

Tesi doctoral presentada per En/Na

Soraya RUIZ PAZ

amb el títol

**"Tráfico intracelular y activación
de la metaloproteasa
ADAM17/TACE"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGÍA

Barcelona, 6 de maig de 2005.

**Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de doctorado BIOMEDICINA del Departamento de
Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Biología
Universidad de Barcelona
Bienio 2000-2002

Memoria presentada por

SORAYA RUIZ PAZ

Para optar al grado de

Doctor en Biología

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratori de Recerca Oncològica del
Hospital Universitario Vall d'Hebrón, bajo la dirección del
Dr. Joaquín V. Arribas.

El Director

El tutor

El interesado

Dr. Joaquín V. Arribas

Dra. Maria Soley

Soraya Ruiz Paz

Marzo, 2005

A mis padres y hermanos

A Toni

No es tiempo todavía

Lo que no logres, quizá mañana lo lograrás
no es tiempo todavía,
nunca en el breve término de un día
madura el trigo y la espiga grana.

No son jamás en la labor humana,
vano el afán, inútil la porfía,
el que con fe y valor lucha y confía
los mayores obstáculos allana.

Trabaja y persevera que en el mundo
nada existe rebelde e infecundo,
para el poder de Dios o el de la idea.

Hasta la estéril y deforme roca
es manantial cuando Moisés la toca,
y estatua cuando Fidias la golpea.

Anónimo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral:

A mi director de tesis, Joaquín, por acogerme en su grupo de investigación y confiar en mí para la realización de este trabajo.

A mis amigas de la facultad con las que he compartido (y seguiré compartiendo) los momentos más importantes de mi vida. A mis amigos del laboratorio con los que aprendo infinitamente cada día.

A mis padres, a mi hermano y sobre todo a mi hermana por su amor e ilusión incondicional y su apoyo en todas mis decisiones.

A Toni, porque no siendo fácil, lo haces más resistible. Esta tesis y todo.

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
TACE/ADAM 17	7
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TACE.....	9
BIOSÍNTESIS Y TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE	11
PROPROTEÍNAS CONVERTASAS EN LA VÍA SECRETORA	14
DEGRADOMA DE TACE.....	16
¿CÓMO SELECCIONA TACE A SUS SUSTRATOS?.....	17
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TACE.....	19
MECANISMOS	20
MODIFICACIÓN DEL PRODOMINIO	21
TRANSPORTE A LA SUPERFÍCIE CELULAR	21
REDISTRIBUCIÓN DE TACE EN LA SUPERFICIE CELULAR.....	22
ACTIVACIÓN DIRECTA DEL DOMINIO CATALÍTICO.....	23
MODIFICACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE TACE.....	24
FACTORES IMPLICADOS	25
FACTORES QUE ACTÚAN EN TRANS	25
Proteína Kinasa C (PKC)	25
Proteínas quininas activadas por mitógenos (MAPKs)	26
Proteínas que interaccionan con el dominio citosólico de TACE	27
FACTORES QUE ACTÚAN EN CIS	29
CORTE PROTEOLÍTICO CONSTITUTIVO	31
INACTIVACIÓN DE TACE.....	31
PAPEL FISIOLÓGICO DE TACE	32
TRANSACTIVACIÓN DEL EGFR	33
VÍAS DE TRANSACTIVACIÓN DEL EGFR ALTERNATIVAS	34
CONCLUSIÓN	34
OBJETIVOS	39

MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
MATERIALES.....	43
ANTICUERPOS.....	43
REACTIVOS	45
LÍNEAS CELULARES.....	47
REACTIVOS DE CULTIVO CELULAR	49
VECTORES PLASMÍDICOS.....	50
VECTORES DE EXPRESIÓN VACÍOS:.....	50
VECTORES DE EXPRESIÓN CON DISTINTOS cADN	50
MUESTRAS TUMORALES	53
MÉTODOS.....	54
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (Método ULTRASPEC de Biotecx):	54
TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT):.....	54
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	54
CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	56
LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN	58
AISLAMIENTO DEL ADN PLASMÍDICO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.	59
TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES.	59
TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	59
TRANSFECCIONES ESTABLES.....	61
TRATAMIENTOS CELULARES.	62
MARCAJE CON BIOTINA	62
MICROSCOPIA CONFOCAL.....	62
OBTENCIÓN DE LISADOS	63
ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE LAS MUESTRAS.	63
INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).....	64
MARCAJE METABÓLICO E INMUNOPRECIPITACIÓN	65
OBTENCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	65
ENSAYO DE PRECIPITACIÓN (<i>PULL DOWN</i>)	66
RESULTADOS.....	69
I. CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR MUTANTE	
DEFECTIVA EN EL SHEDDING DE proTGF- α	69
DETECCIÓN DE TACE EN LA LÍNEA CELULAR M2.....	69
PROCESAMIENTO DE TACE POR PROPROTEÍNAS CONVERTASAS	71
EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE PROPROTEÍNAS CONVERTASAS EN LAS	
CÉLULAS M2.....	75

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TACE EN LAS CÉLULAS M2	79
II. TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES.	87
PROCESAMIENTO DE ADAMs EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES	87
EXPRESIÓN DE ADAM 10 EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES.	90
EXPRESIÓN DE TACE EN TEJIDOS TUMORALES DE MAMA.....	91
EXPRESIÓN DE TACE EN TEJIDOS DE RATÓN.....	92
BIOSÍNTESIS Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TACE EN LAS CÉLULAS SKBR3 Y MDAMB435S	94
III. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO QUE REGULA EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE.	97
PROCESAMIENTO DE DISTINTOS MUTANTES DE DELECIÓN DE TACE.	97
LA TRANSFECCIÓN DE TACE CAUSA SU RETENCIÓN EN COMPARTIMENTOS TEMPRANOS DE LA VÍA SECRETORA.....	99
LOCALIZACIÓN DE TACE DEPENDIENTE DE TEMPERATURA.....	102
LOCALIZACIÓN DE TACE DEPENDIENTE DE LOS EXTREMOS UTRs.....	103
EL MECANISMO QUE REGULA EL TRANSPORTE DE TACE ES SATURABLE	105
LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TACE AFECTA FUNDAMENTALMENTE A LA PROFORMA.	106
IV. POSIBLE MECANISMO QUE REGULA EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE.	108
POSIBLES FACTORES IMPLICADOS EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE	108
COP-I: ¿POSIBLE FACTOR IMPLICADO EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE?	112
DISCUSIÓN.....	117
CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MUTANTE M2.	117
TACE EN LAS CÉLULAS M2.....	118
LAS PROPROTEÍNAS CONVERTASAS EN LAS CÉLULAS M2	118
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TACE EN LAS CÉLULAS M2	119
TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE	120

REGULACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE TACE	121
REGULACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE ADAM 10	122
CARACTERIZACIÓN DEL TRÁFICO DE TACE.	123
SOBRE-EXPRESIÓN DE TACE	123
SOBRE-EXPRESIÓN DE OTRAS ADAMs	124
INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TACE	124
POSIBLES FACTORES IMPLICADOS EN EL MECANISMO DE RETENCIÓN DE TACE.....	125
COP-I.....	125
CONCLUSIONES	131
REFERENCIAS.....	135

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADAM: Proteasa con dominio metaloproteasa y desintegrina.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

APP: Precursor del péptido amiloide.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia.

cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementario.

