *C. elegans*. Aquest òrgan està format per dos braços o tubs oposats que es fusionen a la zona ventral donant lloc a l'úter el qual comunica a l'exterior a través de la vulva (figura 2A) (Blelloch et al., 1999). Per la formació de les gònades és essencial la presència d'unes cèl·lules somàtiques molt grans anomenades DTC (Distal Tip Cells). Aquestes cèl·lules estan localitzades al final de cada braç de la gònada i són les encarregades de guiar el seu desenvolupament des de les membranes basals dels músculs ventrals fins a les mateixes membranes dels músculs dorsals (figura 2A). Perquè les cèl·lules DTC puguin realitzar la seva funció és essencial la presència de dues ADAMs: GON-1 i MIG-17. GON-1 pertany a una subfamília de les ADAMs anomenada ADAMTS (A Disintegrin And Metalloprotease domain with Thrombospondin motifs) ja que conté dominis trombospondina (Porter et al., 2005) i s'expressa principalment en les cèl·lules DTC i les cèl·lules musculars. Individus adults mutants en el gen *gon-1* presenten unes gònades totalment desorganitzades sense pràcticament cap tipus de morfologia tubular (Blelloch et al., 1999).

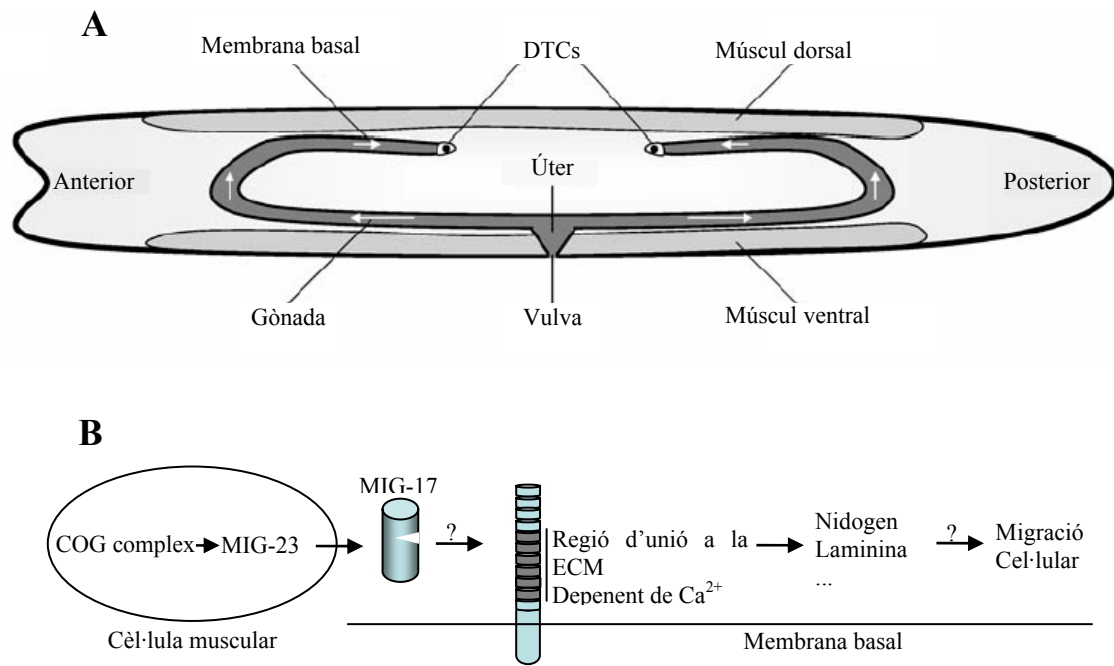


Figura 2. Factors que determinen la morfologia gonadal de *C. elegans*. A, Morfologia de la gònada en un individu adult. B, Factors relacionats amb la regulació de la migració cel·lular en *C. elegans* (per més detalls, llegiu el text).

És important destacar que la funció de GON-1 està conservada durant l'evolució ja que la introducció d'ADAMTS4 i 9 humanes a individus deficientes per la metal·loproteasa li permet recuperar la capacitat de desenvolupar les gònades (Hesselson et al., 2004). Les mutacions en el gen mig-17, en canvi, no generen un fenotip tan evident com les que afecten a gon-1 ja que no regulen la capacitat migratòria de les cèl·lules DTC *per se* sinó que en modifiquen la seva ruta migratòria (Nishiwaki, 1999). Estudis recents amb els gens mig-23, cogc-3 i cogc-1 han demostrat la importància que té el procés de biosíntesi i trànsit intracel·lular de MIG-17 per la seva correcta localització extracel·lular. MIG-23 és una nucleòsid difosfatasa (NDPasa) resident a l'aparell de Golgi i és l'encarregada de la correcta N-glicosilació de MIG-17. Aquesta glicosilació és clau per la correcta localització de la proteïna ja que errors en aquest procés impedeixen detectar MIG-17 a la part externa de la membrana de la gònada (Nishiwaki et al., 2004). Per altra banda, cogc-3 i cogc-1 codifiquen per dues proteïnes, COG-3 i COG-1, que formen part d'un complex proteic localitzat a l'aparell de Golgi anomenat COG (Ungar et al., 2002). Aquest complex participa en diferents aspectes del trànsit intracel·lular (Sztul et al., 2006). A més a més, també intervé en la correcta localització intracel·lular de MIG-23. Donat que l'activitat de MIG-23 és

important per la correcta localització de MIG-17 és lògic pensar que l'activitat d'aquesta estarà afectada per mutacions en COG-3 i COG-1 (figura 2B).

Per què una cèl·lula pugui migrar s'assumeix que la matriu extracel·lular (ECM) ha de ser remodelada. En el nostre cas, les cèl·lules DTC, mitjançant GON-1 i MIG-17, hauran de degradar proteolíticament els components de l'ECM per tal de poder migrar. En la recerca de molècules de la matriu extracel·lular que al ser eliminades revertissin el fenotip mutant de *gon-1* es va identificar la fibulina (FBL-1) (Hesselson et al., 2004; Kubota et al., 2004). Les fibulines (en *C. elegans* existeixen dos variants per processament alternatiu de l'mRNA: FBL-1C i FBL-1D) són unes proteïnes que poden unir-se, de forma depenent de Ca^{2+} , a components de l'ECM com, per exemple, nidogen-1, laminina-1, agrecà i versicà i participen en la regulació de la migració, proliferació i transformació cel·lular (Timpl et al., 2003). La relació entre les tres proteïnes descrites (GON-1, MIG-17 i FBL-1) no es té molt clara però tot sembla indicar que molt probablement MIG-17 s'encarregaria de degradar i reclutar l'FBL-1 cap a la membrana basal de la gònada. En aquesta localització sembla ser que l'FBL facilitaria l'acció de GON-1 en la degradació de l'ECM necessària per la migració cel·lular (figura 2B) (Kubota et al., 2004; Lee et al., 2005). Per tant, les tres proteïnes col·laborarien en la migració de les cèl·lules DTC facilitant la degradació de l'ECM.

Una altra ADAM important en *C. elegans* és SUP-17. Aquesta metal·loproteasa va ser la segona que es va identificar en aquest organisme després que una recerca exhaustiva en el seu genoma permetés la identificació d'ADM-1, la qual s'ha relacionat amb desenvolupament així com en processos de fertilització (Podbilewicz, 1996). SUP-17 és una metal·loproteasa molt similar a *Kuzbanian* en *Drosophila* o ADAM10 en humans (Wen et al., 1997). Aquestes últimes són les responsables del *shedding*, entre d'altres, del receptor Notch (Pan et al., 1997; Seals et al., 2003), per tant, per analogia i també per les dades experimentals de què es disposen SUP-17 és també el principal responsable del *shedding* de l'homòleg de Notch en *C. elegans* anomenat LIN-12 (Wen et al., 1997). Notch és un receptor implicat en processos de desenvolupament embrionari i el paper de les ADAM en la regulació de la seva activitat és clau ja que la introducció i expressió de dominants negatius de *Kuzbanian* en embrions de *Drosophila* o *Xenopus* provoca alteracions severes en el desenvolupament neuronal (Pan et al., 1997).

2.2.-Activitat catalítica del domini metal·loproteasa

La capacitat que tenen les ADAMs per alliberar els dominis extracel·lulars de determinades proteïnes transmembrana es deu a la presència del domini metal·loproteasa. Aquest no està sempre actiu i requereix d'un procés de maduració que succeeix quan la metal·loproteasa arriba a l'aparell de Golgi procedent del reticle endoplasmàtic (ER). Bàsicament consisteix en l'eliminació del prodomini mitjançant un tall proteolític que depèn principalment de la proproteïna convertasa furina (figura 1) (Black et al., 1997; Moss et al., 1997; Zhou et al., 1999). En absència de furina, altres convertases poden substituir-la tot i que el tall que generen és menys eficient (Borroto et al., 2003). És important destacar que aquest mecanisme no és exclusiu de les ADAM sinó que altres metal·loproteases com, per exemple, les MT-MMPs (Yana et al., 2000), incloses a la família de les MMPs, o la subfamília de les ADAMs anomenada ADAMTS (Rodríguez-Manzanares et al., 2000) també comparteixen aquest mecanisme.

2.2.1.-Regulació del shedding i selecció dels substrats

L'activitat metal·loproteasa està regulada per un nombre important de mecanismes tan fisiològics com no fisiològics. En aquest sentit, és important destacar, dins del primer grup, factors de creixement com el factor de creixement epidèrmic (EGF) (Massagué et al., 1993), receptors acoblats a proteïna G (GPCR) (Prenzel et al., 1999), l'acetilcolina (Buxbaum et al., 1992) o l'òxid nítric (NO) (Zhang et al., 2000). Per altra banda, dins del segon grup trobem substàncies com els èsters de forbol (per exemple, el *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; PMA*) (Arribas et al., 1996; Massagué et al., 1993; Pandiella et al., 1991), els ionòfors de calci (Massagué et al., 1993) o el lipopolisacàrid (LPS) (McGeehan et al., 1994). Tots ells són activadors del *shedding* i, en general, es desconeix el mecanisme d'acció tot i que, per exemple, en el cas dels èsters de forbol l'augment de l'activitat proteolítica correlaciona positivament amb una activació de la proteïna quinasa C (PKC) (Mullberg et al., 1992).

Un altre punt interessant en la biologia de les ADAM és com seleccionen els seus substrats. En general, es desconeixen quins són els factors que intervenen en aquest

procés però sembla ser que la regió juxtamembrana (aproximadament entre 10 i 15 aminoàcids a partir de la regió transmembrana) és essencial ja que proteïnes que normalment no estan afectades pel *shedding* es tornen sensibles a ell quan s'introdueix en elles la regió juxtamembrana procedent de substrats coneguts d'ADAM17 (Althoff et al., 2000; Arribas et al., 1997). Per altra banda, estudis de mutagènesi en aquesta regió suggereixen que la seqüència aminoacídica no és crítica pel reconeixement eficient del substrat per part d'ADAM17 (taula 1) mentre que altres paràmetres com, per exemple, l'estructura secundària de la proteïna hi tindrien un paper més rellevant (Hinkle et al., 2004). Un altre factor que sembla estar relacionat amb la selecció de substrat és la formació de complexos estables entre la pròpia ADAM i el seu substrat. En aquest cas, serien les zones més allunyades de la regió juxtamembrana les responsables de l'estabilització del complex, tal i com succeeix, per exemple, quan interaccionen ADAM17 i el receptor de l'hormona del creixement (GHR). En aquest exemple, la formació del complex ADAM17-GHR permetria el *shedding* del receptor mentre que la presència de lligand d'aquest (hormona de creixement; GH) desestabilitzaria el complex inhibint, per tant, el seu *shedding* (Schantl et al., 2004).

Només entre un 2 i un 4% de les proteïnes presents a la superfície cel·lular estan subjectes al *shedding* mediat per ADAMs (Arribas et al., 1995) la qual cosa suggereix que tot i el desconeixement que hi ha sobre aquest punt ha d'existir un tret característic de cada substrat que permeti la seva identificació per part de la metal·loproteasa responsable del seu *shedding*. Per altra banda, també és important destacar, tenint en compte la varietat funcional i estructural dels substrats (taula 1), que les conseqüències del *shedding* variaran depenent de la funció dels substrats. En aquest sentit, possiblement el *shedding* de les efrines, del receptor Notch i dels lligands del receptor d'EGF (EGFR) són els millors exemples de com les ADAM modulen vies de senyalització mecanísticament molt diferents i que afecten a processos biològics tan importants com l'angiogènesi, la migració i proliferació cel·lular o el desenvolupament de teixits.

Taula 1. Degradoma actualitzat d'ADAM17 (Juliol 2006).

<i>Substrats d'ADAM17</i>	<i>Tipus de molècula</i>	<i>Seqüència de tall</i>	<i>Referència</i>
proTNF- α	Citocines	SPLAQA↓VRSSSR	(Mezyk et al., 2003)
Fractalquina		Sense determinar	(Garton et al., 2001)
TRANCE		IVGPQR↓FSGAPA	(Lum et al., 1999; Mohan et al., 2002)
proTGF- α	Lligands de la família d'EGFR/Factors de creixement	HADLLA↓VVAASQ	(Althoff et al., 2001; Sahin et al., 2004)
proNRG α -2C		Sense determinar	(Montero et al., 2000)
proHB-EGF		CHGLTP↓VENPLYTYDH	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
proAmfiregulina		CGEK↓SMSTHEDDKDLSK	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
Betacelulina		CERVDFY↓LQQDRGQ	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
Epiregulina		CEHFFL↓TVHQPLSKEY	(Hinkle et al., 2004; Sahin et al., 2004)
Factor preadipocitari (pref-1)		Sense determinar	(Wang et al., 2006)
p75 TNF- α RII	Receptors	APGAV↓HLPQP	(Mezyk et al., 2003)
p55 TNF- α RI		PQIEN↓VKGTE	(Mezyk et al., 2003)
M-CSFR (Receptor del factor estimulador de macròfags)		Sense Determinar	(Rovida et al., 2001)
CD30		Dominis rics en cisteïna 2 i 5	(Hansen et al., 2000)
IL-6R α		TSLPVQ↓DSSSVP	(Mullberg et al., 1994)
IL-1R II		Sense determinar	(Reddy et al., 2000)
GHR (receptor de l'hormona del creixement)		MSP↓FTCEEDFR	(Wang et al., 2002)
HER4 (human epidermal growth factor receptor-4)		Sense determinar	(Rio et al., 2000)
Notch		PYKIEA↓VKSEPV	(Mohan et al., 2002)
CD40		Sense determinar	(Contin et al., 2003)
p75 ^{NTR}		MGSSQP↓VVTRGT	(Weskamp et al., 2004)
IL-15R α		Sense determinar	(Budagian et al., 2004)

Receptor híbrid SorLA		Sense determinar	(Guo et al., 2002)
Receptor d'LDL		Sense determinar	(Guo et al., 2002)
Receptor AXL Tirosina quinasa		Sense determinar	(Guo et al., 2002)
GPIb α (glicoproteïna Ib α)		Sense determinar	(Bergmeier et al., 2004)
PTP-LAR (Receptor- like protein tyrosine phosphatase)		Sense determinar	(Ruhe et al., 2006)
L-selectina	Molècules d'adhesió	QKLDK \downarrow SFSMI	(Mezyk et al., 2003)
Col·lagen XVII		Sense determinar	(Franzke et al., 2002)
VCAM-1 (molècula d'adhesió cel·lular vascular)		Sense determinar	(Garton et al., 2003)
NCAM (molècula d'adhesió cel·lular neural)		Sense determinar	(Kalus et al., 2006)
ICAM-1 (molècula d'adhesió intercel·lular)		Sense determinar	(Tsakadze et al., 2006)
Nectina-4		Sense determinar	(Fabre-Lafay et al., 2005)
CD44		Sense determinar	(Nagano et al., 2004)
MUC-1 (Mucina-1)	Altres	QYKTEA \downarrow ASRYNL	(Thathiah et al., 2003; Thathiah et al., 2004)
APP (Proteïna precursora del pèptid β -amiloide)		VHHQK \downarrow LVFFA	(Mezyk et al., 2003)
APLP2 (APP-like protein 2)		Sense determinar	(Endres et al., 2005)
Anhidrasa carbònica IX		Sense determinar	(Zatovicova et al., 2005)
Proteïna cel·lular priònica		Sense determinar	(Vincent et al., 2001)
Glicoproteïna del virus de l'èbola		VDKTLPD \downarrow QGDNDNWW	(Dolnik et al., 2004)

2.2.2.-Processos biològics regulats per les ADAMs: I) Shedding de les efrines

Les efrines són un grup de proteïnes transmembrana que interaccionen amb els seus receptors de tipus tirosina-quinasa (Eph) i controlen processos biològics fonamentals com són el desenvolupament vascular, la migració cel·lular o la maduració del sistema nerviós (Kullander et al., 2002; Tessier-Lavigne et al., 1996) mitjançant la regulació de l'adhesió, l'estructura i la motilitat cel·lular (Flanagan et al., 1998; Himanen et al., 2003; Poliakov et al., 2004). Aquestes molècules tenen un paper important en càncer ja que intervenen en processos clau pel desenvolupament de tumors com són l'angiogènesi i la metastasi (Clevers et al., 2006; Surawska et al., 2004). El seu mecanisme d'acció és especialment peculiar ja que una vegada es produeix la interacció efrina-Receptor (Eph) de dues cèl·lules adjacents s'activa una senyalització bidireccional que culmina amb la repulsió entre les dues cèl·lules (figura 3).

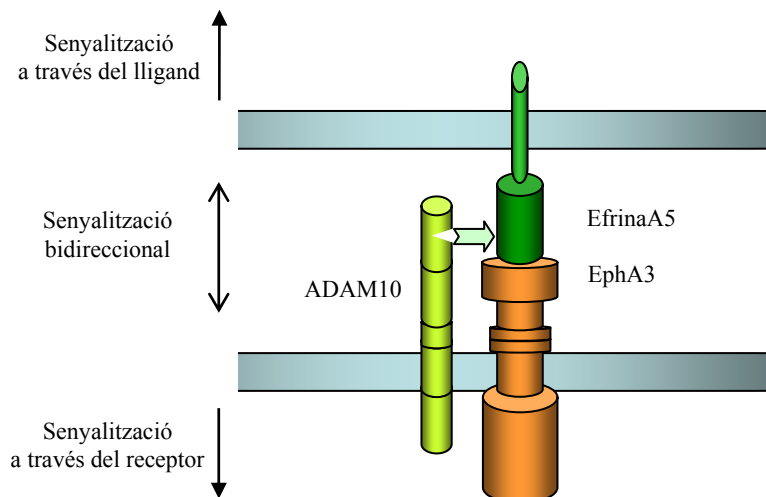


Figura 3. Interacció d'ADAM10 amb el complex efrinaA5-EphA3. Vegeu el text per més detalls.

Aquest mecanisme només es pot entendre si, prèviament al procés de repulsió, desapareix la interacció lligand-receptor. En aquest sentit, es coneix que dos dels membres de la família de les efrines, l'efrinaA2 i l'efrinaA5, són substrats d'ADAM10 (Hattori et al., 2000; Janes et al., 2005). Aquest fet ha permès identificar un mecanisme innovador que explica com les ADAM regulen la repulsió entre dues cèl·lules. Així, el receptor de l'efrinaA5, anomenat EphA3, interacciona constitutivament amb ADAM10 mitjançant el seu domini d'unió al lligand. Quan l'efrinaA5 interacciona amb EphA3 es

genera un canvi estructural a ADAM10 que permet a la metal·loproteasa tallar eficientment l'efrinaA5 (Janes et al., 2005) (figura 3). Aquest treball ens presenta un nou mecanisme de selecció de substrat per part de les metal·loproteases (en aquest exemple, ADAM10 selecciona l'efrinaA5) i planteja la pregunta de si un mecanisme similar podria aplicar-se a altres substrats de *shedding* i a altres metal·loproteases.

2.2.2.-Processos biològics regulats per les ADAMs: II) La via de senyalització de Notch

Notch és un receptor que controla una via de senyalització molt conservada evolutivament relacionada amb la diferenciació cel·lular i que juga un paper crític en el desenvolupament embrionari i l'angiogènesi. Aquesta via s'ha relacionat amb càncer ja que pot activar cèl·lules endotelials i promoure angiogènesi tumoral (Zeng et al., 2005).

Perquè el receptor Notch sigui actiu és necessària l'aparició seqüencial de diversos talls proteolítics (figura 4). El primer d'ells succeeix a l'aparell de Golgi i és degut a l'activitat de la convertasa furina (Fortini, 2001). Aquest primer tall permet a Notch arribar a la superfície cel·lular a on pateix un segon tall proteolític o *shedding* degut a l'acció de les ADAM. El *shedding* genera dos fragments: un fragment soluble extracel·lular i un altre fragment que es manté unit a la membrana plasmàtica. Aquest últim, és l'objectiu d'un tercer tall proteolític anomenat RIP (Regulated Intramembrane Proteolysis), produït per l'efecte del complex γ -secretasa (Fortini, 2001), i genera un fragment citoplasmàtic que és transportat al nucli a on regula la transcripció de gens (Fortini, 2001). Una de les característiques més importants del RIP és que és un tall totalment dependent del *shedding* previ ja que el bloqueig d'aquest impedeix completament la seva formació (Hartmann et al., 2002). Per tant, és obvi que les ADAM tenen un paper clau en la regulació de l'activitat de Notch.

La metal·loproteasa involucrada en el *shedding* de Notch és bàsicament ADAM10 o el seu homòleg en el cas de *Drosophila melanogaster* i *C. elegans* (Kuzbanian i SUP-17, respectivament) (Hartmann et al., 2002; Rooke et al., 1996; Wen et al., 1997) tot i que alguns treballs indiquen que ADAM17 també hi pot jugar un paper important en mamífers (Brou et al., 2000). No obstant això, la primera segueix tenint un paper crucial ja que la senyalització del receptor s'inhibeix pràcticament en la seva

totalitat en cèl·lules deficientes per ADAM10 (Hartmann et al., 2002) mentre que no s'ha descrit un fenotip anormal respecte el *shedding* de Notch en cèl·lules deficientes per ADAM17.

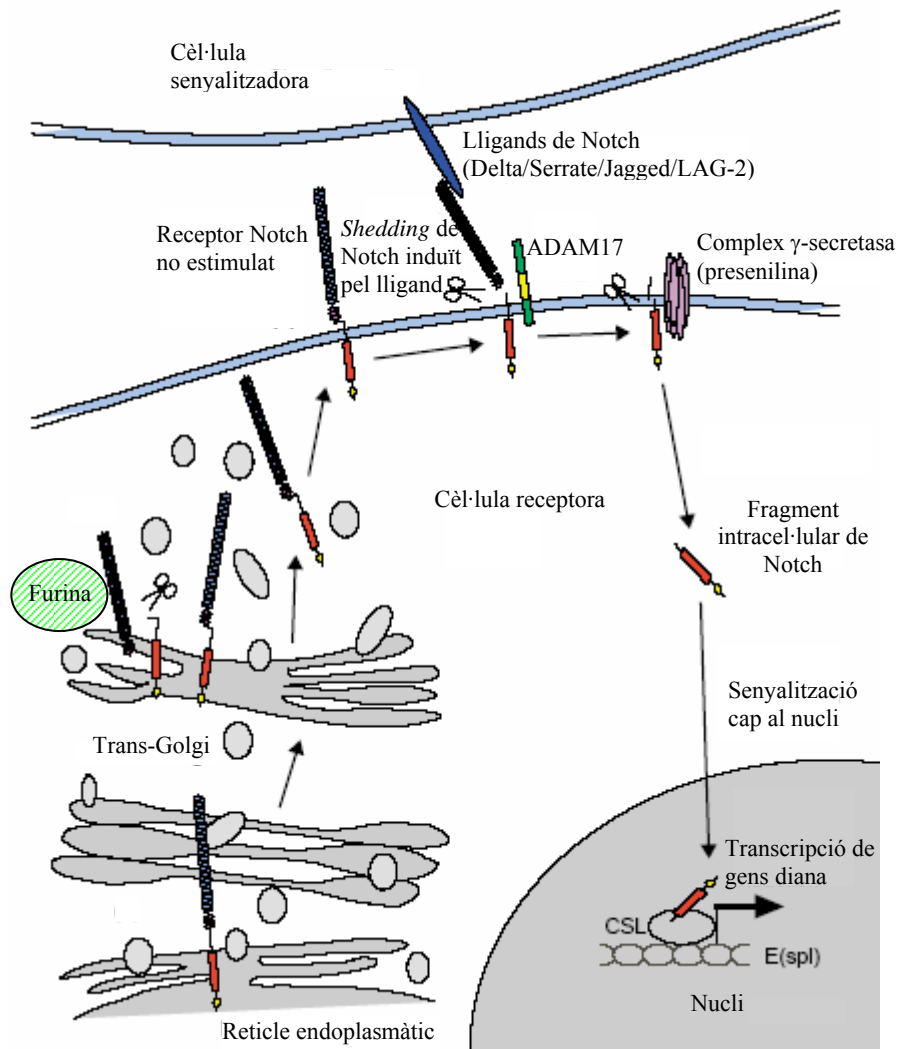


Figura 4. Model general de síntesi i proteòlisi de Notch. El receptor Notch es sintetitza en el reticle endoplasmàtic en forma de precursor de 300kD que és tallat inicialment per convertases del tipus furina en el compartiment del trans-golgi. Els dos fragments generats s'uneixen de forma no covalent per donar lloc a un receptor heterodimèric. Finalment, el *shedding* inicial induït pel lligand i el posterior tall γ -secretasa donen lloc a un fragment intracel·lular de Notch que és transportat al nucli a on interacciona amb factors de transcripció del tipus CSL que induiran la transcripció de gens com, per exemple, l'E(spl) (adaptat de (Fortini, 2001)).

2.2.2.-Processos biològics regulats per les ADAMs: III) La via de senyalització d'EGFR

El receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) és el primer membre d'una família de 4 receptors de tipus tirosina quinasa (RTK) anomenada HER o erbB

(HER1 o EGFR, HER2, HER3 i HER4) (Yarden et al., 2001). Aquests receptors, una vegada han estat activats pels seus lligands, s'autofosforilen i, posteriorment, dimeritzen amb membres de la mateixa família per tal d'iniciar la cascada de senyalització cel·lular (figura 5).

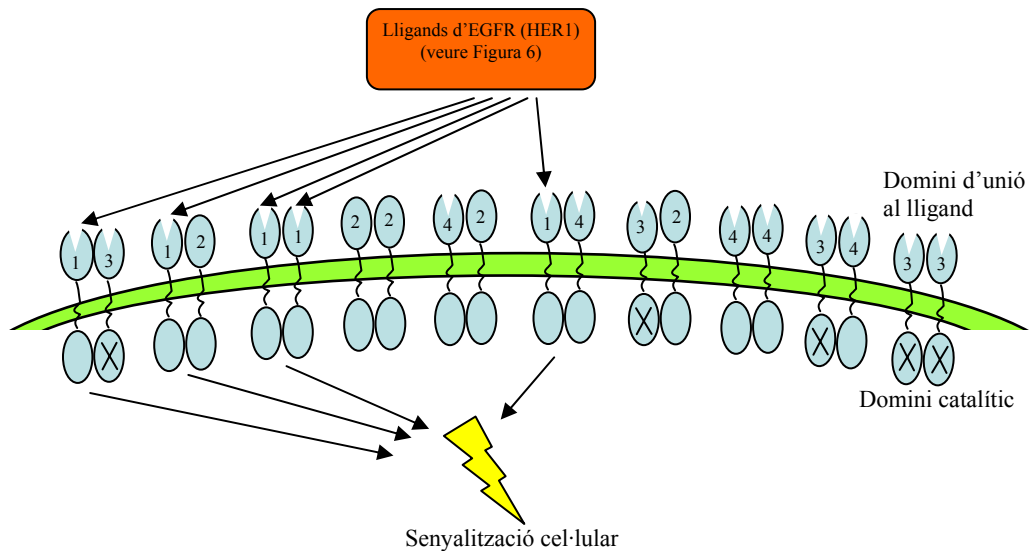


Figura 5. Senyalització dels receptors de la família HER. Una vegada el lligand interacciona amb el seu receptor aquest s'autofosforila, dimeritza i inicia les cascades de senyalització cel·lular específiques (per simplificar la figura només es mostren les interaccions entre l'EGFR i els seus lligands). El número que hi ha als dominis d'unió al lligand representen cadascun dels membres de la família. La creu present en els dominis catalítics significa que aquests no tenen activitat catalítica, per tant, el dímer HER3/HER3 tot i que es pot formar no és actiu.

La família HER s'ha relacionat amb l'activació de processos biològics tan rellevants com la divisió, la motilitat, l'adhesió i la mort cel·lular (Yarden et al., 2001). A més a més, s'ha descrit que l'EGFR s'activa de forma aberrant en una gran varietat de tumors com, per exemple, en càncer de pulmó o en carcinoma renal i colorectal la qual cosa ha fet d'aquest receptor una de les principals dianes terapèutiques contra la patologia del càncer (Baselga et al., 2005; Yarden et al., 2001). Els agents terapèutics utilitzats actualment són anticossos monoclonals com, per exemple, C225 (conegut també com cetuximab) o herceptin (trastuzumab) dirigits contra HER1 i HER2, respectivament, o bé molècules de petit pes molecular que s'uneixen al domini intracel·lular i inhibeixen l'activitat quinasa del receptor (Baselga et al., 2002).

La família de lligands naturals de l'EGFR està formada per proteïnes transmembrana que tenen la peculiaritat de ser substrats de *shedding*. Els membres d'aquesta família són el factor de creixement transformant alfa (proTGF- α) (de Larco et al., 1978), el factor de creixement epidèrmic (proEGF) (Cohen et al., 1963), el factor de

creixement epidèrmic d'unió a heparina (proHB-EGF) (Higashiyama et al., 1991), l'amfiregulina (proAR) (Shoyab et al., 1989), la betacelulina (proBTC) (Sasada et al., 1993), l'epiregulina (proEPR) (Toyoda et al., 1995) i l'epigen (proEPIGEN) (Strachan et al., 2001) (figura 6). El tall proteolític és essencial ja que el seu bloqueig inhibeix l'activació d'EGFR (Borrell-Pages et al., 2003; Dong et al., 1999). Per tant, les ADAMs, i més concretament ADAM10 i ADAM17 que són les principals responsables del *shedding* d'aquests lligands (Horiuchi et al., 2005; Sahin et al., 2004), podrien ser bones dianes terapèutiques (Zhou, 2005).

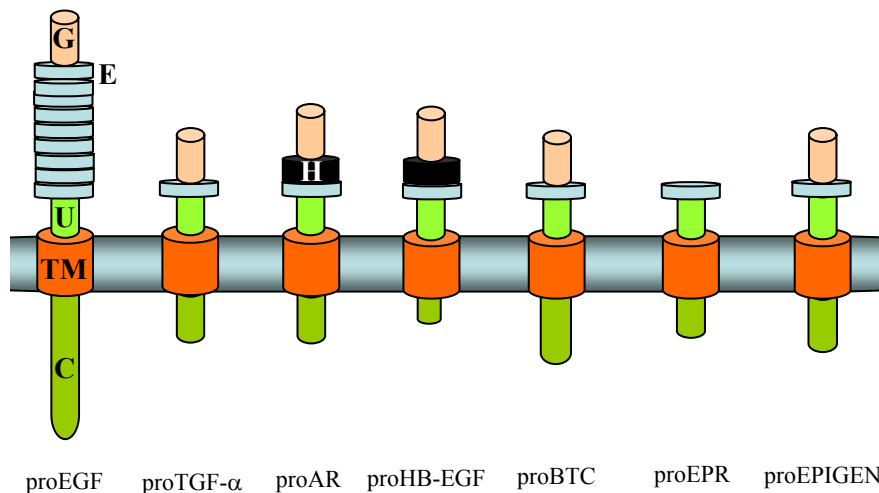


Figura 6. Organització dels lligands de l'EGFR. C, domini citoplasmàtic; TM, domini transmembrana; U, regió d'unió; E, domini EGF; G, domini de glicosilació; H, domini d'unió a heparina.

El *shedding* d'alguns dels lligands del receptor d'EGFR també pot anar seguit d'un tall proteolític intramembranal (RIP) similar al que pateix el receptor Notch. Aquest és el cas de proHB-EGF el qual, una vegada és processat per les ADAM, és objecte d'un segon tall proteolític a la regió intramembrana que genera un fragment citoplasmàtic del lligand que pot arribar al nucli i interaccionar amb proteïnes com, per exemple, PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein). Aquesta proteïna es localitza principalment al nucli i la interacció amb el fragment citoplasmàtic d'HB-EGF provoca la seva exportació al citoplasma. PLZF és un factor de transcripció que reprimeix l'expressió de Cyclina A, una molècula encarregada d'activar el cicle cel·lular (Higashiyama et al., 2005). Així, la presència del fragment citoplasmàtic de proHB-EGF bloquejaria l'efecte inhibitori de PLZF de tal forma que s'iniciaria l'expressió de Cyclina A provocant, així, una entrada de la cèl·lula en el cicle cel·lular. Aquest tipus de tall proteolític no és exclusiu de proHB-EGF ja que també s'ha descrit per altres lligands dels receptors de la família HER com, per exemple, la neuregulina-1 (Bao et al., 2003).

2.2.3.-Paper de les ADAM en la connexió entre diferents vies de senyalització

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'activació de receptors acoblats a proteïna G (GPCRs) incrementa el *shedding* d'algunes molècules. En el cas de que aquestes molècules siguin lligands d'EGFR el *shedding* donarà lloc a l'activació del receptor. Aquest mecanisme, anomenat transactivació d'EGFR (Prenzel et al., 1999), (figura 7) permet la connexió (en anglès, *cross-talk*) entre les vies de senyalització dels GPCRs i la via de senyalització d'EGFR. Les ADAM involucrades en el *cross-talk* són bàsicament ADAM10 i ADAM17 tot i que ADAM12 i ADAM15 poden tenir-hi un paper en algunes línies cel·lulars (Fischer et al., 2003a; Schafer et al., 2004). Per altra banda, els lligands implicats en la transactivació d'EGFR varien en funció de la línia cel·lular però bàsicament són pro-amfiredulina, proHB-EGF o proTGF α (Fischer et al., 2003a).

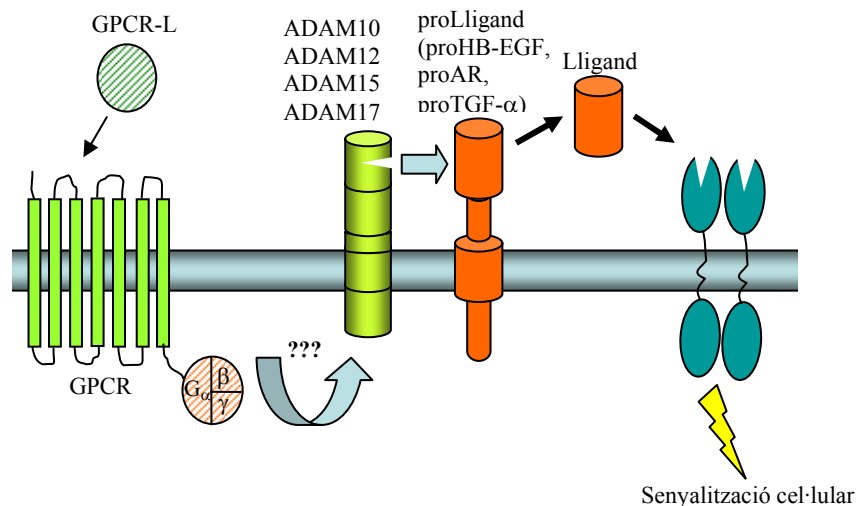


Figura 7. Transactivació de l'EGFR mitjançant GPCRs. L'activació d'un receptor acoblat a proteïna G (GPCR) pel seu lligand (GPCR-L) activa, mitjançant un mecanisme desconegut, el *shedding* depenent d'ADAMs dels lligands descrits a la figura. Aquests, a la vegada, s'uniran al seu receptor i iniciaran la cascada de senyalització específica.

Les ADAMs també integren altres estímuls amb l'activació de l'EGFR. Exemples d'aquests estímuls són l'estrès osmòtic i oxidatiu que poden activar ADAM9, ADAM10 o ADAM17 i promoure la conseqüent activació d'EGFR mitjançant el *shedding* de proHB-EGF (Fischer et al., 2004).

La regulació de la transactivació d'EGFR és crítica pel correcte funcionament de l'organisme i la seva alteració pot provocar, per exemple, l'aparició de tumors. En aquest sentit, es coneix que el microorganisme *Helicobacter pylori* incrementa el risc de càncer gàstric degut a la transactivació d'EGFR (Tanida et al., 2004). El que succeeix en aquest cas és que la infecció provoca un augment de la producció d'interleucina-8 (IL-8) per part de l'organisme infectat la qual cosa dóna lloc a l'activació continua d'ADAM10 i, consegüentment, de l'EGFR mitjançant el *shedding* de proHB-EGF.

2.3.-Interacció ADAMs-integrines: paper del domini desintegrina

Tal i com indiquen les anàlisis d'homologia de seqüència, totes les ADAMs tenen un domini anomenat desintegrina que dóna nom a una família de proteïnes anomenada "desintegrines". Les desintegrines es troben, per exemple, al verí d'algunes serps i són molècules de baix pes molecular que es caracteritzen per tenir una seqüència o domini del tipus RGD (Arg-Gly-Asp) a l'interior d'una estructura anomenada "llaç desintegrina" (Braud et al., 2000; McLane et al., 1998). Aquesta seqüència també està present en alguns components de la matriu extracel·lular com, per exemple, el fibrinogen i és reconeguda per algunes integrines. Aquesta interacció permet la fixació de les cèl·lules a l'ECM (figura 8) (Braud et al., 2000; McLane et al., 1998). Això indica, per tant, que les desintegrines competeixen amb els components de la matriu extracel·lular per la unió amb les integrines de la cèl·lula.

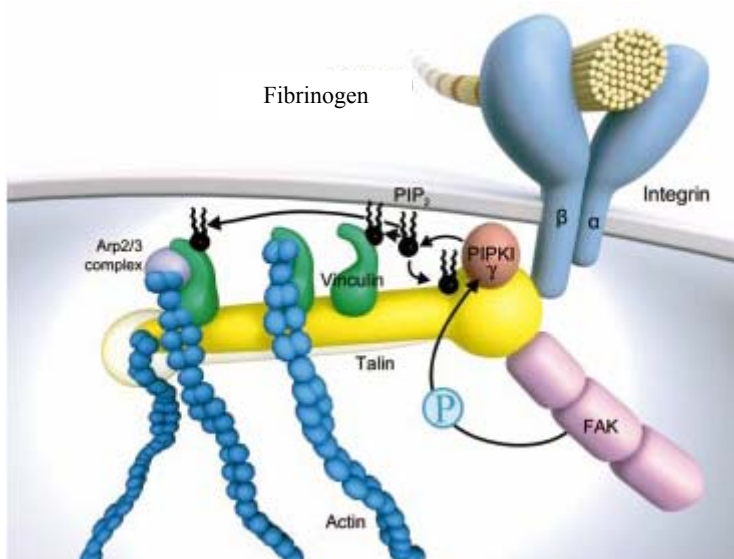


Figura 8. Les integrines comuniquen els components de l'ECM amb el citoesquelet. Representació de la interacció entre el domini extracel·lular d'una integrina i el fibrinogen. Paral·lelament, el domini intracel·lular de la integrina pot interaccionar amb una proteïna anomenada talina. Aquesta recluta la PIPKI γ que és l'encarregada de sintetitzar PIP₂. La unió de PIP₂ a la vinculina permet, per una banda, la unió d'aquesta a la talina i, per l'altra, la unió de la vinculina al complex Arp2/3 que s'encarrega d'iniciar la polimerització del citoesquelet d'actina (adaptat de (Brakebusch et al., 2003)).

Les desintegrines es varen caracteritzar inicialment per la seva habilitat a l'hora d'inhibir la interacció entre el fibrinogen i la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ la qual cosa bloqueja l'agregació plaquetària donat lloc a una hemorràgia (Braud et al., 2000; McLane et al., 1998). Per tant, donat que les ADAMs disposen d'un domini desintegrina tot sembla indicar que tindran un paper important en la regulació de la unió entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular.

Les integrines són receptors heterodimèrics formats per una cadena α i una cadena β que tenen un domini extracel·lular d'unió al lligand molt llarg i una cua citoplasmàtica molt curta. En mamífers, hi ha 18 subunitats α i 8 subunitats β que interaccionen per formar 24 receptors diferents (figura 9) (Hynes, 2002). La missió principal de les integrines és la de mantenir l'ancoratge entre les cèl·lules i l'ECM. Aquestes unions generen canvis conformacionals en les cadenes α i β així com l'agrupament de les integrines en clústers. Aquests canvis inicien senyals intracel·lulars que regulen, a l'hora, alguns aspectes relacionats amb la migració cel·lular com, per exemple, l'adhesió i la polarització cel·lular (Ridley et al., 2003). A més a més, les integrines comuniquen els elements de l'ECM amb el citoesquelet mitjançant proteïnes adaptadores que també poden activar determinades vies de senyalització (figura 8) (Guo et al., 2004; Ridley et al., 2003).

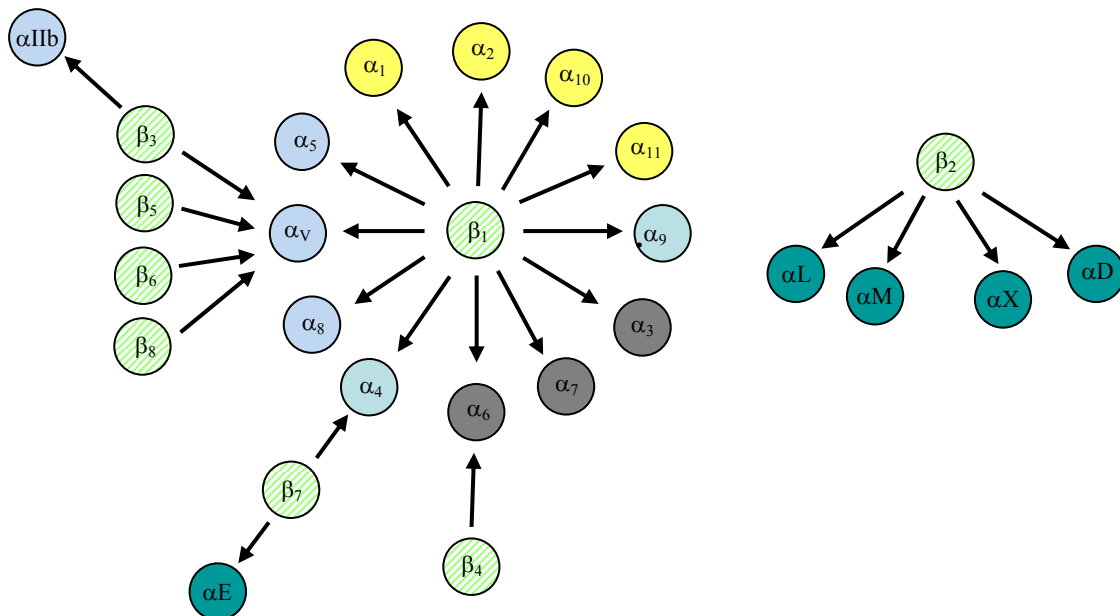


Figura 9. Família de receptors integrina. Representació esquemàtica dels 24 receptors integrina coneguts (heterodimers α/β). El color de la subunitat α representa el tipus de receptor que és cada heterodimer; color groc: receptors de col·lagen, color blau: receptors RGD, color lila: receptors de laminina, color verd: receptors de leucòcits. * L'heterodimer $\alpha_9\beta_1$ inicialment es va descriure com un receptor RGD però posteriors treballs varen determinar que aquesta integrina interacciona amb un motiu diferent (Yokosaki et al., 1999) (Adaptat de (Hynes, 2002)).

2.3.1.-Requeriments estructurals i especificitat de la interacció ADAMs-integrines

Una de les característiques més importants de la interacció entre les ADAMs i les integrines és la seva redundància. Així, podem observar com una integrina pot interaccionar amb més d'una ADAM i una ADAM ho pot fer amb més d'una integrina. A pesar de tot, existeix una certa especificitat ja que algunes combinacions ADAM-integrines no s'han pogut descriure (taula 2).

Un altre fet important és que, tot i la rellevància que té el domini RGD en la interacció entre l'ECM i les integrines, només un membre de la família de les ADAM, ADAM15, presenta aquesta seqüència en el seu domini desintegrina (Nath et al., 1999). A més a més, la importància del domini RGD per la unió entre ADAM15 i les integrines és relatiu ja que, si bé és necessari per la unió d'aquesta amb la integrina $\alpha V\beta 3$ no ho és, en canvi, per la unió amb $\alpha 9\beta 1$. En aquest cas, la presència d'una altra seqüència aminoacídica (RX₆DLPEF) localitzada molt a prop del domini RGD és la que permet la interacció entre ADAM15 i $\alpha 9\beta 1$ (Eto et al., 2002). Aquesta seqüència es troba molt conservada en les ADAM, excepte en ADAM10 i ADAM17, cosa que indica que la integrina $\alpha 9\beta 1$ pot interaccionar amb la gran majoria d'ADAMs excepte amb aquestes dues (Eto et al., 2002) (taula 2). De fet, no està gens clar que el domini desintegrina jugui un paper important en la funció d'ADAM10 i ADAM17 ja que, per una banda, encara no s'ha descrit cap interacció entre la primera d'elles i alguna integrina i, per l'altra, ADAM17 només es coneix que pot interaccionar amb la integrina $\alpha 5\beta 1$ sense que es conegui la base estructural d'aquesta interacció (Huang et al., 2005). Per tant, tot sembla indicar que l'activitat d'ADAM10 i ADAM17 no depèn del domini desintegrina.

2.3.2.-Aspectes funcionals de les interaccions ADAMs-integrines

Com s'ha comentat anteriorment, ADAM17 interacciona amb la integrina $\alpha 5\beta 1$ i ho fa majoritàriament a les adhesions focals (Huang et al., 2005) mentre que en assajos de reparació de ferides (en anglès, *wound healing assays*), en canvi, les dues molècules es redistribueixen i colocalitzen en les protrusions de membrana del front de creixement (en anglès, *leading edges*). Aquesta observació suggereix que l'activitat

metal·loproteasa d'ADAM17 podria estar indirectament regulada pel domini desintegrina ja que s'encarregaria de controlar la seva localització subcel·lular (Bax et al., 2004). Funcionalment, aquesta interacció provoca la inhibició de la migració cel·lular depenent de la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Huang et al., 2005).

Taula 2. Interaccions descrites entre les ADAMs i les integrines.

	$\alpha_2\beta_1$	$\alpha_4\beta_1$	$\alpha_4\beta_7$	$\alpha_5\beta_1$	$\alpha_6\beta_1$	$\alpha_6\beta_4$	$\alpha_9\beta_1$	$\alpha_v\beta_5$	$\alpha_v\beta_3$
ADAM1							(Eto et al., 2002)		
ADAM2		(Tomczuk et al., 2003)			(Bigler et al., 2000; Tomczuk et al., 2003)		(Eto et al., 2002; Tomczuk et al., 2003)		
ADAM3		(Tomczuk et al., 2003)			(Takahashi et al., 2001; Tomczuk et al., 2003)		(Eto et al., 2002; Tomczuk et al., 2003)		
ADAM7		(Bridges et al., 2005)	(Bridges et al., 2005)				(Bridges et al., 2005)		
ADAM9	(Mazzocca et al., 2005)				(Nath et al., 2000)	(Mazzocca et al., 2005)	(Eto et al., 2002)	(Zhou et al., 2001)	
ADAM12		(Huang et al., 2005)					(Eto et al., 2000)		
ADAM15				(Nath et al., 1999)			(Eto et al., 2002)		(Zhang et al., 1998)
ADAM17				(Huang et al., 2005)					
ADAM19		(Huang et al., 2005)		(Huang et al., 2005)					
ADAM23									(Cal et al., 2000)
ADAM28			(Bridges et al., 2005)				(Bridges et al., 2005)		
ADAM33		(Huang et al., 2005)		(Huang et al., 2005)			(Bridges et al., 2005)		

ADAM12 també juga un paper important en la regulació de la funció de les integrines. Aquesta metal·loproteasa interacciona principalment amb la integrina $\alpha 9\beta 1$ encara que en absència d'aquesta altres integrines del tipus $\beta 1$ també ho poden fer (Thodeti et al., 2005). Des de un punt de vista funcional, la interacció entre ADAM12 i aquesta integrina, en un model d'adipogènesi, provoca una reorganització del citoesquelet d'actina així com alteracions en l'adhesió cèl·lula-ECM que donen lloc a l'aparició de cèl·lules arrodonides i a una disminució de la unió a la fibronectina present a la ECM (Kawaguchi et al., 2003). Per altra banda, ADAM12 també inhibeix la migració cel·lular dependent de la integrina $\alpha 4\beta 1$ encara que aquest fenomen no és dependent del domini desintegrina sinó de l'activitat metal·loproteasa sobre la molècula d'adhesió (Huang et al., 2005).

ADAM15 té efectes inhibitoris quan interacciona amb la integrina $\alpha V\beta 3$, ja que l'augment dels nivells de la metal·loproteasa en cèl·lules canceroses d'ovari disminueix la seva adhesió a la vitronectina de l'ECM i en redueix la motilitat cel·lular (Nath et al., 2000).

La interacció entre les ADAMs i les integrines descrites fins ara promouen la inhibició de funcions com l'adhesió cèl·lula-ECM o la migració. En canvi, determinades ADAMs realitzen l'efecte oposat. Aquest és el cas de l'ADAM9 que incrementa la capacitat migratòria de les cèl·lules quan interacciona amb la integrina $\alpha 6\beta 1$, tal i com es pot observar en fibroblasts cultivats en matrius que contenen el domini desintegrina d'ADAM9 (Nath et al., 2000). Un fenomen similar s'observa en cèl·lules estromals hepàtiques que tenen la capacitat de secretar una forma soluble d'ADAM9 obtinguda per un processament alternatiu de l'mRNA. L'aparició d'aquesta forma sembla ser la responsable de l'aparició d'un fenotip altament invasiu i dependent de la presència de les integrines $\alpha 6\beta 4$ i $\alpha 2\beta 1$ que s'encarregarien de fixar la forma soluble d'ADAM9 al front de les cèl·lules malignes invasores. Aquest fet provocaria la degradació de determinats components de l'ECM i permetria progressar a les cèl·lules tumorals, tal i com s'ha observat, també, en metàstasis de fetge en humans (Mazzocca et al., 2005).

En resum, la interacció entre les ADAMs i les integrines interfereix, en alguns casos inhibint i en d'altres activant, funcions clau per la cèl·lula com són l'adhesió o la migració cel·lular les quals tenen un paper rellevant en l'aparició del càncer.

3.-EXPRESSIÓ DE LES ADAMs EN TUMORS

Les metal·loproteases de la família ADAM semblen tenir un paper rellevant en càncer ja que se sobreexpressen en una gran varietat de tumors (taula 3). Excepcionalment, ja que fins ara només s'ha descrit per ADAM23, es pot observar l'efecte contrari, és a dir, una inhibició de l'expressió de la proteasa en el teixit tumoral degut a la hipermetilació del seu promotor (Costa et al., 2004).

Taula 3. Tumors humans en els que s'ha descrit una desregulació d'alguna ADAM. En tots els casos, excepte per ADAM23 (Costa et al., 2004), s'observa un increment dels nivells d'expressió de les ADAM respecte al teixit sà.

	mama	Pàncrees	Fetge	Pulmó	Pròstata	Cartílag	Cervell	Úter/Ovari	Ronyó	Estómac	Còlon
ADAM8				(Ishikawa et al., 2004)					(Roemer et al., 2004a; Roemer et al., 2004b)		
ADAM9	(Lendeckel et al., 2005; O'Shea et al., 2003)	(Grutzmann et al., 2003)	(Le Pabic et al., 2003; Mazzocca et al., 2005; Tannapfel et al., 2003)							(Carl-McGrath et al., 2005)	
ADAM10								(Fogel et al., 2003)		(Yoshimura et al., 2002)	(Gavert et al., 2005; Knosel et al., 2005)
ADAM12	(Iba et al., 1999; Kveiborg et al., 2005; Lendeckel et al., 2005)		(Le Pabic et al., 2003)				(Kodama et al., 2004)			(Carl-McGrath et al., 2005; Iba et al., 1999)	(Iba et al., 1999)
ADAM15				(Schutz et al., 2005)		(Bohm et al., 1999)				(Carl-McGrath et al., 2005; Yoshimura et al., 2002)	

ADAM17	(Borrell-Pages et al., 2003; Lendeckel et al., 2005)		(Ding et al., 2004)		(Karan et al., 2003)			(Tanaka et al., 2005)	(Roemer et al., 2004a; Roemer et al., 2004b)	(Yoshimura et al., 2002)	(Blanchot-Jossic et al., 2005)
ADAM19									(Roemer et al., 2004a; Roemer et al., 2004b)		
ADAM23	(Costa et al., 2004)										
ADAM28				(Ohtsuka et al., 2006)					(Roemer et al., 2004a; Roemer et al., 2004b)		

El mecanisme o mecanismes que donen lloc a la sobreexpressió de les ADAMs en tumors és desconegut en molts casos. No obstant això, sabem que el control dels nivells d'expressió de les metal·loproteases es pot donar tant a nivell transcripcional com post-traducciona. Així, per exemple, l'mRNA d'ADAM17 disminueix fins a un 90% en el pulmó de ratolins deficientes pel factor de transcripció foxm1 (Kim et al., 2005). Per altra banda, el transport d'aquesta metal·loproteasa cap a la superfície cel·lular també presenta una regulació molt precisa ja que tant la fosforilació de residus concrets del domini citoplasmàtic (Soond et al., 2005) com la presència de determinats aminoàcids en la seva estructura (Villanueva de la Torre et al., 2004) són importants per la mobilització d'ADAM17 des de l'ER fins a la superfície cel·lular. Altres factors com, per exemple, els nivells de la proteasa a l'ER també regulen el seu trànsit cap a la membrana plasmàtica donat que la transfecció transitòria de determinades línies cel·lulars amb ADAM17 provoca una acumulació de la proteasa en aquest compartiment subcel·lular (Borroto et al., 2003; Doedens et al., 2003; Fan et al., 2003; Villanueva de la Torre et al., 2004). És important destacar, també, que l'activitat del factor de creixement EGF s'ha relacionat amb un increment dels nivells de forma activa d'ADAM17 a la superfície cel·lular (Santiago-Josefat et al., 2006). L'activitat d'altres membres de la família com, per exemple, ADAM2 i ADAM3 també està íntimament regulada per processos post-traduccionals donat que ADAM3 no és eficientment transportada a la superfície cel·lular, encara que els seus nivells d'expressió són normals, en el ratolí deficient per ADAM2. Això indica que, igual com passa amb

ADAM17, el transport anterògrad és un punt de regulació important de l'activitat d'aquestes dues metal·loproteases (Stein et al., 2005).

3.1.-*Paper individual de les ADAMs*

Els nivells alts d'expressió d'ADAM10 s'han relacionat amb el creixement del carcinoma de cèl·lules orals escamoses i el càncer gàstric ja que la seva inhibició mitjançant oligonucleòtids d'interferència o el tractament amb anticossos anti-ADAM10 redueix la proliferació cel·lular en aquest tipus de tumors (Carl-McGrath et al., 2005) (Ko et al., 2005). De forma similar, s'observa una inhibició de la proliferació cel·lular en càncer gàstric utilitzant anticossos anti-ADAM9 (Carl-McGrath et al., 2005). Aquesta metal·loproteasa té una especial importància clínica ja que s'ha observat, en un model murí, que contribueix significativament al desenvolupament del càncer de pròstata molt probablement degut al seu paper en el *shedding* de substrats de l'EGFR i del receptor del factor de creixement fibroblàstic (FGF) (Peduto et al., 2005). ADAM9 també intervé en invasió tumoral ja que presenta una elevada expressió en metàstasis de fetge provinents de carcinoma de colon i en línies cel·lulars de càncer de pulmó que són altament metastàtiques en cervell. Curiosament, ADAM9 no augmenta els seus nivells en metàstasis que afecten el pulmó (Shintani et al., 2004). A més a més, tal i com s'ha comentat anteriorment, ADAM9 també intervé en la invasió tumoral en un model de tumor hepàtic (Mazzocca et al., 2005).

ADAM9 també pot ser utilitzada per predir la resposta contra fàrmacs antitumorals. Molts càncers de mama recurrents són tractats amb un fàrmac antiestrogènic anomenat tamoxifè ja que els estrògens són necessaris pel creixement de l'epiteli de la glàndula mamària i alguns tumors mantenen aquesta dependència. Donat que alguns dels tumors no responen a aquest tractament es varen intentar caracteritzar possibles factors de predicció de l'èxit d'aquest. Un d'ells és ADAM9 que, juntament amb ADAM11, presenten uns nivells alts d'expressió en tumors que responen positivament al tamoxifè (Sieuwert et al., 2005).

ADAM12 s'ha relacionat amb el càncer de mama perquè s'ha pogut identificar a l'orina d'aquestes pacients una forma soluble de la proteasa amb capacitat per degradar

alguns components de l'ECM (Roy et al., 2004). A més a més, hi podria tenir un paper important ja que en un model murí que presenta nivells alts d'expressió d'ADAM12 en glàndula mamària s'ha observat que la progressió tumoral s'accelera, possiblement degut a una disminució de l'apoptosi en les cèl·lules tumorals i un augment d'aquesta en les cèl·lules estromals sanes (Kveiborg et al., 2005).

4.-PAPER D'ADAM17 EN LA FORMACIÓ DE TUMORS

ADAM17 té especial interès com a diana antitumoral ja que, a més a més de sobreexpressar-se en tumors (taula 3), és responsable del *shedding* la majoria de membres de la família de lligands de l'EGFR (Sahin et al., 2004) (taula 1) el qual està sobreactivat en un gran nombre de carcinomes humans (Mendelsohn et al., 2000). Curiosament, l'augment d'expressió d'ADAM17 en tumors fins ara no s'ha pogut demostrar que tingui cap rellevància clínica (Borrell-Pages et al., 2003; Tanaka et al., 2005). No obstant això, el bloqueig específic del *shedding* d'un dels lligands d'EGFR (proTGF α) així com el tractament de línies cel·lulars de càncer de mama amb anticossos anti-ADAM17 redueix la grandària dels xenografts generats en ratolins nuus així com la proliferació cel·lular, respectivament (Borrell-Pages et al., 2003; Lendeckel et al., 2005).

4.1.-El degradoma d'ADAM17

El degradoma és un terme creat per definir el conjunt de substrats d'una metal·loproteasa (Lopez-Otin et al., 2002). Conèixer amb exactitud quines molècules són substrats de *shedding* és important ja que l'efecte final de la proteasa dependrà, essencialment, de la funció que aquests substrats tinguin a la cèl·lula. Estudiar el degradoma d'una metal·loproteasa és especialment difícil ja que cada tipus cel·lular expressa diferents nivells de cada un dels substrats. A més a més, cada substrat pot ser objecte de *shedding* per varies metal·loproteases a l'hora tal i com succeeix, per exemple, amb Notch o el precursor del pèptid β -amiloide (APP) (Allinson et al., 2004; Brou et al., 2000; Fortini, 2001; Hartmann et al., 2002). Tot això afegeix un grau més de complexitat a l'hora de determinar les conseqüències funcionals del *shedding*. Fent una anàlisi retrospectiva segurament això explicaria el fracàs de la utilització sistemàtica

d'inhibidors de metal·loproteases en diferents assajos clínics (Coussens et al., 2002). De fet, la inhibició d'algunes metal·loproteases com, per exemple, l'MMP-8 (anomenada també colagenasa-2) genera major susceptibilitat a patir tumors de pell, tal i com s'ha observat en ratolins deficients per aquesta proteasa (Balbin et al., 2003). Segurament, el coneixement més complet dels substrats de l'MMP-8 hagués ajudat a predir amb major eficàcia les conseqüències de la seva inhibició.

La llista de substrats coneguts d'ADAM17 és considerable (taula 1) i la majoria d'ells s'han identificat utilitzant cèl·lules procedents de ratolins deficients pel domini d'unió a Zn (TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$). Així, la identificació de proTNF- α com a substrat d'ADAM17 es va realitzar a partir de l'observació que limfòcits T i monòcits procedents del ratolí TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ tenien una reducció del 80-90% en la formació de TNF- α soluble (Black et al., 1997).

Un altre substrat d'ADAM17 és proTGF- α , un dels lligands d'EGFR, i es va deduir degut a la incapacitat dels embrions del ratolí TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ de fusionar les parpelles, així com per la presència de defectes en el pèl i a la pell (Peschon et al., 1998). Aquest fenotip es va veure que era similar al que s'observava en ratolins mancats del factor de creixement transformant (TGF- α). Aquesta molècula es presenta com una proteïna transmembrana susceptible de ser tallada proteolíticament per una metal·loproteasa (Arribas et al., 1996; Luetke et al., 1999). La integració de totes aquestes dades va permetre identificar a ADAM17 com la metal·loproteasa responsable del *shedding* de proTGF- α (Peschon et al., 1998). L'obtenció de fibroblasts procedents del ratolí TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ ha permès generar una eina per comprovar si altres proteïnes poden ser substrats de *shedding*. Experiments de transfecció, per exemple, han demostrat que molècules com el receptor tipus II de la IL-1 i el receptor p55 TNF- α són substrats d'ADAM17 (Reddy et al., 2000).

Per altra banda, l'aïllament i caracterització parcial, l'any 1995, d'una línia cel·lular mutant anomenada M2 que presenta un defecte en el *shedding* de proTGF- α (Arribas et al., 1995) també ha contribuït a la identificació de nous substrats d'ADAM17 com, per exemple, la molècula d'adhesió L-selectina, la subunitat α del receptor de la IL-6 o la proteïna precursora del pèptid β -amiloide (APP) (Arribas et al.,

1996; Borrell-Pages et al., 2003; Le Gall et al., 2003; Merlos-Suarez et al., 2001; Tsou et al., 2001).

4.1.1.-El Factor de creixement transformant alfa (*proTGF- α*)

Totes aquestes aproximacions han permès identificar, fins ara, més de 30 substrats d'ADAM17. Un d'ells, el *proTGF- α* o factor de creixement transformant alfa, pertany a la família dels lligands de l'EGFR (de Larco et al., 1978) i és el factor de creixement més interessant des de un punt de vista mèdic ja que en tumors humans presenta una clara sobreexpressió. De fet, l'expressió de *proTGF- α* tant a nivell d'mRNA com de proteïna s'ha descrit en pràcticament tots els carcinomes coneguts (Derynck, 1992; Salomon et al., 1995). Per altra banda, la relació entre el factor de creixement i la proliferació de cèl·lules de carcinomes humans s'ha demostrat àmpliament. La primera vegada que es va establir aquesta relació va ser el 1990 quan tres estudis independents varen concloure que aquest factor de creixement era un potent mitogen *in vivo* (Jhappan et al., 1990; Matsui et al., 1990; Sandgren et al., 1990). Aquests estudis es varen realitzar en ratolins transgènics als quals se'ls hi va introduir el gen del factor de creixement sota el control d'un promotor no específic de teixit i es varen detectar hiperplàsies en fetge, pàncrees i en el tracte gastrointestinal així com carcinomes hepàtics i de mama. Aquests mateixos estudis també varen demostrar que, si bé el factor de creixement és important pel desenvolupament de tumors, l'exposició perllongada a aquest no és suficient i requereix la presència d'altres factors com, per exemple, algunes hormones sexuals. Així ho demostra el fet que la castració d'aquests animals transgènics redueix sensiblement l'aparició de tumors hepàtics mentre que la injecció de dihidrotestosterona en aquests mateixos animals recupera la capacitat per generar tumors (Takagi et al., 1992). Altres estudis han determinat que el bloqueig de l'expressió dels nivells endògens de *proTGF- α* mitjançant oligonucleòtids antisentit o anticossos neutralitzadors inhibeix significativament tant la proliferació *in vitro* (Casamassimi et al., 2000; Watkins et al., 1991) com el creixement de xenografts de carcinoma de colon *in vivo* (De Luca et al., 2000).

proTGF- α es localitza a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials (Dempsey et al., 2003) i la seva biosíntesi (figura 10) s'inicia al ER amb l'aparició

d'una forma de 18 kD que progressa a través de la via secretora cap a l'aparell de Golgi. En aquest compartiment subcel·lular la prolongació amino terminal d'aquesta forma és glicosilada donant lloc a una forma de proTGF- α de 20-22 kD. A continuació, arriba a la membrana plasmàtica a on és objecte d'un tall proteolític que allibera la prolongació amino terminal glicosilada donant lloc a una forma de 17 kD (Bringman et al., 1987). Finalment, aquesta forma és objecte de *shedding* per part d'ADAM17 produint-se una forma soluble de 6 kD i una forma ancorada a membrana de 15 kD (Arribas et al., 1995). A més a més de les modificacions glucídiques descrites, proTGF- α també pateix dues palmitoilacions a les cisteïnes 153 i 154 del domini citoplasmàtic encara que es desconeix la seva rellevància biològica (shum et al, 1996).

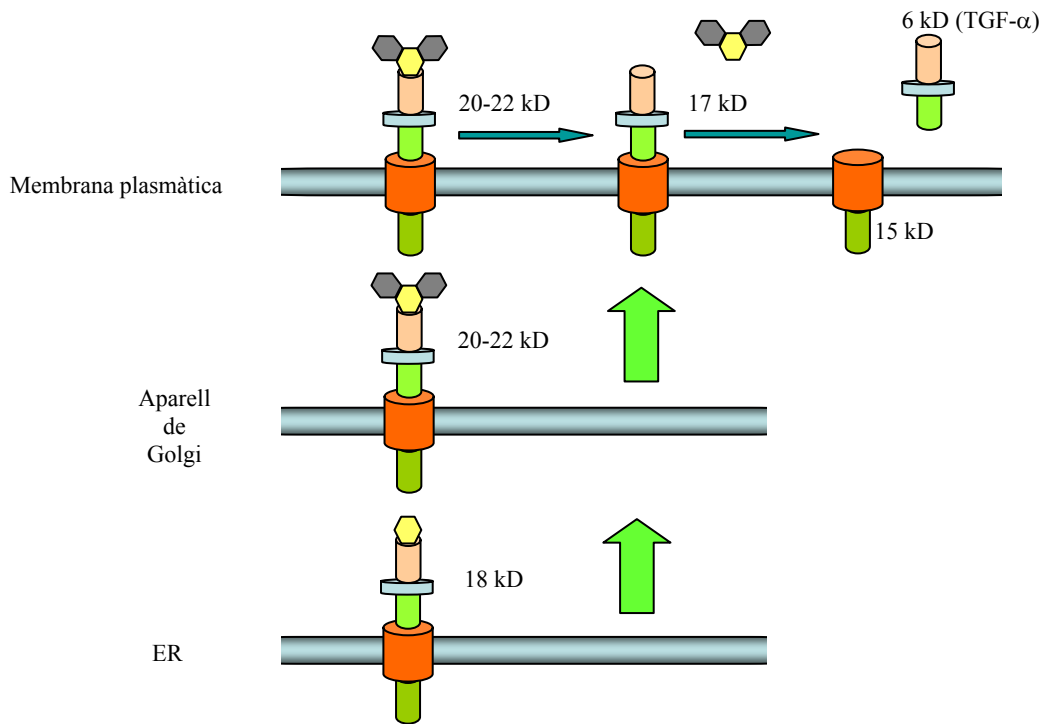


Figura 10. Biosíntesi de proTGF- α . Esquema a on es mostren les diferents formes de proTGF- α així com la seva localització subcel·lular. Prolongació amino terminal glicosilacions específiques de l'Aparell de Golgi.

El transport que pateix proTGF- α a través de la via secretora és un procés molt ben regulat a través de la seva seqüència aminoacídica del seu extrem carboxil terminal el qual s'uneix a proteïnes amb dominis de tipus PDZ (acrònim de PSD/SAP90, Dlg-A i ZO-1, les primeres proteïnes identificades amb aquest tipus de domini) (Briley et al., 1997; Fernandez-Larrea et al., 1999; Urena et al., 1999). En aquesta línia, s'ha identificat una proteïna amb dominis PDZ anomenada TACIP18 o sintenina que

interacciona amb proTGF- α i que és indispensable per la mobilització d'aquest des de l'Aparell de Golgi cap a la superfície cel·lular (Fernandez-Larrea et al., 1999). En treballs posteriors, s'han caracteritzat altres proteïnes d'aquesta família com, per exemple, SITAC (Similar a TACIP) (Borrell-Pages et al., 2000).

4.1.1.1-L'endocitosi: un mecanisme que regula l'activitat de proteïnes de la superfície cel·lular

A més a més del transport a través de la via secretora, un altre mecanisme que regula l'activitat de proTGF- α és el *shedding*. De fet, proTGF- α no té capacitat d'activar l'EGFR tal i com s'ha determinat en assajos de co-cultiu amb cèl·lules deficientes per ADAM17 que expressen proTGF- α i cèl·lules que sobreexpressen el receptor (Borrell-Pages et al., 2003). Per tant, donat que és indispensable el *shedding* per generar el factor de creixement actiu (TGF- α) cal que aquest mecanisme estigui especialment controlat. Tal i com s'ha descrit anteriorment, existeixen una gran varietat de factors fisiològics que activen l'activitat catalítica de les metal·loproteases. Ara bé, aquest processament proteolític, com qualsevol altre mecanisme biològic, necessita una regulació negativa. Això fa, per tant, que mecanismes com, per exemple, l'endocitosi puguin tenir un paper important. En general, l'endocitosi és un procés pel qual la cèl·lula internalitza la membrana plasmàtica i els seus components amb l'objectiu de regular funcions com, per exemple, la disponibilitat de nutrients o la senyalització intracel·lular (Fischer et al., 2006; Polo et al., 2006). Aquesta internalització requereix de la formació d'unes vesícules anomenades vesícules d'endocitosi que són les encarregades de transportar el material present a la superfície cel·lular (anomenat també *càrrega*; en anglès, *cargo*) cap al seu destí a dins de la cèl·lula. La formació de les vesícules s'inicia amb l'acumulació de la càrrega (lípidis i proteïnes) a una zona específica de la membrana plasmàtica. Un cop ha succeït això, unes proteïnes anomenades proteïnes d'encapsulació (*protein coat*) envolten la zona de la membrana a on s'ha acumulat la càrrega i estiren la membrana cap a l'interior de la cèl·lula per formar la vesícula d'endocitosi. A continuació, la vesícula es fusiona ràpidament amb l'endosoma primari (*Early endosome*) donant lloc a una nova estructura que pot ser o bé redirigida de nou a la membrana plasmàtica per reciclar la càrrega (endosoma de reciclatge; en anglès, *recycling endosome*) o bé dirigida als anomenats cossos

multivesiculars o endosomes tardans (En anglès, *Multivesicular bodies/late endosomes*) que, a l'hora, poden ser enviats al lisosoma per ser degradats o bé secretats a l'exterior via exosomes (figura 11) (Ehrlich et al., 2004; Fischer et al., 2006; Merrifield et al., 2005)

Les vesícules de transport i, per tant, els tipus d'endocitosi, es classifiquen segons la presència d'una proteïna d'encapsulació anomenada clatrina. Així, distingim les vesícules cobertes de clatrina que intervien a l'endocitosi regulada per clatrina (*Clathrin-mediated endocytosis; CME*) i les vesícules no cobertes de clatrina que intervien a l'endocitosi no regulada per clatrina (*Clathrin-independent endocytosis; CIE*). Aquesta última és important en zones de la membrana plasmàtica riques en colesterol com, per exemple, les zones d'acumulació de lípids (en anglès, *lipid rafts* (Polo et al., 2006).

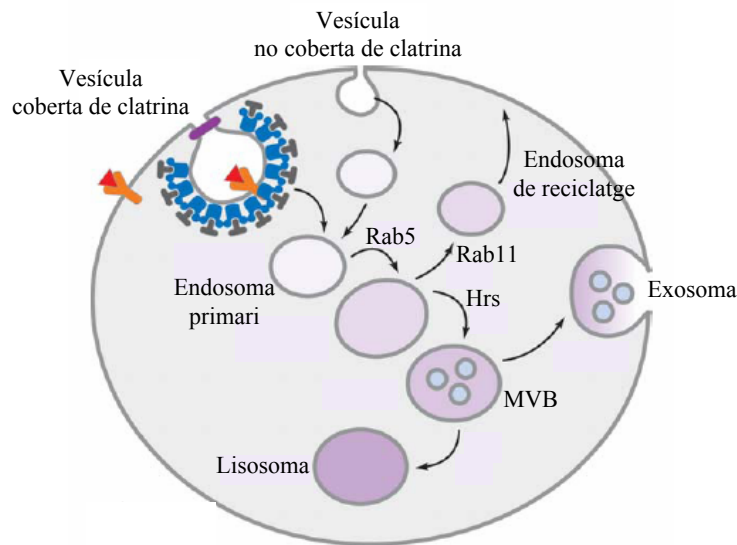


Figura 11. Esquema simplificat de la via d'endocitosi. Les vesícules d'endocitosi es formen a través de dues vies: la via independent de clatrina i la via dependent de clatrina. En aquesta última hi intervien el complex AP-2, la clatrina i la GTPasa dinamina () que s'encarrega de tancar la vesícula. Un cop formades, les vesícules es fusionen amb l'endosoma primari el qual és dirigit cap el seu destí en funció de la presència o no de determinats tipus de proteïnes com, per exemple, Hrs o les GTPases Rab. MVB: Cossos multivesiculars. (AP-2). (clatrina) (adaptat de (Fischer et al., 2006)).

L'endocitosi més ben estudiada i caracteritzada és la CME. Tal i com s'ha comentat anteriorment, les vesícules de transport relacionades amb aquest tipus d'endocitosi estan cobertes per un molècula anomenada clatrina. No obstant això, la clatrina no s'uneix directament a la membrana que envolta a la càrrega transportada sinó

que ho fa mitjançant unes proteïnes anomenades proteïnes adaptadores (*adaptor proteins*; AP). Per tant, en una vesícula de transport coberta de clatrina podem distingir tres capes: la primera està formada per la membrana plasmàtica que s'ha internalitzat i a on hi ha unida la càrrega, la segona capa està formada per les proteïnes adaptadores i, finalment, la tercera capa està formada per l'embolcall de clatrina (figura 11) (Edeling et al., 2006).

Una de les qüestions més controvertides sobre l'endocitosi fa referència a quins són els criteris que decideixen quin tipus de vesícules s'utilitzen en cada cas. Algunes càrregues utilitzen preferentment la CME, d'altres escullen la CIE i algunes poden ser objecte d'endocitosi a través de les dues vies. Una de les explicacions al fet que existeixin dues vies diferents podria ser que ambdues generessin respostes diferents. Un exemple el podem trobar en el receptor del factor de creixement transformant beta (R-TGF- β). Quan aquest és internalitzat mitjançant la CME es promou la senyalització a través de la via dependent de *Smads* mentre que quan la internalització es realitza a través de la CIE es promou la ràpida degradació del receptor i, per tant, la desaparició de la senyal (Di Guglielmo et al., 2003). Paral·lelament, treballs amb l'EGFR indiquen que aquest receptor també pot escollir entre les dues vies d'endocitosi. En aquest cas, el que succeeix és que l'activació de l'EGFR amb dosis baixes de lligand promou la CME mentre que altes dosis d'aquests permeten que el receptor s'internalitzi mitjançant la CIE. Per altra banda, es coneix que l'activació amb dosis elevades d'EGF dona lloc a la monoubiquitinació del receptor prèvia a la seva degradació (Chen et al., 2005). Tot això suggereix que en condicions d'escassetat de lligand la cèl·lula escolliria la CME que permet una senyalització sostinguda a l'endosoma mentre que en condicions d'elevada disponibilitat de lligand i, per tant, d'excés d'estimulació, la cèl·lula escolliria la CIE que implica la degradació del receptor i, per tant, el bloqueig de la senyalització (Polo et al., 2006).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'endocitosi regula processos clau de la biologia cel·lular. De fet, l'activació de receptors tirosina quinasa com l'EGFR per part d'EGF així com l'activació de receptors acoblats a proteïna G (GPCR) per part dels seus agonistes com, per exemple, el receptor β -adrenèrgic (β 2AR) promou l'endocitosi dependent de clatrina dels respectius complexos lligand-receptor donant lloc a la desaparició de la senyal (Carpentier et al., 1982; Goodman et al., 1996; Gorden et al.,

1978; Hanover et al., 1984; von Zastrow et al., 1992). Un mecanisme similar és important pel control del desenvolupament en *Drosophila*. La proteïna *Decapentaplegic* (Dpp, homòleg del factor de creixement transformant beta –TGF- β – en mamífers) és un factor soluble important pel desenvolupament d'aquest organisme i es distribueix en forma de gradients en el teixit embrionari proporcionant, així, informació posicional que determinarà quins gens s'activen a cada zona de l'embrió per donar lloc a les diferents estructures anatòmiques. Estudis recents indiquen que la generació d'aquests gradients és totalment dependent de l'endocitosi (Entchev et al., 2000).

Tot i que l'endocitosi es coneix com un mecanisme de desactivació per a molts receptors, estudis recents suggereixen que també pot tenir un paper clau més enllà d'una simple regulació negativa ja que s'ha observat l'activació de vies de senyalització específiques un cop el complex lligand-receptor s'ha internalitzat (Di Guglielmo et al., 2003; Sorkin et al., 2002).

4.1.2.-Identificació de nous substrats d'ADAM17

Fins ara, s'han aconseguit identificar substrats d'ADAM17 correlacionant la disminució d'un factor soluble conegut i que dóna lloc a un fenotip determinat amb l'absència de la metal·loproteasa. Aquest sistema és poc eficient ja que no necessàriament la disminució del factor soluble i l'absència de la metal·loproteasa han de tenir una relació de causa-efecte. A més a més, aquest sistema exigeix que es conegui la identitat del factor soluble. Això fa que proteïnes encara no identificades no puguin ser descrites com a substrats d'una metal·loproteasa. Per altra banda, anteriorment s'ha comentat la importància que té, des d'un punt de vista terapèutic, conèixer el degradoma de les metal·loproteases. Per tant, necessitem optimitzar mètodes potents de recerca que ens permetin detectar directament aquestes proteïnes. És raonable pensar que la contribució de la genòmica a l'estudi del degradoma d'una metal·loproteasa és limitada ja que l'activitat d'aquests enzims no consisteix en regular transcripcionalment gens sinó en modificar l'activitat de determinades proteïnes mitjançant el tall proteolític d'aquestes. Per tant, aquesta recerca s'ha de fer amb mètodes especialment adaptats a la identificació de proteïnes. Aquests mètodes s'engloben dins de la proteòmica, és a dir, l'estudi a gran escala dels productes gènics (proteïnes) d'un genoma mitjançant tècniques bioquímiques i d'espectrometria de masses. La optimització d'aquestes

estratègies ja ha permès identificar nous substrats d'ADAM17 a partir de barreges complexes de proteïnes (Guo et al., 2002; Tam et al., 2004).

4.1.2.1.-Paper de la proteòmica en la identificació de nous substrats d'ADAM17

El primer pas per a la identificació de proteïnes mitjançant aquestes tècniques és la seva separació. La tècnica més utilitzada per separar proteïnes és l'electroforesi en gels d'acrilamida (PAGE). Amb aquest mètode i utilitzant un medi que conté el detergent SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) podem separar proteïnes en funció de la seva massa. Una evolució de l'electroforesi la troben en l'anomenada electroforesi bidimensional (2D-PAGE) que permet separar les proteïnes mitjançant isoelectroenfoc (primera dimensió) abans d'iniciar la separació per pes molecular (segona dimensió). La separació per isoelectroenfoc es realitza en un gradient de pH immobilitzat present en una tira seca en el que les proteïnes es mouen fins a situar-se en un punt del gradient en què la seva càrrega neta és zero (punt isoelèctric). Per altra banda, la segona dimensió consisteix en la separació per pes molecular en gel d'acrilamida de les proteïnes separades per punt isoelèctric. La 2D-PAGE és actualment un dels mètodes més eficients per separar barreges molt complexes de proteïnes (Graves et al., 2002).

Una vegada s'han separat les proteïnes s'ha de procedir a la seva extracció del gel bidimensional i posterior identificació. Un dels mètodes d'anàlisi que es pot utilitzar és l'espectrometria de masses. Aquest sistema requereix un tractament previ de la mostra amb enzims proteolítics com, per exemple, la tripsina la qual genera un tall just a continuació d'un aminoàcid bàsic (lisina o arginina). Aquest procediment permet obtenir una barreja de pèptids que, a continuació, són ionitzats i separats en funció de la seva massa i la càrrega (m/z) que aquests adquireixen durant el procés d'ionització. Un cop l'espectròmetre de masses obté el mapa peptídic de la mostra estudiada, podem identificar les proteïnes presents a la barreja problema comparant els pèptids obtinguts amb el mapa peptídic calculat a partir de les seqüències de proteïnes conegudes presents en una base de dades.

La combinació dels mètodes de separació amb els mètodes d'anàlisi ha permès optimitzar estratègies per a la identificació de proteïnes en mostres complexes. Un d'aquests mètodes és el DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*) (Pitarch et al., 2003).

En línies generals aquest mètode està basat en el marcatge amb diferents fluorocroms de quantitats equivalents de les dues mostres que es volen comparar les quals, a continuació, es barregen i es corren en un mateix gel bidimensional. Finalment, s'obtenen les imatges corresponents a cada mostra mitjançant l'exposició del gel a les longituds d'ona d'excitació de cadascun dels dos fluorocroms. Aquest sistema elimina la variabilitat entre gels, disminueix el temps d'anàlisi i permet una quantificació més precisa del perfil d'expressió i, per tant, una identificació més eficient de les proteïnes diferencialment expressades.

5.-CONCLUSIÓ

Les metal·loproteases de la família ADAM tenen un doble funció, com a proteases responsables del *shedding* de factors de creixement o molècules d'adhesió i com a reguladores de l'adhesió cel·lular. Això suggereix que poden jugar un paper clau en el desenvolupament de determinats tumors tenint en compte la sobreexpressió que presenten en aquests tipus de teixits. Degut a això, s'ha provat sistemàticament l'ús d'inhibidors com a teràpia antitumoral que han fracassat degut, probablement, al desconeixement dels components del degradoma de les metal·loproteases i, per tant, de la funció real d'aquestes en el context cel·lular en què es troben. Per altra banda, ADAM17 és un membre de la família de les ADAM interessant perquè té un substrat, proTGF- α , que se sobreexpressa en determinats tumors. Donat que el *shedding* és clau pel control de la seva activitat és lògic pensar que la disponibilitat d'aquest factor de creixement per part d'ADAM17 a la superfície cel·lular pugui ser un interessant mecanisme de control de la seva funció.