COP: Proteína de la cubierta de vesículas.

ERGIC: Compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi.

FGF: Factor de crecimiento Fibroblástico.

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína.

GTP: Guanina trifosfato.

HA: Hemaglutinina.

HB-EGF: Factor de crecimiento similar al EGF que une heparina.

KDa: Kilodalton.

NGR: Neuregulina.

PACE: Enzima convertidora de aminoácidos básicos.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TRANCE: Citoquina inducida por la activación relacionada con el TNF- α .

UTR: Región no codificante.

Introducción

INTRODUCCIÓN

Un número sustancial de proteínas de transmembrana de la superficie celular sufren un corte proteolítico que conduce a la liberación de su dominio extracelular. Este proceso, conocido como “*shedding*” (del inglés despojarse o deshacerse), remodela la superficie de las células y regula la función de un número diverso de proteínas de transmembrana que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión, receptores de factores de crecimiento y de citoquinas (Hooper *et al.*, 1997; Schlondorff y Blobel, 1999; Blobel, 2000; Arribas y Borroto, 2002). Durante la década de los ochenta y noventa se puso de manifiesto el papel que jugaban metaloproteasas dependientes de zinc en la realización de la mayoría, si no de todos, los procesos de *shedding* descritos, ya que inhibidores de metaloproteasas bloquean eficientemente este proceso (revisado en Arribas y Borroto, 2002). No obstante, las metaloproteasas implicadas en el *shedding* de ectodominios no se revelaron hasta que en 1997 se descubrió el miembro número 17 de la familia ADAM y se identificó como la metaloproteasa responsable del *shedding* de TNF- α (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Las células derivadas de ratones que tienen una inactivación genética de esta metaloproteasa muestran inhibida la producción de TNF- α soluble. Esta metaloproteasa se denominó ADAM 17 o TACE (Tumor necrosis factor- α converting enzyme), (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997).

TACE/ADAM 17

TACE pertenece a la familia ADAM la cual pertenece a su vez a la superfamilia de las metaloproteasas dependientes de zinc (para una revisión sobre metaloproteasas ver Gomis-Ruth, 2003). Actualmente, la familia ADAM comprende más de 30 miembros (Tabla 1). A pesar de que todos los miembros de esta familia conservan un dominio tipo metaloproteasa, sólo la mitad tienen actividad catalítica. Se ha descrito que esta familia de metaloproteasas están implicadas en funciones de proteólisis, adhesión, fusión y señalización intracelular (Stone *et al.*, 1999). La Tabla 1 muestra algunas de las características de los miembros de la familia ADAM (Duffy *et al.*, 2003); si bien para algunas de ellas está bien caracterizada su función, para otras aún permanece desconocida.

ADAMs	CARACTERÍSTICAS
^a ADAM 1 o Fertilina- α	Participa en espermatogénesis y fertilización.
ADAM 2 o Fertilina- β	Participa en fertilización. Une integrina $\alpha_6\beta_1$.
ADAM 3-7	Participa en fertilización.
^a ADAM 8	Participa en la formación de osteoclastos.
^a ADAM 9, MCD9 o Meltrina γ	Corta proHB-EGF. Tiene actividad α -secretasa Participa en la miogénesis.
^a ADAM 10, Kuzbanian, o MADM	Participa en la neurogénesis. Tiene actividad α -secretasa.
ADAM 11	Candidato como supresor tumoral en cáncer de mama.
^a ADAM 12 o Meltrina α	Participa en la fusión de mioblastos y en la osteogénesis.
^a ADAM 13	Implicado en la migración de la cresta neural.
ADAM 14	Expresado en esperma (<i>C. elegans</i>).
^a ADAM 15 o Metargidina	Une integrinas $\alpha_4\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$.
^a ADAM 16	Participa en la fertilización y la espermatogénesis.
^a ADAM 17 o TACE	(ver Tabla 2)
ADAM 18	Expresada en esperma.
^a ADAM 19 o Meltrina β	Participa en la biogénesis y la diferenciación osteoblástica.
^a ADAM 20-21	Participa en la espermatogénesis.
ADAM 22-23	Expresada en cerebro.
^a ADAM 24-26	Específica de testículo.
^a ADAM 28	Expresada en linfocitos.
ADAM 29	Específica de testículo.
^a ADAM 30	Específica de testículo.
^a ADAM 33	Genera susceptibilidad al asma.
^a ADAM 34	Específica de testículo.

Tabla 1. Características de los miembros de la familia ADAMs. ^a ADAMs con actividad metaloproteasa.

De todas las ADAMs, ADAM 10 es la que comparte una mayor homología de secuencia con TACE (Black y White, 1998; Blobel, 2002). ADAM 10, también llamada Kuzbanian por su homólogo en *Drosophila*, fue el primer miembro de la familia ADAM del que se identificó actividad catalítica (Howard *et al.*, 1996; Lunn *et al.*, 1997). De manera similar a TACE, ADAM 10 está implicada en el *shedding* de diversas proteínas de transmembrana como TNF- α , colágeno de tipo IV, APP y Efrina-A2 (Moss *et al.*, 2001). Otra ADAM cuya actividad está

relacionada con el *shedding* de proteínas de transmembrana es ADAM 9. La sobre-expresión de ADAM 9, aumenta el *shedding* de proHB-EGF (Izumi *et al.*, 1998). No obstante, estos datos son dudosos ya que células deficientes en la actividad de ADAM 9 no presentan ninguna alteración en el *shedding* de este factor de crecimiento (Weskamp *et al.*, 2002).

No sólo miembros de la familia ADAM están implicados en el *shedding* de ectodominios, también metaloproteasas de matriz extracelular ancladas a membrana plasmática (MT-MMP) juegan un papel en este proceso (Kajita *et al.*, 2001; Schlondorff *et al.*, 2001).