Objectius

III. OBJECTIUS

El nostre grup està interessat en l'estudi del degradoma d'ADAM17, tant en la comprensió dels mecanismes que regulen la disponibilitat dels substrats coneguts d'ADAM17 a la superfície cel·lular com en la identificació dels components del degradoma d'aquesta metal·loproteasa. Per tant, els objectius d'aquest treball són:

1.- Caracteritzar els mecanismes involucrats en l'endocitosi de proTGF- α i determinar si el domini citoplasmàtic d'aquest juga un paper important en la seva regulació, igual com ho fa en el seu transport anterògrad.

2.-Identificar i caracteritzar el *shedding* de nous substrats d'ADAM17 mitjançant l'aplicació de la tècnica proteòmica del DIGE.

Resultats (I)

IV. RESULTATS (I)

1.-CARACTERITZACIÓ DELS MECANISMES QUE INTERVENEN EN L'ENDOCITOSI DE *proTGF- α*

proTGF- α és un dels lligands de l'EGFR (Larco et al., 1978) i és substrat de la metal·loproteasa ADAM17 (Arribas et al., 1995). Per caracteritzar el processament proteolític d'aquest factor de creixement varem analitzar mitjançant citometria de flux cèl·lules CHO establiment transfectades amb *proTGF- α* . La construcció utilitzada per transfectar les cèl·lules conté un epítip HA en el domini extracel·lular que és alliberat amb el tall proteolític (figura 14A).

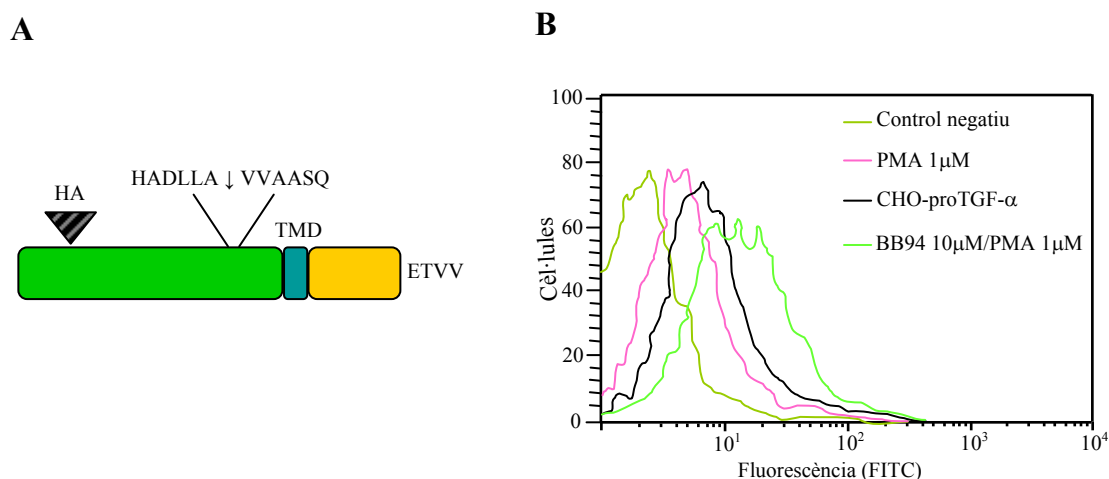


Figura 14. Anàlisi del *shedding* de *proTGF- α* en cèl·lules CHO. A, Esquema de la construcció de *proTGF- α* marcada amb l'epítip HA a on es pot veure la localització de l'epítip i el lloc de tall d'ADAM17 (HADLLA ↓ VVAASQ). B, Cèl·lules CHO establiment transfectades amb la construcció descrita a l'apartat anterior es varen tractar (—) o no (—) amb PMA 1 μM durant 15 minuts. Paral·lelament, un set de cèl·lules es varen tractar amb BB94 durant 16 hores abans del tractament conjunt amb PMA 1 μM durant 15 minuts (—). A continuació, les cèl·lules es varen incubar amb l'anticòs anti-HA i, seguidament, amb un anticòs secundari conjugat a FITC. Com a control negatiu es varen utilitzar cèl·lules sense marcar amb l'anticòs anti-HA (—).

Com es pot observar a la figura 14B, el tractament amb un activador no fisiològic del *shedding* (PMA) provoca l'alliberament de la forma soluble (*TGF- α*) del factor de creixement (també descrit a (Arribas et al., 1995; Villanueva de la Torre et al., 2004)). En canvi, el tractament combinat de les cèl·lules amb PMA i l'inhibidor de metal·loproteases BB94 bloqueja el *shedding* de *proTGF- α* . També es pot veure que el marcatge de superfície de les cèl·lules tractades amb l'inhibidor és superior al que

presenten les cèl·lules control. Això indica que aquestes cèl·lules tenen un *shedding* basal responsable de la secreció constitutiva de TGF- α . Donat que TGF- α és la forma activa del factor de creixement (Borrell-Pages et al., 2003; Dong et al., 1999) és raonable pensar que la seva producció pugui estar regulada mitjançant el control de la disponibilitat que ADAM17 té de proTGF- α a la superfície cel·lular. Un dels mecanismes implicats en aquest control és el transport a través de la via secretora. En el cas de proTGF- α sabem que el domini citoplasmàtic i, més concretament, els quatre aminoàcids de l'extrem carboxil terminal, són essencials pel correcte transport d'aquesta molècula a la superfície cel·lular (Borrell-Pages et al., 2000; Fernandez-Larrea et al., 1999; Urena et al., 1999). Ara bé, desconeixem totalment el paper que altres esdeveniments com, per exemple, el transport a través de la via endocítica poden exercir en el control de la disponibilitat a la superfície d'aquest factor de creixement. El fet que el domini citoplasmàtic tingui un paper clau en el transport de proTGF- α a través de la via secretora ens va animar a estudiar si també el tenia en la regulació de la seva endocitosi. Abans, però, varem caracteritzar el mecanisme d'endocitosi de proTGF- α .

1.1.-*proTGF- α és eficientment endocitat des de la superfície cel·lular*

Per determinar si proTGF- α era eficientment endocitat varem utilitzar un clon de cèl·lules MDCK establement transfectades amb la versió de proTGF- α anteriorment descrita (figura 14A) que varem marcar amb anticossos anti-HA. La incubació es va realitzar a 4°C per evitar la internalització del complex proTGF- α -anticòs. Un cop marcades, les cèl·lules es varen rentar per eliminar les restes d'anticòs i, a continuació, es varen incubar a 37°C per deixar que el complex proTGF- α -anticòs s'internalitzés. Finalment, les cèl·lules es varen fixar i marcar amb l'anticòs secundari. Paral·lelament, les mateixes cèl·lules es varen incubar a 4°C i, a continuació, fixar i marcar amb l'anticòs secundari. Tal i com es pot observar a la figura (figura 15A; panells superiors) les cèl·lules marcades a 4°C i directament fixades presentaven un marcatge exclusivament de membrana mentre que la incubació a 37°C donava lloc a un marcatge intracel·lular de tipus vesicular concomitant a una disminució en el marcatge de superfície. Això indicava, per tant, que proTGF- α era internalitzat. Aquestes vesícules no s'observaven en cèl·lules silvestres i, a més a més, altres línies cel·lulars tenien un

comportament similar (figura 15B; panells de l'esquerra). Això descartava, per una banda, que el marcatge fos un artefacte de l'anticòs i, per l'altra, que l'endocitosi observada en MDCK no fos una particularitat exclusiva d'aquesta línia cel·lular. Una crítica raonable a aquests resultats podia ser que, donat que proTGF- α és un substrat de *shedding*, les vesícules observades fossin el resultat de la internalització del factor soluble acomplexat amb el seu receptor (EGFR). Per demostrar això es va analitzar l'endocitosi en presència de BB-94 i es varen obtenir els mateixos resultats (veure figura 15A; panells inferiors). A més a més, la quantitat de vesícules observades no es veia afectada per la presència de BB-94 (figura 15A; panells de la dreta) la qual cosa indicava que pràcticament totes les vesícules contenien pro-TGF- α .

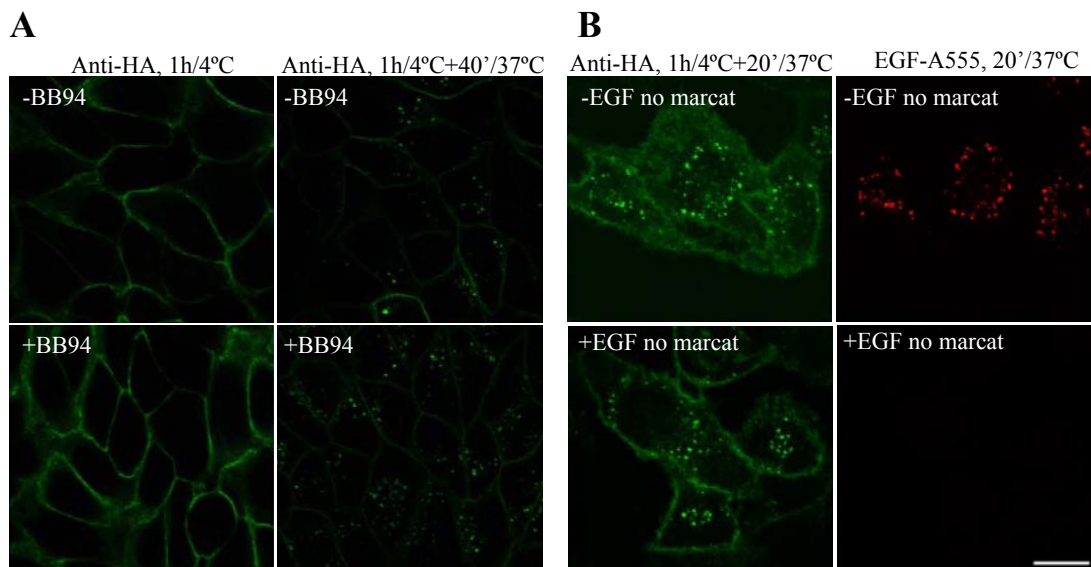


Figura 15. Anàlisi de la internalització de proTGF- α . A, Cèl·lules MDCK establement transfectades amb proTGF- α unit a l'epítot HA, tractades prèviament o no amb BB-94, es varen incubar amb anti-HA a 4°C i seguidament o bé es varen fixar directament (Anti-HA, 1h/4°C, els dos panells esquerra) o bé es varen rentar i es va fer una caça a 37°C en medi sense sèrum per, posteriorment ser fixades (Anti-HA, 1h/4°C+40'/37°C, els dos panells drets). B, Cèl·lules HeLa establement transfectades amb la mateixa construcció de proTGF- α , tractades prèviament o no amb EGF 20 mM, es varen incubar a 4°C amb anti-HA, rentar i es va fer una caça a 37°C en presència d'EGF marcat fluorescentment (EGF-Alexa Fluor555; 2 ng/ml). Barra: 20 μ m.

Per demostrar definitivament que l'endocitosi del factor de creixement era independent del receptor es va realitzar el mateix experiment d'immunofluorescència (IFF) utilitzant cèl·lules HeLa establement transfectades amb la construcció de pro-TGF- α que conté l'epítot HA en presència d'EGF el qual varem utilitzar com a competidor de TGF- α pel receptor (figura 15B; panells de l'esquerra). Aquest model de competició funciona molt bé en aquesta línia cel·lular ja que la internalització d'EGF marcat amb fluorocrom s'inhibeix totalment quan tractem les cèl·lules amb un excés d'EGF no marcat (figura 15B; panells de la dreta). De nou, els resultats indicaven que

l'endocitosis de proTGF- α era igualment eficient en presència d'un competidor per l'EGFR. Tenint en compte que l'habilitat d'ambdós lligands per unir-se al receptor és pràcticament indistingible (Massague, 1990) podem afirmar definitivament que proTGF- α és eficientment internalitzat des de la superfície cel·lular.

1.2.-L'endocitosis de proTGF- α és dependent de vesícules recobertes de clatrina

L'endocitosis és un procés que pot estar mediat per vesícules recobertes de clatrina (*Clathrin-coated vesicles; CCV*) o bé per vesícules no recobertes de clatrina. Per determinar quin tipus d'endocitosis seguia proTGF- α varem analitzar si les vesícules que contenien proTGF- α també estaven carregades amb el receptor de transferrina, una molècula utilitzada freqüentment com a marcador de la via endocítica dependent de clatrina.

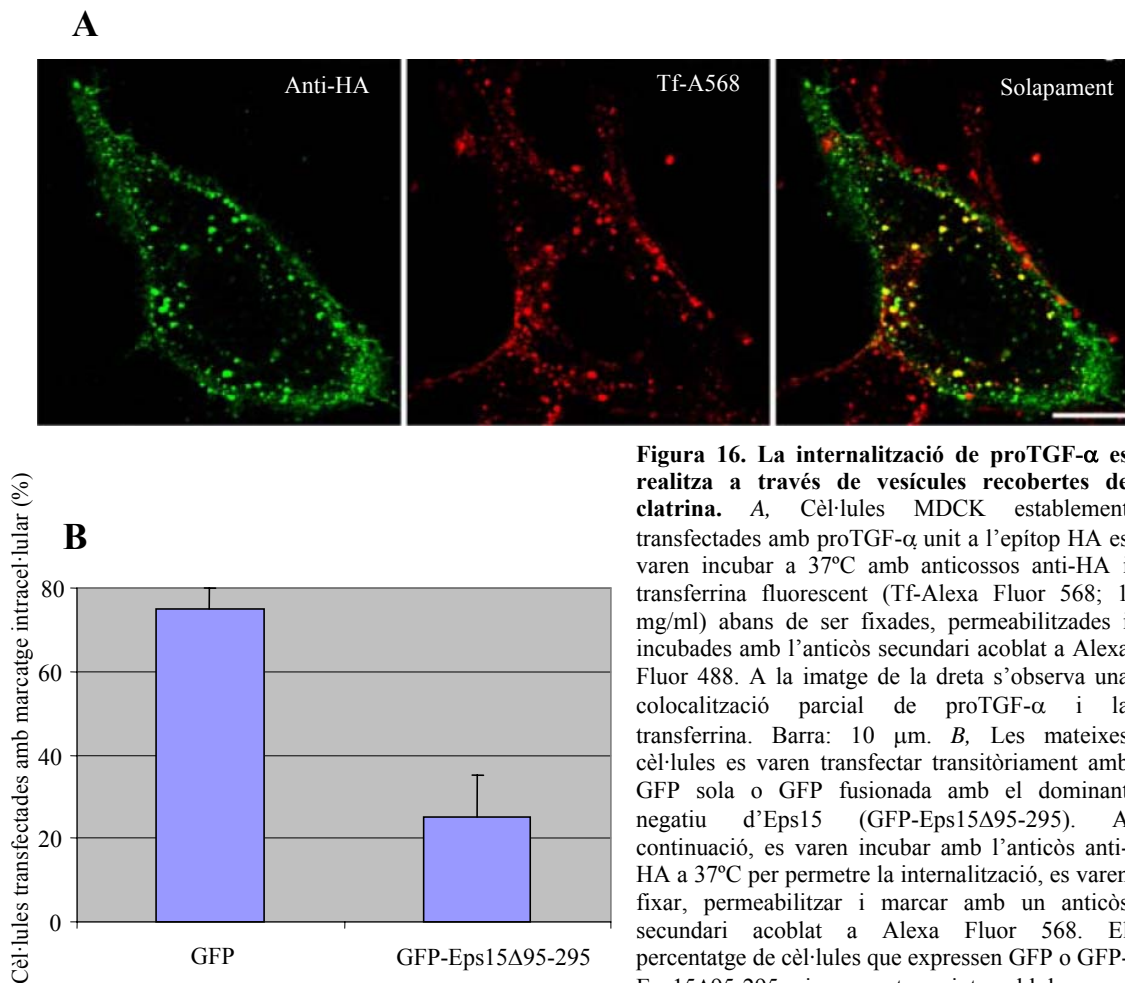


Figura 16. La internalització de proTGF- α es realitza a través de vesícules recobertes de clatrina. A, Cèl·lules MDCK establement transfectades amb proTGF- α unit a l'epítot HA es varen incubar a 37°C amb anticossos anti-HA i transferrina fluorescent (Tf-Alexa Fluor 568; 1 mg/ml) abans de ser fixades, permeabilitzades i incubades amb l'anticòs secundari acoblat a Alexa Fluor 488. A la imatge de la dreta s'observa una colocalització parcial de proTGF- α i la transferrina. Barra: 10 μ m. B, Les mateixes cèl·lules es varen transfectar transitòriament amb GFP sola o GFP fusionada amb el dominant negatiu d'Eps15 (GFP-Eps15 Δ 95-295). A continuació, es varen incubar amb l'anticòs anti-HA a 37°C per permetre la internalització, es varen fixar, permeabilitzar i marcar amb un anticòs secundari acoblat a Alexa Fluor 568. El percentatge de cèl·lules que expressen GFP o GFP-Eps15 Δ 95-295 i marcatge intracel·lular per proTGF- α es varen quantificar. L'histograma representa la mitja i desviació estàndard de quatre experiments independents.

A la figura 16A podem veure un experiment realitzat amb el clon de cèl·lules MDCK anteriorment descrit a on es mostra la colocalització parcial del receptor de transferrina, el qual s'ha marcat amb transferrina unida a un fluorocrom, amb proTGF- α , que s'ha marcat amb l'anticòs anti-HA. Aquest resultat ens indica, per tant, que proTGF- α és endocitat mitjançant un mecanisme dependent de clatrina. No obstant, per acabar de confirmar-ho varem analitzar l'endocitosi en la mateixa línia cel·lular transfectada transitòriament amb un dominant negatiu, Eps15 Δ 95-295, d'una proteïna d'unió al complex AP2 anomenada Eps15 que és crucial per la formació de la coberta de clatrina (Benmerah et al., 1999; Benmerah et al., 1998). Donat que Eps15 Δ 95-295 estava fusionada a GFP varem determinar el percentatge de cèl·lules transfectades que tenien marcatge de tipus vesicular i el varem comparar amb les cèl·lules transfectades amb GFP sola. Tal i com es pot veure a la figura 16B el dominant negatiu té un clar efecte inhibitori de l'endocitosi. Aquests experiments s'han realitzat en presència de BB-94 per descartar l'endocitosi de TGF- α acomplexat amb l'EGFR, per tant, tot indica que proTGF- α segueix la via d'endocitosi dependent de clatrina.

1.3.-El proTGF- α internalitzat s'escapa de la via de degradació lisosomal i és reciclat a la superfície cel·lular

Una vegada internalitzat mitjançant les vesícules recobertes de clatrina, proTGF- α colocalitza amb diferents marcadors endocítics. Així, per exemple, a temps curts veiem en cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb la construcció de proTGF- α una colocalització del factor de creixement amb un marcador d'endosomes primaris (*early endosomes*) com és l'EGFR (figura 17A; panell esquerre). També es pot veure la colocalització entre proTGF- α i el receptor de transferrina, un altre marcador d'endosomes primaris, en el clon de cèl·lules MDCK establement transfectat (figura 16A). En canvi, a temps llargs, pràcticament no s'observa colocalització entre proTGF- α i l'EGFR (figura 17A; panell dret). Això indica que a partir d'un cert punt les dues molècules segueixen rutes endocítiques diferents. Es coneix que el complex EGF:EGFR segueix la via de degradació lisosomal (Sorkin et al., 1993), per tant, una de les rutes alternatives que podria seguir proTGF- α és la via de reciclatge cap a la superfície cel·lular. Per demostrar aquesta hipòtesi es va transfectar transitòriament amb la construcció de proTGF- α un clon de cèl·lules MDCK que expressa de forma estable una

fusió de GFP i una proteïna anomenada celubrevina que s'ha descrit com un marcador d'endosomes de reciclatge (Daro et al., 1996). La colocalització observada entre aquestes dues molècules indica que proTGF- α s'escapa de la via de degradació lisosomal i segueix la via de reciclatge cap a la superfície cel·lular (figura 17B).

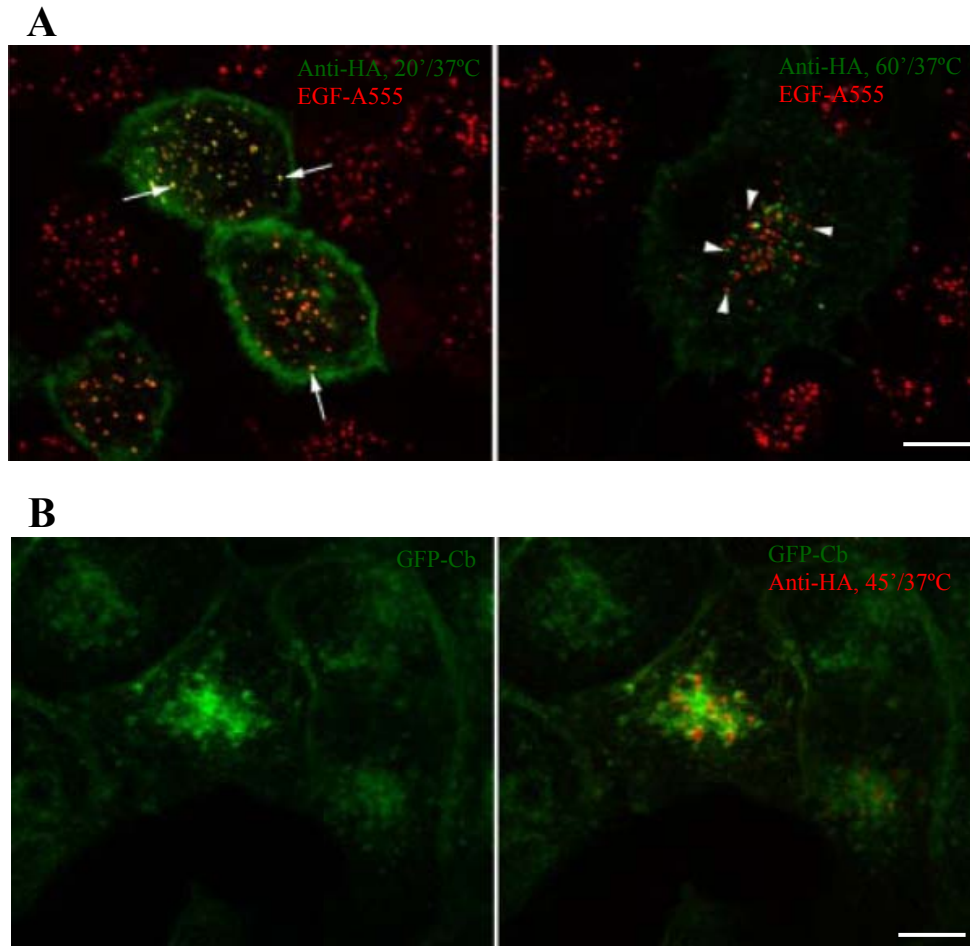


Figura 17. proTGF- α s'escapa de la via lisosomal una vegada s'ha internalitzat. A, Cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb proTGF- α unit a l'epítot HA es varen incubar amb l'anticòs anti-HA 1 hora a 4°C. A continuació, es varen rentar i es va realitzar una caça a 37°C amb medi sense sèrum i en presència d'EGF-Alexa Fluor 555 (EGF-A555). Seguidament, les cèl·lules es varen fixar, permeabilitzar i incubar directament amb un anticòs secundari acoblat a Alexa Fluor A488. Les fletxes blanques indiquen la colocalització de proTGF- α amb EGF-A555 en els endosomes primerencs a temps curts de caça (20'; panell esquerre) mentre que aquesta desapareix a temps llargs d'incubació (puntes de fletxa; panell dret). B, Cèl·lules MDCK establement transfectades amb GFP-celubrevina (GFP-Cb) es varen transfectar transitòriament amb proTGF- α unit a l'epítot HA i incubar amb l'anticòs anti-HA 1 hora a 4°C. Seguidament es varen rentar i es va fer una caça de 45' amb medi sense sèrum abans de processar les cèl·lules com en el punt A. En aquest cas, s'observa una colocalització entre la celubrevina i proTGF- α als endosomes de reciclatge perinuclears. Barra: 10 μ m.

Per confirmar definitivament aquesta hipòtesi varem utilitzar el clon de cèl·lules MDCK que sobreexpressen la construcció de proTGF- α i el varem incubar amb l'anticòs anti-HA durant 1 hora a 37°C. Posteriorment, varem sotmetre a les cèl·lules a

un rentat àcid per eliminar el marcatge de superfície i, seguidament, les varen retornar a 37°C per permetre el transport de proTGF- α des de les vesícules de reciclatge cap a la superfície cel·lular. Tal i com es pot veure a la figura 18A (panell dret) proTGF- α apareix de nou a la superfície cel·lular indicant que el factor de creixement és reciclat a la membrana plasmàtica una vegada s'ha escapat de la via de degradació lisosomal.

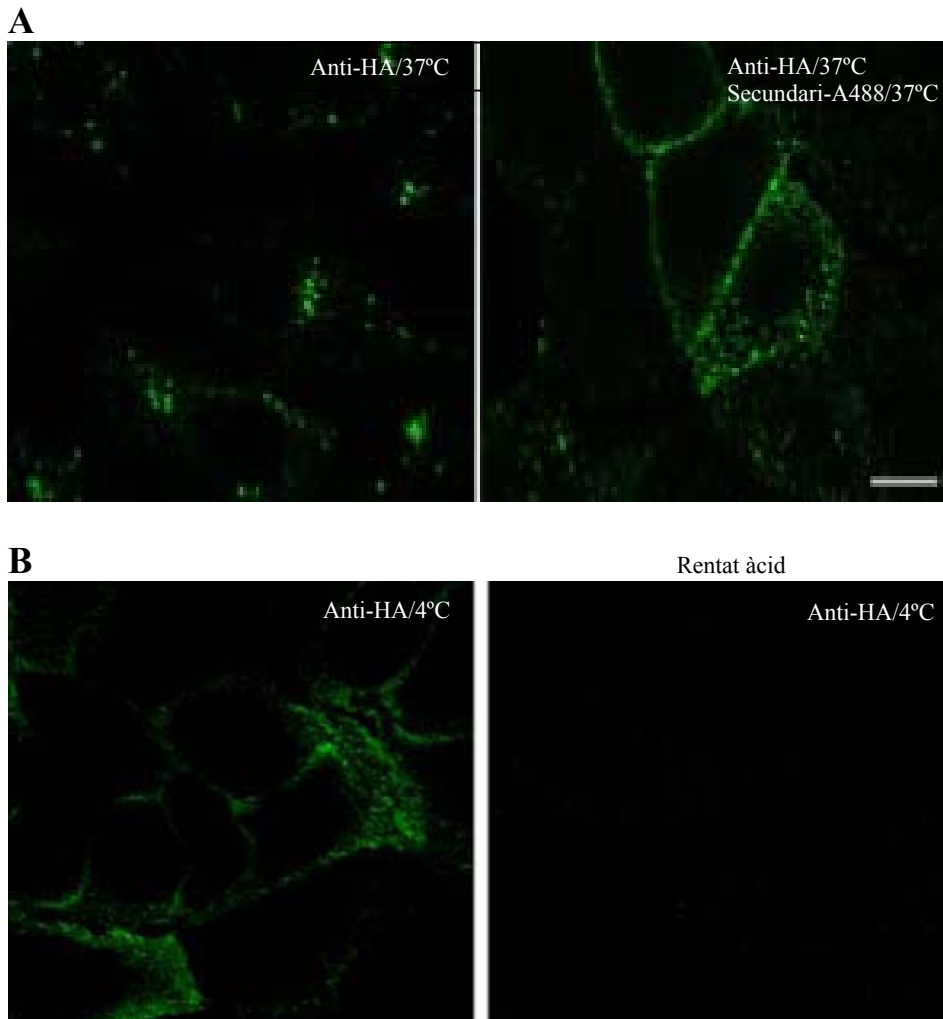


Figura 18. proTGF- α recicla a la superfície cel·lular. A, Cèl·lules MDCK establiment transfectades amb proTGF- α unit a l'epítot HA es varen incubar 1 hora a 37°C amb l'anticòs anti-HA. A continuació, es va fer un rentat àcid per eliminar el marcatge de superfície per, seguidament, sotmetre les cèl·lules a dos tipus de tractaments. Per una banda, un grup de cèl·lules varen ser immediatament fixades, permeabilitzades i incubades amb un anticòs secundari acoblat a Alexa Fluor 488 (panell esquerre) i, per l'altra, un altre grup va ser retornat a 37°C durant 1 hora per determinar quina localització final aconseguia el proTGF- α internalitzat (panell dret). B, Les mateixes cèl·lules descrites a l'apartat A es varen incubar durant 1 hora a 4°C amb l'anticòs anti-HA. Seguidament, les cèl·lules es varen rentar (panell dret) o no (panell esquerre) amb la solució àcida, es varen fixar, permeabilitzar i incubar amb un anticòs secundari acoblat a Alexa Fluor 488 per tal de determinar l'efectivitat del rentat àcid. Barra: 10 μ m.

L'efectivitat del rentat es va determinar de dues maneres: la primera, mitjançant la observació de que les cèl·lules marcades amb l'anticòs anti-HA durant 1 hora a 37°C, fixades just després i sotmeses al rentat àcid perden el marcatge de superfície però no el

marcatge intracel·lular (figura 18A; panell esquerre). La segona, mitjançant la realització d'aquest mateix control incubant les cèl·lules amb l'anticòs anti-HA a 4°C. En aquest cas varem observar la pèrdua completa del marcatge de membrana juntament amb una absència de marcatge intracel·lular (figura 18B). Finalment, destacar que l'assaig complert es va realitzar en presència de BB-94 per tal de controlar, per una banda, que el marcatge observat correspongués a proTGF- α i, per altra banda, que proTGF- α un cop reciclat no fos sotmès a *shedding* amb la conseqüent pèrdua de senyal a la superfície cel·lular.

1.4.-*La deleció del domini citoplasmàtic de proTGF- α bloqueja l'endocitosi del factor de creixement i n'incrementa la seva expressió a la membrana plasmàtica*

L'endocitosi depenent de vesícules recobertes de clatrina requereix del reconeixement de seqüències específiques localitzades en el domini citoplasmàtic de les proteïnes (Aridor et al., 2002), per tant, és raonable pensar que la deleció d'aquest domini podria afectar a aquest mecanisme. Per poder demostrar aquesta hipòtesi varem utilitzar una forma silvestre de proTGF- α (proTGF- α WT) i una altra sense el domini citoplasmàtic (proTGF- α Δ CT-PDZ) però que conservava els quatre aminoàcids de l'extrem carboxil terminal (ETVV) per tal de no afectar el transport depenent de proteïnes PDZ del factor de creixement (Borrell-Pages et al., 2000; Fernandez-Larrea et al., 1999; Urena et al., 1999).

Aquestes construccions contenen un epítip myc al domini extracel·lular que és alliberat quan proTGF- α és objecte de *shedding* per part d'ADAM17 (figura 19A). Amb aquests cDNAs es varen obtenir clons estables en cèl·lules CHO dels quals se'n varen seleccionar dos, mitjançant l'anàlisi per marcatge metabòlic, que expressessin nivells similars de les dues construccions (figura 19B). Amb aquest assaig radioactiu també es va poder determinar que proTGF- α Δ CT-PDZ és sintetitzat i glicosilat sense cap problema ja que presenta un patró de bandes igual al que s'observa per la forma silvestre.

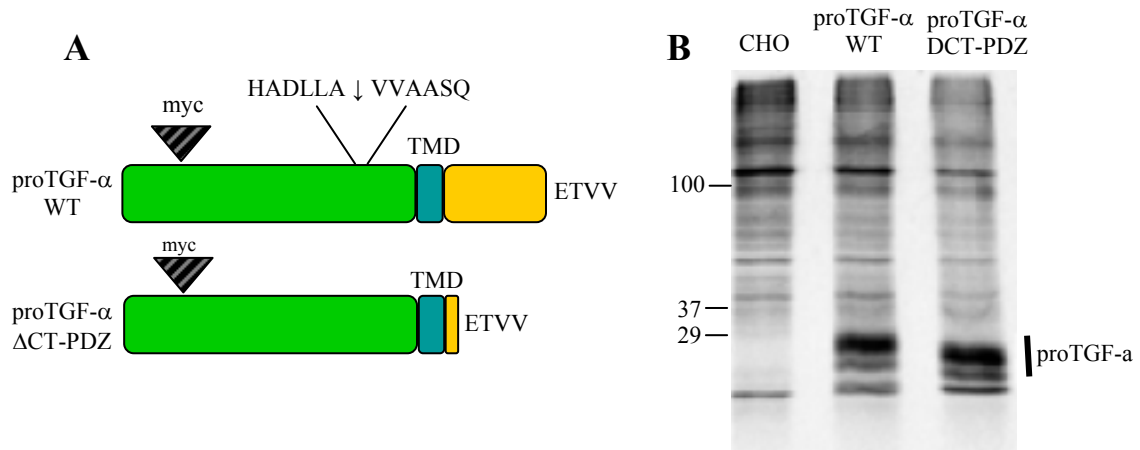


Figura 19. Caracterització de les construccions proTGF- α WT i proTGF- α Δ CT-PDZ. A, Esquema de les dues construccions a on es pot veure la localització de l'epítot myc i el lloc de tall d'ADAM17 (HADLLA \downarrow VVAASQ). B, Marcatge metabòlic de dos clons que expressen les dues construccions.

La localització subcel·lular d'aquestes construccions, determinada mitjançant IFF i utilitzant anticossos anti-myc (figura 20A i 20B), va ser similar a la descrita en cèl·lules MDCK i HeLa (intens marcatge intracel·lular, sobretot a la regió perinuclear, i marcatge suau a la membrana plasmàtica). No obstant això, al comparar el marcatge de proTGF- α a la superfície cel·lular en els dos clons de CHO ens varem adonar que aquest era més intens en el clon que expressava proTGF- α Δ CT-PDZ (figura 20A). Aquesta diferència era més evident quan marcàvem les cèl·lules a 4°C (figura 20B). A un resultat similar s'arriba mitjançant l'anàlisi i quantificació dels nivells d'expressió a la superfície cel·lular d'ambdues construccions per citometria de flux (figura 20C). Això suggeria, per tant, que l'augment del marcatge a la superfície cel·lular en el clon que expressava proTGF- α Δ CT-PDZ podria ser degut a un defecte en el mecanisme d'endocitosi. No obstant això, aquesta hipòtesi no descartava que l'absència del domini citoplasmàtic afectés a altres mecanismes que regulen els nivells de proTGF- α a la superfície cel·lular com, per exemple, el *shedding*. Per aclarir aquest punt es va comparar el *shedding* de proTGF- α WT i proTGF- α Δ CT-PDZ mitjançant el tractament dels dos clons amb PMA durant diferents temps i posterior anàlisi per citometria de flux. A la figura 20E es pot veure, per cada clon, una quantificació del marcatge a la superfície cel·lular per cada un dels tractaments amb PMA que s'ha normalitzat respecte al marcatge observat en les cèl·lules sense tractar. El resultat indica que el grau de *shedding* en els dos clons no varia significativament. A més a més, el tractament amb BB-94, encara que incrementa els nivells del factor de creixement a la membrana plasmàtica degut a la inhibició del *shedding*, no modifica la diferència d'aproximadament 4 vegades que hi ha en el *shedding* de les dues construccions en

absència d'inhibidor (figures 20C i 20D). Per tant, l'augment del nivell d'expressió de proTGF- α Δ CT-PDZ a la superfície cel·lular no és degut a un defecte en el *shedding* causat per la falta del domini citoplasmàtic.

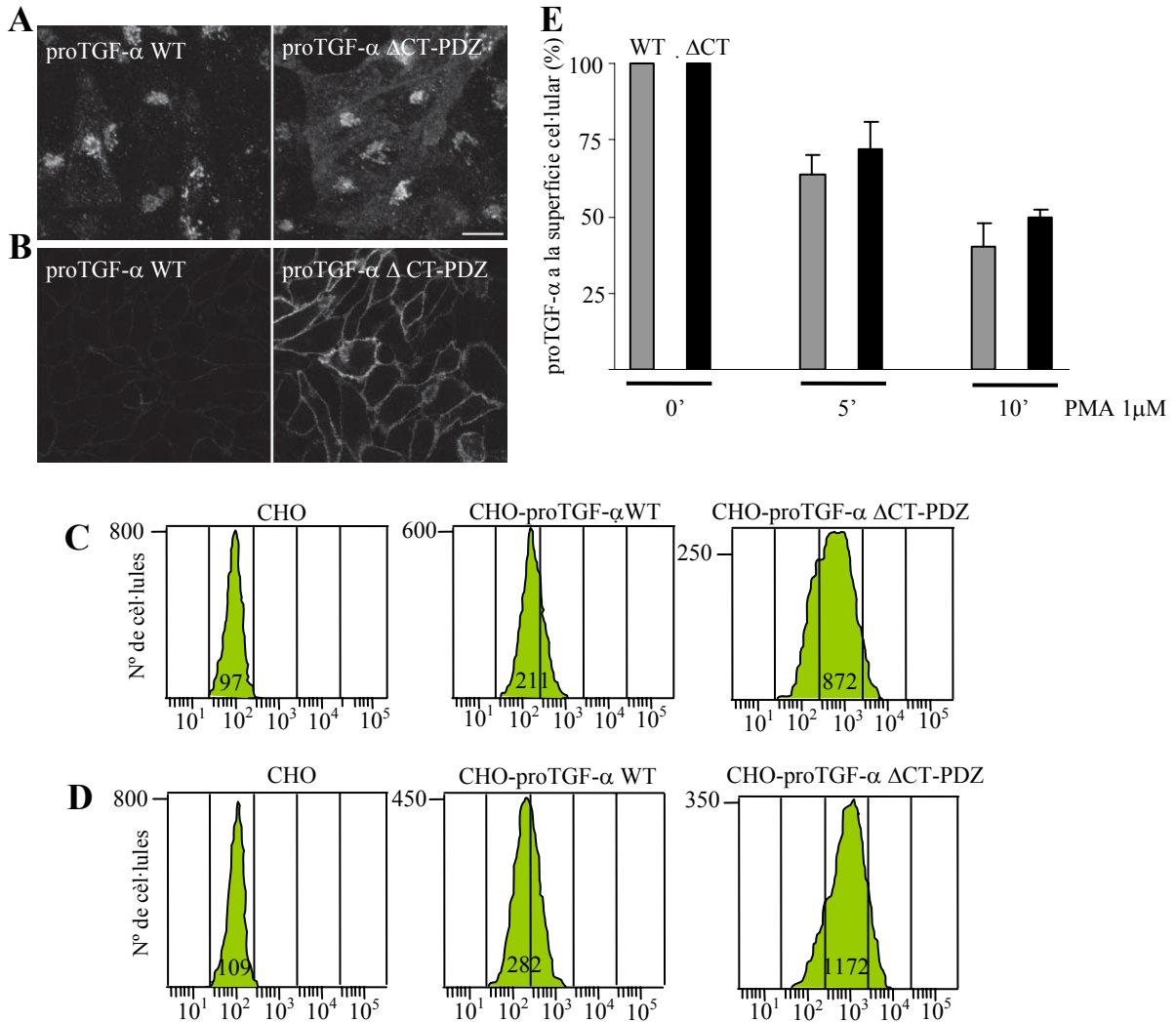


Figura 20. La deleció del domini citoplasmàtic incrementa els nivells de proTGF- α a la superfície cel·lular. *A*, Cèl·lules CHO que sobreexpressen la forma silvestre i mutant de proTGF- α són fixades, permeabilitzades i incubades amb l'anticòs anti-myc seguit d'una incubació amb l'anticòs secundari conjugat amb Alexa Fluor 488. *B*, les mateixes cèl·lules utilitzades en *A* són incubades a 4°C amb l'anticòs anti-myc seguit de la seva fixació, permeabilització i incubació amb l'anticòs secundari conjugat amb Alexa Fluor 488. Barra: 10 μ m. *C i D*, Les mateixes cèl·lules utilitzades en *A* són incubades en absència (*C*) o presència (*D*) de BB-94 durant 16 hores i, a continuació, marcades en suspensió amb l'anticòs anti-myc (4°C) seguit d'un anticòs secundari conjugat a fluoresceïna (4°C). Finalment, les cèl·lules són analitzades mitjançant citometria de flux. *E*, Les mateixes cèl·lules utilitzades en *A* són tractades amb PMA 1 μ M durant diferents temps abans de ser marcades amb l'anticòs anti-myc (4°C) seguit d'un anticòs secundari conjugat a fluoresceïna (4°C). A continuació, les cèl·lules són analitzades mitjançant citometria de flux i els resultats representats al gràfic de la figura (mitjana i desviació estàndard de la fluorescència mitja de tres experiments diferents).

Aclarit aquest punt, ens varem centrar en determinar si el domini citoplasmàtic afectava el procés d'endocitosis de proTGF- α . Mitjançant assajos d'internalització utilitzant els dos clons de CHO incubats amb anticossos anti-myc a 37°C varem

demostrar que la forma mutant de proTGF- α tenia greument afectada l'endocitosi. A la figura 21A podem observar els resultats d'una anàlisi mitjançant IFF dels dos clons de cèl·lules CHO a on, efectivament, el clon que sobreexpressa proTGF- α Δ CT-PDZ presenta un major marcatge a la superfície cel·lular i una disminució en el marcatge de vesícules respecte al clon que sobreexpressa proTGF- α WT. Aquesta mateixa observació la varem realitzar mitjançant assajos d'internalització quantificats mitjançant citometria de flux. En aquest cas, el que varem fer va ser incubar els dos clons amb l'anticòs anti-myc a 4°C i, a continuació, els varem deixar a 37°C a diferents temps per tal de facilitar l'endocitosi del complex proTGF- α -anticòs. Durant tot l'experiment, les cèl·lules estaven en presència de BB-94. Finalment, varem quantificar el marcatge de superfície dels dos clons a cada un dels temps indicats i els varem normalitzar respecte el temps zero. Els resultats es poden veure a la figura 21B i clarament indiquen que el clon que sobreexpressa proTGF- α Δ CT-PDZ té més dificultats per internalitzar el factor de creixement, per tant, podem concloure que la construcció proTGF- α Δ CT-PDZ té greument alterada la seva endocitosi.