La inactivación de TACE causada por una delección en el dominio catalítico de la metaloproteasa en ratones *knock-out* (conocidos como ratones TACE ^{Δ Zn/ Δ Zn}), produce letalidad perinatal en estos animales, demostrando la importancia de la actividad de TACE en el desarrollo *in vivo* (Peschon *et al.*, 1998). Además de esta función, el análisis de los fibroblastos derivados de estos ratones TACE ^{Δ Zn/ Δ Zn} (células TACE ^{Δ Zn/ Δ Zn}) ha confirmado convincentemente el papel de TACE en el *shedding* de ectodominios, (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). El uso de estas líneas celulares ha permitido avanzar en el conocimiento del repertorio de sustratos, también conocido como degradoma (Lopez-Otin y Overall, 2002), de TACE. A pesar del papel central que juega TACE en el *shedding* de ectodominios, poco es lo que se conoce acerca de los mecanismos que regulan su biosíntesis, tráfico intracelular o actividad proteolítica.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TACE

Originalmente, el ARN mensajero (ARNm) de TACE se encontró en una gran variedad de tejidos distintos, sugiriendo que su gen se expresaba de manera ubicua y constitutiva (Black *et al.*, 1997). No obstante, dependiendo del estado del desarrollo, se hallaron diferencias sustanciales en los niveles de ARNm de TACE. En tejido adulto se detectaron niveles altos de ARNm en corazón, placenta, músculo esquelético, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios e intestino delgado, mientras que en tejido fetal se detectaron niveles altos en cerebro, pulmón e hígado (Black *et al.*, 1997). Posteriormente, diversos estudios han demostrado que los niveles de ARNm de TACE no son constantes y su expresión varía en distintas situaciones patológicas como la osteoartritis (Amin, 1999), la artritis reumática (Patel *et al.*, 1998), el infarto agudo de miocardio (Akatsu *et al.*, 2003) o el cáncer de mama (Borrell-Pages *et al.*, 2003; Lendeckel *et al.*, 2005). Además, ciertos compuestos tales como citoquinas, factores de

crecimiento o ésteres de forbol pueden modular la expresión de TACE en algunas líneas celulares (Wang *et al.*, 2000; Bzowska *et al.*, 2004).

Aunque estas evidencias demuestran que la expresión de TACE puede ser regulada, al menos bajo ciertas condiciones, se conoce poco sobre la estructura y funcionalidad del promotor de TACE así como de sus regiones no codificantes. El análisis de un fragmento que comprende el promotor y la región 5' no codificante (5'UTR) del gen de TACE murino, reveló la existencia de varios sitios de unión a factores de transcripción como, por ejemplo, la proteína activadora 2 (AP2) o la proteína estimuladora 1 (Sp1) (Mizui *et al.*, 1999). Estos fragmentos del gen de TACE carecen de una caja TATA consenso pero incluyen una caja CCAAT (Mizui *et al.*, 1999) y una caja rica en G-C, responsables de la transcripción de una variedad de genes que no tienen caja TATA en sus promotores (Duffy *et al.*, 2003). Un análisis de deleciones del promotor de TACE demostró que el pequeño fragmento que va desde el nucleótido -290 al -1, el cual incluye las cajas G-C y CCAAT, es esencial para la transcripción basal del gen (Mizui *et al.*, 1999).

No está claro como algunas condiciones patológicas o determinados compuestos pueden modular la expresión de TACE, ni tampoco si la sobre-regulación es a nivel del promotor o a nivel de la estabilidad del ARNm. Se ha descrito que algunos compuestos como los ésteres de forbol aumentan la expresión de genes a través de los factores de transcripción AP2 y Sp1 (Biggs *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1997). Podría especularse que estos factores fuesen los responsables de la transcripción del gen de TACE cuando determinadas células se estimulan con compuestos como los ésteres de forbol. De manera similar al papel del extremo 5'UTR en la regulación de la expresión de genes, se ha que la región 3' no codificante de un gen (3'UTR) puede ser importante, no sólo para la estabilidad del ARNm, sino para su traducción eficiente (Kozak, 1992). La ausencia de la región 3'UTR aumenta la cantidad de determinadas proteínas, indicando que esta región es importante para la unión de moléculas inhibitoras de la traducción (Hensley *et al.*, 2003).

Los diferentes estudios realizados indican que, a pesar de que TACE se distribuye ampliamente en una variedad de tejidos humanos, su expresión puede ser regulada. No obstante, no se conoce el mecanismo ni los factores que regulan la transcripción del gen de TACE. En algunas condiciones patológicas, los niveles del ARNm de TACE aumentan, aunque no se conoce si el aumento es una causa o consecuencia de la condición patológica. El

desarrollo de animales transgénicos para el gen de TACE podría ayudar a solventar esta cuestión.

BIOSÍNTESIS Y TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE

Como ocurre con los miembros de la familia ADAMs, TACE es una proteína de tipo I (con la región amino-terminal en la zona extracelular/intraluminal) que contiene los siguientes dominios identificables: péptido señal, prodominio, dominio catalítico o metaloproteasa, dominio desintegrina, dominio rico en cisteínas, dominio como el factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), dominio transmembrana y dominio citosólico (Figura 1).

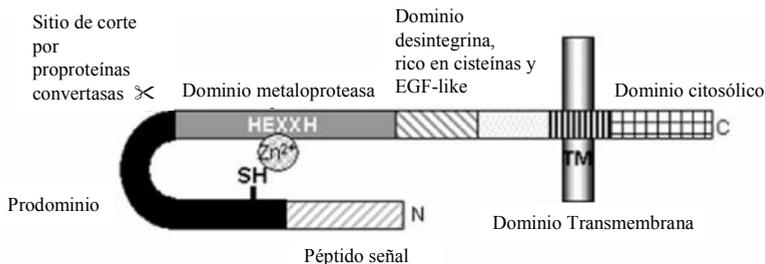


Figura 1. Estructura en dominios de una metaloproteasa típica de la familia ADAMs. Los dominios constan de un péptido señal en la región amino-terminal, un prodominio con un residuo cisteína (SH) seguido de un lugar de corte para serin-proteasas como la Furina (RVKR↓R), un dominio catalítico que contiene la secuencia HEXXH, un dominio desintegrina/rico en cisteínas/EGF-like, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio citosólico (adaptado de Allinson *et al.*, 2003).

A medida que el ARNm se va traduciendo, da lugar a un primer polipéptido que entra en el Retículo Endoplasmático (RE) como un cimógeno estable, en el cual el prodominio está inhibiendo el dominio catalítico, por lo que esta forma denominada proTACE, es inactiva. Aunque por analogía con otras metaloproteasas dependientes de zinc, se propuso que el mecanismo de inhibición implicaba el modelo de “interruptor de cisteína” o “*cysteine-switch*”, que consiste en una coordinación del átomo de zinc del dominio metaloproteasa con una cisteína libre del prodominio, algunas publicaciones recientes indican que la cisteína del prodominio no es indispensable para la inhibición de proTACE (Gonzales *et al.*, 2004;

Leonard *et al.*, 2004), sugiriendo que puede existir otro mecanismo alternativo para la inhibición de la metaloproteasa.

En células de mamífero, el plegamiento de las proteínas ocurre simultáneamente a la traducción del ARNm (Kozak, 1992). Las proteínas recién sintetizadas se ven sometidas a un control de calidad en el RE (para una revisión reciente ver Sitia y Braakman, 2003). Aquellas proteínas que no son residentes en el RE y superan con éxito el control de calidad, progresan a través de la vía secretora empaquetadas en vesículas de transporte anterógrado. Estas vesículas se caracterizan por contener cubiertas de COP-II (Figura 2 y revisado en Lee *et al.*, 2004).

El RE no es un compartimento homogéneo ya que existen dominios localizados que se designan como regiones de salida de proteínas que serán el cargo de vesículas COP-II (Pagano *et al.*, 1999). Los componentes citosólicos de las cubiertas COP-II comprenden la pequeña GTPasa Sarp1 y dos complejos heterodiméricos, Sec12p y Sec13/31p (revisado en Duden, 2003). La especificidad de las proteínas que se seleccionan como cargo de vesículas COP-II depende de la interacción de las subunidades de la vesícula con señales en el dominio citosólico de las proteínas del cargo. De hecho se han descrito dos señales de exportación de proteínas del RE en células de mamífero: un motivo di-fenilalanina presente en ERGIC-53, un receptor de glicoproteínas similar a lectina (Nufer *et al.*, 2002) y una señal di-acídica Asp-X-Glu (donde X es cualquier aminoácido) que se identificó en la región carboxilo terminal de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (Nishimura y Balch, 1997). Las proteínas solubles se introducen en las vesículas COP-II por defecto o a través de interacciones selectivas de la cubierta de COP-II con receptores de membrana que interaccionan a su vez con este cargo soluble (revisado en Duden, 2003).

Una vez las proteínas se seleccionan como cargo en las vesículas COP-II, se transportan hasta llegar al complejo de Golgi, constituido por una serie de complejas cisternas en las que ocurren modificaciones de las cadenas de azúcares, procesamiento y clasificación de las proteínas (revisado en Lee *et al.*, 2004). Las modificaciones de los carbohidratos suceden secuencialmente a través de los compartimentos *cis*-, *medio*- y *trans*- del complejo de Golgi. La red *trans*- del complejo de Golgi (*trans* Golgi network o TGN) sirve como estación de selección de las proteínas que se transportarán hacia la superficie celular o bien hacia compartimentos vesiculares adicionales (vacuolas, lisosomas, etc.). En el caso de las ADAMs

y en concreto de proTACE, en este compartimento es donde ocurre el procesamiento de la metaloproteasa (Figura 2).

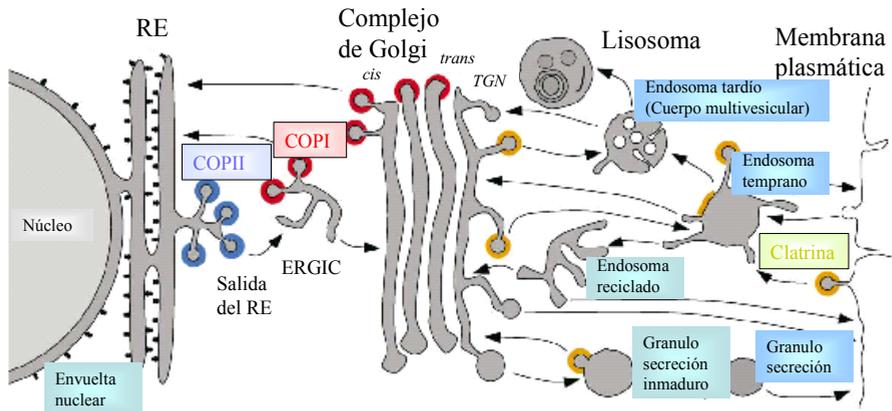


Figura 2. Vías de transporte intracelular. La figura muestra un esquema de los compartimentos de las distintas vías secretora, lisosomal/vacuolar y endocítica. Los pasos de transporte están indicados con flechas. Los colores indican las localizaciones de COP-I (rojo), COP-II (azul) y clatrina (naranja). ERGIC, es la zona intermedia entre la salida del RE y la llegada al *cis*-Golgi. La región *trans*-Golgi es donde ocurre el procesamiento de las ADAMs (adaptado de Bonifacino y Glick, 2004)

En algunos casos, las proteínas que han llegado al complejo de Golgi deben volver al RE, generalmente porque son residentes de este compartimento y han escapado el control de calidad o porque son proteínas de la maquinaria de formación de vesículas. Este transporte retrógrado está mediado por vesículas cubiertas de COP-I (Figura 2 y revisado en Duden, 2003). La cubierta de las vesículas COP-I está compuesta de la pequeña GTPasa similar a Ras, ARF-1 (ADP-ribosylation factor) y del coatómero, un complejo citosólico de aproximadamente 700 KDa que comprende 7 subunidades conservadas desde mamífero a levadura (Gaynor *et al.*, 1998). Se ha descrito que las proteínas del cargo que se transportan en vesículas COP-I incluyen proteínas de membrana de tipo I que contienen un motivo dilisina (lisinas en la posición -3 y -4 o bien en la posición -3 y -5 de la región carboxilo terminal, KKXX o KXXXX, donde X puede ser cualquier aminoácido), (revisado en Duden, 2003). Este motivo es necesario y suficiente para conducir proteínas del complejo de Golgi al RE *in vivo* y para que el coatómero pueda interactuar con estos motivos *in vitro* (Gaynor *et al.*, 1994). También se ha descrito que las subunidades α -, β - y ϵ -COP pueden unirse al

motivo di-lisina (KKXX) *in vitro*, de manera independientemente del resto de subunidades del coatómero (Cosson y Letourneur, 1994).

La maduración de proTACE está firmemente ligada a su transporte desde el RE hasta el complejo de Golgi donde la eliminación proteolítica del prodominio tiene lugar (revisado en Zhou *et al.*, 1999). Entre el prodominio y el dominio metaloproteasa de todas las ADAMs se encuentra una secuencia de reconocimiento típica por proproteínas convertasas (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Esta secuencia también se encuentra en otras muchas proteínas que siguen la vía secretora y en metaloproteasas que no pertenecen a la familia ADAMs, como las MT-MMP (Yana y Weiss, 2000) o las ADAM-TS (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2000) que son una subfamilia de la familia ADAMs con motivos tromboespondina y secretadas al medio extracelular (para una revisión reciente ver Porter *et al.*, 2005). La regulación de la actividad de las distintas proproteínas convertasas podría ser importante para modular la actividad de muchas metaloproteasas.