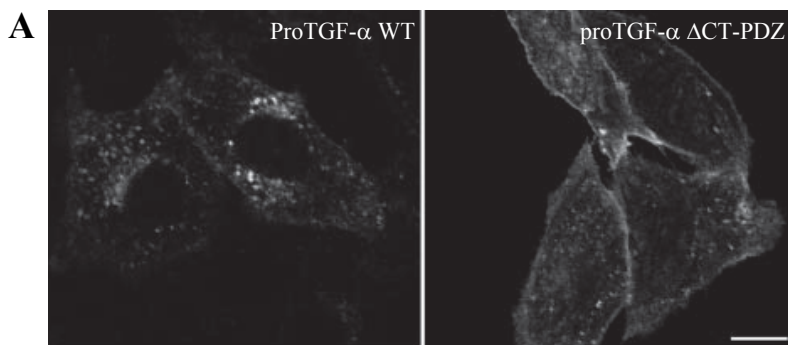
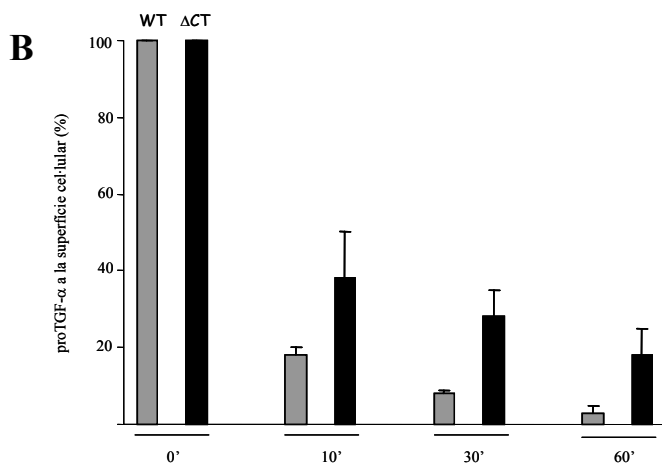


Figura 21. La deleció del domini citoplasmàtic de proTGF- α bloqueja la internalització del factor de creixement. A, Les cèl·lules CHO que sobreexpressen la forma silvestre (panell esquerre) i mutant (panell dret) de proTGF- α s'incuben a 37°C durant 1 hora. A continuació, es fixen, permeabilitzen i finalment es marquen amb un anticòs secundari conjugat amb Alexa Fluor 488. Barra: 10 μ m. B, Els mateixos clons utilitzats en A s'incuben en suspensió amb l'anticòs anti-myc a 4°C durant 1 hora. Seguidament, les incubem a 37°C amb l'anticòs secundari conjugat a Alexa Fluor 488 durant els temps indicats al gràfic i es quantifica el marcatge de superfície mitjançant citometria de flux (representació de la mitja i desviació estàndard de la fluorescència mitja de 4 experiments diferents. Test t desaparellat amb un valor de p a dues cues de 0.02, 0.003 i 0.04 per 10, 30 i 60 minuts, respectivament).



1.5.-Activació de l'EGFR per part de proTGF- α Δ CT-PDZ

El fet que proTGF- α Δ CT-PDZ s'expressi més eficientment a la superfície cel·lular que la forma silvestre afegit al fet que ambdues versions de proTGF- α siguin igualment susceptibles al *shedding* suggereix que la seva funcionalitat, és a dir, la capacitat que tenen per activar l'EGFR, podria ser diferent en les dues construccions. Per demostrar aquesta hipòtesi varem analitzar el grau de fosforilació de l'EGFR present en cèl·lules A431 per part dels clons de CHO establiment transfectats amb proTGF- α i proTGF- α Δ CT-PDZ. Els resultats d'aquest assaig varen demostrar que les cèl·lules que expressen la forma proTGF- α Δ CT-PDZ tenen la capacitat d'activar més eficientment l'EGFR que la forma silvestre (figura 22) i, per tant, confirmen que la internalització de proTGF- α juga un paper en la regulació de l'activitat del factor de creixement. Així, aquests resultats suggereixen un nou mecanisme de regulació de l'EGFR a través de l'endocitosis de proTGF- α .

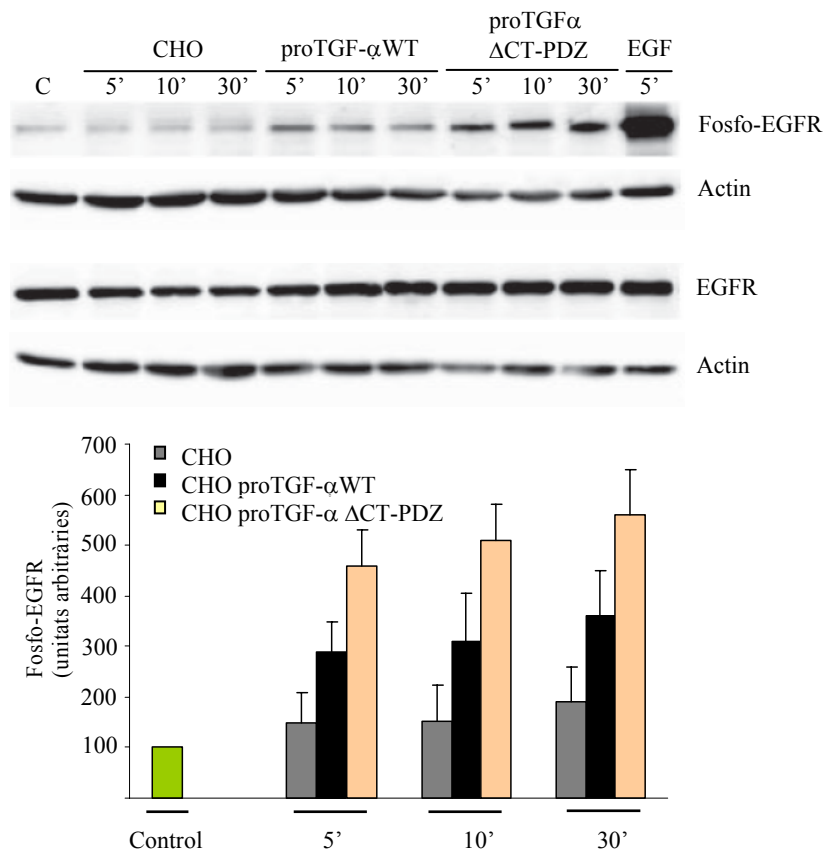


Figura 22. Activació de l'EGFR mitjançant cèl·lules CHO que sobreexpressen la forma silvestre i mutant de proTGF- α . Cèl·lules A431 cultivades en absència de sèrum durant 24 hores es varen incubar amb cèl·lules CHO, CHO proTGF- α WT i CHO proTGF- α Δ CT durant els temps indicats. En paral·lel, es varen tractar cèl·lules A431 amb EGF (100 ng/ml) durant 5 minuts com a control. A continuació, les cèl·lules CHO es varen rentar i les A431 es varen lliurar i analitzar per western-blot els nivells d'EGFR total (EGFR), EGFR fosforilat (fosfo-EGFR) i actina (panell superior). En el panell inferior es pot veure una quantificació dels nivells de fosfo-EGFR de tres experiments diferents representada com el percentatge de fosfo-EGFR induït per les diferents línies cel·lulars i agafant com a 100% els nivells de fosfo-EGFR de les cèl·lules A431 sense tractar normalitzats amb l'EGFR. Els valors de p en el test a dues cues per les CHO-proTGF- α WT comparades amb les CHO-proTGF- α Δ CT són <0.0001, 0.007 i 0.0036 per 5, 10 i 30 minuts, respectivament.

Discussió (I)

V. DISCUSSIÓ (I)

1.-CARACTERITZACIÓ DELS MECANISMES INVOLUCRATS EN L'ENDOCITOSI DE *proTGF- α*

Els factors de creixement controlen diversos processos biològics com la proliferació, diferenciació o migració cel·lular. Aquest control l'exerceixen mitjançant l'activació de receptors específics molts dels quals pertanyen a la família de receptors del tipus RTK (Blume-Jensen et al., 2001). La desregulació de més de 30 d'aquests receptors s'ha relacionat amb l'aparició de càncer (Blume-Jensen et al., 2001), per tant, és important conèixer quins són els mecanismes que intervenen en l'activació i desactivació d'aquestes molècules per poder establir posteriorment teràpies contra aquesta patologia. Un d'aquests mecanismes és l'endocitosi el qual es troba greument afectat en una gran varietat de processos cancerosos (Dikic et al., 2003). Fins ara l'endocitosi s'havia plantejat com un mecanisme de regulació de l'activitat dels RTKs consistent bàsicament en la internalització i posterior degradació al lisosoma del complex format pel receptor i el seu lligand. Ara bé, també és raonable pensar que l'endocitosi podria controlar l'activitat dels RTKs mitjançant la regulació de la disponibilitat a la superfície cel·lular del mateix receptor, del lligand o bé d'ambdues molècules. En aquesta línia, els resultats presentats han demostrat que l'activitat d'EGFR, un membre de la família dels RTKs, és eficientment controlada per l'endocitosi d'un dels seus lligands: el *proTGF- α* . A més a més, en aquest control també hi intervé un altre mecanisme: el reciclatge a la superfície cel·lular del factor de creixement.

La utilització del dominant negatiu d'una de les proteïnes clau per la formació de les vesícules recobertes de clatrina, anomenada Eps15, ens va permetre demostrar que *proTGF- α* és endocitat mitjançant aquest tipus de vesícules. Això ho varem confirmar amb la observació de que *proTGF- α* colocalitza amb dos marcadors clàssics de la via d'endocitosi depenent de clatrina com són el receptor de transferrina i el complex EGFR:EGF. A continuació, varem demostrar que *proTGF- α* s'escapa de la via de degradació lisosomal i es localitza en endosomes de reciclatge. Finalment, els

experiments descrits a la figura 18 ens varen permetre concloure que aquestes vesícules eren les responsables del reciclatge de proTGF- α a la superfície cel·lular. Així, amb aquest treball afegim dos nous conceptes que, juntament amb la síntesi de proteïnes o el transport a través de la via secretora, intervenen en la regulació de la disponibilitat de proTGF- α a la superfície cel·lular: l'endocitosi i el reciclatge.

L'endocitosi és un procés que molt probablement estigui sota un estricte control per part de la cèl·lula. Sabem que el domini citoplasmàtic d'algunes proteïnes intervenen tant en el seu transport anterògrad com retrògrad. Així doncs, varem analitzar si aquest domini tenia algun paper en el control de l'endocitosi. Per fer-ho, varem utilitzar una construcció de proTGF- α que no tenia el domini citoplasmàtic però que mantenia els quatre últims aminoàcids carboxil terminal necessaris per un correcte transport del factor de creixement a través de la via secretora. Tal i com esperàvem, la construcció mutant es sintetitzava correctament i no presentava cap tipus de deficiència a nivell de modificacions postraduccional així com de transport a la superfície cel·lular o en el *shedding*. L'única alteració important que varem detectar va ser que la internalització de la construcció mutant estava inhibida de forma important de tal manera que les cèl·lules que l'expressaven presentaven un marcatge a la superfície cel·lular molt més intens. Aquest resultat indicava que l'endocitosi era un mecanisme que podia controlar de forma eficient la disponibilitat de proTGF- α a la superfície cel·lular. Donat que, a més a més, les cèl·lules que expressaven la forma mutant també tenien més capacitat per activar l'EGFR que les que expressaven la forma silvestre varem concloure que l'endocitosi també regulava l'activitat del factor de creixement. La forma com el domini citoplasmàtic controla l'endocitosi de proTGF- α no es coneix però molt probablement, com ja s'ha descrit en altres casos, ho faci mitjançant motius presents en aquesta regió de la proteïna (Aridor et al., 2002). Consistent amb aquesta hipòtesi, en el domini citoplasmàtic de proTGF- α ja s'hi han descrit motius essencials relacionats amb el transport encarregat de distribuir proTGF- α a la membrana basolateral (Dempsey et al., 2003).

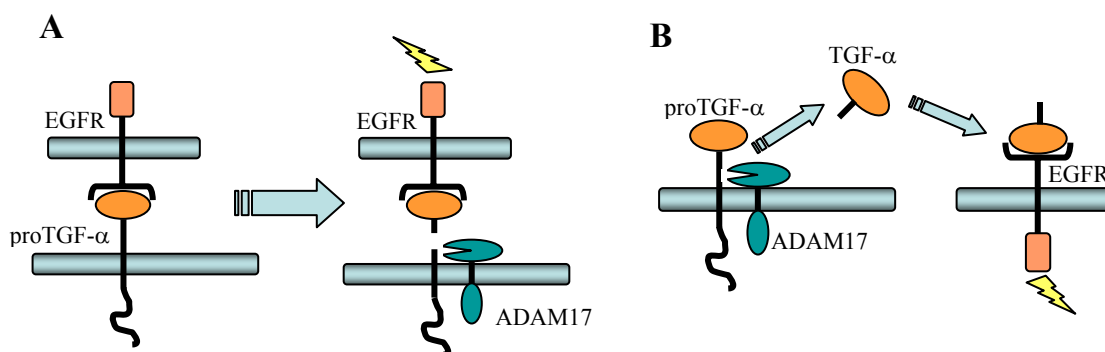


Figura 23. Models d'activació del receptor d'EGF (EGFR) per part de proTGF- α . A, Model d'activació juxtacrina. B, Model d'activació paracrina (veure el text per més detalls).

Alguns autors han descrit que proTGF- α pot actuar de forma juxtacrina unint-se a l'EGFR de la cèl·lula adjacenta, tant *in vitro*, en cèl·lules tumoral humanes en cultiu, (Baselga et al., 1996) com, *in vivo*, en mucosa gàstrica i de colon de rates (Xiao et al., 2001). Un cop establerta la unió, el *shedding* del factor de creixement donaria lloc a la forma soluble que s'encarregaria d'activar el receptor (figura 23A) (Borrell-Pages et al., 2003). Per altra banda, també sabem que ADAM17 pot actuar sobre proTGF- α , independentment de la seva unió al receptor, donant lloc a la forma soluble activa. En aquest cas, el factor de creixement actuaria de forma paracrina activant l'EGFR present en cèl·lules allunyades de les productores de TGF- α (figura 23B). La inhibició de l'endocitosis donaria lloc a un increment del número de molècules de proTGF- α a la superfície cel·lular que provocaria, assumint que ADAM17 no és un factor limitant, una sobreactivació de la via de senyalització depenent de l'EGFR com a resultat de la suma de les dues vies: la via juxtacrina i la via paracrina. (figura 22). És difícil establir quina és la rellevància que cada una d'aquestes vies té en l'activació de l'EGFR i, en el cas que una tingui més relació que l'altra en la tumorigènesi, si l'alteració del mecanisme d'endocitosis descrit anteriorment afavoreix més aquesta via. El que sí que es coneix és que determinades molècules de la família de les tetraspanines com, per exemple, CD9 tenen la capacitat d'interaccionar amb proTGF- α i inhibir el seu *shedding* promovent, per tant, l'acumulació del factor de creixement a la superfície cel·lular (Shi et al., 2000). Donat que en aquestes circumstàncies els nivells de forma soluble disminueixen de forma important, la sobreexpressió de CD9 s'ha utilitzat per estudiar el funcionament de l'activació juxtacrina del receptor i el que s'ha vist és que aquesta és més potent que l'activació paracrina ja que les cèl·lules sobreexpressores de CD9 poden fosforilar més eficientment l'EGFR (Shi et al., 2000). En el nostre model, l'acumulació de proTGF- α

no es deu a una inhibició significativa del *shedding* sinó a una deficiència en el procés d'internalització i reciclatge del factor de creixement que fa que el resultat net sigui una acumulació d'aquest a la superfície cel·lular. Per tant, és lògic pensar que les dues vies estaran igualment sobreactivades. Ara bé, tal i com s'ha apuntat anteriorment, desconeixem si la pròpia sobreexpressió de proTGF- α a la superfície cel·lular afavoreix l'activació preferent d'alguna d'aquestes dues vies. A més a més, tampoc sabem si l'activació d'una o altra via té diferents conseqüències a nivell funcional o si l'afavoriment d'una via o altra és important per la tumorigènesi. Respecte aquest últim punt és important destacar que el fet que la via juxtacrina activi més eficientment l'EGFR (Shi et al., 2000) suggereix que aquesta podria tenir un paper important en la formació de tumors. Tot això fa pensar que calen més estudis per determinar quin paper juga la sobreexpressió de proTGF- α en l'activació de l'EGFR a través de cada una de les dues vies per tal de poder establir teràpies antitumorals més eficients.

Tenint en compte, per tant, les implicacions de proTGF- α en la tumorigènesi (Normanno et al., 2001; Yarden, 2001) i assumint que cada vegada surten més treballs implicant l'endocitosi amb càncer (Bache et al., 2004; Floyd et al., 1998) apareix un nou escenari en l'estudi d'aquesta malaltia en què, a més a més de tenir en compte paràmetres com l'expressió o el *shedding* de proTGF- α , altres factors com l'endocitosi poden tenir un paper clau. Així, a més a més d'aprofundir en l'estudi de les dues vies d'activació de l'EGFR seria interessant continuar aquest treball amb l'anàlisi de l'estat del trànsit de proTGF- α en diferents tumors a on la senyalització dependent d'EGFR estigui greument afectada.

Conclusions (I)

VI. CONCLUSIONS (I)

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquesta part del treball hem extret les següents conclusions:

1. proTGF- α és objecte d'endocitosi mitjançant un mecanisme dependent de vesícules de clatrina. El proTGF- α endocitat es pot reciclar a la superfície cel·lular.
2. L'endocitosi de proTGF- α és inhibida quan el seu domini citoplasmàtic és eliminat donant lloc a l'acumulació d'aquesta forma mutant a la superfície cel·lular.
3. Tot i que el domini citoplasmàtic de proTGF- α no afecta a la capacitat d'ADAM17 per tallar proteolíticament el factor de creixement si que en controla la seva disponibilitat a la superfície cel·lular i, per tant, la capacitat de la cèl·lula per produir la forma activa del factor de creixement. L'augment de l'expressió de proTGF- α a la superfície cel·lular degut a la inhibició de la seva endocitosi dóna lloc a un augment de l'activació del receptor d'EGF (EGFR).

Resultats (II)

VII. RESULTATS (II)

1.-IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL *shedding* DE NOUS SUBSTRATS D'ADAM17 MITJANÇANT L'APLICACIÓ DE LA TÈCNICA PROTEÒMICA DEL DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*)

La identificació del degradoma d'ADAM17 és clau per poder determinar el paper real que aquesta metal·loproteasa té en un organisme. Per dur a terme aquest objectiu varem decidir comparar els medis condicionats de cèl·lules tractades amb l'inhibidor BB-94 i cèl·lules sense tractar. Amb aquesta aproximació el que esperàvem era que els productes de *shedding* disminuïssin en els medis condicionats procedents de cèl·lules tractades amb l'inhibidor. Per posar a punt la tècnica varem utilitzar les cèl·lules A431 perquè presenten uns elevats nivells d'EGFR endogen. Aquest fet les fa un bon model per estudiar una hipotètica regulació del *shedding* dels substrats identificats a través d'aquest receptor el qual es troba sobreactivat en un gran nombre de tumors (Baselga et al., 2005). Aquesta línia cel·lular, però, presenta nivells relativament baixos d'ADAM17 (figura 24). Per tant, per poder facilitar la identificació de possibles substrats varem obtenir clons que sobreexpressessin de forma estable aquesta metal·loproteasa.

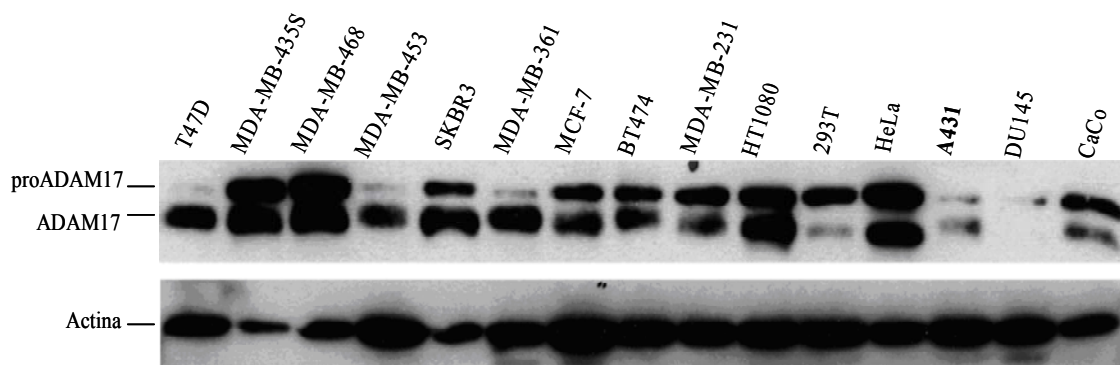


Figura 24. Anàlisi dels nivells d'expressió d'ADAM17 en diferents línies cel·lulars. Llisats cel·lulars de 15 línies cel·lulars diferents es varen analitzar per western-blot utilitzant un anticòs específic contra el domini citoplasmàtic d'ADAM17. Com a control de càrrega es varen analitzar els mateixos llisats amb un anticòs anti-actina. proADAM17: Forma inactiva d'ADAM17; ADAM17: Forma activa de la metal·loproteasa.

A la figura 25A es pot veure l'anàlisi per western-blot dels nivells d'expressió d'ADAM17 en el clon utilitzat (A431/ADAM17) comparat amb els nivells endògens de

les cèl·lules silvestres. Com es pot observar, ADAM17 presenta dues bandes: una banda de major pes molecular que correspon a la forma inactiva (proADAM17) de la metal·loproteasa i una banda de menor pes molecular que correspon a la forma activa (ADAM17). Amb aquesta figura volem destacar, també, que la transfecció d'ADAM17 provoca una important acumulació de la forma inactiva d'aquesta mentre que la forma activa augmenta de forma molt discreta (descriu també a (Villanueva de la Torre et al., 2004)).

Un punt clau per tenir èxit en aquest tipus d'aproximacions experimentals és seleccionar adequadament dintre de les mostres (en el nostre cas, els medis condicionats de cèl·lules) quina serà la població de proteïnes objecte d'anàlisi ja que s'ha descrit, per exemple, que proteïnes de xoc tèrmic (*heat shock proteins*) o enzims metabòlics, que a priori no ens interessin, són components majoritaris del medi extracel·lular (Guo et al., 2002). Per intentar resoldre aquest inconvenient ens varem recolzar en el fet que el prototipus de molècula que és substrat de *shedding* és una proteïna transmembrana que normalment està glicosilada. Per tant, abans d'analitzar els medis condicionats procedents de les cèl·lules control i de les cèl·lules tractades amb BB-94 varem fer una purificació prèvia d'aquests mitjançant cromatografia d'afinitat amb una lectina anomenada WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) (figura 25B). Les lectines són proteïnes que es caracteritzen per tenir una elevada afinitat pels residus glucídics de les proteïnes. Amb aquest pas, doncs, varem disminuir la complexitat de la barreja de proteïnes i, per tant, facilitar la identificació del substrats.

Les glicoproteïnes obtingudes varen ser marcades amb els fluorocroms Cy3 (verd; glicoproteïnes procedents de les cèl·lules control) i Cy5 (vermell; glicoproteïnes procedents de les cèl·lules tractades amb BB-94) i analitzades en un mateix gel mitjançant electroforesi bidimensional. Per visualitzar el patró de proteïnes de les dues mostres es va escanejar el gel amb longituds d'ona d'excitació específiques per a cada un dels fluorocroms per tal d'obtenir dues imatges independents (figura 25C; panells superior i central) en les que es pot veure la distribució i l'abundància de les proteïnes en forma d'espots per a cada una de les mostres. A continuació, aquestes imatges varen ser analitzades mitjançant el software DeCyder per tal d'obtenir els espots que disminuïen en els medis condicionats corresponents a les cèl·lules tractades amb BB-94. En el nostre cas, són els espots que apareixen en verd en el solapament de les dues

imatges (figura 25C; panell inferior). La llista d'espots candidats la varem obtenir establint el nivell de significació en 1.5, és a dir, varem considerar que un spot disminuïa significativament quan ho feia per sobre d'un 50% respecte a les cèl·lules control (figura 25D).

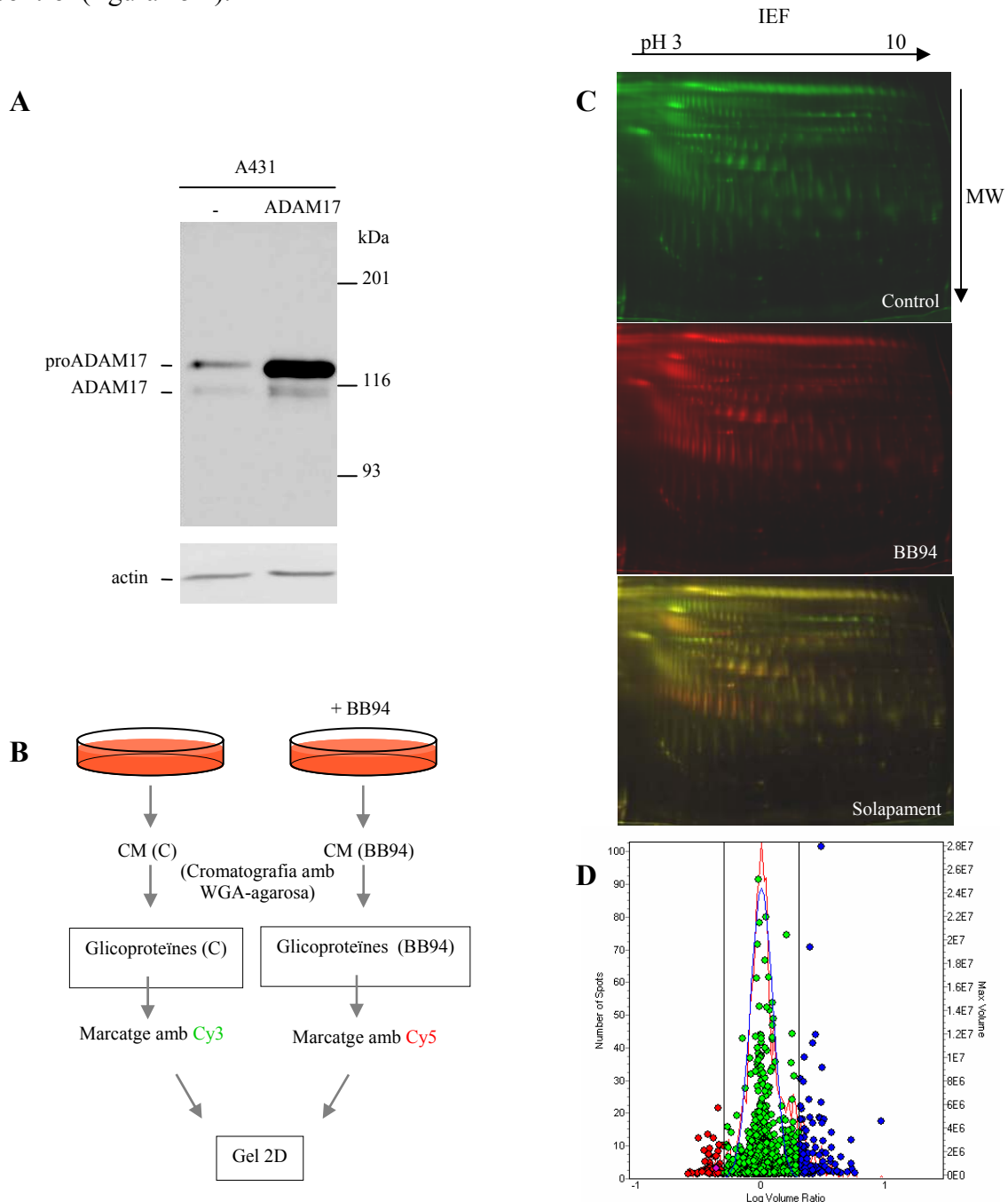


Figura 25. Identificació proteòmica de substrats de *shedding*. *A*, Expressió d'ADAM17 en cèl·lules A431 i A431 establiment transfectades amb ADAM17. *B*, Esquema del protocol utilitzat. Els medis condicionats (CM) de les cèl·lules A431/ADAM17 control (C) i tractades amb BB94 són sotmesos a una cromatografia d'afinitat amb WGA-agarosa. Les glicoproteïnes resultants són marcades amb Cy3 o Cy5 i analitzades mitjançant un gel bidimensional (Gel 2D). *C*, El Gel 2D és escanejat amb les longituds d'ona d'excitació corresponents a cadascun dels fluorocroms. MW, Pes molecular; IEF, isoelectroenfoc. *D*, Gràfic a on s'hi representa, a l'eix d'ordenades de la dreta, el volum de cada spot individual, representat com un punt. Els spots en vermell representen proteïnes que disminueixen més d'1.5 vegades en el MC procedent de les cèl·lules tractades amb BB94 (possibles substrats) mentre que els spots en blau representen proteïnes que augmenten més d'1.5 vegades. Els spots en verd no varien els seus nivells d'expressió (eix d'abscisses).

Un cop determinats els espots candidats, aquests es varen extreure del gel i sotmetre a una digestió amb tripsina. Els pèptids resultants es varen sotmetre a l'anàlisi del seu pes molecular mitjançant espectrometria de masses basada en la ionització per làser i assistida per matriu (MALDI; *Matrix-assisted laser desorption ionization*) i posterior acoblament a un instrument de temps de vol (TOF; *Time of flight*). Aquest procés permet obtenir, per a cada spot, un perfil de pèptids que serà utilitzat per determinar, mitjançant una recerca en una base de dades, a quina proteïna correspon. Amb aquest procediment, varem identificar 32 dels 43 espots que varem analitzar i els varem poder assignar a set proteïnes diferents (taula 4). D'aquestes, només tres, el receptor de transferrina (TfnR), ALCAM (*Activated leukocyte cell adhesion molecule*; anomenada també CD166) i Desmogleïna-2 (Dsg-2) són proteïnes transmembrana i, per tant, proteïnes candidates a ser substrats de *shedding* per part d'ADAM17. És important destacar que els pèptids identificats per cadascun dels tres candidats es localitzen a la regió extracel·lular de cadascun d'ells (figura 26A) la qual cosa dóna consistència al fet que puguin ser substrats de *shedding*. La resta de proteïnes no són proteïnes transmembrana i, per tant, es varen descartar.

Taula 4. Proteïnes identificades mitjançant espectrometria de masses (SD: Desviació estàndard).

Proteïna	Nº d'accés	Nº d'espots	Mitja (SD) de la disminució dels espots
Ribosomal protein RS 40K	A31233	1	3.9
Transferrin Receptor	A93343	5	2.7(0.23)
Extracellular matrix protein I	U65938	7	2.5(0.40)
ALCAM	I39428	8	2.4(0.22)
Annexin V	A67023	1	2.1
b-hexosaminidase alpha chain	A23561	3	1.6(0.04)
Desmoglein-2	S38673	7	1.6 (0,14)

1.1.-Validació de TfnR, ALCAM i Dsg-2 com a substrats de *shedding*

Per confirmar que aquestes proteïnes són substrats de *shedding* varem analitzar-ne els seus nivells, per western-blot, en cèl·lules A431 silvestres (A431) i en cèl·lules A431 transfectades amb la metal·loproteasa (A431/ADAM17) en presència o absència de l'inhibidor BB-94.

Respecte al TfnR cal dir que el seu *shedding* està parcialment caracteritzat. Aquest receptor és una proteïna transmembrana de tipus II d'uns 90 kDa que pot ser objecte de *shedding* i donar lloc a un fragment soluble d'uns 80 kDa (Dassler et al., 2003; Kaup et al., 2002). Tenint en compte aquestes dades, podem observar com apareix una banda d'uns 80 kDa en els medis condicionats procedents de cèl·lules A431/ADAM17 i que desapareix quan aquestes són tractades amb BB-94 (figura 26B; panell superior). Això indica que aquesta forma soluble correspon al producte de *shedding* del TfnR.

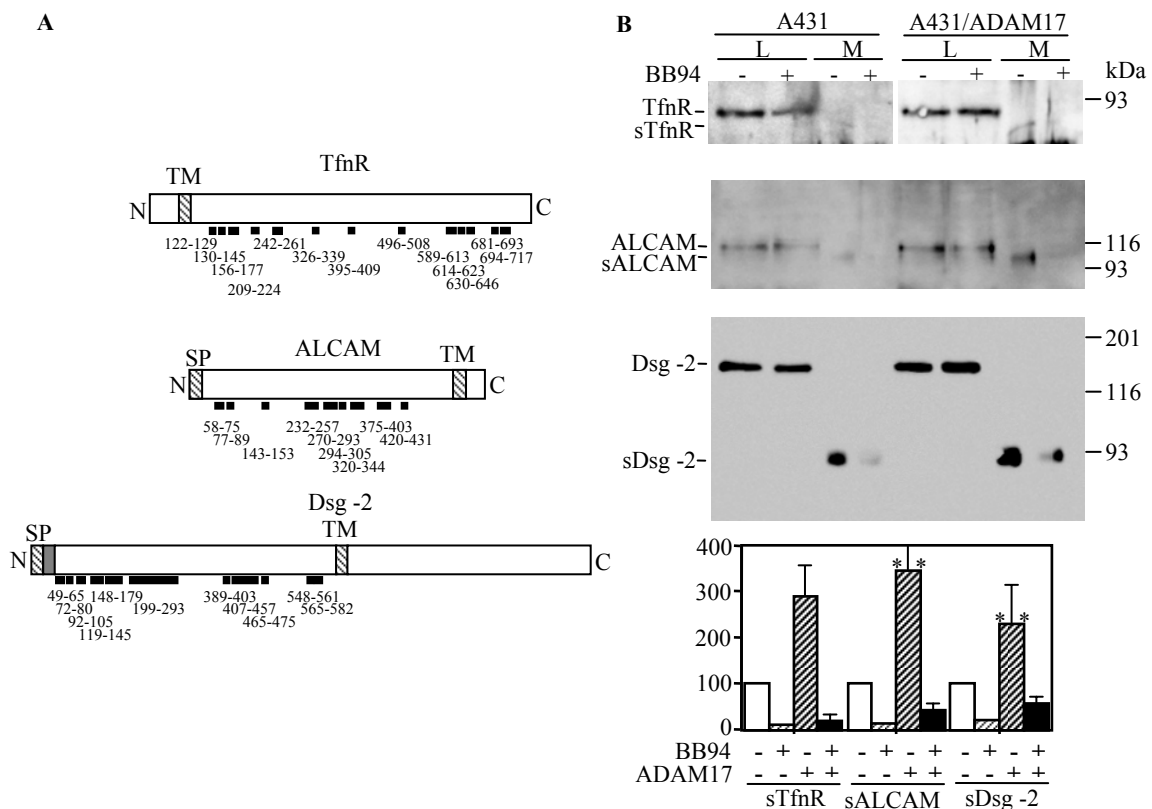


Figura 26. Anàlisi del *shedding* de TfnR, ALCAM i Dsg-2 en cèl·lules A431 i A431/ADAM17. A, Esquema a on es pot veure l'extrem amino terminal (N), el pèptid senyal (SP), el domini transmembrana (TM) i l'extrem carboxil terminal (C) del TfnR, ALCAM i Dsg-2. El prodomini de Dsg-2, eliminat proteolíticament per convertases del tipus furina, està marcat amb un rectangle negre després del SP. Les línies gruixudes a sota de cada gràfic representen els pèptids identificats per cada substrat mitjançant espectrometria de masses i el número, la posició a la molècula. B, Les cèl·lules A431 i A431/ADAM17 són tractades amb o sense BB94 i, a continuació, rentades i llisades. Els llisats cel·lulars (L) són analitzats mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra el domini extracel·lular de TfnR, ALCAM i Dsg-2 (panells superior, central i inferior, respectivament). Els medis condicionats (M) es concentren mitjançant cromatografia amb WGA-agarosa i s'analitzen de la mateixa forma que els llisats. La mitja de tres experiments independents i les seves desviacions estàndard es mostren en el gràfic. Test t d'Student ($P < 0.01$) per comparar el material soluble produït per les cèl·lules A431 i les cèl·lules A431/ADAM17.

El *shedding* d'ALCAM, en canvi, encara no s'ha caracteritzat tot i que alguns autors especulen amb la possibilitat de la seva existència ja que la transfecció de línies

cel·lulars de melanoma humà amb una forma d'ALCAM que té truncat el domini extracel·lular dóna lloc a un fenotip més metastàtic en assajos amb xenografts en ratolins nus (van Kempen et al., 2004). Aquesta molècula d'adhesió és una proteïna transmembrana de tipus I (figura 26A; esquema central) que pertany a la superfamília de les immunoglobulines (Ig) i està formada per un domini citoplasmàtic molt curt i un domini extracel·lular amb cinc dominis del tipus Ig (Swart, 2002) (figura 27A). ALCAM es va caracteritzar inicialment com el lligand d'una molècula implicada en l'adhesió dels limfòcits T amb l'epiteli del timus anomenada CD6. Aquesta interacció es realitza a través d'homodímers ALCAM-ALCAM que interaccionen amb homodímers CD6-CD6 de cèl·lules adjacents (Bowen et al., 1995) (figura 27B). En estudis posteriors en melanoma humà (Degen et al., 1998; van Kempen et al., 2000) i en hematopoesi (Cortes et al., 1999; Uchida et al., 1997) es va observar que els homodímers ALCAM-ALCAM també poden interaccionar amb homodímers ALCAM-ALCAM de cèl·lules adjacents (figura 27C).

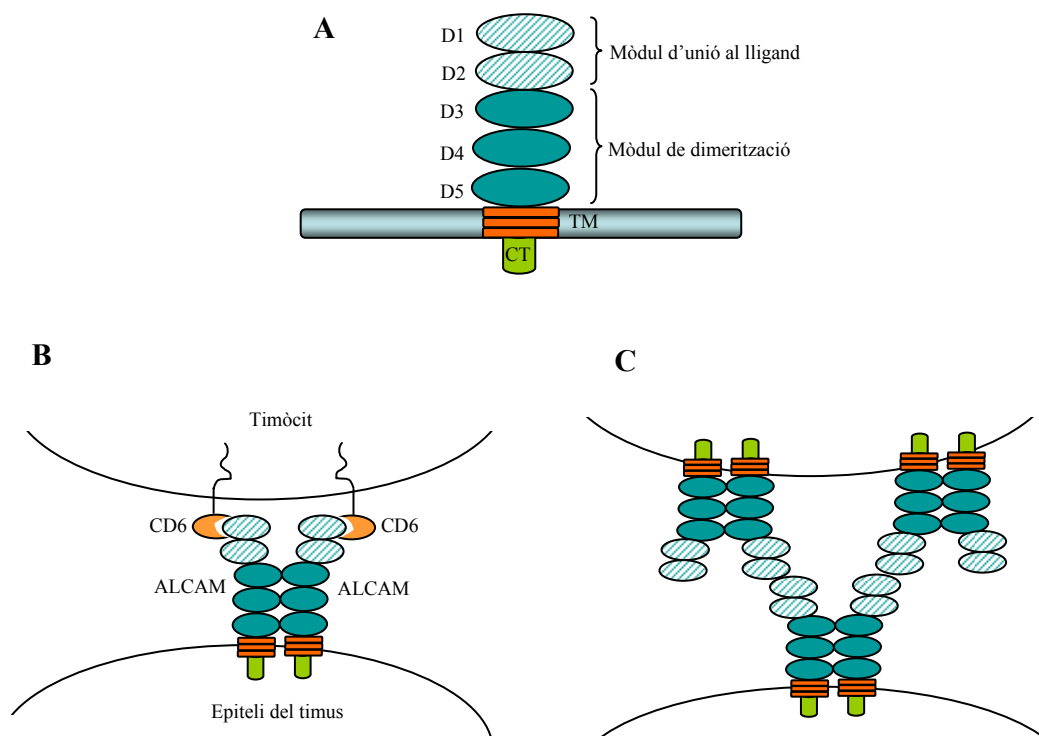


Figura 27. Caracterització estructural d'ALCAM. A, Estructura en dominis d'ALCAM. Els dos dominis tipus IgG de l'extrem amino terminal (D1 i D2) interaccionen amb el lligand de la cèl·lula adjacent mentre que els altres tres (D3, D4 i D5) s'encarreguen de l'homodimerització. TM, domini transmembrana; CT, domini citoplasmàtic. B, interacció entre l'homodímer ALCAM-ALCAM i CD6 (adaptat de (Bowen et al., 2000)). C, Interacció entre homodímers ALCAM-ALCAM de dues cèl·lules adjacents (adaptat de (van Kempen et al., 2001)).

En llisats cel·lulars detectem una banda d'aproximadament 110 kDa que coincideix amb la que ja s'ha descrit a la bibliografia (Swart, 2002) i que correspon a la forma sencera de la proteïna (figura 26B; panell central). Per altra banda, la migració electroforètica de la forma soluble observada en medis condicionats procedents de cèl·lules A431/ADAM17 dona un pes molecular d'uns 100 kDa que correspon al pes esperat per pràcticament tot el domini extracel·lular (figures 26A i 26B; panell central). Aquesta banda desapareix quan tractem les A431/ADAM17 amb l'inhibidor BB-94 (figura 26B; panell central). Tot això indica, per tant, que aquesta banda correspon al producte de *shedding* d'ALCAM.