PROPROTEÍNAS CONVERTASAS EN LA VÍA SECRETORA

Las proproteínas convertasas (PCs) forman parte de la familia de las serin-endoproteasas implicadas en el procesamiento de prohormonas, precursores neuropeptídicos y una gran variedad de proteínas precursoras en la vía secretora. Las proproteínas convertasas reconocen una secuencia básica de aminoácidos (R-X-K/R-R) como lugar de procesamiento (Steiner *et al.*, 1992). En mamíferos, se han caracterizado siete miembros de la familia denominados Furina, PC2, PC3, PC4, PACE-4, PC6B y PC7 (Seidah y Chretien, 1997). Mientras Furina, PACE-4, PC6B y PC7 se expresan de manera ubicua, PC2 y PC3 se expresan específicamente en tejidos neuroendocrinos y PC4 en tejido testicular (Steiner *et al.*, 1992). De todas las proproteínas convertasas la Furina ha sido la más estudiada; se ha descrito su papel en procesos de invasión neuronal, control de señalización yuxtacrina y paracrina, degradación de la matriz extracelular y metástasis tumoral (Thomas, 2002). La Furina se autoactiva mediante dos procesamientos constitutivos, el primero ocurre en el ambiente a pH neutro del RE, justo antes del sitio catalítico de la convertasa (después de la arginina 107) y el segundo ocurre mientras la convertasa progresa a través del complejo de Golgi (en el prodominio, después de la arginina 75) (Figura 3). Finalmente, la Furina se ubica en el TGN lo que presupone que el procesamiento de sus sustratos ocurre en este compartimento. No obstante,

resultados recientes indican que la Furina puede ciclar entre la membrana plasmática, los endosomas y el TGN, indicando que podría realizar su función en cualquiera de estas zonas (Schapiro *et al.*, 2004).

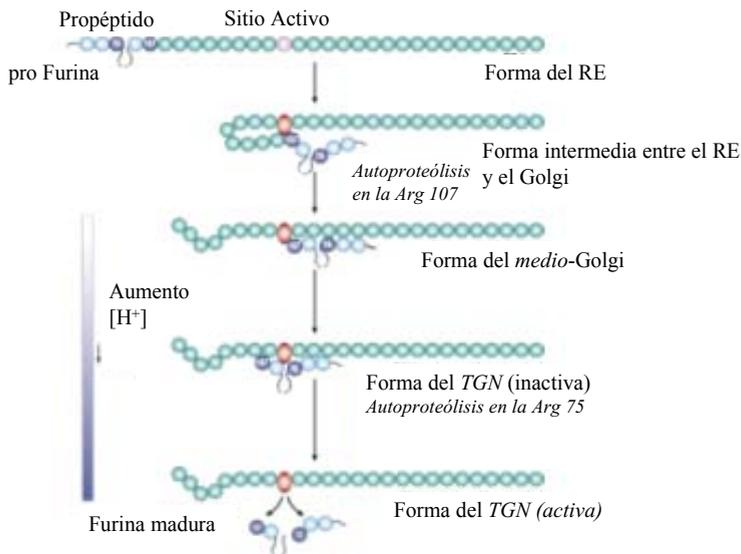


Figura 3. Vía de autoactivación de la Furina. El prodominio de la Furina actúa como una chaperona intramolecular que facilita que el dominio catalítico inactivo (círculo rosa) adquiera la conformación activa (óvalo rojo). Después de salir del RE, la Furina sufre dos cortes autoproteolíticos (ver texto, adaptado de Thomas, 2002).

La inhibición de la Furina es la aproximación más utilizada para determinar la participación de esta convertasa en el procesamiento proteolítico de un determinado sustrato. Uno de los inhibidores más utilizados es el α_1 -Antitripsina Portland (α_1 -PDX), una variante generada mediante mutación del sitio reactivo de α_1 -Antitripsina que contiene la mínima secuencia de corte por Furina (-Arg-Ile-Pro-Arg-). Este inhibidor es altamente selectivo de Furina ($K_i = 600$ pM), aunque a elevadas concentraciones también inhibe otras convertasas (Jean *et al.*, 1998).

En el transporte de proTACE a través de la vía secretora hacia la membrana plasmática ocurre su procesamiento, ya que sólo la forma de TACE carente de prodominio se detecta en la superficie celular (Schlondorff *et al.*, 2000). Debido a que el *shedding* de distintos sustratos se induce por diversos compuestos, además de la regulación del transporte de TACE,

probablemente otros mecanismos adicionales regularán la actividad de la metaloproteasa una vez se encuentra en la superficie celular.

DEGRADOMA DE TACE

Dada la diversidad estructural y funcional de las proteínas de la superficie celular que sufren el proceso de *shedding* y el gran número de metaloproteasas dependientes de zinc que podrían ser las responsables de este fenómeno, una hipótesis obvia es implicar a varias metaloproteasas en este proceso de corte proteolítico. Cada una de ellas cortaría un número determinado de sustratos, así TACE se encargaría de cortar TNF- α y otras moléculas estructural y funcionalmente relacionadas con la citoquina (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). No obstante, el estudio exhaustivo de células derivadas de ratones genéticamente deficientes para la actividad de TACE (fibroblastos TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$) (Black *et al.*, 1997), descartó esta hipótesis. El *shedding* de una diversidad de proteínas no relacionadas con TNF- α se ve afectado en los fibroblastos TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ (Tabla 2), invalidando, al menos parcialmente, la hipótesis inicial y apuntando a TACE como una metaloproteasa central en el *shedding* de ectodominios.

Evidencias genéticas independientes confirman este concepto. Las células M2 son células CHO mutadas y seleccionadas por su defecto en el *shedding* del factor de crecimiento transformante, proTGF- α (Arribas y Massague, 1995; Arribas *et al.*, 1996). La parcial caracterización de estas células ha mostrado la existencia de un defecto en el *shedding* de distintas proteínas no relacionadas entre sí de manera similar al que se observa en las células TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$, (Arribas *et al.*, 1996; Merlos-Suarez *et al.*, 2001; Tsou *et al.*, 2001; Borrell-Pages *et al.*, 2003; Le Gall *et al.*, 2003).

De forma paralela a los análisis genéticos mencionados, se han llevado a cabo una variedad de análisis *in vitro* para caracterizar el degradoma de TACE. Estos análisis consisten en utilizar proteínas recombinantes solubles y péptidos modelos. En general, estas aproximaciones han conducido a resultados dudosos e inconsistentes debido a sus limitaciones, ya que se ha descrito que la actividad de TACE requiere un entorno celular y que la conformación de los sustratos determina también la eficiencia del *shedding*. Aparentemente, TACE debe anclarse a la membrana plasmática de la superficie celular para realizar correctamente su función (Reddy *et al.*, 2000) y además actúa sólo sobre sustratos que están ubicados en la misma

célula (Reddy *et al.*, 2000). La sobre-expresión conjunta de TACE y TNF- α en células de mamífero produce un aumento de TNF- α soluble (Itai *et al.*, 2001). No obstante, cuando TACE se sobre-expresa en células que se co-cultivan con células que sobre-expresan TNF- α , no se observa un aumento del *shedding* de este factor (Itai *et al.*, 2001), indicando que sustrato y metaloproteasa deben encontrarse en la misma célula. Algunos autores han sugerido que estos resultados abren la posibilidad de que en el contexto de una célula intacta, la forma de TACE en la superficie celular interaccione con otras proteínas y/o adquiera una conformación diferencial que incremente la afinidad por ciertos sustratos, lo que no puede estimarse en experimentos *in vitro* (Reddy *et al.*, 2000).

En conclusión, aunque algunos experimentos *in vitro* se han usado para demostrar que TACE es la responsable del *shedding* de determinados sustratos (Sunnarborg *et al.*, 2002; Hinkle *et al.*, 2004), los resultados obtenidos con células TACE $\Delta Zn/\Delta Zn$ son consistentes entre ellos y apuntan a TACE como la metaloproteasa central en los procesos de *shedding* de proteínas de transmembrana. Hasta la fecha, las evidencias genéticas han indicado que cerca de 30 proteínas de transmembrana son sustratos de TACE (Tabla 2) y que previsiblemente, este número irá creciendo. La cuestión que surge ahora es cómo TACE reconoce y selecciona a esta gran variedad de sustratos.

¿CÓMO SELECCIONA TACE A SUS SUSTRATOS?

La caracterización del degradoma de TACE apunta claramente a la necesidad de un mecanismo de selección inusual dada esta extensa variedad de sustratos (Tabla 2).

Teniendo en cuenta que sólo entre el 2-5% de las proteínas de la superficie celular sufren procesos de *shedding* (Arribas *et al.*, 1996), TACE debe distinguir algún rasgo entre las moléculas que son sus sustratos. A pesar del esfuerzo de muchos laboratorios, todavía se está lejos de entender las propiedades de este mecanismo de selección.

La comparación de las secuencias de corte de los sustratos de TACE muestra claramente que no existe ninguna secuencia consenso de corte reconocida ni ninguna estructura característica aparente común a los sustratos (ver Tabla 2). A estas conclusiones se ha llegado mediante experimentos de mutagénesis del sitio de corte de algunos sustratos de TACE, como el IL-6R (receptor de la interleuquina 6) o p55TNF- α R (receptor p55 de TNF- α) e incluso mutagénesis extensiva alrededor del sitio de corte no tienen ningún efecto relevante sobre el

shedding de dichas proteínas indicando que no existe una secuencia específica alrededor del sitio de corte necesaria para este proceso (Brakebusch *et al.*, 1994; Mullberg *et al.*, 2000)

Sustratos de TACE	Categoría funcional	Sitio de corte	Referencia	
ProTNF- α	<u>Citoquinas</u>	SPLAQA ↓ VRSSSR	(Mezyk <i>et al.</i> , 2003)	
Fractalquina		Secuencia yuxtamembrana	(Garton <i>et al.</i> , 2001)	
TRANCE		IVGPQR ↓ FSGAPA	(Lum <i>et al.</i> , 1999; Mohan <i>et al.</i> , 2002)2)	
ProTGF- α		<u>Ligandos de la familia del EGF</u>	HADLLA ↓ VVAASQ	(Althoff <i>et al.</i> , 2001; Sahin <i>et al.</i> , 2004)
ProNRG α -2C			No establecido	(Montero <i>et al.</i> , 2000)
proHB-EGF			CHGLTP ↓ VENPLYTYDH	(Hinkle <i>et al.</i> , 2004; Sahin <i>et al.</i> , 2004)
proAmfíregulina			CGEK ↓ SMSTHEDDKDLSK	(Hinkle <i>et al.</i> , 2004; Sahin <i>et al.</i> , 2004)
Betacelulina			CERVDLFY ↓ LQQDRGQ	(Hinkle <i>et al.</i> , 2004; Sahin <i>et al.</i> , 2004)
Epiregulina			CEHFFL ↓ TVHQPLSKEY	(Hinkle <i>et al.</i> , 2004; Sahin <i>et al.</i> , 2004)
p 75 TNF- α RII			<u>Receptores</u>	APGAV ↓ HLPQP
p 55 TNF- α R	PQIEN ↓ VKGTE			(Mezyk <i>et al.</i> , 2003)
CD30	Dominios ricos en cisteína 2 y 5			(Hansen <i>et al.</i> , 2000; Hansen <i>et al.</i> , 2004)
IL-6R α	TSLPVQ ↓ DSSSVP			(Mullberg <i>et al.</i> , 1994)
IL-1R II	No establecido	(Reddy <i>et al.</i> , 2000)		
GHR	MSP ↓ FTCEEDFR	(Wang <i>et al.</i> , 2002)		
HER4 (Human Epidermal Growth Receptor-4)	HGLSLPVENRLTYTDH ^a	(Mohan <i>et al.</i> , 2002)		
Notch	PYKIEA ↓ VKSEPV	(Mohan <i>et al.</i> , 2002)		
CD40	No establecido	(Contin <i>et al.</i> , 2003)		
p75 ^{NTR}	MGSSQP ↓ VVTRGT	(Weskamp <i>et al.</i> , 2004)		
IL-15R α	No establecido	(Budagian <i>et al.</i> , 2004)		
Receptor híbrido SorLA	No establecido	(Guo <i>et al.</i> , 2002)		
Receptor de LDL (low density lipoproteins)	No establecido	(Guo <i>et al.</i> , 2002)		
Receptor AXL Tirosina kinasa	No establecido	(Guo <i>et al.</i> , 2002)		
GPIb α (glicoproteína Ib α)	No establecido	(Bergmeier <i>et al.</i> , 2004)		
L-selectina	<u>Moléculas de adhesión</u>	QKLDK ↓ SFSMI	(Mezyk <i>et al.</i> , 2003)	
Colágeno XVII		No establecido	(Franzke <i>et al.</i> , 2002)	
VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular)		No establecido	(Garton <i>et al.</i> , 2003)	
CD44		No establecido	(Nagano <i>et al.</i> , 2004)}.	
MUC-1 (Mucina-1)		<u>Otros</u>	QYKTEA ↓ ASRYNL	(Thathiah <i>et al.</i> , 2003; Thathiah y Carson, 2004),
β -APP	VHHQK ↓ LVFFA		(Mezyk <i>et al.</i> , 2003)	
Proteína celular priónica	No establecido		(Vincent <i>et al.</i> , 2001)	
GP del virus del ébola	VDKTLPD ↓ QGDNDNWW		(Dolnik <i>et al.</i> , 2004)	

Tabla 2: Degradoma actual de TACE. ^a el lugar de corte fisiológico no se ha establecido concluyentemente.

Algunos autores han propuesto la región yuxtamembrana como zona esencial que confiere susceptibilidad al *shedding*: la introducción de esa secuencia de sustratos de TACE induce el *shedding* constitutivo de moléculas reporteras quiméricas, que normalmente no sufren *shedding* (ver por ejemplo, Arribas *et al.*, 1997; Althoff *et al.*, 2000). No obstante, el análisis mutacional de esas secuencias sugiere que, más que una secuencia aminoacídica concreta, se trata de una característica indefinida en la estructura secundaria que determina una mayor eficiencia y susceptibilidad del *shedding* de los sustratos de TACE (Hinkle *et al.*, 2004).