El *shedding* de Desmogleina-2 (Dsg-2) està caracteritzat parcialment. Aquesta molècula d'adhesió és una proteïna transmembrana de tipus I (figura 26A; esquema inferior) que forma part, juntament amb altres tres proteïnes, de la família de les desmogleïnes (desmogleïna 1-4). Aquestes, juntament amb les desmocolines (desmocolina-1, -2 i -3) formen un grup de proteïnes anomenades cadherines desmosomals (Garrod et al., 2002; Kljuic et al., 2003; Whittock et al., 2003). Estructuralment, la desmogleïna-2 i, en general, totes les desmogleïnes, estan formades per quatre dominis a la regió extracel·lular anomenats "repeticions de tipus cadherina" (en anglès, *cadherin repeats*) i un domini d'ancoratge extracel·lular situat just després de la membrana plasmàtica. El primer domini de tipus cadherina, situat més a l'extrem amino terminal, conté una seqüència anomenada CAR (*Cell adhesion recognition*) (Tselepis et al., 1998) que és crucial per la interacció amb altres cadherines desmosomals presents en les cèl·lules adjacents. Aquesta interacció és depenent de la presència de calci (Amagai et al., 1998; Hanakawa et al., 2003; Jones et al., 1985; Watt et al., 1984) (figura 28A). Les cadherines desmosomals també interaccionen, mitjançant el seu domini intracel·lular, amb altres proteïnes (figura 28B i també 28A). Així, el domini ICS (*Intracellular cadherin-like sequence*) de les desmogleïnes, que és l'únic domini del qual se'n coneix una funció (Getsios et al., 2004), interacciona principalment amb una proteïna anomenada placoglobina (anomenada també, γ -catenina). Al seu torn, aquest complex pot interaccionar amb altres molècules com, per exemple, les placofilines (Bonne et al., 2003; Chen et al., 2002; Hatzfeld, 1999; Hatzfeld et al., 2003) que, a l'hora, poden reclutar-ne d'altres com, per exemple, la desmoplaquina (Bornslaeger et al., 2001; Smith et al., 1998), la qual pot unir-se al citoesquelet de filaments intermedis (Leung et al., 2002). A la figura 28C es pot veure un esquema de

tot el complex de proteïnes descrit, que rep el nom de desmosoma, i que té com a principal funció unir cèl·lules adjacents mitjançant, per una banda, la unió extracel·lular entre les cadherines desmosomals i, per l'altra, la unió intracel·lular amb el citoesquelet de filaments intermedis (vegeu també la figura 28D). Els desmosomes, juntament amb les unions adherents (figura 29) (en anglès, *adherens junctions*) formen les anomenades unions d'ancoratge (en anglès, *Anchoring junctions*) i tenen com a principal missió, respectivament, connectar els citoesquelets de filaments intermedis (desmosomes) i actina (unions adherents) de cèl·lules adjacents per proporcionar estructura i consistència al teixit (Koch et al., 1994).

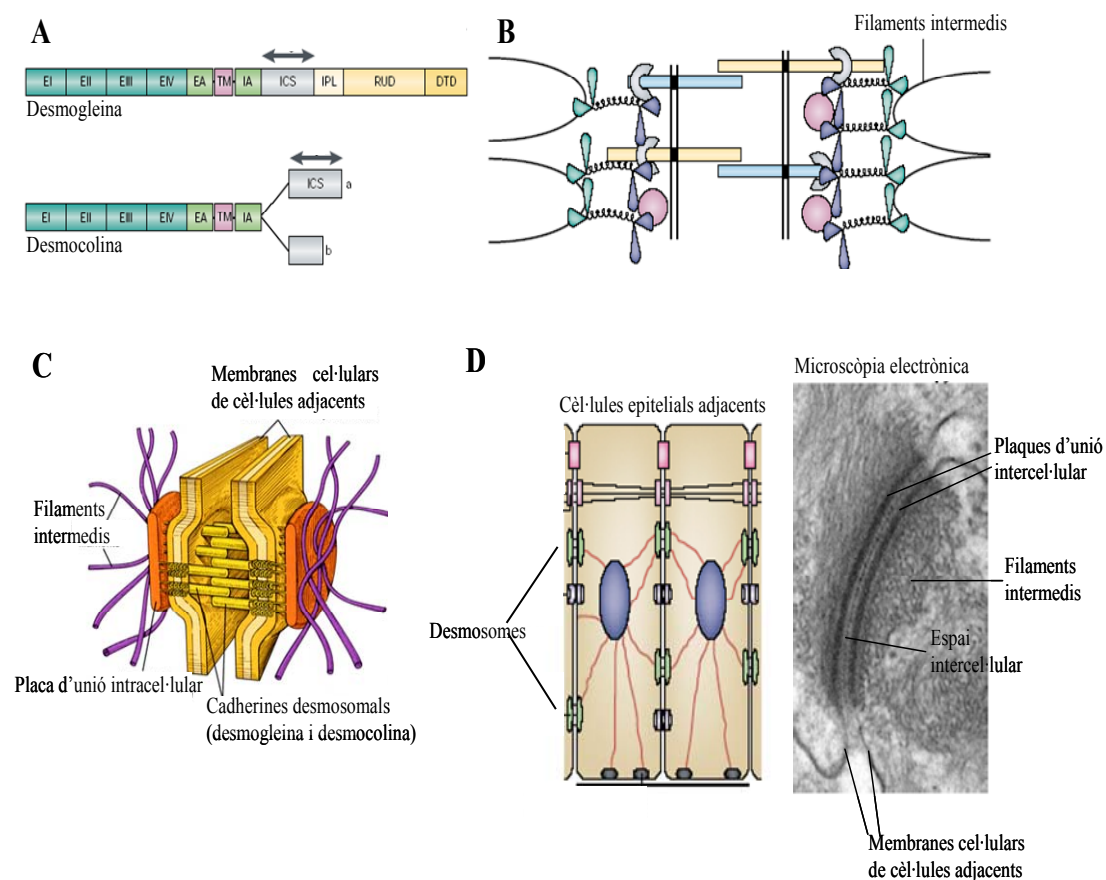


Figura 28. Components i estructura dels desmosomes. A, Estructura en dominis de les cadherines desmosomals desmogleina i desmocolina. EI-IV, repeticions de tipus cadherines; EA, domini d'ancoratge extracel·lular; TM, domini transmembrana; IA, domini d'ancoratge intracel·lular; ICS, domini intracel·lular d'unió a catenines (↔; zona d'unió a la placoglobina); IPL, domini d'unió ric en prolines; RUD, domini d'unitats repetides; DTD, domini terminal de les desmogleïnes. Les desmocolines tenen dues variants per processament alternatiu de l'mRNA (a i b). La forma b no té el domini ICS i no pot unir-se a la placoglobina. B, Interaccions de les cadherines desmosomals. □, desmogleïna; □, desmocolina; ⚙, placoglobina; ⚙, placofilina; ⚙, desmoplaquina (les figures 27A i 27B s'han adaptat de (Green et al., 2000)) C, Estructura en 3D d'un desmosoma. La placa d'unió intracel·lular està formada pel complex de proteïnes que uneix les cadherines desmosomals amb els filaments intermedis (adaptat de http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/lecture.f04/cell.f04/cellf04.html.html). D, panell esquerre: disposició dels desmosomes en les cèl·lules epitelials adjacents. Panell dret, visió d'un desmosoma mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (adaptat de (Green et al., 2000)).

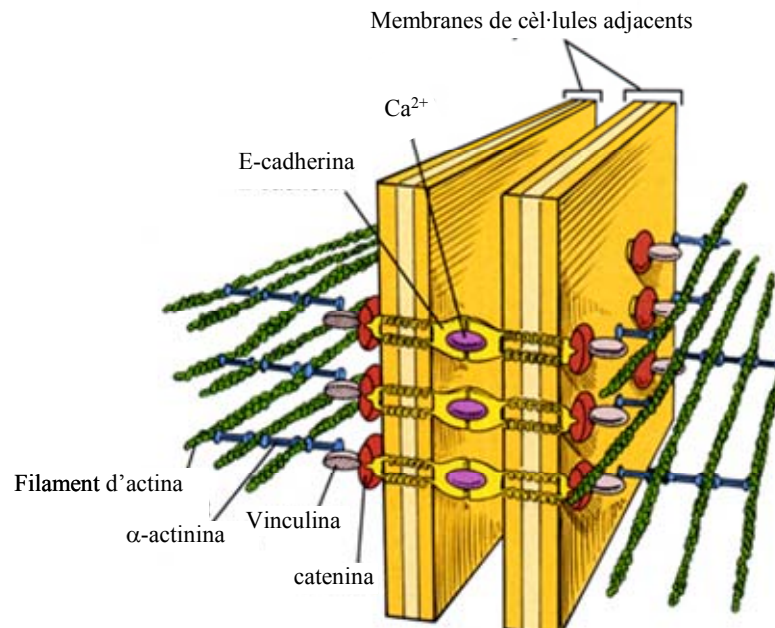


Figura 29. Estructura de les unions adherents. Les unions adherents uneixen els citoesquelets d'actina de cèl·lules adjacents mitjançant les cadherines clàssiques (en l'exemple, e-cadherina), que s'uneixen entre elles de forma dependent de Ca^{2+} , i proteïnes accessòries, que enllacen les cadherines amb els filaments d'actina (adaptat de http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/lecture.f04/cell.f04/cellf04.html.html).

Estudis recents descriuen l'existència de tres formes diferents de Dsg-2. Totes elles es troben unides a la membrana plasmàtica: una forma d'aproximadament 160 kDa, que representa la forma sencera de la proteïna, i dos fragments d'uns 100 i 60 kDa (Lorch et al., 2004). A més a més, apareix una forma soluble d'aproximadament 60 kDa (sDsg-2) que s'acumula en els medis condicionats de cèl·lules que expressen Dsg-2 (Lorch et al., 2004). La formació d'aquest fragment és inhibida per inhibidors de metal·loproteases la qual cosa fa que s'hagi considerat com un producte de *shedding* (Lorch et al., 2004).

En llistats de cèl·lules A431/ADAM17 detectem un producte que probablement correspongui a la forma sencera de Dsg-2 (figura 26B; panell inferior). A més a més, també observem una banda d'aproximadament 100 kDa quan sobreexposem els western-blots o en determinades condicions experimentals (figures 33, 34, 35 i 37). Finalment, i d'acord amb els resultats de Lorch et al (Lorch et al., 2004), detectem una banda en els medis condicionats corresponent a sDsg-2 encara que en el nostre cas és

sensiblement més pesada (aproximadament uns 90 kDa) (figura 26B; panell inferior). El tractament amb BB-94 inhibeix la formació de sDsg-2 la qual cosa suggereix que aquesta forma correspon al producte de *shedding* de Dsg-2.

En els tres casos estudiats (TfnR, ALCAM i Dsg-2) també podem detectar les corresponents formes solubles en els medis condicionats procedents de les cèl·lules silvestres (A431) encara que en menor quantitat (figura 26B). Això indica que la sobreexpressió d'ADAM17 intervé de forma significativa en el *shedding* de les tres proteïnes estudiades.

1.2.-Anàlisi del *shedding* d'ALCAM i Dsg-2 en cèl·lules funcionalment deficientes per ADAM17

Donat que el *shedding* de TfnR ja està pràcticament caracteritzat (Dassler et al., 2003; Kaup et al., 2002) ens varem centrar en l'estudi d'ALCAM i Dsg-2. El següent pas, doncs, va consistir en analitzar el *shedding* d'aquestes dues proteïnes en una línia cel·lular mutant derivada de la línia CHO anomenada M2. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per tenir dues mutacions en dues cisteïnes de la seqüència d'ADAM17 que fan que la metal·loproteasa s'acumuli i quedi retinguda en el reticle endoplasmàtic. Això fa que aquestes cèl·lules no puguin sintetitzar la forma activa d'ADAM17 i, per tant, són considerades funcionalment deficientes per aquesta metal·loproteasa (Borroto et al., 2003; Villanueva de la Torre et al., 2004). A més a més, la deficiència observada és específica per ADAM17 ja que altres metal·loproteases com, per exemple, ADAM10 presenten un processament normal (figura 30).

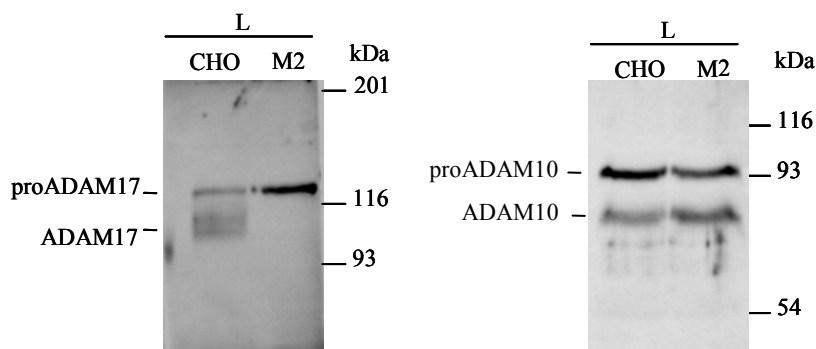


Figura 30. Expressió d'ADAM17 i ADAM10 en les cèl·lules mutants M2. Cèl·lules CHO i M2 són lliades i els llisats cel·lulars (L) analitzats mitjançant western-blot utilitzant anticossos específics contra ADAM17 (panell esquerre) o ADAM10 (panell dret).

Tant la línia cel·lular silvestre (CHO) com la mutant (M2) presenten nivells endògens d'ALCAM que poden ser detectats amb l'anticòs que tenim mentre que els nivells d'expressió de Dsg-2 són molt baixos o nuls ja que no els podem detectar. Per tant, en aquestes línies cel·lulars varem analitzar el *shedding* d'ALCAM endogen mentre que per fer el mateix amb Dsg-2 les varem haver de transfectar transitòriament.

Tal i com es pot observar a la figura 31A la forma soluble d'ALCAM es detecta fàcilment en medis condicionats procedents de cèl·lules CHO mentre que en cèl·lules M2 s'inhibeix de forma significativa. En aquesta figura també es pot veure que en aquestes línies cel·lulars ALCAM no apareix com una banda única sinó que detectem un patró de bandes difús. Per caracteritzar aquestes bandes varem realitzar el mateix experiment de la figura 31A tractant els llisats cel·lulars i els medis condicionats amb N-Glicosidasa F (figura 31B). Tal i com s'esperava, el patró de bandes difús es transforma en una banda discreta confirmant-se així l'especificitat de totes les bandes detectades a la figura 31A. Per acabar de confirmar el paper d'ADAM17 en el *shedding* ALCAM varem transfectar establement les cèl·lules M2 amb el cDNA d'ADAM17 i varem observar que en aquestes condicions les cèl·lules M2 recuperaven parcialment la capacitat d'induir el *shedding* a ALCAM (figura 31C; panell esquerre). La recuperació del *shedding* és concomitant a la capacitat de les cèl·lules per sintetitzar la forma activa d'ADAM17 (figura 31C; panell dret). Tot això indica, per tant, que ADAM17 és la principal responsable del *shedding* d'ALCAM en cèl·lules CHO.

La transfecció de cèl·lules CHO i M2 amb Dsg-2 ens va permetre detectar la forma sencera de la proteïna en els respectius llisats totals. Ara bé, inesperadament, varem identificar sDsg-2 en les dues línies cel·lulars (figura 31D). Aquesta dada ens indica, per tant, que ADAM17 no és la principal responsable del *shedding* de Dsg-2 encara que hi intervé quan aquesta se sobreexpressa. Per tant, el següent pas va ser identificar quina era la metal·loproteasa responsable del *shedding* d'aquesta proteïna.

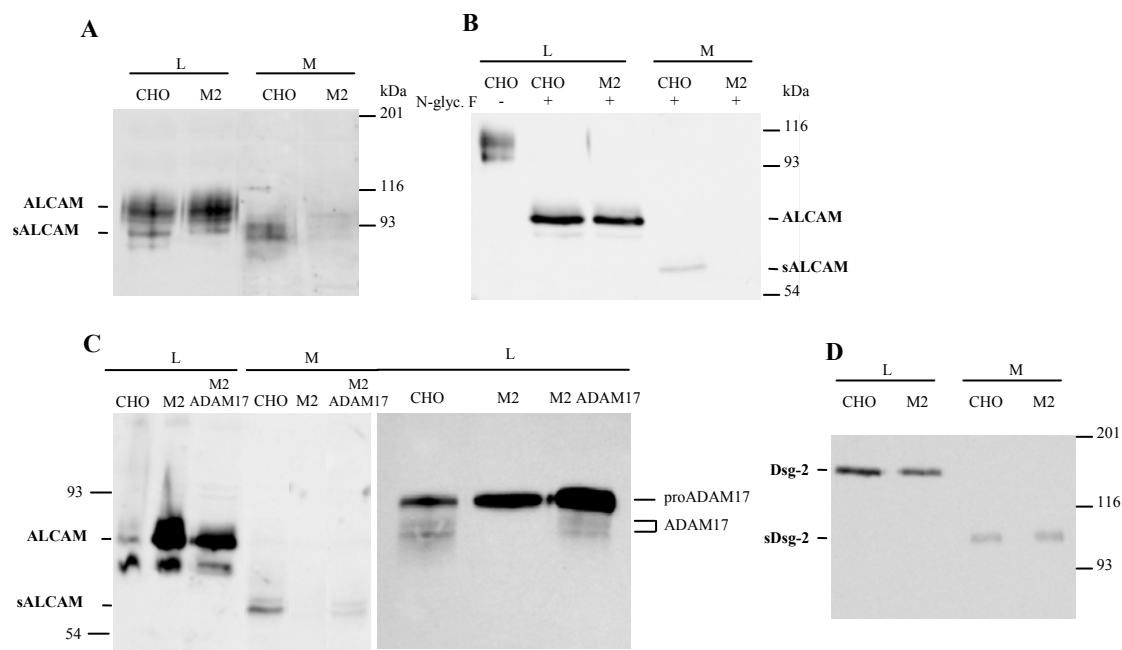


Figura 31. Anàlisi del *shedding* d'ALCAM i Dsg-2 en cèl·lules genèticament deficientes per ADAM17. A, Llisats (L) i medis condicionats (M) procedents de cèl·lules CHO i M2 es varen concentrar mitjançant cromatografia amb WGA-agarosa i posteriorment es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra el domini extracel·lular d'ALCAM. B, Llisats i medis condicionats obtinguts igual que a l'apartat A es varen tractar o no amb N-glicosidasa F i posteriorment analitzats de la mateixa forma. C, panell esquerre; Llisats i medis condicionats procedents de cèl·lules CHO, M2 i M2 establiment transfectades amb ADAM17 (M2 ADAM17) es varen obtenir i analitzar igual que en l'apartat B. Totes les mostres (L i M) es varen tractar amb N-glicosidasa F abans de ser analitzades. Panell dret; Llisats de cèl·lules CHO, M2 i M2 ADAM17 obtinguts igual que a la figura 30 es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos específics contra ADAM17. D, Cèl·lules CHO i M2 es varen transfectar transitòriament amb el cDNA que codifica per la Dsg-2 humana. Els llisats cel·lulars i medis condicionats de les cèl·lules transfectades es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra el domini extracel·lular de Dsg-2.

1.3.-Anàlisi del *shedding* de Dsg-2 en cèl·lules deficientes per ADAM10

ADAM10 és la metal·loproteasa filogenèticament més propera a ADAM17 (Blobel, 2005) i també està implicada en processos de *shedding*. De fet, en alguns casos com, per exemple, amb la proteïna precursora del pèptid β -amiloide (APP), ambdues metal·loproteases poden actuar sobre el mateix substrat (Buxbaum et al., 1998). Per altra banda, estudis recents han determinat que ADAM10 està directament relacionada amb el *shedding* de la E-cadherina i la N-cadherina (Maretzky et al., 2005; Reiss et al., 2005) així com amb d'altres molècules d'adhesió com les γ -protocadherines C3 i B4 (Reiss et al., 2006). Per tant, ADAM10 sembla un bon candidat a ser la principal metal·loproteasa responsable del *shedding* de Dsg-2. A més a més, sabem que ADAM10 s'expressa i s'activa correctament tant en les cèl·lules CHO com en les M2 (figura 30) la qual cosa explicaria, si aquesta hipòtesi és certa, la presència de sDsg-2 en els medis condicionats procedents d'aquestes dues línies cel·lulars.

Per demostrar aquesta hipòtesi varem utilitzar fibroblasts procedents d'embrions de ratolins deficients per ADAM10 (MEFs ADAM10 $-/-$). Com es pot comprovar a la figura 32 (panell esquerre) aquesta línia cel·lular no expressa ADAM10 si la comparem amb les mateixes cèl·lules procedents del ratolí silvestre (MEFs ADAM10 $+/+$). Aquesta deficiència no afecta a ADAM17 ja que aquesta s'expressa i s'activa correctament (figura 32; panell dret).

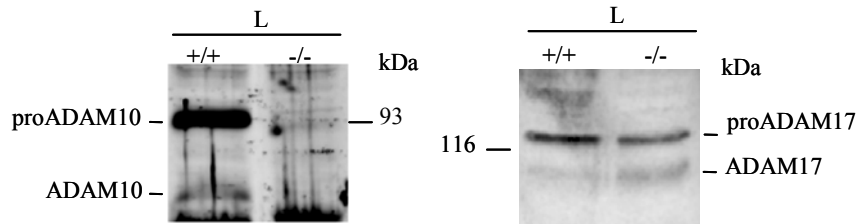


Figura 32. Expressió d'ADAM17 i ADAM10 en fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) silvestres ($+/+$) i deficients per ADAM10 ($-/-$). Llissats cel·lulars (L) de MEFs procedents de ratolins $+/+$ i $-/-$ es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra ADAM10 (panell esquerre) i ADAM17 (panell dret).

L'anàlisi prèvia dels nivells endògens de Dsg-2 a la línia MEFs ADAM10 $-/-$ ens va permetre concloure que aquestes cèl·lules no expressen la molècula d'adhesió. Aquesta conclusió la varem fer extensible a les MEFs ADAM10 $+/+$ per tant, excepte en els casos indicats, per analitzar el *shedding* en aquestes línies cel·lulars varem transfectar-les transitòriament amb el cDNA de Dsg-2.

Tal i com es pot veure a la figura 33A les cèl·lules silvestres tenen un *shedding* de Dsg-2 normal mentre que aquest està completament inhibit en les cèl·lules deficients per ADAM10. A més a més, veiem com la transfecció de les cèl·lules MEFs ADAM10 $-/-$ amb el cDNA d'ADAM10 permet a aquesta línia cel·lular recuperar gairebé en la seva totalitat el fenotip silvestre (figura 33A). Per tant, aquests resultats indiquen, per una banda, que el *shedding* de Dsg-2 depèn bàsicament d'ADAM10 i, per l'altra, que els nivells d'ADAM17 presents en les cèl·lules mutants no són suficients per compensar la deficiència d'ADAM10 ja que la seva absència inhibeix completament el *shedding* de Dsg-2.

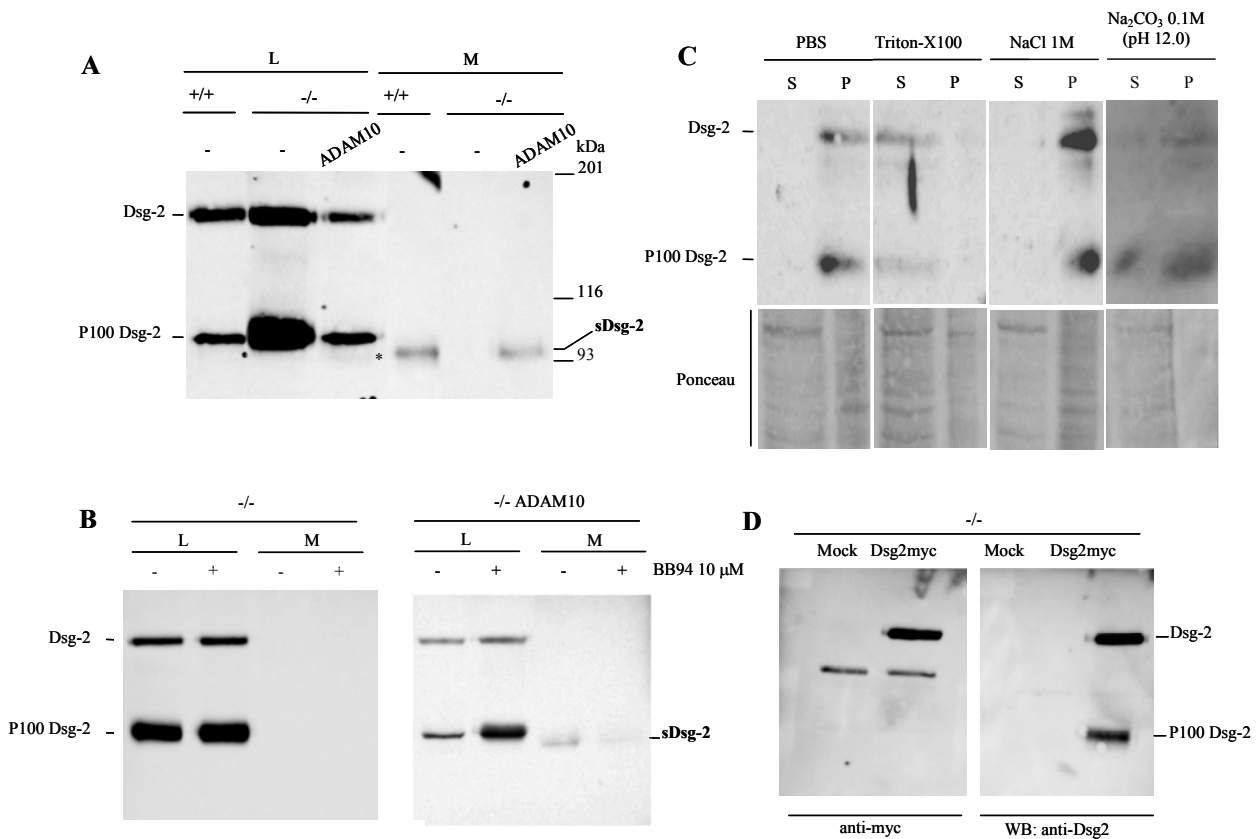


Figura 33. Anàlisi del shedding de Dsg-2 en cèl·lules genèticament deficientes per ADAM10. A, MEFs silvestres (+/+) o deficientes per ADAM10 (-/-) es varen cotransfectar amb el cDNA de Dsg-2 i un cDNA control (-) o el cDNA d'ADAM10. Els llisats cel·lulars (L) i els medis condicionats (M) obtinguts igual que a la figura 31 es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2. B, MEFs deficientes per ADAM10 es varen cotransfectar amb el cDNA de Dsg-2 i un cDNA control (-/-) o el cDNA d'ADAM10 (-/- ADAM10). A continuació, es varen tractar o no amb BB94 i seguidament es varen lliar. Els llisats (L) i els medis condicionats (M) es varen obtenir i analitzar igual que en el panell A. C, Les fraccions microsomals obtingudes a partir de cèl·lules MEFs ADAM10 -/- establiment transfectades amb el cDNA de Dsg-2 es varen extreure amb PBS, triton X-100, NaCl 1M i Na₂CO₃ 0.1M (pH 12.0). A continuació, es varen recuperar les fraccions solubilitzades (S) i insolubilitzades (P) per cada tampó d'extracció i es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2. L'eficiència de l'extracció es va verificar amb una tinció de Ponceau. D, MEFs ADAM10 -/- es varen transfectar transitòriament amb el cDNA de Dsg-2 que conté l'epítip myc a l'extrem carboxil terminal (Dsg2myc) o amb un cDNA control (Mock). A continuació, es varen lliar i els llisats cel·lulars es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2 (domini extracel·lular) i contra l'epítip myc.

1.4.-Identificació d'una nova forma de Dsg-2 (P100 Dsg-2) en cèl·lules deficientes per ADAM10

L'anàlisi del shedding de Dsg-2 en MEFs ens va permetre identificar en els llisats cel·lulars una nova forma de Dsg-2 d'aproximadament 100 kDa que varem anomenar P100 Dsg-2 (figura 33A). Donat que la migració electroforètica d'aquesta forma és similar a la de sDsg-2 varem creure, inicialment, que P100 Dsg-2 en realitat representava un producte de shedding no dependent d'ADAM10, ja que també el podíem detectar en les cèl·lules deficientes per aquesta metal·loproteasa, que per alguna raó es mantenia unit a la membrana plasmàtica de les MEFs. Per corroborar aquesta hipòtesi, varem tractar la línia cel·lular MEF ADAM10 -/- amb BB-94 i el resultat va ser que la

presència de l'inhibidor no afectava l'expressió de P100 Dsg-2 (figura 33B; panell esquerre). Per tant, P100 Dsg-2 no podia ser cap producte de *shedding*. Per altra banda, la transfecció de les MEFs ADAM10 *-/-* amb ADAM10 provocava una disminució en els nivells de P100 Dsg-2 respecte a la mateixa línia cel·lular també transfectada amb ADAM10 i tractada amb BB-94 (figura 33B; panell dret). Per tant, tot i que ADAM10 no era la responsable de la formació de P100 Dsg-2 sí que modulava els seus nivells d'expressió. Aquests resultats ens varen permetre desenvolupar una hipòtesi segons la qual Dsg-2 podia ser substrat de dos tipus de talls proteolítics. Per una banda, ADAM10 i ADAM17 serien les responsables del *shedding* de Dsg-2 i, per altra banda, una proteasa desconeguda que no pot ser inhibida per BB-94 s'encarregaria de generar, mitjançant un tall proteolític intracel·lular, la forma unida a membrana anomenada P100 Dsg-2. Aquesta hipòtesi implicava, per tant, que P100 Dsg-2 es mantenia unida a la membrana plasmàtica mitjançant el domini transmembrana. D'aquesta manera i assumint que l'hipotètic tall proteolític intracel·lular es produeix just per sota de la membrana plasmàtica demostrariem que la regió transmembrana seria la responsable de la lleugera variació en la migració electroforètica entre P100 Dsg-2 i la forma soluble de Dsg-2 (veure, per exemple, la figura 33A). Per confirmar aquesta hipòtesi havíem de demostrar, per una banda, que P100 Dsg-2 es mantenia unida a la membrana plasmàtica mitjançant la regió transmembrana i, per l'altra, que perdia el domini citoplasmàtic. La resposta a la primera pregunta la varem obtenir posant a punt uns experiments de fraccionament subcel·lular utilitzant les cèl·lules MEFs ADAM10 *-/-* establiment transfectades amb el cDNA de Dsg-2. La fracció de membranes o fracció microsomal obtinguda es va sotmetre a una extracció de proteïnes utilitzant dues solucions d'extracció: la primera contenia una elevada concentració de sals i l'altra, un elevat pH. Aquestes dues solucions tenen la propietat d'extreure proteïnes que estan unides a la membrana mitjançant interaccions febles amb altres proteïnes mentre que manté intactes les proteïnes de tipus transmembrana. Tal i com es pot veure a la figura 33C el tractament amb aquestes solucions no extreia P100 Dsg-2 de la membrana mentre que si ho feia el triton X-100, un detergent usualment utilitzat per solubilitzar proteïnes d'aquest tipus. Per tant, P100 Dsg-2 és una proteïna unida a la membrana plasmàtica mitjançant el domini transmembrana.

Per altra banda, també varem demostrar que P100 Dsg-2 és una forma de Dsg-2 que s'origina per la pèrdua del seu domini citoplasmàtic. Per fer-ho, varem transfectar

transitoriament les MEFs ADAM10 $-/-$ amb el cDNA de Dsg-2. Aquesta construcció conté un epítoc myc just a l'extrem carboxil terminal de tal manera que utilitzant un anticòs anti-myc varem poder determinar si P100 Dsg-2 perdia o no el domini citoplasmàtic. Com es pot observar a la figura 33D l'anticòs anti-Dsg-2, que reconeix el domini extracel·lular de Dsg-2, detecta tant la forma sencera (Dsg-2) com P100 Dsg-2 mentre que l'anticòs anti-myc només pot detectar la forma sencera. Per tant, la formació de P100 Dsg-2 requereix de la pèrdua del domini citoplasmàtic. Tot i que amb aquest experiment no podem determinar la regió exacte a on es produeix aquest hipotètic tall intracel·lular si que podem predir, per les dades de migració electroforètica de les formes P100 Dsg-2 i sDsg-2, que s'ha de produir molt proper a la membrana plasmàtica.

La següent pregunta que ens varem plantejar va ser quina proteasa podria ser la responsable de la formació de P100 Dsg-2. Per respondre-la varem tractar cèl·lules A431 així com el clon de cèl·lules MEF ADAM10 $-/-$ transfectat establement amb Dsg-2 (MEFs ADAM10 $-/-$ Dsg-2myc) amb un ampli panell d'inhibidors (taula 5). Com es pot observar a la figura 34 cap dels inhibidors utilitzats bloqueja la formació de P100 Dsg-2 en les dues línies. A més a més, i com a confirmació dels resultats obtinguts amb l'inhibidor L-685,458, l'estudi de la formació de P100 Dsg-2 en cèl·lules deficientes per presenilina 1 (MEFs PS1 $-/-$) també indiquen que el complex γ -secretasa no té cap paper rellevant en la formació de P100 Dsg-2 (figura 34). Per tant, la qüestió de quina és la proteasa que genera aquesta forma es manté oberta.

Taula 5. Llistat dels inhibidors utilitzats.

Tipus d'inhibidor	Proteasa diana
L-685,458	Presenilina 1
Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO	Caspasa 3
N-CBZ-Val-Ala-Asp (O-Me) fluorometilcetona (Z-VAD)	Inhibidor general de caspases
N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN)	Calpaines
Dicloroisocumarina (DCI)	Romboids
MG-132	Proteasoma

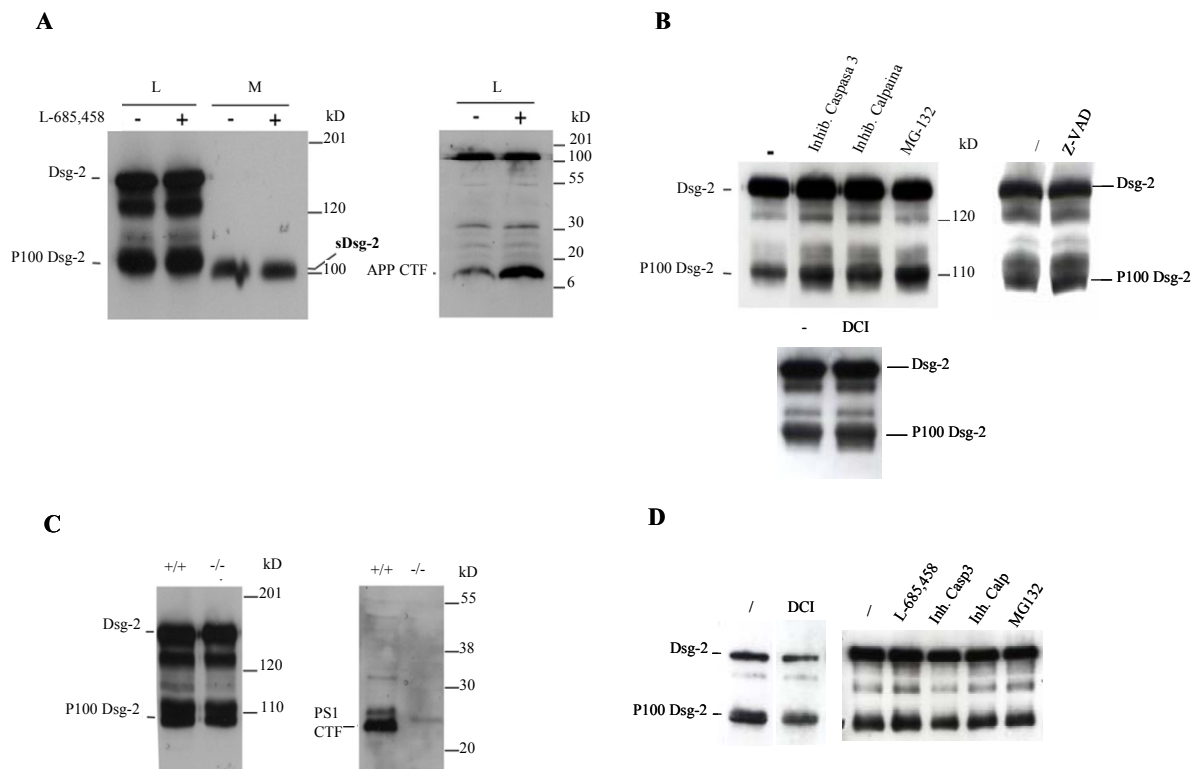


Figura 34. Efecte de la inhibició de diferents activitats proteolítiques en la formació de P100 Dsg-2 en les línies cel·lulars A431 (panells A i B) i MEFs ADAM10^{-/-} Dsg-2myc (panells C i D). A, cèl·lules A431 són tractades amb l'inhibidor del complex γ -secretasa L-685,458. A continuació, els medis condicionats (M) i els llistats cel·lulars (L) obtinguts són analitzats mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2 (panell esquerre). Paral·lelament, els llistats també són analitzats amb anticossos contra el domini carboxil terminal de la proteïna APP. L'acumulació d'aquest domini als llistats cel·lulars quan tractem les cèl·lules amb L-685,458 indica que el tractament amb l'inhibidor ha funcionat (panell dret). B, La mateixes cèl·lules de l'apartat A són tractades amb diferents inhibidors de proteases i, posteriorment, llistades. Els llistats totals són analitzats com s'ha descrit anteriorment. -, cèl·lules sense tractar; MG-132, inhibidor del proteasoma; Z-VAD, inhibidor general de caspases; DCI, dicloroisocumarina (inhibidor de romboïds). C, Cèl·lules MEFs genèticament deficientes per presenilina 1 (-/-) i cèl·lules MEFs silvestres (+/+) són transfectades transitòriament amb el cDNA de Dsg-2 i els seus llistats analitzats mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2 (panell esquerre) i presenilina 1 (panell dret). D, cèl·lules deficientes per ADAM10 (MEFs ADAM10^{-/-}) són tractades amb diferents inhibidors de proteases i els seus llistats posteriorment analitzats mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2.

A més a més de caracteritzar quin era el mecanisme que generava P100 Dsg-2 també varem considerar important conèixer si aquesta forma de Dsg-2 era rellevant des de un punt de vista funcional o, pel contrari, era una forma de degradació sense cap més interès. El primer pas per resoldre aquesta qüestió va ser determinar si P100 Dsg-2 formava part del desmosoma, és a dir, del complex de proteïnes a on la Dsg-2 exerceix la seva funció. Per fer això, varem utilitzar la propietat dels desmosomes que fa que les cadherines desmosomals siguin insolubles en detergents com el triton X-100. Així, fent una extracció inicial amb aquest detergent seguida d'una segona extracció amb urea, que sí pot solubilitzar aquestes proteïnes, varem poder determinar quina fracció de Dsg-2 formava part del desmosoma i quina no. Aquest assaig es va realitzar en cèl·lules A431 i com es pot observar a la figura 35 es detecta P100 Dsg-2 a la fracció insoluble

en triton X-100 la qual cosa indica que aquesta forma es troba present al desmosoma. Això suggereix que P100 Dsg-2 podria ser important pel control de l'activitat dels desmosomes ja que no disposa de la regió citoplasmàtica necessària per la unió als filaments intermedis.

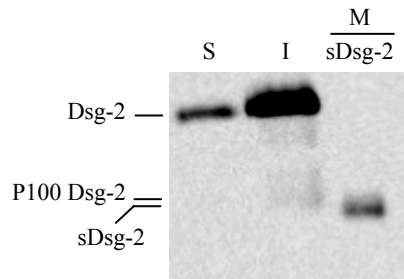


Figura 35. Anàlisi de P100 Dsg-2 en les fraccions soluble (S) i insoluble (I) en triton X-100. Cèl·lules A431 són incubades amb medi sense sèrum durant 24 hores. A continuació, es recupera el medi condicionat (M) i es llisen les cèl·lules amb un tampó que conté triton X-100. Seguidament, el llisat és centrifugat a 15.000g durant 15' per tal d'obtenir la fracció soluble en aquest detergent (S). La fracció insoluble (I) en triton la obtenim solubilitzant el sediment cel·lular obtingut de la centrifugació anterior amb un tampó amb urea 6M. Finalment, les dues fraccions i el medi condicionat (M) són analitzats mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2.

1.5.-Factors que intervenen en la regulació del shedding d'ALCAM i Dsg-2: I) La confluència cel·lular incrementa el shedding d'ALCAM

Tal i com es pot observar a la figura 26B (panell central) necessitem exposar molt el western-blot per poder detectar la banda corresponent a ALCAM tant en llisats cel·lulars com en els medis condicionats. Una de les raons que poden explicar això és que l'anticòs utilitzat és de baixa qualitat ja que a més a més de detectar bandes molt tènues, en general, el western-blot surt molt brut. Estudis recents, però, suggereixen que la densitat cel·lular és un factor que intervé decisivament en el control de l'activitat d'ALCAM (Lunter et al., 2005). Per tant, varem concloure que la densitat cel·lular podria afectar el shedding d'ALCAM i, per tant, la seva funció a la cèl·lula. Per demostrar això, varem analitzar el shedding d'aquesta proteïna en diferents estats de confluència utilitzant la línia cel·lular A431 i varem observar que aquest augmentava concomitantment amb la confluència cel·lular (figura 36).

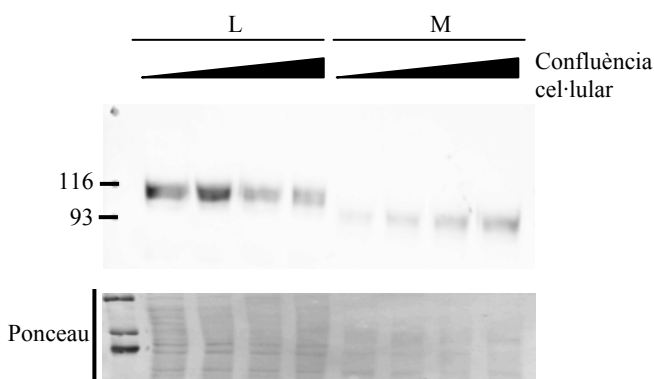


Figura 36. Efecte de la confluència en el shedding d'ALCAM. Cèl·lules A431 es varen sembrar en diferents graus de confluència (▲; vegeu també material i mètodes) i es varen condicionar durant 48 hores amb medi sense sèrum. A continuació, els medis condicionats (M) es varen recuperar i les cèl·lules es varen llisar per obtenir els llisats cel·lulars (L). Finalment, medis (M) i llisats (L) es varen concentrar utilitzant cromatografia amb WGA-agarosa i analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra el domini extracel·lular d'ALCAM. El control de càrrega de proteïna es va realitzar mitjançant una tinció amb Ponceau.

1.5.-Factors que intervenen en la regulació del shedding d'ALCAM i Dsg-2: II) El factor de creixement EGF concomitantment incrementa els nivells de la forma activa d'ADAM17 i el shedding de Dsg-2

Recentment s'ha suggerit que l'ús d'inhibidors de l'EGFR incrementa els nivells de la forma sencera de Dsg-2 a la membrana plasmàtica (Lorch et al., 2004) obrint la possibilitat que aquest receptor pugui regular el *shedding* de Dsg-2. Per altra banda, estudis en el nostre laboratori indiquen que tractaments perllongats amb EGF incrementen els nivells de la forma activa d'ADAM17. Per tant, ens varem proposar analitzar l'efecte de l'activació de l'EGFR sobre el *shedding* de Dsg-2. Tal i com es pot observar a la figura 37A (panell superior) el tractament amb EGF incrementa els nivells de sDsg-2. A més a més, aquest efecte és bloquejat amb BB-94 la qual cosa demostra que el *shedding* activat per EGFR és dependent de metal·loproteases. En aquesta mateixa figura també es pot observar que, tal i com passa a la figura 33B, el tractament amb BB94 incrementa els nivells de P100 Dsg-2 (veure l'asterisc).

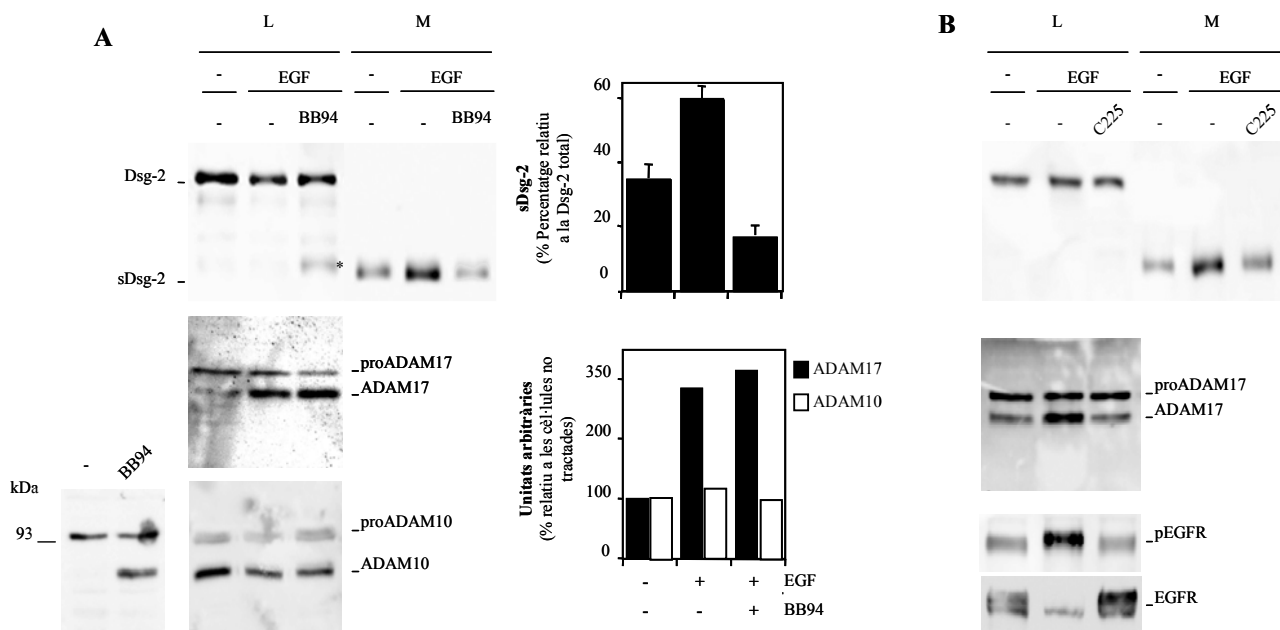


Figura 37. Anàlisi del *shedding* en cèl·lules A431 tractades amb EGF. A, Les cèl·lules A431 es varen tractar o no amb EGF i BB94 segons s'indica i posteriorment es varen lliurar. Els llistats (L) i els medis condicionats (M) es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2 (panell superior), ADAM17 (panell central) o ADAM10 (panells inferiors). Al panell inferior esquerre es pot observar que en absència de BB94 en el tampó de llisi només s'observa la proforma d'ADAM10 en aquesta línia cel·lular mentre que l'addició de l'inhibidor ens permet detectar també la forma activa. Als panells de la dreta es pot observar la quantificació de tres experiments diferents (mitja i desviació estàndard; gràfic superior) o la mitja de dos experiments (gràfic inferior). B, Cèl·lules A431 es varen tractar o no amb EGF i C225 (anticòs monoclonal que bloqueja l'activació d'EGFR) durant 48h. Els llistats cel·lulars (L) i els medis condicionats (M) es varen analitzar mitjançant western-blot utilitzant anticossos contra Dsg-2 (panell superior), ADAM17 (panell central) o l'EGFR total (EGFR) i fosforilat (pEGFR).

Per determinar quina metal·loproteasa estava relacionada amb el *shedding* de Dsg-2 activat per EGF varem analitzar els nivells d'ADAM17 i ADAM10 en els mateixos llisats cel·lulars. Així, varem determinar que d'acord amb resultats previs del laboratori els tractaments perllongats amb EGF incrementen els nivells de forma activa d'ADAM17 (figura 37A; panell central). Per altra banda, i a diferència del que varem observar a les figures 29 (panell dret) i 31 (panell esquerre), l'anàlisi dels llisats cel·lulars d'A431 amb anticossos anti-ADAM10 només permet veure una banda d'aquesta metal·loproteasa, que correspon a la forma inactiva (pro-ADAM10) (figura 37; panell inferior esquerre). Només quan afegim BB-94 a la solució de llisi podem detectar la forma activa d'ADAM10 la qual cosa indica que en aquesta línia cel·lular hi ha una proteasa inhibida per BB-94 que degrada ADAM10. Així doncs, l'anàlisi d'ADAM10 en aquestes condicions ens va permetre demostrar que aquesta metal·loproteasa s'expressa i s'activa correctament en aquesta línia cel·lular i, a més a més, no varia els seus nivells d'expressió en presència de l'EGF (figura 37; panell inferior dret). Per tant, aquests resultats indiquen que ADAM17 és la principal responsable del *shedding* de Dsg-2 induït per EGFR. Com a control del tractament amb EGF varem fer servir un anticòs monoclonal (C225; cetuximab) que bloqueja l'accés del lligand al seu receptor i, per tant, inhibeix la seva activació (Yarden et al., 2001). Tal i com esperàvem, el bloqueig d'EGFR amb C225 inhibeix l'activació del *shedding* de Dsg-2 mediada per EGF així com l'increment de la forma activa d'ADAM17 (figura 37B; panell superior i central) confirmant la importància d'aquesta metal·loproteasa en el *shedding* de Dsg-2 mediat per aquest receptor. A més a més, C225 també provoca una disminució dels nivells de la forma fosforilada d'EGFR (pEGFR) (figura 37B; panells inferiors), tal i com ja estava descrit (Yarden et al., 2001), la qual cosa indica que el tractament amb l'anticòs ha funcionat perfectament.

Discussió (II)

VIII. DISCUSSIÓ (II)

1.-IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL *shedding* DE NOUS SUBSTRATS D'ADAM17 MITJANÇANT L'APLICACIÓ DE LA TÈCNICA PROTEÒMICA DEL DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*)

Cada vegada hi ha més evidències que suggereixen que la funció de les metal·loproteases extracel·lulars (MMPs) va més enllà de la degradació de components de la matriu extracel·lular (Mott et al., 2004). Actualment se sap que regulen aspectes importants del comportament de la cèl·lula clarament relacionats amb el càncer com, per exemple, la migració i proliferació. Això, juntament amb el fet que la seva sobreexpressió és habitual en aquest tipus de patologia, ha fet que les metal·loproteases s'hagin considerat potencials dianes terapèutiques. D'aquesta manera es varen començar a utilitzar diferents inhibidors de metal·loproteases en un gran nombre d'assajos clínics la majoria dels quals, inesperadament, varen fracassar (Coussens et al., 2002). És més, s'ha descrit que la inhibició d'algunes metal·loproteases com, per exemple, l'MMP-8 afavoreix l'aparició de tumors (Balbin et al., 2003). Malgrat aquests resultats decebedors, altres estudis han pogut concloure que algunes metal·loproteases com, per exemple, l'MMP-1 sí que són bones dianes terapèutiques (Boire et al., 2005) ja que al ser inhibida es bloqueja el *shedding* de PAR-1, un receptor de membrana relacionat amb la capacitat tumorogènica i invasiva de determinades línies cel·lulars humanes.

Tot això ens permet concloure que és important caracteritzar en detall la funció individual de cada metal·loproteasa per poder definir, així, quines d'elles poden ser susceptibles de ser inhibides en una teràpia antitumoral. Una de les formes de caracteritzar la funció d'una metal·loproteasa és identificar el seu repertori de substrats, és a dir, el seu degradoma (Lopez-Otin et al., 2002). Aquest objectiu no és fàcil de complir ja que, per una banda, un mateix substrat pot ser-ho per diferents metal·loproteases i, per l'altra, sovint les metal·loproteases estan sobreexpressades en tumors i aquest fet pot afavorir que molècules irrellevants per la metal·loproteasa passin a formar part del seu degradoma.

Per tal d'identificar nous substrats de metal·loproteases varem comparar per DIGE els proteomes dels medis condicionats de cèl·lules tractades i sense tractar amb BB-94, un inhibidor no específic de metal·loproteases derivat de l'àcid hidroxàmic. Com a model varem utilitzar cèl·lules que sobreexpressaven ADAM17, una metal·loproteasa responsable del *shedding* de diferents lligands de l'EGFR (Sahin et al., 2004) algun dels quals estan inactius quan estan ancorats a la membrana (Borrell-Pages et al., 2000). Aquest receptor s'activa de forma aberrant en una gran varietat de càncers com, per exemple, càncer de pulmó o carcinomes renal i colorectal (Baselga et al., 2005; Yarden et al., 2001). Per tant, aquesta molècula s'ha convertit en una diana terapèutica de primer ordre contra el càncer i, de fet, un gran nombre de fàrmacs antitumorals tenen com a objectiu la seva inhibició (Baselga et al., 2005). En aquest sentit, és important destacar que estudis *in vitro* revelen que la inactivació d'ADAM17 provoca una inhibició de l'EGFR (Borrell-Pages et al., 2003; Dong et al., 1999). Amb tot això podríem especular d'inici que la inhibició d'ADAM17 podria ser interessant com a teràpia antitumoral però el fet que ADAM17 sigui molt probablement responsable del *shedding* d'un número elevat de proteïnes que desconeixem fa que sigui imprescindible conèixer millor el degradoma d'aquesta metal·loproteasa abans de considerar-la una diana terapèutica.

Els resultats obtinguts amb el DIGE mostren que el *shedding* del TfnR, ALCAM i Dsg-2 augmenta en cèl·lules A431 transfectades amb ADAM17 indicant que la sobreexpressió de la metal·loproteasa té un efecte sobre les tres proteïnes. Per altra banda, hem demostrat el paper principal que juga ADAM17 sobre ALCAM ja que en cèl·lules defectives per aquesta metal·loproteasa el *shedding* de la molècula d'adhesió s'inhibeix considerablement. En canvi, l'anàlisi del *shedding* de Dsg-2 en aquesta mateixa línia cel·lular ens indicava que una altra metal·loproteasa era la responsable principal del seu processament proteolític. Finalment, varem determinar que aquesta responsable era ADAM10 ja que en cèl·lules deficientes per la metal·loproteasa el *shedding* de Dsg-2 quedava completament bloquejat. Per tant, Dsg-2 és substrat de dues metal·loproteases: per una banda, d'ADAM10 i, per l'altra, i només en condicions de sobreexpressió, d'ADAM17.

1.1.-Caracterització d'una nova forma de Dsg-2: P100 Dsg-2

Els estudis de caracterització del *shedding* de Dsg-2 ens van permetre identificar, a més a més, una nova forma de Dsg-2 que varem anomenar P100 Dsg-2. Aquesta forma té una migració electroforètica lleugerament superior a la que presenta sDsg-2 i la detectem en els llistats cel·lulars. Estudis de fraccionament subcel·lular ens varen indicar que P100 Dsg-2 era una proteïna integral de membrana i, per tant, conservava la regió transmembrana. Aquestes dades ens varen permetre plantejar la hipòtesi de que P100 Dsg-2 es formaria mitjançant un tall proteolític intracel·lular molt proper a la membrana plasmàtica que eliminaria el domini citoplasmàtic de tal manera que les diferències en la migració electroforètica de P100 Dsg-2 i sDsg-2 es deurien exclusivament a la presència de la regió transmembrana a P100 Dsg-2. Per confirmar que aquesta hipòtesi era certa havíem de demostrar, per una banda, que P100 Dsg-2 perdia la regió citoplasmàtica i així ho varem fer, encara que no varem poder especificar per quin punt concret i, per l'altra, l'existència d'una proteasa que generés aquesta forma. Inicialment varem especular amb la opció que aquesta proteasa fos una metal·loproteasa però el fet que el tractament amb BB-94 incrementés els seus nivells en comptes de disminuir-los ens va fer descartar aquesta idea. El següent inhibidor que varem provar va ser L-685,458 que inhibeix les presenilines del complex γ -secretasa. Aquest complex és l'encarregat de processar proteolíticament algunes proteïnes de la superfície cel·lular mitjançant un tall a la regió transmembrana que dona lloc a l'alliberament d'un fragment citoplasmàtic soluble que es translocarà al nucli i tindrà la capacitat de regular la transcripció de gens (Annaert et al., 2002; Fortini, 2002). Les presenilines són, dins del complex γ -secretasa, unes proteïnes de la família de les aspartil proteases amb vuit dominis transmembrana responsables directes d'aquest tall. Així, la seva inhibició mitjançant L-685,458 bloqueja la formació del fragment citoplasmàtic soluble de proteïnes com l'APP (*β -Amyloid Protein Precursor*), el receptor Notch (Annaert et al., 2002; Fortini, 2002) o HER4 (Ni et al., 2001), els lligands del receptor Notch (LaVoie et al., 2003) o molècules d'adhesió com les E- i N-cadherines o les γ -protocadherines (Hambusch et al., 2005; Marambaud et al., 2002; Rao et al., 2003). És molt important destacar que el complex γ -secretasa només actua sobre la proteïna diana si aquesta ha estat primer objecte de *shedding* per part de metal·loproteases. Encara que aquest no és el nostre cas, varem intentar bloquejar la

formació de P100 Dsg-2 amb l'inhibidor L-685,468 i el resultat va ser que el complex γ -secretasa no era el responsable de la formació de P100 Dsg-2.

El següent grup d'inhibidors que varem provar varen ser l'inhibidor de caspasa 3 (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) i, seguidament, l'inhibidor general de caspases anomenat Z-Vad. Les caspases són cisteïn proteases (Yuan et al., 2000) que tenen com a principal missió provocar l'entrada de les cèl·lules en apoptosi i poden tenir com a substrats a altres membres de la mateixa família de les caspases així com altres proteïnes proapoptòtiques. Entre aquests substrats cal destacar un gran nombre de proteïnes transmembrana les quals són processades proteolíticament en el seu domini citoplasmàtic després del segon àcid aspàrtic d'una seqüència consens del tipus DXXD (Shi, 2002; Talanian et al., 1997). Aquestes proteases semblaven unes interessants candidates a ser les responsables de la formació de P100 Dsg-2 ja que dels més de 250 substrats identificats de caspases (Fischer et al., 2003b) la gran majoria són molècules d'adhesió o proteïnes associades al citoesquelet com, per exemple, les queratines 18 i 19 (Caulin et al., 1997; Ku et al., 1997), la vimentina (Byun et al., 2001), la E-cadherina (Steinhusen et al., 2001), la desmoplaquina (Weiske et al., 2001), la β -catenina i la placoglobina (Brancolini et al., 1998; Herren et al., 1998) o les cadherines desmosomals 1 i 3 (Dsg-1 i Dsg-3) les quals s'han identificat com a substrats de caspasa 3 (Dusek et al., 2006; Weiske et al., 2001). Així doncs, varem provar inicialment l'inhibidor de caspasa 3 i el resultat va ser que la formació de P100 Dsg-2 no era bloquejada per aquest inhibidor. La utilització de l'inhibidor general de caspases (Z-Vad) va donar els mateixos resultats negatius. També varem provar inhibidors de calpaines (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO; ALLN), unes proteases intracel·lulars de la família de les cisteïn proteases i amb un domini catalític anàleg al d'altres proteases com, per exemple, les caspases encara que d'origen filogenètic diferent (Sorimachi et al., 1997). La seva activitat està regulada per Ca^{2+} i es desconeix exactament quin paper fisiològic juguen tot i que se les ha relacionat amb apoptosi o amb l'aparició de la malaltia d'Alzheimer (Sorimachi et al., 1997). Aquestes proteases són les responsables de la proteòlisi de filaments intermedis (Elamrani et al., 1995; Makowski et al., 1998) així com de la E-cadherina la qual perd el seu domini citoplasmàtic donant lloc a una versió d'aquesta que no pot unir-se a la β -catenina, γ -catenina o p120. A més a més, aquesta versió truncada de la E-cadherina s'acumula tant en metàstasis com en tumors primaris de

pròstata (Rios-Doria et al., 2003). Tenint en compte això varem creure convenient analitzar si aquestes proteases eren les responsables de P100 Dsg-2 i el resultat va determinar que tampoc hi participaven.

El següent pas va ser provar inhibidors de romboïds com, per exemple, la dicloroisocumarina (DCI). Aquestes proteases són proteïnes amb set dominis transmembrana que pertanyen a la família de les serín proteases i tenen la peculiaritat de produir un tall intramembrana similar al que realitzen les presenilines (Freeman, 2004). El primer membre d'aquesta família es va descobrir en *Drosophila melanogaster* (Rhomboid-1) encara que són unes proteïnes extraordinàriament conservades en tota l'evolució. Funcionalment s'ha descrit que tenen un paper regulador de l'activitat d'spitz, l'homòleg de l'EGF en *D. Melanogaster* (Freeman, 2004), i també intervenen en la proteòlisi d'una família de molècules d'adhesió anomenades adhesines i que són essencials per l'activitat de paràsits causants de malalties com, per exemple, la malària (Brossier et al., 2005). Els resultats amb aquest inhibidor indiquen que aquestes proteases tampoc intervenen en la formació de P100 Dsg-2.

Finalment, varem provar inhibidors del proteasoma (MG132), un complex de proteïnes encarregat de degradar proteïnes que no són necessàries per la cèl·lula o que s'han plegat erròniament. El resultat amb l'inhibidor MG132 indicava que el proteasoma tampoc estava relacionat amb la síntesi de P100 Dsg-2. El fet que es demostrés que P100 Dsg-2 no era un producte de degradació per part del proteasoma era esperable tenint en compte que el proteasoma realitza la seva funció al citoplasma i aquesta forma es trobava a la membrana plasmàtica formant part dels desmosomes (figura 35).

A pesar dels resultats negatius amb els inhibidors de proteases creiem que un tall proteolític és la via més raonable per explicar la formació de P100 Dsg-2, per tant, queda totalment oberta la qüestió sobre la identitat de la proteasa responsable de la seva formació. Per altra banda, el fet que un tall proteolític intracel·lular pugui ser l'origen de P100 Dsg-2 permet especular amb l'existència d'un fragment citoplasmàtic soluble de Dsg-2 amb una potencial activitat transcripcional similar a la que tenen els fragments citoplasmàtics que genera el complex γ -secretasa per altres proteïnes. L'existència d'una fragment citoplasmàtic soluble podria explicar els resultats d'uns treballs a on detecten

en línies cel·lulars de carcinoma escamós de pell un marcatge juxtenuclear de Dsg-1 i Dsg-2 utilitzant un anticòs que reconeix el domini citoplasmàtic de les dues isoformes (Kronic et al., 1998).

Malgrat que desconeixem quin és el mecanisme que dóna lloc a la formació de P100 Dsg-2 els resultats obtinguts sobre ella referents a la localització subcel·lular i el fet que sigui una forma particularment aparent en cèl·lules MEF ADAM10 $-/-$ o en cèl·lules tractades amb BB-94 ens va permetre elaborar dos models que explicarien la seva formació: el primer model suggereix que ADAM10 i ADAM17 competirien amb la proteasa desconeguda responsable de la formació de P100 Dsg-2 per la Dsg-2 (figura 38A). El segon model, en canvi, proposa que P100 Dsg-2 pot ser també substrat d'ADAM10 i ADAM17 (figura 38B). En els dos casos, la inhibició de les metal·loproteases, ja sigui per un inhibidor com BB-94 o per ablació genètica, sempre donaria com a resultat l'acumulació de P100 Dsg-2 mentre que l'activació de metal·loproteases com ADAM17 mitjançant, per exemple, el tractament amb EGF, donaria lloc a la desaparició de P100 Dsg-2 concomitantment a un augment en els nivells de forma soluble (sDsg-2).

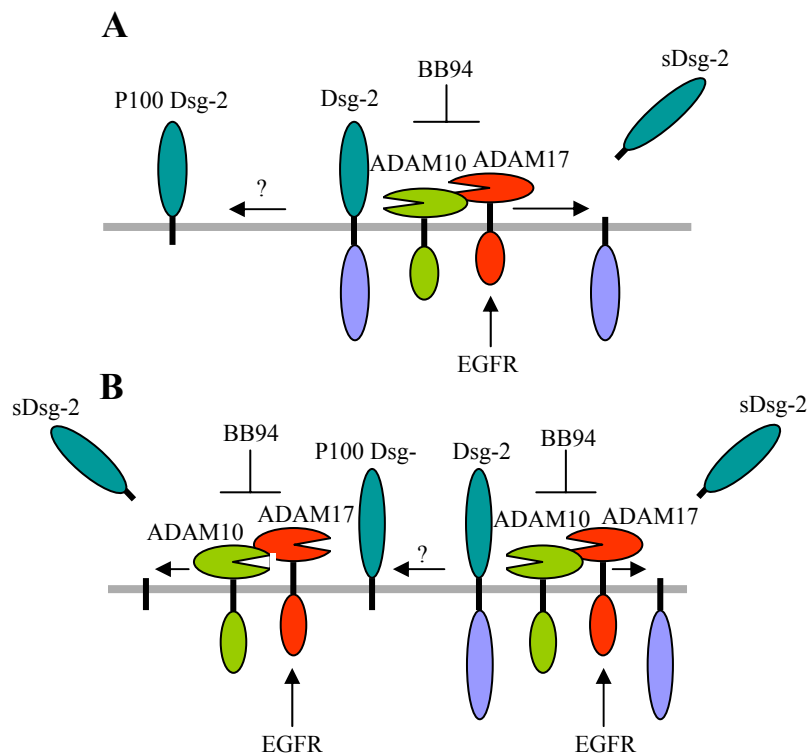


Figura 38. Models hipotètics per la generació de les diferents espècies de Dsg-2. A, Esquema a on es descriu el *shedding* de Dsg-2 per ADAM10 i ADAM17. L'activació de l'EGFR incrementa els nivells d'ADAM17 activa i, conseqüentment, la producció de sDsg-2. Per altra banda, la inhibició d'ADAM10 i ADAM17 mitjançant BB-94 dóna lloc a un increment en la disponibilitat de Dsg-2 per part de la proteasa desconeguda que dóna lloc a P100 Dsg-2. B, en aquest model, les dues formes, Dsg-2 i P100 Dsg-2 poden ser substrats d'ADAM10 i ADAM17.

Una altra pregunta que es planteja veient aquests resultats és quin sentit té que aparegui una forma de Dsg-2 sense domini citoplasmàtic en els desmosomes tenint en compte que en aquesta regió de les cadherines desmosomals s'hi uneixen les proteïnes que fan d'intermediàries entre aquestes i els filaments intermedis (Getsios et al., 2004). Sembla raonable pensar que la presència d'aquesta forma pot comportar la desestructuració del desmosoma i, per tant, la pèrdua de la capacitat de les cèl·lules per mantenir les unions entre elles. En les unions adherents, la falta del domini citoplasmàtic de la E-cadherina no només interromp la unió d'aquesta al citoesquelet d'actina sinó que també afecta greument a la unió entre els dominis extracel·lulars de les cadherines de cèl·lules adjacents (figura 29) i la raó la trobem en el fet que per establir aquesta unió es necessita la interacció prèvia de la E-cadherina amb el citoesquelet d'actina (Yap et al., 1997). És possible, per tant, que la presència de P100 Dsg-2 tingui un paper clau en la complexa dinàmica de formació-desestructuració del desmosoma i, per tant, en la regulació de processos com la migració cel·lular.

1.2.-Mecanismes de regulació i paper del *shedding* d'ALCAM i Dsg-2

El *shedding* és un tall proteolític que afecta a una gran quantitat de proteïnes transmembrana i en modula la seva funció. Això fa, per tant, que necessiti un control adequat. A la figura 37 (panell superior) es pot veure com l'activació de l'EGFR amb tractaments llargs d'EGF dóna lloc a un increment del *shedding* de Dsg-2. Aquest resultat coincideix amb els d'altres autors que descriuen que l'ús d'inhibidors d'EGFR bloqueja el *shedding* d'aquesta molècula d'adhesió (Lorch et al., 2004). A més a més, sabem que el tractament amb EGF també incrementa els nivells de la forma activa d'ADAM17 a la superfície cel·lular (figura 37; panell central), per tant, molt probablement l'augment del *shedding* de Dsg-2 degut al tractament amb EGF s'expliqui per un increment concomitant dels nivells d'ADAM17 a la membrana plasmàtica. Una de les conseqüències de la inhibició d'EGFR i, per tant, del *shedding*, és que la quantitat de Dsg-2 present en el desmosoma augmenta (Lorch et al., 2004) per tant el processament proteolític de Dsg-2 podria regular l'adhesió cel·lular. No obstant això, altres estudis com, per exemple, la determinació de la quantitat de desmosomes presents en cèl·lules deficientes o bé que sobreexpressin ADAM10 i ADAM17 ajudarien a comprendre millor el paper real del *shedding* de Dsg-2 en l'adhesió cel·lular.

L'EGFR se sobreexpressa en un gran número de tumors humans (Baselga et al., 2005; Yarden et al., 2001) la qual cosa suggereix que en aquests tipus de tumors el *shedding* dels substrats d'ADAM17 és probable que estigui sobreactivat. Per tant, les cèl·lules tumorals que presenten una sobreactivació d'EGFR molt probablement tinguin, per una banda, un excés de disponibilitat de factors de creixement, que promouran proliferació cel·lular, i per l'altra, una disminució de l'adhesió cel·lular degut a una disminució de les molècules d'adhesió a la superfície cel·lular, la qual cosa incrementarà la capacitat migratòria. En aquest sentit, existeixen diversos treballs que relacionen la pèrdua d'expressió de les cadherines desmosomals a la superfície cel·lular i la capacitat invasiva de certs tumors. Així, Kurrey i col·laboradors demostren que la capacitat metastàtica de determinades línies cel·lulars de càncer d'ovari es deu a la inhibició de l'expressió de molècules d'adhesió com la E-cadherina, la β -catenina o la Dsg-2 per efecte de la sobreexpressió dels factors de transcripció *Snail* i *Slug* (Kurrey et al., 2005). També s'ha descrit que la capacitat metastàtica correlaciona positivament amb el número de components desmosomals que no s'expressen en carcinoma escamós oral (Shinohara et al., 1998). Així mateix, la sobreexpressió de Dsg-1 i Dsg-2, entre d'altres, inhibeix la capacitat invasiva de línies cel·lulars de carcinoma escamós oral (De Bruin et al., 1999). A més a més, s'ha descrit que Dsg-2 és un marcador de metàstasi en línies cel·lulars humanes de càncer prostàtic (Trojan et al., 2005) i la seva expressió està anormalment reduïda a la superfície cel·lular (o s'expressa en altres compartiments subcel·lulars) tant en càncers gàstrics familiars com esporàdics (Biedermann et al., 2005). En qualsevol cas, la proliferació i la migració cel·lular són dos processos importants per entendre la formació i invasió tumoral, per tant, l'augment del *shedding* dels substrats d'ADAM17 per efecte d'una sobreactivació d'EGFR podria ajudar a entendre el paper que té aquest receptor en la tumorogènesi.

La caracterització del *shedding* de Dsg-2 i ALCAM ens ha obert una nova via per estudiar els mecanismes que regulen processos com l'adhesió i la migració cel·lular. En aquest treball hem pogut demostrar que el *shedding* és un procés regulat per mecanismes com, per exemple, l'activació d'EGFR el qual està sobreactivat en un gran número de tumors. No obstant això, aquest treball hauria de continuar per intentar determinar quin paper juga realment el *shedding* d'aquestes molècules tant en l'adhesió com en la migració cel·lular. Per fer-ho, cal establir bons models cel·lulars a on el processament proteolític d'aquestes proteïnes estigui completament inhibit, per una

banda, i models a on no existeixi la forma sencera de la proteïna, per l'altra. A més a més, en el cas de Dsg-2 també s'hauria d'establir un bon model a on el component majoritari dels desmosomes fos P100 Dsg-2. Amb tot això, s'hauria de determinar en aquests models com es veu afectada l'adhesió i la migració cel·lular mitjançant assajos funcionals específics. No cal oblidar que aquests dos substrats de *shedding* s'han identificat en una línia cel·lular puntual i mitjançant l'aplicació d'una tècnica proteòmica concreta anomenada DIGE, per tant, l'ús d'altres línies cel·lulars així com la optimització de la tècnica del DIGE mitjançant el marcatge específic de les proteïnes de la superfície cel·lular en comptes dels medis condicionats així com l'aplicació d'altres tècniques proteòmiques com, per exemple, els marcatge isotòpic (*Isotope Coded Protein Labeling; ICPL*) o bé el marcatge metabòlic mitjançant aminoàcids també marcats isotòpicament (*Stable Isotopic Labeling with Aminoacids in Cell culture; SILAC*) poden col·laborar a caracteritzar encara millor els degradomes de les metal·loproteases.

Conclusions (II)

IX. CONCLUSIONS (II)

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquesta part del treball hem extret les següents conclusions:

1. El DIGE és un mètode útil per identificar substrats de metal·loproteases. Amb aquesta tècnica hem identificat tres nous substrats de *shedding* anomenats TfnR, ALCAM i Dsg-2.
2. ADAM17 és la principal metal·loproteasa responsable del *shedding* d'ALCAM mentre que només intervé en el *shedding* de Dsg-2 quan se sobreexpressa.
3. ADAM10 és la metal·loproteasa responsable del *shedding* de Dsg-2 ja que la seva absència el bloqueja completament.
4. L'activació d'EGFR incrementa el *shedding* de Dsg-2 molt probablement degut al fet que també augmenta la quantitat d'ADAM17 a la superfície cel·lular.
5. Dsg-2 pot donar lloc a una forma alternativa anomenada P100 Dsg-2 que apareix independentment del tall proteolític mediat per metal·loproteases.
6. P100 Dsg-2 es troba ancorada a la superfície cel·lular mitjançant un domini transmembrana i la seva formació no és sensible a cap dels inhibidors de proteases utilitzats. Només es detecta un augment dels nivells d'aquesta quan tractem les cèl·lules amb BB-94 molt probablement degut a un augment de la disponibilitat de Dsg-2 per part de la proteasa responsable de la seva formació.
7. P100 Dsg-2 és una forma que apareix en els desmosomes la qual cosa suggereix que pot tenir un paper important en la regulació de l'adhesió cèl·lula-cèl·lula.

Materials i mètodes

X. MATERIALS I MÈTODES

1.-CARACTERITZACIÓ DELS MECANISMES QUE INTERVENEN EN L'ENDOCITOSI DE *proTGF- α*

1.1.-Materials

1.1.1.-Construccions utilitzades

- **proTGF- α unit a l'epítot HA:** Aquesta construcció està descrita en (Arribas et al., 1995) i consisteix en la inserció mitjançant PCR de l'epítot HA entre la His⁴² i la Phe⁴³ del cDNA de proTGF- α de rata i posterior clonatge al vector d'expressió eucariota pVAO (Paabo et al., 1983).
- **proTGF- α unit a l'epítot myc:** Aquesta construcció es va obtenir mitjançant la inserció per PCR de l'epítot myc entre la His⁴² i la Phe⁴³ del cDNA de proTGF- α de rata i posterior clonatge al vector d'expressió eucariota pCDNA3.1 Z(+) (Invitrogen).
- **proTGF- α Δ CT:** A partir de la construcció anterior, es va eliminar mitjançant PCR el domini citoplasmàtic de proTGF- α des de la His¹²⁹ fins la Ser¹⁵⁵ però es varen mantenir els quatre últims aminoàcids (Glu¹⁵⁶, Thr¹⁵⁷, Val¹⁵⁸, Val¹⁵⁹).
- **Fusió GFP-Eps15 Δ 95-295:** Aquesta construcció va ser cedida per la Dra. Dautry-Varsat i està descrita en (Benmerah et al., 1999). Bàsicament, consisteix en el clonatge d'Eps15 silvestre en el vector d'expressió eucariota EGFP-C2 (Clontech) i posterior deleció de la regió aminoacídica 95-295 mitjançant PCR.

1.1.2.-Anticossos

- Anticòs monoclonal anti-HA (RYDVPDYASL) (obtingut de Babco).
- Anticòs policlonal anti-myc (AYILSVQAEEQKLISEEDLL) (ab9106; obtingut d'Abcam).

- Anticòs monoclonal anti-actina (epítop no especificat; reconeix les isoformes α , β i γ) (Oncogene Products).
- L'anticòs monoclonal anti-EGFR (Tyr¹¹⁷³ no fosforilada) s'ha obtingut d'Upstate Biotechnology, Inc.
- Anticòs policlonal anti-EGFR fosforilat (Tyr¹⁰⁶⁸) s'ha obtingut de Cell Signaling.
- Tots els anticossos secundaris fluorescents s'han obtingut de Molecular Probes, Inc.

1.13.-Reactius

- L'EGF recombinant humà s'ha obtingut d'R&D Systems.
- L'EGF i la transferrina fluorescents s'han obtingut de Molecular Probes, Inc.
- El BB94 prové de British Biotech.

1.1.4.-Línies cel·lulars i transfeccions

- Les línies cel·lulars MDCK (procedents de ronyó de gos normal; *Canis familiaris*), HeLa (procedents de càncer de cèrvix; *Homo sapiens*) i CHO (procedents d'ovari de hámster xinès; *Cricetulus griseus*) s'han crescut en medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complementat amb 10% de sèrum fetal boví i glutamina 2 mM.
- La línia cel·lular MDCK que sobreexpressa la fusió GFP-celubrevina va ser cedida pel Dr. T. Galli i està descrita en (Martinez-Arca et al., 2003).
- Les cèl·lules A431 (procedents de carcinoma de cèrvix; *Homo sapiens*) es varen créixer en DMEM/F-12 complementat amb 10% de sèrum fetal boví i glutamina 2 mM.
- Les transfeccions transitòries es varen fer utilitzant el reactiu Lipofectamine 2000 (invitrogen).
- Per tal d'obtenir els clons estables les cèl·lules es varen cotransfectar amb els plasmidis d'interès i el que confereix resistència a geneticina anomenat pCDneo (Arribas et al., 1995) o resistència a higromicina (pREP4; Invitrogen) segons correspongui. Posteriorment, es varen seleccionar clons individuals amb

geneticina 500 µg/ml (per les MDCK i les HeLa) o higromicina 250 µg/ml (per les CHO). Les transfeccions es varen fer mitjançant la tècnica del fosfat càlcic¹ i per cada construcció es varen seleccionar com a mínim dos clons que es comportessin de forma similar. Finalment, d'aquests dos se'n va seleccionar un per fer els experiments.

1.2.-Mètodes

1.2.1.-Marcatge metabòlic i immunoprecipitació

Les cèl·lules CHO establiment transfectades amb la forma silvestre de pro-TGF- α que conté l'epítop myc o la mateixa construcció sense el domini citoplasmàtic es varen sembrar en medi de cultiu a una densitat de 2×10^6 cèl·lules en una placa de 60mm. El dia després, les cèl·lules es varen rentar dues vegades amb DMEM sense metionina i cisteïna i es varen incubar en aquest medi durant 1 hora abans del marcatge amb 1 mCi/ml de translabel S³⁵ (Biolink). Després d'aquest pols, les cèl·lules es varen lliurar en tampó de llisi² i els extractes, obtinguts mitjançant la centrifugació durant 15 minuts a 16.000g del producte resultant de la llisi i posterior recuperació del sobrenedant, es varen clarificar prèviament mitjançant la incubació amb proteïna A-agarosa (Amersham Biosciences) durant 1h a 4°C. A continuació, aquests extractes es varen immunoprecipitar durant tota la nit a 4°C i en rotació constant mitjançant l'anticòs policlonal contra l'epítop myc seguit d'una incubació d'1 hora a 4°C amb proteïna A-agarosa. Les proteïnes marcades i immunoprecipitades es varen resoldre en SDS-PAGE i detectades mitjançant fluorografia.

¹ Les cèl·lules (50-60% de confluència) es transfecten amb una proporció 10:1 de plasmidi d'interès:plasmidi de resistència (8µg:0.8µg) que es barreja amb 450 µl d'H₂O estèril i 50 µl de CaCl₂ 2.5M. A continuació, s'afegeixen gota a gota 500 µl d'HBS 2X (50 mM HEPES pH 7.1, NaCl 280mM, Na₂HPO₄ 1.5mM) a la barreja anterior mentre aquesta és sotmesa a bombolleig. La barreja total s'aboca a les cèl·lules i es deixa 16-18 hores. Finalment, es retira el medi amb la barreja de transfecció, es fa un tractament amb glicerol al 10% en PBS durant 1.5 minuts, es renten les cèl·lules 3 cops amb PBS i s'incuben amb medi complementat amb 20% de sèrum fetal durant 12 hores. Seguidament es renten les cèl·lules i s'afegeix medi nou complementat amb 10% de sèrum fetal més la resistència adequada i penicil·lina/estreptomicina.

² 1% Nonidet P-40, 10 mM EDTA i inhibidors de proteases (10 mM 1,10-fenantrolina, 10 µg / ml aprotinina i 10 µg/ml leupeptina) en PBS.

1.2.2.-Anàlisi mitjançant citometria de flux

Anàlisi del shedding de proTGF- α (figura 14B) - Les cèl·lules CHO que expressen establement la construcció silvestre de pro-TGF- α amb l'epítot HA es varen sembrar en quatre plaques de 60mm a una densitat de 2×10^6 per placa. Al cap de 8 hores es varen rentar les quatre plaques i, posteriorment, es varen incubar durant 16 hores en medi sense sèrum fetal boví. Una de les plaques es va tractar, a més a més, amb BB94 10 μ M. El dia després, les cèl·lules es varen tractar o no amb PMA 1 μ M i seguidament es varen resuspendre mecànicament³. A continuació, es varen incubar amb l'anticòs contra l'epítot HA (10 μ g/ml en PBS-BSA 2.5%) durant 1 hora a 4°C, es varen rentar 3 vegades amb PBS-BSA 2.5% i, posteriorment, es varen incubar amb un anticòs secundari conjugat a fluoresceïna (FITC; fluoresceïn isothiocyanate) diluït en PBS-BSA 2.5% durant 1 hora a 4°C. Transcorregut aquest temps, les cèl·lules es varen rentar de nou 3 vegades amb PBS-BSA 2.5% i resuspeses amb iodur de propidi 2mg/ml (en PBS-BSA 2.5%). Només es varen incloure en l'anàlisi les cèl·lules vives.

Anàlisi del shedding de proTGF- α (figura 20E) - Les cèl·lules CHO que expressen establement la construcció silvestre de proTGF- α amb l'epítot myc o la mateixa construcció sense el domini citoplasmàtic es varen sembrar un dia abans en plaques de 100mm. El dia després, les cèl·lules es varen tractar amb PMA 1 μ M i seguidament es varen resuspendre igual que a l'apartat anterior, es varen contar i 2×10^6 es varen incubar amb l'anticòs policlonal anti-myc en PBS-BSA 2.5% durant 1 hora a 4°C. Seguidament les cèl·lules es varen rentar 3 vegades amb PBS-BSA 2.5% i, a continuació, es varen incubar amb un anticòs secundari conjugat a FITC (diluït en PBS-BSA 2.5%) durant 1 hora a 4°C. Finalment, les cèl·lules es varen rentar de nou 3 vegades amb PBS-BSA 2.5% i, seguidament, es varen resuspendre amb iodur de propidi (2mg/ml en PBS-BSA 2.5%). Només es varen incloure en l'anàlisi les cèl·lules vives.