La formación de complejos estables entre la metaloproteasa y sus sustratos también se ha sugerido como mecanismo que media el reconocimiento. Se ha descrito que las secuencias alejadas de la región yuxtamembrana participan en la generación de estos complejos, los cuales incrementan la eficiencia del *shedding*. Por ejemplo, la formación de complejos transitorios entre TACE y el receptor de la hormona de crecimiento (GHR) ocurre antes del *shedding* de esta última (Schantl *et al.*, 2004). La interacción entre TACE y GHR se bloquea por la presencia de la propia hormona de crecimiento (GH) ligando de GHR, explicando el hecho de que la presencia de la hormona inhiba el *shedding* del receptor (Schantl *et al.*, 2004). En conclusión, la ausencia de aparente similitud entre los sitios de corte de los sustratos de TACE (Tabla 2) indica que no existen requerimientos específicos sobre la secuencia en el sitio de corte. De igual manera, aunque la región yuxtamembrana claramente juega un papel central en el reconocimiento del sustrato por la metaloproteasa, las estructuras relevantes todavía no se conocen. Finalmente, en algunos casos, otros dominios alejados de la región yuxtamembrana parecen tener una influencia en el reconocimiento, pero dada la diversidad del degradoma de TACE no parece que este sea un mecanismo general.

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TACE

La descripción del *shedding* de proteínas de transmembrana de la superficie celular fue anterior a la identificación de las ADAMs y particularmente de TACE como las metaloproteasas implicadas en este proceso. Los niveles del *shedding* constitutivo aumentan drásticamente cuando las células se exponen a diferentes compuestos. Estos compuestos incluyen agentes naturales como factores de crecimiento (factores no identificados del suero, factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF)) (Massague y Pandiella, 1993), la acetilcolina (Buxbaum *et al.*, 1992) y el óxido nítrico

(NO) (Zhang *et al.*, 2000). De igual forma, agentes no fisiológicos como ésteres de forbol, ionóforos de calcio (Massague y Pandiella, 1993), lipopolisácaridos (LPS) (McGeehan *et al.*, 1994) e inhibidores de calmodulina, de acetilcolinesterasas y del proteosoma (Kahn *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 2004; Peiretti *et al.*, 2005) aumentan el *shedding* basal de muchas proteínas de transmembrana.

A pesar de la importancia que supone regular el *shedding* de proteínas de la superficie celular, el mecanismo de acción de estos compuestos es desconocido. Hasta que TACE no se identificó como responsable del *shedding* de proteínas de la superficie celular, el problema se planteaba en identificar las distintas vías mediante las cuales los diferentes compuestos regulaban el *shedding*. Actualmente la pregunta se plantea en cómo distintos compuestos inducen el *shedding* través de la actividad de TACE.

MECANISMOS

Teóricamente, la regulación de los diferentes pasos de la biosíntesis de TACE podría conducir a la modulación de su actividad. A estos posibles mecanismos de regulación se le suman aquellos que podrían actuar sobre la metaloproteasa madura una la vez ha llegado a la membrana (Figura 4).

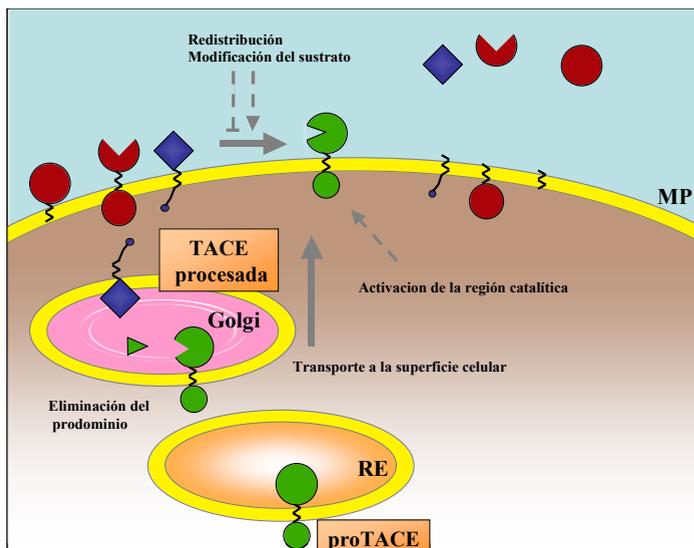


Figura 4. Biosíntesis de TACE mostrando los posibles mecanismos de regulación. RE: Reticulo Endoplasmático, MP: membrana plasmática (ver el texto para detalles).

MODIFICACIÓN DEL PRODOMINIO

La modificación del prodominio de TACE podría conducir a un aumento de la actividad de la metaloproteasa. Algunos autores han sugerido que ciertos compuestos incrementan el *shedding* de determinadas proteínas mediante este mecanismo. Se ha descrito que los ésteres de forbol aumentan el metabolismo oxidativo de las células induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sagone *et al.*, 1984; Datta *et al.*, 2000). Existen evidencias de que tanto ROS como el óxido nítrico (NO) pueden oxidar el grupo tiol de la cisteína del prodominio, rompiendo el enlace formado entre este grupo y el átomo de Zn^{2+} del dominio catalítico (Murrell *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1997): la eliminación de ROS, atenúa significativamente el *shedding* de proteínas de transmembrana inducido por ésteres de forbol y la adición de ROS lo aumenta (Zhang *et al.*, 2001). Por lo tanto, estos estudios muestran la relación causal entre la producción de ROS y el *shedding* de ectodominios. Se ha propuesto que ROS y NO podrían actuar activando directamente proTACE mediante la oxidación del enlace entre el prodominio y el dominio metaloproteasa y que los ésteres de forbol activarían el *shedding* de proteínas de transmembrana mediante este mecanismo (Zhang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001).

No obstante, aunque estos trabajos confieren una posible explicación al efecto que los ésteres de forbol o compuestos oxidantes tienen sobre proTACE y el *shedding* de sus sustratos, se debería demostrar si el modesto incremento en el procesamiento de proTACE corresponde al considerable aumento del *shedding* que se detecta al estimular las células con estos compuestos. Por otro lado, algunos autores han mostrado que el aumento de la actividad de TACE no se corresponde con un aumento de su procesamiento (Doedens *et al.*, 2003). Así, aunque la modificación del prodominio pueda ser un requisito indispensable para la actividad de la metaloproteasa, serán necesarias más evidencias para determinar la contribución de este mecanismo en el control del *shedding* de ectodominios.

TRANSPORTE A LA SUPERFÍCIE CELULAR

El *shedding* de proteínas de transmembrana ocurre cerca o en la superficie celular (Teixido *et al.*, 1990; Arribas *et al.*, 1996). Un posible punto de control de la actividad de TACE sería regular el transporte de la proteasa hacia la superficie celular, lo que, probablemente, conduciría a aumentar el corte proteolítico de sus sustratos. Distintas evidencias indican que

el efecto de compuestos que inducen el *shedding* de proteínas de la superficie celular como los ésteres de forbol, el LPS o el NO, no provocan ningún efecto medible sobre el tráfico intracelular de TACE (Black *et al.*, 1997; Doedens y Black, 2000; Schlondorff *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Doedens *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito el papel de inhibidores de acetilcolinesterasas en la inducción del tráfico de TACE y ADAM10 hacia la membrana plasmática y en el aumento del *shedding* de proHB-EGF (Zimmermann *et al.*, 2004). No se conoce como este tipo de inhibidores incrementan el tráfico intracelular pero este efecto se pierde cuando las células se tratan con drogas que influyen en el transporte de proteínas como la brefeldina (Zimmermann *et al.*, 2004)

A pesar de la importancia del control del tráfico intracelular de TACE para regular su actividad, las evidencias descritas indican que no este mecanismo no es general, al menos cuando las células se estimulan con determinados compuestos.