Assajos d'internalització - Aquest assaig es va fer exactament igual que el descrit en l'apartat anterior amb l'excepció de que una vegada finalitzada la incubació amb l'anticòs anti-myc a 4°C, les cèl·lules es varen rentar i resuspendre en PBS-BSA 2.5% i

³ Per la resuspensió es va utilitzar un tampó de PBS amb EDTA 10 mM.

es varen deixar a 37°C durant els temps indicats abans de continuar amb la incubació amb l'anticòs secundari.

1.2.3.-*Immunofluorescències*

Per realitzar les immunofluorescències en cèl·lules permeabilitzades aquestes es varen fixar amb paraformaldèhid al 4% durant 20 minuts a temperatura ambient. Seguidament, es varen rentar amb PBS-NH₄Cl 50 mM i es varen permeabilitzar amb un tampó de permeabilització⁴. Tots els anticossos es varen diluir en tampó de permeabilització i es varen fer servir per incubar les cèl·lules durant 1 hora a temperatura ambient. En els casos indicats, les cèl·lules vives es varen incubar amb els anticossos primaris diluïts amb DMEM suplementat amb HEPES 15 mM, pH 7.4, abans de la fixació.

1.2.4.-*Assajos d'internalització de proTGF- α*

Per analitzar el paper de la clatrina en l'endocitosi de proTGF- α , les cèl·lules MDCK establiment transfectades amb la construcció de proTGF- α que conté l'epítot HA es varen transfectar transitòriament amb la construcció GFP-Eps15 Δ 95-295 o GFP sola (vector EGFP-C2 buit). 20 hores després de la transfecció, les cèl·lules es varen rentar i incubar amb medi sense sèrum durant 1 hora a 37°C i, posteriorment, incubades amb l'anticòs monoclonal anti-HA (10ng/ml) durant 15 minuts a 37°C abans de la fixació i permeabilització. El proTGF- α internalitzat i marcat amb l'anticòs anti-HA va ser detectar amb un anticòs secundari conjugat a Alexa fluor 568. L'experiment es va realitzar quatre vegades i en cada un d'ells es varen contar entre 50 i 100 cèl·lules expressant nivells comparables de GFP.

1.2.5.-*Assaig de reciclatge de proTGF- α*

En aquest assaig, les cèl·lules es varen incubar durant 1 hora a 4°C o a 37°C amb l'anticòs monoclonal anti-HA (10ng/ml) diluït en DMEM-HEPES 15 mM, pH 7.4.

⁴ 0.1% Saponina / 1% BSA en PBS.

Seguidament, l'anticòs present a la superfície cel·lular és eliminat mitjançant un rentat àcid⁵ i, a continuació, les cèl·lules es varen incubar en DMEM-HEPES 15 mM, pH 7.4 durant 1 hora a 37°C amb un anticòs secundari conjugat a Alexa Fluor A488 en presència d'EGF (100ng/ml) i l'inhibidor BB94 (25 µM) per tal de permetre el reciclatge del proTGF-α internalitzat a la superfície cel·lular així com la seva detecció.

1.2.6.-Assaig d'activació de l'EGFR

Les cèl·lules A431 es varen sembrar el dia 1 a una densitat de 10^6 cèl·lules per pou d'una placa de 6 pous. El dia següent (dia 2), les cèl·lules es varen rentar dues vegades amb DMEM/F12 i posteriorment es varen incubar 24 hores en medi sense sèrum. En paral·lel, el dia 2 es varen sembrar cèl·lules CHO o cèl·lules CHO establement transfectades amb el proTGF-α que conté l'epítoc myc o la versió que no té el domini citoplasmàtic a una densitat de 5×10^6 cèl·lules per placa de 100mm (varem utilitzat plaques no específiques per cultiu cel·lular per tal de facilitar la seva ressuspensió mecànica posterior). El dia 3, les cèl·lules CHO es varen resuspendre mecànicament (amb el tampó de ressuspensió descrit anteriorment) i, posteriorment, rentar dues vegades amb DMEM/F12. Seguidament, es varen contar i es varen afegir 5×10^6 cèl·lules de cada tipus cel·lular a cada un dels pous de la placa de 6 pous sembrada amb cèl·lules A431 durant els temps indicats. A més a més, un dels pous sembrats amb A431 es va incubar amb EGF (100ng/ml) com a control. Finalment, les cèl·lules es varen rentar dues vegades amb PBS fred i llisades amb el tampó de llisi anteriorment descrit. Els extractes cel·lulars es varen obtenir tal i com ja s'ha descrit i es varen analitzar mitjançant western-blot.

⁵ 0.5M àcid acètic / 0.2 M NaCl durant 2 minuts a 4°C.

2.-IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL *shedding* DE NOUS SUBSTRATS D'ADAM17 MITJANÇANT L'APLICACIÓ DE LA TÈCNICA PROTEÒMICA DEL DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*)

2.1.-Materials

2.1.1.-Construccions utilitzades

- **Dsg-2 humana:** Aquesta construcció va ser cedida per la Dra. K. Green i consisteix en el cDNA de desmogleina 2 humana que conté un epítot myc just a l'extrem carboxil terminal. La fusió Dsg2-myc es va alliberar del plasmidi original mitjançant una digestió amb BamHI i es va subclonar en pCDNA3.1 Z(+) utilitzant la mateixa diana.
- **ADAM17:** La construcció d'ADAM17 utilitzada per transfectar establement o transitòria les diferents línies cel·lulars va ser cedida pel Dr. R. Black i correspon al cDNA d'ADAM17 insertat en el vector d'expressió eucariota pCDNA3.1 Z(+).
- **ADAM10:** La construcció d'ADAM10 va ser cedida pel Dr. E.T. Parkin i correspon al cDNA d'ADAM10 bovina el qual es va escindir del plasmidi original mitjançant una digestió amb HindIII/NotI i posteriorment es va subclonar en pCDNA3-1 Z(+) utilitzant les mateixes dianes.

2.1.2.-Anticossos

- L'anticòs policlonal contra el domini citoplasmàtic d'ADAM17 es va obtenir en el laboratori mitjançant la immunització de conills de la soca *New Zeland* amb un pèptid que es troba situat entre els aminoàcids 695-824 de la metal·loproteasa i que es va conjuguar a KLH. Posteriorment, es va purificar per afinitat.
- Els anticossos policlonals contra el domini citoplasmàtic d'ADAM10 (B42.2), contra el fragment carboxil terminal de la presenilina 1 de ratolí (B32.1; l'antigen és el pèptid PKNPKYNTQRAERETQDSGSG corresponent als aminoàcids 310 a 330 que es va conjuguar a KLH abans de procedir a la immunització) i contra el domini carboxil terminal de l'APP (B63.3; l'antigen

correspon als últims 16 aminoàcids carboxil terminals: NGYENPTYKFFEQMQN que es varen conjuguar a KLH abans de procedir a la immunització) van ser cedits pel Dr. W. Annaert.

- Els anticossos policlonals contra els dominis extracel·lulars d'ALCAM i TfnR es varen comprar a Santa Cruz Biotechnology.
- L'anticòs monoclonal contra el domini citoplasmàtic de Dsg-2 es va comprar a ABCAM.
- L'anticòs policlonal contra l'EGFR total es va comprar a ABCAM mentre que l'anticòs contra l'EGFR fosforilat ja s'ha descrit anteriorment.
- L'anticòs monoclonal anti-myc (9E10) es va obtenir fent créixer l'hibridoma que el produeix.
- L'anticòs anti-actina ja s'ha descrit anteriorment.

2.1.3.-*Reactius*

- L'EGF i el BB94 ja s'han descrit anteriorment.
- L'anticòs bloquejant C225 s'ha obtingut de Merck.
- Els inhibidors de proteases L-685,458, l'inhibidor de caspasa 3, l'inhibidor general de caspases (Z-Vad) i l'MG-132 s'han comprat a Calbiochem. La resta d'inhibidors (Inhibidor de calpaina: ALLN i l'inhibidor de romboids: dicloroisocumarina; DCI) s'han comprat a Sigma.
- L'N-glicosidasa F s'ha comprat a Roche Diagnostics.
- La lectina aglutinina de la llavor del blat (WGA; *Wheat Germ Agglutinin*) es va adquirir de Vector Laboratories.

2.1.4.-*Línies cel·lulars i transfeccions*

- La línia cel·lular A431 ja s'ha descrit anteriorment.
- La línia cel·lular A431/ADAM17 creix en medi DMEM/F-12 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM de glutamina i 500 µg/ml de geneticina.
- Les cèl·lules CHO i les cèl·lules mutants deficients per ADAM17 (M2) creixen en DMEM suplementat amb 10% de sèrum fetal boví.

- Els fibroblasts procedents d'embrions de ratolins silvestres i deficients per ADAM10 (MEFs) creixen en medi DMEM suplementat amb 5% de sèrum fetal boví i en plaques de cultiu retractades amb 0,25% de gelatina.
- La línia cel·lular estable A431/ADAM17 es va obtenir mitjançant la sobreinfecció estable de les cèl·lules A431 amb la construcció d'ADAM17 anteriorment descrita i el vector buit que confereix resistència a geneticina anomenat pCDneo (Arribas et al., 1995) utilitzant el mètode de Fugene 6 (Roche Diagnostics). Per altra banda, les transfeccions transitòries de les cèl·lules CHO i M2 es varen realitzar mitjançant el mètode del DEAE-Dextrà⁶ mentre que per la transfecció estable de les cèl·lules M2 amb ADAM17 (M2/ADAM17) es va utilitzar el mètode del fosfat càlcic. Finalment, les transfeccions estables i transitòries de les cèl·lules MEFs es varen realitzar utilitzant el mètode de Fugene 6 (Roche Diagnostics).

2.2.-Mètodes

2.2.1.-Anàlisi del shedding de Dsg-2, ALCAM i TfnR en cèl·lules A431 i A431/ADAM17

Es varen sembrar cèl·lules A431 i A431/ADAM17 a una densitat de 5×10^5 per placa de 60mm. Al dia següent, les cèl·lules es varen rentar 3 vegades amb PBS i es varen cultivar durant 48 hores en medi sense sèrum fetal en presència o no de $10 \mu\text{M}$ de BB94. En el cas de Dsg-2, les cèl·lules també es varen tractar amb 50ng/ml d'EGF i/o 200nM de C225 durant 48 hores, segons les indicacions dels experiments. Transcorregut aquest temps, les cèl·lules es varen llisar en tampó de llisi⁷ i els llisats es varen quantificar⁸. Seguidament, es varen concentrar quantitats iguals de proteïna de

⁶ Les cèl·lules sembrades en plaques de 100mm (50-60% de confluència) es renten dues vegades amb medi sense sèrum fetal i, seguidament, són tractades amb la solució de transfecció (3,96 ml de medi de cultiu sense sèrum fetal, 40 μl de cloroquina (Sigma), 160 μl de DEAE-dextrà (dietilaminoetil-dextrà) i 8 μg del DNA d'interès). Al cap de 3 hores (s'ha de vigilar perquè el DEAE-dextrà és tòxic. Es considera acceptable fins a un 30% de mort cel·lular) es retira la solució de transfecció i s'afegeixen 5 ml. de DMSO (Merck) al 10% en PBS durant 1.5 minuts. Seguidament, es renten les cèl·lules i s'incuben durant 48 hores amb el medi de cultiu complementat amb 10% de sèrum fetal més penicil·lina/estreptomicina.

⁷ 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5M EDTA, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 10mM 1,10-fenantrolina, 1mM PMSF. Per analitzar els nivells d'ADAM10 en cèl·lules A431 varem afegir 25 μM de BB94 al tampó de llisi.

⁸ Assaig de proteïna DC (Biorad) basat en el mètode de Bradford.

cada un dels llisats amb aglutinina de llavor de blat (WGA)-conjugada a agarosa durant 2 hores a 4°C en rotació constant⁹. Les proteïnes unides a la lectina es varen eluir en tampó de càrrega¹⁰ i analitzar mitjançant SDS-PAGE i western-blot utilitzant anticossos específics. En paral·lel, els medis condicionats de les mateixes mostres es varen recuperar, concentrar amb WGA-agarosa i analitzar tal i com s'ha descrit pels llisats. El control de càrrega dels llisats i medis condicionats es va efectuar mitjançant una tinció de la membrana de nitrocel·lulosa amb el colorant vermell ponceau.

2.2.2.-Anàlisi del shedding de Dsg-2 en cèl·lules CHO i M2

Es varen sembrar 1.5×10^6 cèl·lules de CHO i M2 en plaques de 100mm i passades 16 hores es varen transfectar mitjançant el mètode del DEAE-dextrà. Al cap de 24 hores les cèl·lules es varen rentar amb medi sense sèrum i incubades en aquest mateix medi durant 48 hores. Finalment, es varen obtenir els medis condicionats i els llisats cel·lulars que es varen concentrar i analitzar tal i com s'ha descrit anteriorment.

2.2.3.-Anàlisi del shedding d'ALCAM en cèl·lules CHO, M2 i M2/ADAM17

Es varen sembrar 4×10^6 cèl·lules de CHO, M2 i M2/ADAM17 en plaques de 100mm. Passades 16 hores es varen rentar 3 vegades amb medi sense sèrum i incubades en aquest mateix medi durant 48 hores. Seguidament, es varen obtenir els llisats cel·lulars i medis condicionats que es varen concentrar amb WGA-agarosa i posteriorment tractar amb N-glicosidasa F¹¹. Finalment, les mostres es varen analitzar tal i com s'ha indicat anteriorment.

⁹ 30 µl d'una barreja 1:1 (v/v) de complex WGA-agarosa (sediment sòlid):tampó (10mM HEPES pH 7.5, 0.15M NaCl).

¹⁰ 40mM Tris-HCl pH 6.8, 6,25% Glicerol, 32 mM DTT, 1.5% SDS, 0,025% Blau de bromofenol.

¹¹ L'WGA-agarosa recuperada amb les glicoproteïnes dels llisats cel·lulars i medis condicionats unides (4000g 5 minuts) es ressuspèn amb 30µl de tampó de llisi i s'incuba a 95°C durant 5 minuts per eluir les proteïnes. Després es deixa refredar a 4°C (5-10 minuts) i, a continuació, s'hi afegeixen 3U d'N-Glicosidasa F per mostra. S'incuba durant 16 hores a 37°C.

2.2.4.-Anàlisi del paper de la confluència cel·lular en el shedding d'ALCAM

Es varen sembrar 3×10^5 cèl·lules A431 per placa en 4 plaques de 60mm. Al cap de 24 hores, es va rentar 3 vegades amb PBS una de les plaques i, posteriorment, es va incubar amb medi sense sèrum fetal durant 48 hores. Al cap de 48, 72 i 96 hores es va fer el mateix amb les tres plaques restants. Un cop transcorregut el temps d'incubació amb el medi sense sèrum (48 hores) es varen recuperar els medis condicionats i es varen obtenir els llisats cel·lulars que es varen quantificar, concentrar amb WGA-agarosa i analitzar mitjançant western-blot tal i com s'ha descrit anteriorment (figura 39). L'anàlisi del *shedding* d'ALCAM en cèl·lules A431 que es mostra a la figura 36B es va realitzar exactament igual com es descriu a l'apartat "Anàlisi del *shedding* de *Dsg-2*, *ALCAM* i *TfnR* en cèl·lules A431 i A431/ADAM17" però utilitzant les condicions de màxima confluència cel·lular descrites a la figura 39.

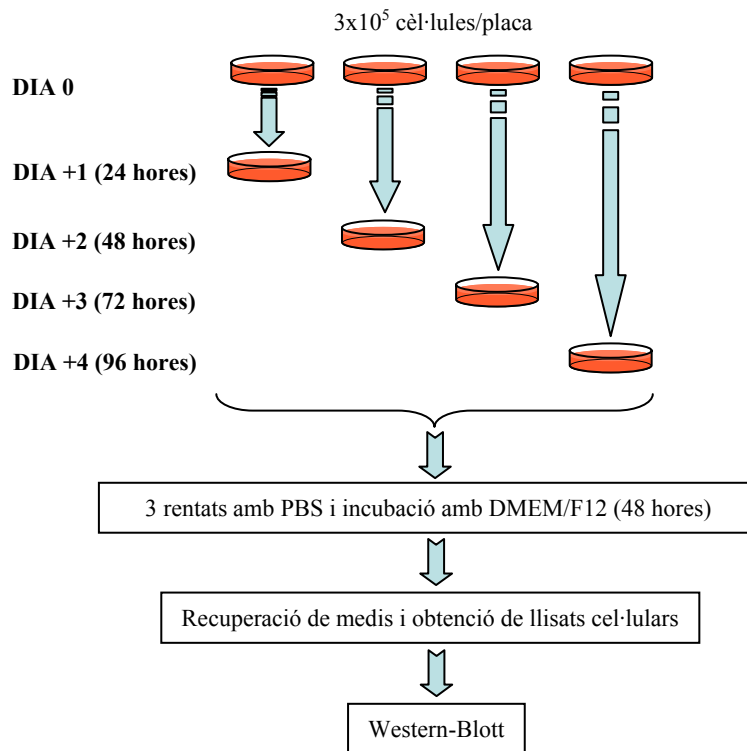


Figura 39. Esquema del protocol utilitzat per analitzar el paper de la confluència cel·lular en el *shedding* d'ALCAM.

2.2.5.-Anàlisi del shedding de Dsg-2 i P100 Dsg-2 en MEFs silvestres i deficients per ADAM10

Es varen sembrar cèl·lules MEFs silvestres i deficients per ADAM10 en plaques de 60 mm a una densitat de 5×10^5 cèl·lules per placa. A continuació, les cèl·lules es varen transfectar amb el cDNA de Dsg-2 utilitzant el reactiu Fugene 6 segons les indicacions del fabricant. Al cap de 24 hores les cèl·lules es varen rentar 3 vegades amb medi sense sèrum i es varen incubar en aquest mateix medi durant 48 hores. Seguidament, es varen recuperar els medis i es varen obtenir els llisats cel·lulars que es varen quantificar, concentrar amb WGA-agarosa i analitzar tal i com s'ha descrit anteriorment.

Per analitzar la presència de P100 Dsg-2 en cèl·lules MEFs deficients per ADAM10 mitjançant l'anticòs anti-myc es va transfectar transitòriament aquesta línia cel·lular (10^6 cèl·lules per placa de 60mm) utilitzant el reactiu Fugene 6 segons les indicacions del fabricant i al cap de 24 hores es varen llisar les cèl·lules per obtenir el llisat cel·lular que es va concentrar amb WGA-agarosa i analitzar mitjançant western-blot, tal i com s'ha descrit anteriorment.

2.2.6.-Obtenció de la fracció microsomal i extracció de proteïnes sense detergents

Les cèl·lules MEFs deficients per ADAM10 establiment transfectades amb Dsg-2 es varen llisar mitjançant sonicació (3 polsos de 5 segons. Potència 70%; Ultrasonicador UP50H Dr. Hielscher, GmbH). Els llisats cel·lulars obtinguts es varen centrifugar a 1.500g durant 15 minuts i el sediment obtingut (format per cèl·lules no trencades i nuclis) es va descartar. A continuació, els sobrenedants resultants es varen centrifugar a 100.000g durant 1 hora i els sediments obtinguts (fracció microsomal) es varen extreure amb PBS, 1% triton X-100, 1M NaCl o 0.1M Na_2CO_3 (pH 12.0) durant 30 minuts en gel. Transcorregut aquest temps les mostres es varen centrifugar de nou a 100.000g durant 1 hora. Els sobrenedants obtinguts (S) es varen recuperar i els sediments es varen rentar 3 vegades amb PBS i, posteriorment, es varen extreure amb 1% triton X-100 (en PBS) durant 30 minuts en gel. Finalment, l'extracte es va centrifugar de nou a 100.000g durant 1 hora i el sobrenedant resultant (P) juntament amb el que es va obtenir anteriorment (S) es varen concentrar amb WGA-agarosa durant

1 hora a 4°C. Les proteïnes obtingudes a partir de la concentració de les dues fraccions varen ser analitzades mitjançant western-blot.

2.2.7.-Anàlisi del shedding de Dsg-2 i de P100 Dsg-2 en les fraccions solubles i insolubles en triton X-100 procedents de cèl·lules A431

Es varen sembrar 5×10^5 cèl·lules A431 en una placa de 60mm. Al dia següent es varen rentar 3 vegades amb medi sense sèrum i, a continuació, es varen incubar en aquest mateix medi durant 48 hores. Passat aquest temps es va recuperar el medi condicionat i es va concentrar amb WGA-agarosa segons ja s'ha descrit. Paral·lelament, les cèl·lules es varen lliar mitjançant un tampó de llisi amb triton¹². El lliat obtingut es va centrifugar a 15.000g durant 15 minuts. El sobrenedant final és la fracció soluble en triton (S) mentre que el sediment residual es va extreure de nou amb un volum igual d'un tampó amb urea¹³. El lliat resultant és la fracció insoluble en triton (I) i es va sonicar (un pols de 5 segons. Potència 70%; Ultrasonicador UP50H Dr. Hielscher, GmbH) per tal de trencar el DNA alliberat per la llisi dels nuclis. Finalment, volums iguals de les fraccions S i I, juntament amb els medis condicionats (M) es varen analitzar mitjançant western-blot.

2.2.8.-Tractaments amb els inhibidors de proteases

Es varen sembrar cèl·lules A431 o MEFs deficientes per ADAM10 establiment transfectades amb la construcció de Dsg-2 (MEFs ADAM10 -/- Dsg2myc) en plaques de 60mm (5×10^5 cèl·lules per placa) i al dia següent es varen rentar 3 vegades amb medi sense sèrum. Seguidament, les cèl·lules es varen incubar amb els diferents inhibidors de proteases¹⁴ diluïts en medi sense sèrum durant 16 hores. Transcorregut aquest temps, els medis condicionats i/o els lliats cel·lulars es varen analitzar segons s'ha descrit anteriorment.

¹² 145mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% triton X-100.

¹³ 1% SDS, 8M Urea, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4.

¹⁴ Inhibidor del complex γ -secretasa (L-658,458): 125nM; Inhibidor de Caspasa 3: 10nM; Inhibidor del proteasoma (MG-132): 10 μ M, Inhibidor de calpaina: 2 μ M, Inhibidor general de caspases (Z-VAD): 5 μ M, Inhibidor de romboids (DCI; dicloroisocumarina): 10 μ M.

2.2.9.-*Western-blotting*

Els llisats i medis condicionats concentrats amb WGA-agarosa així com els llisats totals obtinguts a partir de les fraccions solubles i insolubles en triton es varen carregar en SDS-PAGE del 8% i córrer a 150V aproximadament 90 minuts. Seguidament, els gels es varen transferir a membranes de nitrocel·lulosa (100V durant 150 minuts) que varen ser incubades amb anticossos anti-Dsg-2, anti-ALCAM o anti-TfnR. Els llisats cel·lulars utilitzats per determinar la presència d'ADAM10 i ADAM17 es varen concentrar amb la lectina concanavalina A (ConA) unida a sefarosa abans de ser correguts i transferits en les mateixes condicions anteriorment descrites i finalment analitzats mitjançant anticossos específics contra ADAM10 i ADAM17. Els anticossos secundaris que es varen utilitzar estaven conjugats a la peroxidasa de rave i la detecció es va fer mitjançant el reactiu quimioluminiscent SuperSignal West Dura (Pierce).

2.2.10.-*Difference Gel Electrophoresis (DIGE)*

Es varen sembrar 4×10^8 cèl·lules A431/ADAM17 i passades 24 hores es varen rentar 5 vegades amb medi sense sèrum fetal. A continuació, la meitat de les cèl·lules es varen tractar amb BB94 $10 \mu\text{M}$ i l'altre meitat sense inhibidor durant 48 hores en absència de sèrum. Els medis condicionats obtinguts per cada tractament (500 ml de cada) es varen recuperar i incubar durant 16 hores a 4°C i en rotació en presència de WGA-agarosa ($1 \mu\text{l}$ d'una barreja 1:1 de complex WGA-agarosa o sediment sòlid:tampó descrit al peu de pàgina⁹ per cada ml de medi condicionat). Seguidament es va recuperar la WGA-agarosa mitjançant una centrifugació a 4.000g durant 10 minuts i es va rentar 2 vegades amb tampó de rentat (10mM HEPES pH 7.5, 0.15M NaCl). A continuació, es varen eluir les glicoproteïnes unides a la WGA-agarosa mitjançant 0.5 ml d'una solució 0.5M d'N-acetilglucosamina en 10mM HEPES pH 7.5 i 0.15M NaCl (2 hores a 4°C en rotació). La solució de glicoproteïnes es va concentrar 5 vegades (volum final: $100 \mu\text{l}$) mitjançant ultrafiltració (Amicon Ultra-4, 5 kDa -cutoff; Millipore) seguit d'una precipitació amb acetona:àcid tricloroacètic (2D-CleanUp kit; GE Healthcare). Els sediments sòlids obtinguts es varen resuspendre en tampó de marcatge de DIGE¹⁵ i la concentració de proteïna es va determinar utilitzant l'assaig de bradford RCDC (Biorad)

¹⁵ 8M Urea, 4% CHAPS/ 30 mM Tris pH 8.0.

segons les instruccions del fabricant. La concentració de proteïna es va ajustar a 2mg/ml mitjançant l'adició del tampó de marcatge de DIGE. A continuació, 50µg de proteïna de cada mostra es varen marcar amb 400pmols dels marcadors fluorescents Cy3 y Cy5 (GE Healthcare) en presència d'1µl de dimetilformamida anhidre durant 30 minuts en gel i a la foscor. Transcorregut aquest temps, la reacció es va aturar amb l'adició de lisina 10mM durant 10 minuts. Finalment, les mostres marcades amb Cy3 (control) y Cy5 (BB94 10µM) es varen barrejar i diluir a la meitat mitjançant el tampó d'enfocament isoelèctric¹⁶.

L'electroforesi bidimensional (2D) es va optimitzar utilitzant reactius i equipaments GE Healthcare. La primera dimensió o enfocament per punt isoelèctric es va realitzar en tires immobilitzades que tenen un gradient de pH (24 cm; pH 3-10) utilitzant un sistema Ettan IPGphor. Les mostres es varen aplicar a la zona de càrrega pròxima a la part bàsica del gradient de la tira que prèviament es va rehidratar durant 16 hores en 450µl de tampó de rehidratació¹⁷. L'enfocament es va realitzar per un total de 67 kV/h i, a continuació, la tira es va equilibrar durant 15 minuts en 6 ml de solució de reducció¹⁸ i en rotació constant. La segona dimensió es va realitzar en un SDS-PAGE al 12.5% encastat en vidres de baixa fluorescència que es va córrer col·locant la tira de la primera dimensió a sobre d'aquest (20x24 cm) utilitzant un sistema Ettan DALT VI. El gel es va córrer a 20°C i a potència constant de 2.5W per gel durant 30 minuts seguit d'un increment de potència a 17W fins que el front del blau de bromofenol va començar a sortir per sota del gel (aproximadament 5 hores). Finalment, les imatges de fluorescència es varen adquirir amb un escàner Typhoon 9400 (GE Healthcare) (longitud d'ona d'excitació/emissió del Cy3 y Cy5: 532/580nm i 633/670nm, respectivament, amb una resolució de 100µm). L'anàlisi de les imatges es va realitzar amb el software DeCyder V5.0 (GE Healthcare).

¹⁶ 8M Urea, 4% CHAPS, 2% DTT, 2% farmalits [pH 3-10].

¹⁷ 8M Urea, 4% CHAPS, 1% farmalits [pH 3-10], 100mM DeStreak.

¹⁸ 6M Urea, 100 mM Tris pH 8.0, 30% glicerol, 2% SDS, 22.5 mg/ml iodocetamida.

2.2.11.-Identificació de proteïnes mitjançant espectrometria de masses

Els espots d'interès es varen extreure del gel mitjançant un sistema automatitzat SpotPicker (GE Healthcare) i es varen digerir amb una tripsina estabilitzada per evitar autòlisi tal i com està descrit en (Shevchenko et al., 1996). Els digerits tríptics es varen purificar mitjançant plaques de microtitulació ZipTip (Millipore). Finalment, l'anàlisi espectrofotomètrica mitjançant ionització per làser i assistida per matriu (MALDI) dels pèptids es va realitzar en un instrument Ultraflex TOF-TOF (Bruker) i les mostres es varen preparar utilitzant àcid α -ciano-4-hidroxicinnàmic com a matriu que es col·loca a les targetes de detecció (en anglès, *anchor chips*). La identificació de les proteïnes es va dur a terme mitjançant la comparació dels pèptids obtinguts amb els pèptids teòrics presents en una base de dades teòrica utilitzant l'algoritme Mascot (Matrix Science).

Bibliografia

XI. BIBLIOGRAFIA

Althoff K., Mullberg J., Aasland D., Voltz N., Kallen K., Grotzinger J., Rose-John S. "Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins". *Biochem J* 353(Pt 3): 663-72 (2001).

Althoff K., Reddy P., Voltz N., Rose-John S., Mullberg J. "Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins". *Eur J Biochem* 267(9): 2624-31 (2000).

Allinson T. M., Parkin E. T., Condon T. P., Schwager S. L., Sturrock E. D., Turner A. J., Hooper N. M. "The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein". *Eur J Biochem* 271(12): 2539-47 (2004).

Allinson T. M., Parkin E. T., Turner A. J., Hooper N. M. "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases". *J Neurosci Res* 74(3): 342-52 (2003).

Amagai M., Nishikawa T., Nousari H. C., Anhalt G. J., Hashimoto T. "Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice". *J Clin Invest* 102(4): 775-82 (1998).

Annaert W., De Strooper B. "A cell biological perspective on Alzheimer's disease". *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 25-51 (2002).

Aridor M., Traub L. M. "Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat". *Traffic* 3(8): 537-46 (2002).

Arribas J., Borroto A. "Protein ectodomain shedding". *Chem Rev* 102(12): 4627-38 (2002).

Arribas J., Coodly L., Vollmer P., Kishimoto T. K., Rose-John S., Massagué J. "Diverse Cell Surface Protein Ectodomains Are Shed by a System Sensitive to Metalloprotease Inhibitors". *J. Biol. Chem.* 271(19): 11376-11382 (1996).

Arribas J., Lopez-Casillas F., Massague J. "Role of the Juxtamembrane Domains of the Transforming Growth Factor-alpha Precursor and the beta -Amyloid Precursor Protein in Regulated Ectodomain Shedding". *J. Biol. Chem.* 272(27): 17160-17165 (1997).

Arribas J., Massague J. "Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism". *J. Cell Biol.* 128(3): 433-441 (1995).

Bache K. G., Slagsvold T., Stenmark H. "Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer". *Embo J* 23(14): 2707-12 (2004).

Balbin M., Fueyo A., Tester A. M., Pendas A. M., Pitiot A. S., Astudillo A., Overall C. M., Shapiro S. D., Lopez-Otin C. "Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice". *Nat Genet* 35(3): 252-7 (2003).

Bao J., Wolpowitz D., Role L. W., Talmage D. A. "Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain". *J Cell Biol* 161(6): 1133-41 (2003).

Baselga J., Arteaga C. L. "Critical Update and Emerging Trends in Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer". *J Clin Oncol* 23(11): 2445-2459 (2005).

Baselga J., Mendelsohn J., Kim Y.-M., Pandiella A. "Autocrine Regulation of Membrane Transforming Growth Factor- α Cleavage". *J. Biol. Chem.* 271(6): 3279-3284 (1996).

Baselga J., Norton L. "Focus on breast cancer". *Cancer Cell* 1(4): 319-22 (2002).

Bax D. V., Messent A. J., Tart J., van Hoang M., Kott J., Maciewicz R. A., Humphries M. J. "Integrin $\alpha 5 \beta 1$ and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells". *J Biol Chem* 279(21): 22377-86 (2004).

Benmerah A., Bayrou M., Cerf-Bensussan N., Dautry-Varsat A. "Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant". *J Cell Sci* 112 (Pt 9): 1303-11 (1999).

Benmerah A., Lamaze C., Begue B., Schmid S. L., Dautry-Varsat A., Cerf-Bensussan N. "AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis". *J Cell Biol* 140(5): 1055-62 (1998).

Bergmeier W., Piffath C. L., Cheng G., Dole V. S., Zhang Y., von Andrian U. H., Wagner D. D. "Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/IIIa shedding from platelets in vitro and in vivo". *Circ Res* 95(7): 677-83 (2004).

Biedermann K., Vogelsang H., Becker I., Plaschke S., Siewert J. R., Hofler H., Keller G. "Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer". *J Pathol* 207(2): 199-206 (2005).

Bigler D., Takahashi Y., Chen M. S., Almeida E. A., Osbourne L., White J. M. "Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the $\alpha(6)$ integrin subunit". *J Biol Chem* 275(16): 11576-84 (2000).

Black R. A., Rauch C. T., Kozlosky C. J., Peschon J. J., Slack J. L., Wolfson M. F., Castner B. J., Stocking K. L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K. A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J. N., Johnson R. S., Paxton R. J., March C. J., Cerretti D. P. "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells". *Nature* 385(6618): 729-33 (1997).

Blanchot-Jossic F., Jarry A., Masson D., Bach-Ngohou K., Paineau J., Denis M. G., Laboisie C. L., Mosnier J. F. "Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells". *J Pathol* 207(2): 156-63 (2005).

Blelloch R., Newman C., Kimble J. "Control of cell migration during *Caenorhabditis elegans* development". *Curr Opin Cell Biol* 11(5): 608-13 (1999).

Blobel C. P. "ADAMs: key components in EGFR signalling and development". *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 32-43 (2005).

Blobel C. P. "Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding". *Inflamm Res* 51(2): 83-4 (2002).

Blume-Jensen P., Hunter T. "Oncogenic kinase signalling". *Nature* 411(6835): 355-65 (2001).

Bode W., Grams F., Reinemer P., Gomis-Ruth F. X., Baumann U., McKay D. B., Stocker W. "The metzincin-superfamily of zinc-peptidases". *Adv Exp Med Biol* 389: 1-11 (1996).

Bohm B. B., Aigner T., Gehrsitz A., Blobel C. P., Kalden J. R., Burkhardt H. "Up-regulation of MDC15 (metargidin) messenger RNA in human osteoarthritic cartilage". *Arthritis Rheum* 42(9): 1946-50 (1999).

Boire A., Covic L., Agarwal A., Jacques S., Sherifi S., Kuliopulos A. "PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells". *Cell* 120(3): 303-13 (2005).

Bonne S., Gilbert B., Hatzfeld M., Chen X., Green K. J., van Roy F. "Defining desmosomal plakophilin-3 interactions". *J Cell Biol* 161(2): 403-16 (2003).

Bornslaeger E. A., Godsel L. M., Corcoran C. M., Park J. K., Hatzfeld M., Kowalczyk A. P., Green K. J. "Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders". *J Cell Sci* 114(Pt 4): 727-38 (2001).

Borrell-Pages M., Fernandez-Larrea J., Borroto A., Rojo F., Baselga J., Arribas J. "The carboxy-terminal cysteine of the tetraspanin L6 antigen is required for its interaction with SITAC, a novel PDZ protein". *Mol Biol Cell* 11(12): 4217-25 (2000).

Borrell-Pages M., Rojo F., Albanell J., Baselga J., Arribas J. "TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors". *Embo J* 22(5): 1114-24 (2003).

Borroto A., Ruiz-Paz S., de la Torre T. V., Borrell-Pages M., Merlos-Suarez A., Pandiella A., Blobel C. P., Baselga J., Arribas J. "Impaired trafficking and activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in cell mutants defective in protein ectodomain shedding". *J Biol Chem* 278(28): 25933-9 (2003).

Bowen M. A., Aruffo A. A., Bajorath J. "Cell surface receptors and their ligands: in vitro analysis of CD6-CD166 interactions". *Proteins* 40(3): 420-8 (2000).

Bowen M. A., Patel D. D., Li X., Modrell B., Malacko A. R., Wang W. C., Marquardt H., Neubauer M., Pesando J. M., Francke U., et al. "Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand". *J Exp Med* 181(6): 2213-20 (1995).

Brakebusch C., Fassler R. "The integrin-actin connection, an eternal love affair". *Embo J* 22(10): 2324-33 (2003).

Brancolini C., Sgorbissa A., Schneider C. "Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis". *Cell Death Differ* 5(12): 1042-50 (1998).

Braud S., Bon C., Wisner A. "Snake venom proteins acting on hemostasis". *Biochimie* 82(9-10): 851-9 (2000).

Bridges L. C., Sheppard D., Bowditch R. D. "ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7". *Biochem J* 387(Pt 1): 101-8 (2005).

Briley G. P., Hissong M. A., Chiu M. L., Lee D. C. "The carboxyl-terminal valine residues of proTGF alpha are required for its efficient maturation and intracellular routing". *Mol Biol Cell* 8(8): 1619-31 (1997).

Bringman T. S., Lindquist P. B., Derynck R. "Different transforming growth factor-alpha species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor". *Cell* 48(3): 429-40 (1987).

Brossier F., Jewett T. J., Sibley L. D., Urban S. "A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*". *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11): 4146-51 (2005).

Brou C., Logeat F., Gupta N., Bessia C., LeBail O., Doedens J. R., Cumano A., Roux P., Black R. A., Israel A. "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE". *Mol Cell* 5(2): 207-16 (2000).

Budagian V., Bulanova E., Orinska Z., Ludwig A., Rose-John S., Saftig P., Borden E. C., Bulfone-Paus S. "Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)". *J Biol Chem* 279(39): 40368-75 (2004).

Buxbaum J. D., Liu K. N., Luo Y., Slack J. L., Stocking K. L., Peschon J. J., Johnson R. S., Castner B. J., Cerretti D. P., Black R. A. "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor". *J Biol Chem* 273(43): 27765-7 (1998).

Buxbaum J. D., Oishi M., Chen H. I., Pinkas-Kramarski R., Jaffe E. A., Gandy S. E., Greengard P. "Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10075-8 (1992).

Byun Y., Chen F., Chang R., Trivedi M., Green K. J., Cryns V. L. "Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis". *Cell Death Differ* 8(5): 443-50 (2001).

Cal S., Freije J. M., Lopez J. M., Takada Y., Lopez-Otin C. "ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism". *Mol Biol Cell* 11(4): 1457-69 (2000).

Carl-McGrath S., Lendeckel U., Ebert M., Roessner A., Rocken C. "The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer". *Int J Oncol* 26(1): 17-24 (2005).

Carpentier J. L., Gorden P., Anderson R. G., Goldstein J. L., Brown M. S., Cohen S., Orci L. "Co-localization of 125I-epidermal growth factor and ferritin-low density lipoprotein in coated pits: a quantitative electron microscopic study in normal and mutant human fibroblasts". *J Cell Biol* 95(1): 73-7 (1982).

Casamassimi A., De Luca A., Agrawal S., Stromberg K., Salomon D. S., Normanno N. "EGF-related antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of human ovarian carcinoma cells". *Ann Oncol* 11(3): 319-25 (2000).

Caulin C., Salvesen G. S., Oshima R. G. "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis". *J Cell Biol* 138(6): 1379-94 (1997).

Clevers H., Batlle E. "EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer". *Cancer Res* 66(1): 2-5 (2006).

Cohen S., Elliott G. A. "The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse". *J Invest Dermatol* 40: 1-5 (1963).

Contin C., Pitard V., Itai T., Nagata S., Moreau J. F., Dechanet-Merville J. "Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling". *J Biol Chem* 278(35): 32801-9 (2003).

Cortes F., Deschaseaux F., Uchida N., Labastie M. C., Frieria A. M., He D., Charbord P., Peault B. "HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues". *Blood* 93(3): 826-37 (1999).

Costa F. F., Verbisck N. V., Salim A. C., Ierardi D. F., Pires L. C., Sasahara R. M., Sogayar M. C., Zanata S. M., Mackay A., O'Hare M., Soares F., Simpson A. J., Camargo A. A. "Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors". *Oncogene* 23(7): 1481-8 (2004).

Coussens L. M., Fingleton B., Matrisian L. M. "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations". *Science* 295(5564): 2387-92 (2002).

Chen H., De Camilli P. "The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin". *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8): 2766-71 (2005).

Chen X., Bonne S., Hatzfeld M., van Roy F., Green K. J. "Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling". *J Biol Chem* 277(12): 10512-22 (2002).

Daro E., van der Sluijs P., Galli T., Mellman I. "Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling". *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9559-64 (1996).

Dassler K., Kaup M., Tauber R., Fuchs H. "Mutational suppression of transferrin receptor shedding can be compensated by distinct metalloproteases acting on alternative sites". *FEBS Lett* 536(1-3): 25-9 (2003).

De Bruin A., Muller E., Wurm S., Caldelari R., Wyder M., Wheelock M. J., Suter M. M. "Loss of invasiveness in squamous cell carcinoma cells overexpressing desmosomal cadherins". *Cell Adhes Commun* 7(1): 13-28 (1999).

de Larco J. E., Todaro G. J. "Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(8): 4001-5 (1978).

De Luca A., Arra C., D'Antonio A., Casamassimi A., Losito S., Ferraro P., Ciardiello F., Salomon D. S., Normanno N. "Simultaneous blockage of different EGF-like growth factors results in efficient growth inhibition of human colon carcinoma xenografts". *Oncogene* 19(51): 5863-71 (2000).

Degen W. G., van Kempen L. C., Gijzen E. G., van Groningen J. J., van Kooyk Y., Bloemers H. P., Swart G. W. "MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule)". *Am J Pathol* 152(3): 805-13 (1998).

Dempsey P. J., Meise K. S., Coffey R. J. "Basolateral sorting of transforming growth factor-alpha precursor in polarized epithelial cells: characterization of cytoplasmic domain determinants". *Exp Cell Res* 285(2): 159-74 (2003).

Derynck R. "The physiology of transforming growth factor-alpha". *Adv Cancer Res* 58: 27-52 (1992).

Di Guglielmo G. M., Le Roy C., Goodfellow A. F., Wrana J. L. "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover". *Nat Cell Biol* 5(5): 410-21 (2003).

Dikic I., Giordano S. "Negative receptor signalling". *Curr Opin Cell Biol* 15(2): 128-35 (2003).

Ding X., Yang L. Y., Huang G. W., Wang W., Lu W. Q. "ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma". *World J Gastroenterol* 10(18): 2735-9 (2004).

Doedens J. R., Mahimkar R. M., Black R. A. "TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation". *Biochem Biophys Res Commun* 308(2): 331-8 (2003).

Dolnik O., Volchkova V., Garten W., Carbonnelle C., Becker S., Kahnt J., Stroher U., Klenk H. D., Volchkov V. "Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus". *Embo J* 23(10): 2175-84 (2004).

Dong J., Opresko L. K., Dempsey P. J., Lauffenburger D. A., Coffey R. J., Wiley H. S. "Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6235-40 (1999).

Dusek R. L., Getsios S., Chen F., Park J. K., Amargo E. V., Cryns V. L., Green K. J. "The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes". *J Biol Chem* 281(6): 3614-24 (2006).

Edeling M. A., Smith C., Owen D. "Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures". *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1): 32-44 (2006).

Ehrlich M., Boll W., Van Oijen A., Hariharan R., Chandran K., Nibert M. L., Kirchhausen T. "Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits". *Cell* 118(5): 591-605 (2004).

Elamrani N., Brustis J. J., Dourdin N., Balcerzak D., Poussard S., Cottin P., Ducastaing A. "Desmin degradation and Ca(2+)-dependent proteolysis during myoblast fusion". *Biol Cell* 85(2-3): 177-83 (1995).

Endres K., Postina R., Schroeder A., Mueller U., Fahrenholz F. "Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases". *Febs J* 272(22): 5808-20 (2005).

Entchev E. V., Schwabedissen A., Gonzalez-Gaitan M. "Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp". *Cell* 103(6): 981-91 (2000).

Eto K., Huet C., Tarui T., Kupriyanov S., Liu H. Z., Puzon-McLaughlin W., Zhang X. P., Sheppard D., Engvall E., Takada Y. "Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions". *J Biol Chem* 277(20): 17804-10 (2002).

Eto K., Puzon-McLaughlin W., Sheppard D., Sehara-Fujisawa A., Zhang X. P., Takada Y. "RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction". *J Biol Chem* 275(45): 34922-30 (2000).

Fabre-Lafay S., Garrido-Urbani S., Reymond N., Goncalves A., Dubreuil P., Lopez M. "Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17". *J Biol Chem* 280(20): 19543-50 (2005).

Fan H., Turck C. W., Derynck R. "Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide". *J Biol Chem* 278(20): 18617-27 (2003).

Fernandez-Larrea J., Merlos-Suarez A., Urena J. M., Baselga J., Arribas J. "A role for a PDZ protein in the early secretory pathway for the targeting of proTGF- α to the cell surface". *Mol Cell* 3(4): 423-33 (1999).

Fischer J. A., Eun S. H., Doolan B. T. "Endocytosis, Endosome Trafficking, and the Regulation of *Drosophila* Development". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22(1) (2006).

Fischer O. M., Hart S., Gschwind A., Prenzel N., Ullrich A. "Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor". *Mol Cell Biol* 24(12): 5172-83 (2004).

Fischer O. M., Hart S., Gschwind A., Ullrich A. "EGFR signal transactivation in cancer cells". *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1203-8 (2003a).

Fischer U., Janicke R. U., Schulze-Osthoff K. "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates". *Cell Death Differ* 10(1): 76-100 (2003b).

Flanagan J. G., Vanderhaeghen P. "The ephrins and Eph receptors in neural development". *Annu Rev Neurosci* 21: 309-45 (1998).

Floyd S., De Camilli P. "Endocytosis proteins and cancer: a potential link?" *Trends Cell Biol* 8(8): 299-301 (1998).

Fogel M., Gutwein P., Mechttersheimer S., Riedle S., Stoeck A., Smirnov A., Edler L., Ben-Arie A., Huszar M., Altevogt P. "L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas". *Lancet* 362(9387): 869-75 (2003).

Fortini M. E. "Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 673-84 (2002).

Fortini M. E. "Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges". *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 627-34 (2001).

Franzke C. W., Tasanen K., Schacke H., Zhou Z., Tryggvason K., Mauch C., Zigrino P., Sunnarborg S., Lee D. C., Fahrenholz F., Bruckner-Tuderman L. "Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs". *Embo J* 21(19): 5026-35 (2002).

Freeman M. "Proteolysis within the membrane: Rhomboids revealed". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(3): 188-197 (2004).

Garrod D. R., Merritt A. J., Nie Z. "Desmosomal cadherins". *Curr Opin Cell Biol* 14(5): 537-45 (2002).

Garton K. J., Gough P. J., Blobel C. P., Murphy G., Greaves D. R., Dempsey P. J., Raines E. W. "Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)". *J Biol Chem* 276(41): 37993-8001 (2001).

- Garton K. J., Gough P. J., Philalay J., Wille P. T., Blobel C. P., Whitehead R. H., Dempsey P. J., Raines E. W. "Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17)". *J Biol Chem* 278(39): 37459-64 (2003).
- Gavert N., Conacci-Sorrell M., Gast D., Schneider A., Altevogt P., Brabletz T., Ben-Ze'ev A. "L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers". *J Cell Biol* 168(4): 633-42 (2005).
- Getsios S., Huen A. C., Green K. J. "Working out the strength and flexibility of desmosomes". *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4): 271-81 (2004).
- Goodman O. B., Jr., Krupnick J. G., Santini F., Gurevich V. V., Penn R. B., Gagnon A. W., Keen J. H., Benovic J. L. "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor". *Nature* 383(6599): 447-50 (1996).
- Gorden P., Carpentier J. L., Cohen S., Orci L. "Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts". *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(10): 5025-9 (1978).
- Graves P. R., Haystead T. A. "Molecular biologist's guide to proteomics". *Microbiol Mol Biol Rev* 66(1): 39-63; table of contents (2002).
- Green K. J., Gaudry C. A. "Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 208-16 (2000).
- Grutzmann R., Foerder M., Alldinger I., Staub E., Brummendorf T., Ropcke S., Li X., Kristiansen G., Jesnowski R., Sipos B., Lohr M., Luttgies J., Ockert D., Kloppel G., Saeger H. D., Pilarsky C. "Gene expression profiles of microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma". *Virchows Arch* 443(4): 508-17 (2003).
- Guo L., Eisenman J. R., Mahimkar R. M., Peschon J. J., Paxton R. J., Black R. A., Johnson R. S. "A Proteomic Approach for the Identification of Cell-surface Proteins Shed by Metalloproteases". *Mol Cell Proteomics* 1(1): 30-36 (2002).
- Guo W., Giancotti F. G. "Integrin signalling during tumour progression". *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 816-26 (2004).
- Hamsch B., Grinevich V., Seeburg P. H., Schwarz M. K. " γ -Protocadherins, Presenilin-mediated Release of C-terminal Fragment Promotes Locus Expression". *J. Biol. Chem.* 280(16): 15888-15897 (2005).
- Hanakawa Y., Selwood T., Woo D., Lin C., Schechter N. M., Stanley J. R. "Calcium-dependent conformation of desmoglein 1 is required for its cleavage by exfoliative toxin". *J Invest Dermatol* 121(2): 383-9 (2003).
- Hanover J. A., Willingham M. C., Pastan I. "Kinetics of transit of transferrin and epidermal growth factor through clathrin-coated membranes". *Cell* 39(2 Pt 1): 283-93 (1984).

Hansen H. P., Dietrich S., Kisseleva T., Mokros T., Mentlein R., Lange H. H., Murphy G., Lemke H. "CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme". *J Immunol* 165(12): 6703-9 (2000).

Hartmann D., de Strooper B., Serneels L., Craessaerts K., Herreman A., Annaert W., Umans L., Lubke T., Lena Illert A., von Figura K., Saftig P. "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts". *Hum Mol Genet* 11(21): 2615-24 (2002).

Hattori M., Osterfield M., Flanagan J. G. "Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent". *Science* 289(5483): 1360-5 (2000).

Hatzfeld M. "The armadillo family of structural proteins". *Int Rev Cytol* 186: 179-224 (1999).

Hatzfeld M., Green K. J., Sauter H. "Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains". *J Cell Sci* 116(Pt 7): 1219-33 (2003).

Herren B., Levkau B., Raines E. W., Ross R. "Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases". *Mol Biol Cell* 9(6): 1589-601 (1998).

Hesselson D., Newman C., Kim K. W., Kimble J. "GON-1 and fibulin have antagonistic roles in control of organ shape". *Curr Biol* 14(22): 2005-10 (2004).

Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J., Fiddes J. C., Klagsbrun M. "A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF". *Science* 251(4996): 936-9 (1991).

Higashiyama S., Nanba D. "ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk". *Biochim Biophys Acta* 1751(1): 110-7 (2005).

Himanen J. P., Nikolov D. B. "Eph receptors and ephrins". *Int J Biochem Cell Biol* 35(2): 130-4 (2003).

Hinkle C. L., Sunnarborg S. W., Loiselle D., Parker C. E., Stevenson M., Russell W. E., Lee D. C. "Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency". *J Biol Chem* 279(23): 24179-88 (2004).

Horiuchi K., Zhou H. M., Kelly K., Manova K., Blobel C. P. "Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2". *Dev Biol* 283(2): 459-71 (2005).

Huang J., Bridges L. C., White J. M. "Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members". *Mol Biol Cell* 16(10): 4982-91 (2005).

Hynes R. O. "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines". *Cell* 110(6): 673-87 (2002).

Iba K., Albrechtsen R., Gilpin B. J., Loechel F., Wewer U. M. "Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion". *Am J Pathol* 154(5): 1489-501 (1999).

Ishikawa N., Daigo Y., Yasui W., Inai K., Nishimura H., Tsuchiya E., Kohno N., Nakamura Y. "ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer". *Clin Cancer Res* 10(24): 8363-70 (2004).

Janes P. W., Saha N., Barton W. A., Kolev M. V., Wimmer-Kleikamp S. H., Nievergall E., Blobel C. P., Himanen J. P., Lackmann M., Nikolov D. B. "Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans". *Cell* 123(2): 291-304 (2005).

Jhappan C., Stahle C., Harkins R. N., Fausto N., Smith G. H., Merlino G. T. "TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas". *Cell* 61(6): 1137-46 (1990).

Jones J. C., Goldman R. D. "Intermediate filaments and the initiation of desmosome assembly". *J Cell Biol* 101(2): 506-17 (1985).

Kalus I., Bormann U., Mzoughi M., Schachner M., Kleene R. "Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth". *J Neurochem* 98(1): 78-88 (2006).

Karan D., Lin F. C., Bryan M., Ringel J., Moniaux N., Lin M. F., Batra S. K. "Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas". *Int J Oncol* 23(5): 1365-71 (2003).

Kaup M., Dassler K., Weise C., Fuchs H. "Shedding of the transferrin receptor is mediated constitutively by an integral membrane metalloprotease sensitive to tumor necrosis factor alpha protease inhibitor-2". *J Biol Chem* 277(41): 38494-502 (2002).

Kawaguchi N., Sundberg C., Kveiborg M., Moghadaszadeh B., Asmar M., Dietrich N., Thodeti C. K., Nielsen F. C., Moller P., Mercurio A. M., Albrechtsen R., Wewer U. M. "ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function". *J Cell Sci* 116(Pt 19): 3893-904 (2003).

Kim I. M., Ramakrishna S., Gusarova G. A., Yoder H. M., Costa R. H., Kalinichenko V. V. "The forkhead box m1 transcription factor is essential for embryonic development of pulmonary vasculature". *J Biol Chem* 280(23): 22278-86 (2005).

Kljuic A., Bazzi H., Sundberg J. P., Martinez-Mir A., O'Shaughnessy R., Mahoney M. G., Levy M., Montagutelli X., Ahmad W., Aita V. M., Gordon D., Uitto J., Whiting D., Ott J., Fischer S., Gilliam T. C., Jahoda C. A., Morris R. J., Panteleyev A. A., Nguyen V. T., Christiano A. M. "Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal

adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris". *Cell* 113(2): 249-60 (2003).

Knosel T., Emde A., Schluns K., Chen Y., Jurchott K., Krause M., Dietel M., Petersen I. "Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer". *Neoplasia* 7(8): 741-7 (2005).

Ko S. Y., Lin S. C., Wong Y. K., Liu C. J., Chang K. W., Liu T. Y. "Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma". *Cancer Lett* (2005).

Koch P. J., Franke W. W. "Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules". *Curr Opin Cell Biol* 6(5): 682-7 (1994).

Kodama T., Ikeda E., Okada A., Ohtsuka T., Shimoda M., Shiomi T., Yoshida K., Nakada M., Ohuchi E., Okada Y. "ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor". *Am J Pathol* 165(5): 1743-53 (2004).

Kronic A. L., Garrod D. R., Madani S., Buchanan M. D., Clark R. E. "Immunohistochemical staining for desmogleins 1 and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype: actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin". *Br J Cancer* 77(8): 1275-9 (1998).

Ku N. O., Liao J., Omary M. B. "Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins". *J Biol Chem* 272(52): 33197-203 (1997).

Kubota Y., Kuroki R., Nishiwaki K. "A fibulin-1 homolog interacts with an ADAM protease that controls cell migration in *C. elegans*". *Curr Biol* 14(22): 2011-8 (2004).

Kullander K., Klein R. "Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(7): 475-86 (2002).

Kurrey N. K., K A., Bapat S. A. "Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level". *Gynecol Oncol* 97(1): 155-65 (2005).

Kveiborg M., Frohlich C., Albrechtsen R., Tischler V., Dietrich N., Holck P., Kronqvist P., Rank F., Mercurio A. M., Wewer U. M. "A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis". *Cancer Res* 65(11): 4754-61 (2005).

Larco J. E. D., Todaro G. J. "Growth Factors from Murine Sarcoma Virus-Transformed Cells". *PNAS* 75(8): 4001-4005 (1978).

LaVoie M. J., Selkoe D. J. "The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments". *J Biol Chem* 278(36): 34427-37 (2003).

Le Gall S. M., Auger R., Dreux C., Mauduit P. "Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process". *J Biol Chem* 278(46): 45255-68 (2003).

Le Pabic H., Bonnier D., Wewer U. M., Coutand A., Musso O., Baffet G., Clement B., Theret N. "ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling". *Hepatology* 37(5): 1056-66 (2003).

Lee N. V., Rodriguez-Manzaneque J. C., Thai S. N., Twal W. O., Luque A., Lyons K. M., Argraves W. S., Iruela-Arispe M. L. "Fibulin-1 acts as a cofactor for the matrix metalloprotease ADAMTS-1". *J Biol Chem* 280(41): 34796-804 (2005).

Lendeckel U., Kohl J., Arndt M., Carl-McGrath S., Donat H., Rocken C. "Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines". *J Cancer Res Clin Oncol* 131(1): 41-8 (2005).

Leung C. L., Green K. J., Liem R. K. "Plakins: a family of versatile cytolinker proteins". *Trends Cell Biol* 12(1): 37-45 (2002).

Lopez-Otin C., Overall C. M. "Protease degradomics: a new challenge for proteomics". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(7): 509-19 (2002).

Lorch J. H., Klessner J., Park J. K., Getsios S., Wu Y. L., Stack M. S., Green K. J. "Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells". *J Biol Chem* 279(35): 37191-200 (2004).

Luetke N. C., Qiu T. H., Fenton S. E., Troyer K. L., Riedel R. F., Chang A., Lee D. C. "Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development". *Development* 126(12): 2739-50 (1999).

Lum L., Wong B. R., Josien R., Becherer J. D., Erdjument-Bromage H., Schlondorff J., Tempst P., Choi Y., Blobel C. P. "Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival". *J Biol Chem* 274(19): 13613-8 (1999).

Lunter P. C., van Kilsdonk J. W., van Beek H., Cornelissen I. M., Bergers M., Willems P. H., van Muijen G. N., Swart G. W. "Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity". *Cancer Res* 65(19): 8801-8 (2005).

Makowski G. S., Ramsby M. L. "Degradation of cytokeratin intermediate filaments by calcium-activated proteases (calpains) in vitro: implications for formation of Mallory bodies". *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 101(3): 211-23 (1998).

Marambaud P., Shioi J., Serban G., Georgakopoulos A., Sarner S., Nagy V., Baki L., Wen P., Efthimiopoulos S., Shao Z., Wisniewski T., Robakis N. K. "A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions". *Embo J* 21(8): 1948-56 (2002).

Maretzky T., Reiss K., Ludwig A., Buchholz J., Scholz F., Proksch E., de Strooper B., Hartmann D., Saftig P. "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation". *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26): 9182-7 (2005).

Martinez-Arca S., Proux-Gillardeaux V., Alberts P., Louvard D., Galli T. "Ectopic expression of syntaxin 1 in the ER redirects TI-VAMP- and cellubrevin-containing vesicles". *J Cell Sci* 116(Pt 13): 2805-16 (2003).

Massague J. "Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors". *J Biol Chem* 265(35): 21393-6 (1990).

Massague J., Pandiella A. "Membrane-anchored growth factors". *Annu Rev Biochem* 62: 515-41 (1993).

Matsui Y., Halter S. A., Holt J. T., Hogan B. L., Coffey R. J. "Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF alpha transgenic mice". *Cell* 61(6): 1147-55 (1990).

Mazzocca A., Coppari R., De Franco R., Cho J. Y., Libermann T. A., Pinzani M., Toker A. "A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions". *Cancer Res* 65(11): 4728-38 (2005).

McGeehan G. M., Becherer J. D., Bast R. C., Jr., Boyer C. M., Champion B., Connolly K. M., Conway J. G., Furdon P., Karp S., Kidao S., et al. "Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor". *Nature* 370(6490): 558-61 (1994).

McLane M. A., Marcinkiewicz C., Vijay-Kumar S., Wierzbicka-Patynowski I., Niewiarowski S. "Viper venom disintegrins and related molecules". *Proc Soc Exp Biol Med* 219(2): 109-19 (1998).

Mendelsohn J., Baselga J. "The EGF receptor family as targets for cancer therapy". *Oncogene* 19(56): 6550-65 (2000).

Merlos-Suarez A., Ruiz-Paz S., Baselga J., Arribas J. "Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme". *J Biol Chem* 276(51): 48510-7 (2001).

Merrifield C. J., Perrais D., Zenisek D. "Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells". *Cell* 121(4): 593-606 (2005).

Mezyk R., Bzowska M., Bereta J. "Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme". *Acta Biochim Pol* 50(3): 625-45 (2003).

Mohan M. J., Seaton T., Mitchell J., Howe A., Blackburn K., Burkhart W., Moyer M., Patel I., Waitt G. M., Becherer J. D., Moss M. L., Milla M. E. "The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity". *Biochemistry* 41(30): 9462-9 (2002).

Montero J. C., Yuste L., Diaz-Rodriguez E., Esparis-Ogando A., Pandiella A. "Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme". *Mol Cell Neurosci* 16(5): 631-48 (2000).

Moss M. L., Jin S. L., Milla M. E., Bickett D. M., Burkhart W., Carter H. L., Chen W. J., Clay W. C., Didsbury J. R., Hassler D., Hoffman C. R., Kost T. A., Lambert M. H., Leesnitzer M. A., McCauley P., McGeehan G., Mitchell J., Moyer M., Pahel G., Rocque W., Overton L. K., Schoenen F., Seaton T., Su J. L., Becherer J. D., et al. "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha". *Nature* 385(6618): 733-6 (1997).

Moss M. L., Lambert M. H. "Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases". *Essays Biochem* 38: 141-53 (2002).

Mott J. D., Werb Z. "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases". *Curr Opin Cell Biol* 16(5): 558-64 (2004).

Mullberg J., Oberthur W., Lottspeich F., Mehl E., Dittrich E., Graeve L., Heinrich P. C., Rose-John S. "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site". *J Immunol* 152(10): 4958-68 (1994).

Mullberg J., Schooltink H., Stoyan T., Heinrich P. C., Rose-John S. "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor". *Biochem Biophys Res Commun* 189(2): 794-800 (1992).

Nagano O., Murakami D., Hartmann D., De Strooper B., Saftig P., Iwatsubo T., Nakajima M., Shinohara M., Saya H. "Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation". *J Cell Biol* 165(6): 893-902 (2004).

Nath D., Slocombe P. M., Stephens P. E., Warn A., Hutchinson G. R., Yamada K. M., Docherty A. J., Murphy G. "Interaction of metargidin (ADAM-15) with alpha5beta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells". *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 579-87 (1999).

Nath D., Slocombe P. M., Webster A., Stephens P. E., Docherty A. J., Murphy G. "Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility". *J Cell Sci* 113 (Pt 12): 2319-28 (2000).

Ni C. Y., Murphy M. P., Golde T. E., Carpenter G. "gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase". *Science* 294(5549): 2179-81 (2001).

Nishiwaki K. "Mutations affecting symmetrical migration of distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*". *Genetics* 152(3): 985-97 (1999).

Nishiwaki K., Kubota Y., Chigira Y., Roy S. K., Suzuki M., Schvarzstein M., Jigami Y., Hisamoto N., Matsumoto K. "An NDPase links ADAM protease glycosylation with organ morphogenesis in *C. elegans*". *Nat Cell Biol* 6(1): 31-7 (2004).

Normanno N., Bianco C., De Luca A., Salomon D. S. "The role of EGF-related peptides in tumor growth". *Front Biosci* 6: D685-707 (2001).

O'Shea C., McKie N., Buggy Y., Duggan C., Hill A. D., McDermott E., O'Higgins N., Duffy M. J. "Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer". *Int J Cancer* 105(6): 754-61 (2003).

Ohtsuka T., Shiomi T., Shimoda M., Kodama T., Amour A., Murphy G., Ohuchi E., Kobayashi K., Okada Y. "ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis". *Int J Cancer* 118(2): 263-73 (2006).

Paabo S., Weber F., Kampe O., Schaffner W., Peterson P. A. "Association between transplantation antigens and a viral membrane protein synthesized from a mammalian expression vector". *Cell* 33(2): 445-53 (1983).

Pan D., Rubin G. M. "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis". *Cell* 90(2): 271-80 (1997).

Pandiella A., Massague J. "Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process". *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1726-30 (1991).

Peduto L., Reuter V. E., Shaffer D. R., Scher H. I., Blobel C. P. "Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer". *Cancer Res* 65(20): 9312-9 (2005).

Peschon J. J., Slack J. L., Reddy P., Stocking K. L., Sunnarborg S. W., Lee D. C., Russell W. E., Castner B. J., Johnson R. S., Fitzner J. N., Boyce R. W., Nelson N., Kozlosky C. J., Wolfson M. F., Rauch C. T., Cerretti D. P., Paxton R. J., March C. J., Black R. A. "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development". *Science* 282(5392): 1281-4 (1998).

Pitarch A., Sanchez M., Nombela C., Gil C. "Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications". *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 787(1): 101-28 (2003).

Podbilewicz B. "ADM-1, a protein with metalloprotease- and disintegrin-like domains, is expressed in syncytial organs, sperm, and sheath cells of sensory organs in *Caenorhabditis elegans*". *Mol Biol Cell* 7(12): 1877-93 (1996).

Poliakov A., Cotrina M., Wilkinson D. G. "Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly". *Dev Cell* 7(4): 465-80 (2004).

Polo S., Di Fiore P. P. "Endocytosis conducts the cell signaling orchestra". *Cell* 124(5): 897-900 (2006).

Porter S., Clark I. M., Kevorkian L., Edwards D. R. "The ADAMTS metalloproteinases". *Biochem J* 386(Pt 1): 15-27 (2005).

Prenzel N., Zwick E., Daub H., Leserer M., Abraham R., Wallasch C., Ullrich A. "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF". *Nature* 402(6764): 884-8 (1999).

Rao V. R., Finkbeiner S. "Secrets of a secretase: N-cadherin proteolysis regulates CBP function". *Cell* 114(5): 533-5 (2003).

Reddy P., Slack J. L., Davis R., Cerretti D. P., Kozlosky C. J., Blanton R. A., Shows D., Peschon J. J., Black R. A. "Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme". *J Biol Chem* 275(19): 14608-14 (2000).

Reiss K., Maretzky T., Haas I. G., Schulte M., Ludwig A., Frank M., Saftig P. "Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma -protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion". *J. Biol. Chem.*: M602663200 (2006).

Reiss K., Maretzky T., Ludwig A., Tousseyn T., de Strooper B., Hartmann D., Saftig P. "ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling". *Embo J* 24(4): 742-52 (2005).

Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R. "Cell migration: integrating signals from front to back". *Science* 302(5651): 1704-9 (2003).

Rio C., Buxbaum J. D., Peschon J. J., Corfas G. "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4". *J Biol Chem* 275(14): 10379-87 (2000).

Rios-Doria J., Day K. C., Kuefer R., Rashid M. G., Chinnaiyan A. M., Rubin M. A., Day M. L. "The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells". *J Biol Chem* 278(2): 1372-9 (2003).

Rodriguez-Manzaneque J. C., Graubert M., Iruela-Arispe M. L. "Endothelial cell dysfunction following prolonged activation of progesterone receptor". *Hum Reprod* 15 Suppl 3: 39-47 (2000).

Roemer A., Schwettmann L., Jung M., Roigas J., Kristiansen G., Schnorr D., Loening S. A., Jung K., Lichtinghagen R. "Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome". *Oncol Rep* 11(2): 529-36 (2004a).

Roemer A., Schwettmann L., Jung M., Stephan C., Roigas J., Kristiansen G., Loening S. A., Lichtinghagen R., Jung K. "The membrane proteases adams and hepsin are differentially expressed in renal cell carcinoma. Are they potential tumor markers?" *J Urol* 172(6 Pt 1): 2162-6 (2004b).

Rooke J., Pan D., Xu T., Rubin G. M. "KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis". *Science* 273(5279): 1227-31 (1996).

Rovida E., Paccagnini A., Del Rosso M., Peschon J., Dello Sbarba P. "TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation". *J Immunol* 166(3): 1583-9 (2001).

Roy R., Wewer U. M., Zurakowski D., Pories S. E., Moses M. A. "ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage". *J Biol Chem* 279(49): 51323-30 (2004).

Ruhe J. E., Streit S., Hart S., Ullrich A. "EGFR signaling leads to downregulation of PTP-LAR via TACE-mediated proteolytic processing". *Cell Signal* 18(9): 1515-27 (2006).

Sahin U., Weskamp G., Kelly K., Zhou H. M., Higashiyama S., Peschon J., Hartmann D., Saftig P., Blobel C. P. "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands". *J Cell Biol* 164(5): 769-79 (2004).

Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies". *Crit Rev Oncol Hematol* 19(3): 183-232 (1995).

Sandgren E. P., Luetke N. C., Palmiter R. D., Brinster R. L., Lee D. C. "Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast". *Cell* 61(6): 1121-35 (1990).

Santiago-Josefat B., Arribas J. "Post-transcriptional upregulation of ADAM17 in breast tumors and upon EGFR activation". Submitted to *Cancer Research* (2006).

Sasada R., Ono Y., Taniyama Y., Shing Y., Folkman J., Igarashi K. "Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family". *Biochem Biophys Res Commun* 190(3): 1173-9 (1993).

Schafer B., Marg B., Gschwind A., Ullrich A. "Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival". *J Biol Chem* 279(46): 47929-38 (2004).

Schantl J. A., Roza M., Van Kerkhof P., Strous G. J. "The growth hormone receptor interacts with its sheddase, the tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)". *Biochem J* 377(Pt 2): 379-84 (2004).

Schutz A., Hartig W., Wobus M., Grosche J., Wittekind C., Aust G. "Expression of ADAM15 in lung carcinomas". *Virchows Arch* 446(4): 421-9 (2005).

Seals D. F., Courtneidge S. A. "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions". *Genes Dev* 17(1): 7-30 (2003).

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels". *Anal Chem* 68(5): 850-8 (1996).

Shi W., Fan H., Shum L., Derynck R. "The Tetraspanin CD9 Associates with Transmembrane TGF- α and Regulates TGF- α -induced EGF Receptor Activation and Cell Proliferation". *J. Cell Biol.* 148(3): 591-602 (2000).

Shi Y. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis". *Mol Cell* 9(3): 459-70 (2002).

Shinohara M., Hiraki A., Ikebe T., Nakamura S., Kurahara S., Shirasuna K., Garrod D. R. "Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour". *J Pathol* 184(4): 369-81 (1998).

Shintani Y., Higashiyama S., Ohta M., Hirabayashi H., Yamamoto S., Yoshimasu T., Matsuda H., Matsuura N. "Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis". *Cancer Res* 64(12): 4190-6 (2004).

Shoyab M., Plowman G. D., McDonald V. L., Bradley J. G., Todaro G. J. "Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family". *Science* 243(4894 Pt 1): 1074-6 (1989).

Siewewerts A. M., Meijer-van Gelder M. E., Timmermans M., Trapman A. M., Garcia R. R., Arnold M., Goedheer A. J., Portengen H., Klijn J. G., Foekens J. A. "How ADAM-9 and ADAM-11 differentially from estrogen receptor predict response to tamoxifen treatment in patients with recurrent breast cancer: a retrospective study". *Clin Cancer Res* 11(20): 7311-21 (2005).

Smith E. A., Fuchs E. "Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes". *J Cell Biol* 141(5): 1229-41 (1998).

Soond S. M., Everson B., Riches D. W., Murphy G. "ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking". *J Cell Sci* 118(Pt 11): 2371-80 (2005).

Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. "Structure and physiological function of calpains". *Biochem J* 328 (Pt 3): 721-32 (1997).

Sorkin A., Von Zastrow M. "Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(8): 600-14 (2002).

Sorkin A., Waters C. M. "Endocytosis of growth factor receptors". *Bioessays* 15(6): 375-82 (1993).

Stein K. K., Go J. C., Primakoff P., Myles D. G. "Defects in secretory pathway trafficking during sperm development in Adam2 knockout mice". *Biol Reprod* 73(5): 1032-8 (2005).

- Steinhusen U., Weiske J., Badock V., Tauber R., Bommert K., Huber O. "Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis". *J Biol Chem* 276(7): 4972-80 (2001).
- Stone A. L., Kroeger M., Sang Q. X. "Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review)". *J Protein Chem* 18(4): 447-65 (1999).
- Strachan L., Murison J. G., Prestidge R. L., Sleeman M. A., Watson J. D., Kumble K. D. "Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily". *J Biol Chem* 276(21): 18265-71 (2001).
- Surawska H., Ma P. C., Salgia R. "The role of ephrins and Eph receptors in cancer". *Cytokine Growth Factor Rev* 15(6): 419-33 (2004).
- Swart G. W. "Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration". *Eur J Cell Biol* 81(6): 313-21 (2002).
- Sztul E., Lupashin V. "Role of tethering factors in secretory membrane traffic". *Am J Physiol Cell Physiol* 290(1): C11-26 (2006).
- Takagi H., Sharp R., Hammermeister C., Goodrow T., Bradley M. O., Fausto N., Merlino G. "Molecular and genetic analysis of liver oncogenesis in transforming growth factor alpha transgenic mice". *Cancer Res* 52(19): 5171-7 (1992).
- Takahashi Y., Bigler D., Ito Y., White J. M. "Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98". *Mol Biol Cell* 12(4): 809-20 (2001).
- Talanian R. V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M. C., Mankovich J. A., Banach D., Ghayur T., Brady K. D., Wong W. W. "Substrate specificities of caspase family proteases". *J Biol Chem* 272(15): 9677-82 (1997).
- Tam E. M., Morrison C. J., Wu Y. I., Stack M. S., Overall C. M. "Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates". *PNAS* 101(18): 6917-6922 (2004).
- Tanaka Y., Miyamoto S., Suzuki S. O., Oki E., Yagi H., Sonoda K., Yamazaki A., Mizushima H., Maehara Y., Mekada E., Nakano H. "Clinical Significance of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor and A Disintegrin and Metalloprotease 17 Expression in Human Ovarian Cancer". *Clin Cancer Res* 11(13): 4783-4792 (2005).
- Tanida S., Joh T., Itoh K., Kataoka H., Sasaki M., Ohara H., Nakazawa T., Nomura T., Kinugasa Y., Ohmoto H., Ishiguro H., Yoshino K., Higashiyama S., Itoh M. "The mechanism of cleavage of EGFR ligands induced by inflammatory cytokines in gastric cancer cells". *Gastroenterology* 127(2): 559-69 (2004).

Tannapfel A., Anhalt K., Hausermann P., Sommerer F., Benicke M., Uhlmann D., Witzigmann H., Hauss J., Wittekind C. "Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays". *J Pathol* 201(2): 238-49 (2003).

Tessier-Lavigne M., Goodman C. S. "The molecular biology of axon guidance". *Science* 274(5290): 1123-33 (1996).

Thathiah A., Blobel C. P., Carson D. D. "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding". *J Biol Chem* 278(5): 3386-94 (2003).

Thathiah A., Carson D. D. "MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17". *Biochem J* 382(Pt 1): 363-73 (2004).

Thodeti C. K., Frohlich C., Nielsen C. K., Holck P., Sundberg C., Kveiborg M., Mahalingam Y., Albrechtsen R., Couchman J. R., Wewer U. M. "Hierarchy of ADAM12 binding to integrins in tumor cells". *Exp Cell Res* 309(2): 438-50 (2005).

Timpl R., Sasaki T., Kostka G., Chu M. L. "Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins". *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6): 479-89 (2003).

Tomczuk M., Takahashi Y., Huang J., Murase S., Mistretta M., Klaffky E., Sutherland A., Bolling L., Coonrod S., Marcinkiewicz C., Sheppard D., Stepp M. A., White J. M. "Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3". *Exp Cell Res* 290(1): 68-81 (2003).

Toyoda H., Komurasaki T., Uchida D., Takayama Y., Isobe T., Okuyama T., Hanada K. "Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes". *J Biol Chem* 270(13): 7495-500 (1995).

Trojan L., Schaaf A., Steidler A., Haak M., Thalmann G., Knoll T., Gretz N., Alken P., Michel M. S. "Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines". *Anticancer Res* 25(1A): 183-91 (2005).

Tsakadze N. L., Sithu S. D., Sen U., English W. R., Murphy G., D'Souza S. E. "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)". *J Biol Chem* 281(6): 3157-64 (2006).

Tselepis C., Chidgey M., North A., Garrod D. "Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8064-9 (1998).

Tsou C. L., Haskell C. A., Charo I. F. "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine". *J Biol Chem* 276(48): 44622-6 (2001).

Uchida N., Yang Z., Combs J., Pourquie O., Nguyen M., Ramanathan R., Fu J., Welply A., Chen S., Weddell G., Sharma A. K., Leiby K. R., Karagogeos D., Hill B., Humeau L., Stallcup W. B., Hoffman R., Tsukamoto A. S., Gearing D. P., Peault B. "The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells". *Blood* 89(8): 2706-16 (1997).

Ungar D., Oka T., Brittle E. E., Vasile E., Lupashin V. V., Chatterton J. E., Heuser J. E., Krieger M., Waters M. G. "Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function". *J Cell Biol* 157(3): 405-15 (2002).

Urena J. M., Merlos-Suarez A., Baselga J., Arribas J. "The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid determines the subcellular localization of proTGF-(alpha) and membrane type matrix metalloprotease (MT1-MMP)". *J Cell Sci* 112 (Pt 6): 773-84 (1999).

van Kempen L. C., Meier F., Egeblad M., Kersten-Niessen M. J., Garbe C., Weidle U. H., Van Muijen G. N., Herlyn M., Bloemers H. P., Swart G. W. "Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis". *J Invest Dermatol* 122(5): 1293-301 (2004).

van Kempen L. C., Nelissen J. M., Degen W. G., Torensma R., Weidle U. H., Bloemers H. P., Figdor C. G., Swart G. W. "Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction". *J Biol Chem* 276(28): 25783-90 (2001).

van Kempen L. C., van den Oord J. J., van Muijen G. N., Weidle U. H., Bloemers H. P., Swart G. W. "Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin". *Am J Pathol* 156(3): 769-74 (2000).

Villanueva de la Torre T., Bech-Serra J. J., Ruiz-Paz S., Baselga J., Arribas J. "Inactivating mutations block the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in the early secretory pathway". *Biochem Biophys Res Commun* 314(4): 1028-35 (2004).

Vincent B., Paitel E., Saftig P., Frobert Y., Hartmann D., De Strooper B., Grassi J., Lopez-Perez E., Checler F. "The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein". *J Biol Chem* 276(41): 37743-6 (2001).

von Zastrow M., Kobilka B. K. "Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors". *J Biol Chem* 267(5): 3530-8 (1992).

Wang X., He K., Gerhart M., Huang Y., Jiang J., Paxton R. J., Yang S., Lu C., Menon R. K., Black R. A., Baumann G., Frank S. J. "Metalloprotease-mediated GH receptor proteolysis and GHBP shedding. Determination of extracellular domain stem region cleavage site". *J Biol Chem* 277(52): 50510-9 (2002).

Wang Y., Sul H. S. "Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and Inhibition of Adipocyte Differentiation". *Mol Cell Biol* 26(14): 5421-35 (2006).

Watkins L. F., Levine A. E. "Differential role of transforming growth factor-alpha in two human colon-carcinoma cell lines". *Int J Cancer* 47(3): 455-60 (1991).

Watt F. M., Matthey D. L., Garrod D. R. "Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes". *J Cell Biol* 99(6): 2211-5 (1984).

Weiske J., Schoneberg T., Schroder W., Hatzfeld M., Tauber R., Huber O. "The Fate of Desmosomal Proteins in Apoptotic Cells". *J. Biol. Chem.* 276(44): 41175-41181 (2001).

Wen C., Metzstein M. M., Greenwald I. "SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling". *Development* 124(23): 4759-67 (1997).

Weskamp G., Schlondorff J., Lum L., Becherer J. D., Kim T. W., Saftig P., Hartmann D., Murphy G., Blobel C. P. "Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR)". *J Biol Chem* 279(6): 4241-9 (2004).

Whittock N. V., Bower C. "Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4". *J Invest Dermatol* 120(4): 523-30 (2003).

Xiao Z.-Q., Majumdar A. P. N. "Increased in vitro activation of EGFR by membrane-bound TGF- α from gastric and colonic mucosa of aged rats". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(1): G111-116 (2001).

Yana I., Weiss S. J. "Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases". *Mol Biol Cell* 11(7): 2387-401 (2000).

Yap A. S., Briehner W. M., Gumbiner B. M. "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions". *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 119-46 (1997).

Yarden Y. "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities". *Eur J Cancer* 37 Suppl 4: S3-8 (2001).

Yarden Y., Sliwkowski M. X. "Untangling the ErbB signalling network". *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 127-37 (2001).

Yokosaki Y., Matsuura N., Sasaki T., Murakami I., Schneider H., Higashiyama S., Saitoh Y., Yamakido M., Taooka Y., Sheppard D. "The integrin $\alpha(9)\beta(1)$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin". *J Biol Chem* 274(51): 36328-34 (1999).

Yoshimura T., Tomita T., Dixon M. F., Axon A. T., Robinson P. A., Crabtree J. E. "ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa". *J Infect Dis* 185(3): 332-40 (2002).

Yuan C., Kadiiska M., Achanzar W. E., Mason R. P., Waalkes M. P. "Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis". *Toxicol Appl Pharmacol* 164(3): 321-9 (2000).

Zatovicova M., Sedlakova O., Svastova E., Ohradanova A., Ciampor F., Arribas J., Pastorek J., Pastorekova S. "Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17". *Br J Cancer* 93(11): 1267-76 (2005).

Zeng Q., Li S., Chepeha D. B., Giordano T. J., Li J., Zhang H., Polverini P. J., Nor J., Kitajewski J., Wang C. Y. "Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling". *Cancer Cell* 8(1): 13-23 (2005).

Zhang X. P., Kamata T., Yokoyama K., Puzon-McLaughlin W., Takada Y. "Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3". *J Biol Chem* 273(13): 7345-50 (1998).

Zhang Z., Kolls J. K., Oliver P., Good D., Schwarzenberger P. O., Joshi M. S., Ponthier J. L., Lancaster J. R., Jr. "Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide". *J Biol Chem* 275(21): 15839-44 (2000).

Zhou A., Webb G., Zhu X., Steiner D. F. "Proteolytic processing in the secretory pathway". *J Biol Chem* 274(30): 20745-8 (1999).

Zhou B. B. "Targeting ligand cleavage to inhibit the ErbB pathway in cancer". *Ann N Y Acad Sci* 1059: 56-60 (2005).

Zhou M., Graham R., Russell G., Croucher P. I. "MDC-9 (ADAM-9/Meltrin gamma) functions as an adhesion molecule by binding the alpha(v)beta(5) integrin". *Biochem Biophys Res Commun* 280(2): 574-80 (2001).

Aquest treball ha donat lloc a la publicació dels següents articles:

Villanueva de la Torre T., **Bech-Serra JJ.**, Ruiz-Paz S., Baselga J., Arribas J. “Inactivating mutations block the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in the early secretory pathway”. *Biochem Biophys Res Commun* 314(4):1028-35 (2004).

Martinez-Arca S., **Bech-Serra JJ.**, Hurtado-Kuttner M., Borroto A., Arribas J. “Recycling of cell surface pro-transforming growth factor- α regulates epidermal growth factor receptor activation”. *J Biol Chem* 280(44):36970-7 (2005).

Arribas J., **Bech-Serra JJ.**, Santiago-Josefat B. “ADAMs, cell migration and cancer”. *Cancer Metastasis Rev* 25(1):57-68 (2006).

Bech-Serra JJ., Santiago-Josefat B., Esselens C., Saftig P., Baselga J., Arribas J., Canals F. “Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis”. *Mol Cell Biol* 26(13):5086-95 (2006).