REDISTRIBUCIÓN DE TACE EN LA SUPERFICIE CELULAR

La membrana plasmática es una región heterogénea que presenta una compartimentalización en microdominios funcionales que facilitan procesos de señalización celular, adhesión y tráfico (para una revisión reciente ver Laude y Prior, 2004). Un posible punto de control de la actividad de TACE sería la regulación de la co-localización del sustrato y la metaloproteasa en la membrana plasmática (Figura 5). Se ha descrito que los ésteres de forbol causan la redistribución de TACE en áreas especializadas de la membrana plasmática, llamadas “*ruffling areas*” y que tras la re-localización tiene lugar la activación del *shedding* de CD44, una molécula de adhesión que interacciona con el ácido hialurónico, abriendo la posibilidad de que esta redistribución contribuya a la regulación del *shedding* de esta molécula (Nagano *et al.*, 2004). De igual manera, compuestos que eliminan el colesterol de las membranas celulares, rompiendo las estructuras conocidas como “*lipids rafts*” (regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos), aumentan el *shedding* de IL-6R (Matthews *et al.*, 2003). Las diferencias en el *shedding* de IL-6R observadas en fibroblastos TACE^{ΔZn/ΔZn} comparadas con células silvestres después de eliminar estos dominios ricos en colesterol, confirman que el *shedding* de IL-6R mediado por TACE es dependiente del contenido de colesterol en la membrana plasmática (Matthews *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que la eliminación del colesterol y la consecuente destrucción de las estructuras de “*lipids rafts*”,

conducen a aumentar la accesibilidad del sustrato a TACE y por lo tanto aumenta considerablemente el *shedding* no detectado anteriormente en presencia de colesterol. De manera similar, la eliminación de colesterol aumenta el *shedding* de CD30 (von Tresckow *et al.*, 2004), un receptor de linfocitos activados y sustrato conocido de TACE (Hansen *et al.*, 2000).

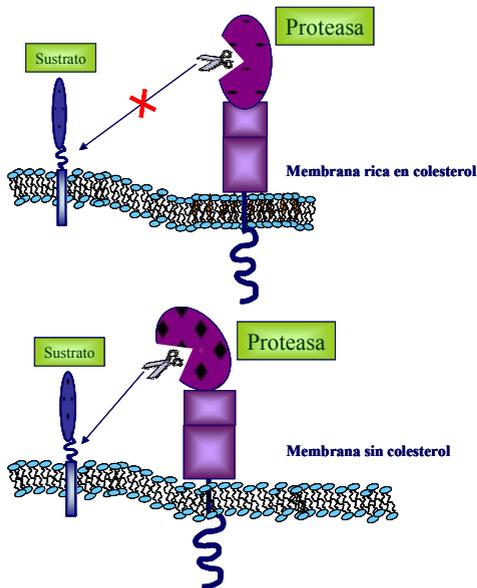


Figura 5. Localización de TACE en la superficie celular. La ubicación de la proteasa en compartimentos específicos de la membrana plasmática ricos en colesterol (*lipid-raft*) impide el *shedding* de sus sustratos. Cuando las células son tratadas con compuestos que eliminan el colesterol, la metaloproteasa tiene acceso a su sustrato y se induce el *shedding* (zona rica en colesterol)

Además, el uso de concentraciones elevadas de sales (1M NaCl), que cambian el potencial de la membrana plasmática, induce el *shedding* de TrkA, el receptor de NGF (factor de crecimiento neural) (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002). Estas evidencias sugieren que la regulación de la accesibilidad entre sustrato-metaloproteasa explicaría la activación del *shedding* de ectodominios.

ACTIVACIÓN DIRECTA DEL DOMINIO CATALÍTICO

El agente modificador de grupos tiol APMA activa proTACE actuando sobre cisteínas del dominio catalítico de la metaloproteasa necesarias para su actividad, aunque a concentraciones elevadas de APMA, la metaloproteasa se inhibe (Milla *et al.*, 1999). Este mismo mecanismo podría activar otras metaloproteasas y explicar la inducción del *shedding*

de proTGF- α observadas en células TACE ^{Δ Zn/ Δ Zn} estimuladas con APMA (Merlos-Suarez *et al.*, 2001). Adicionalmente, proTACE contiene una región rica en cisteínas (Black *et al.*, 1997) que podría desplazar al prodominio de la metaloproteasa (Milla *et al.*, 1999). El NO, otro compuesto que induce el *shedding*, podría actuar oxidando el dominio rico en cisteínas de TACE y conduciendo a un aumento de la metaloproteasa activa (Zhang *et al.*, 2000).

Recientemente se ha descrito que determinados compuestos pueden actuar directamente sobre la actividad catalítica intrínseca de TACE. En este caso, la actividad de TACE se analiza sin tener en cuenta su interacción con sustratos celulares, como por ejemplo midiendo el *shedding* de un péptido exógeno que contiene la secuencia de corte del TNF- α , estimulando las células con ésteres de forbol (Doedens *et al.*, 2003). Los autores muestran que los ésteres de forbol activan, en un contexto celular, la capacidad proteolítica de TACE sin aumentar la cantidad de la metaloproteasa en la superficie celular, sugiriendo que estos compuestos actúan directamente aumentando la capacidad catalítica de la enzima. Paralelamente, TACE estaría asociada a inhibidores que bloquean su sitio catalítico y que son desplazados después de la estimulación de las células con ésteres de forbol (Doedens *et al.*, 2003).

MODIFICACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE TACE

Hipotéticamente, los compuestos que estimulan el *shedding* de proteínas de la superficie celular podrían actuar directamente sobre los sustratos en lugar de sobre la metaloproteasa. De esta manera, la proteólisis constitutiva aumentaría cuando las modificaciones del sustrato facilitarían su acceso a la proteasa. Algunos autores han descrito que tratamientos con ésteres de forbol no inducen la fosforilación de algunos sustratos de TACE, como la APP, ni tampoco causan la redistribución de esta proteína desde compartimentos intracelulares hacia la superficie celular (Jolly-Tornetta y Wolf, 2000). Conclusiones similares fueron obtenidas cuando se estudió el efecto de distintos compuestos sobre el *shedding* de proTGF- α (Bosenberg *et al.*, 1992). Sin embargo, se ha descrito que la estimulación de células con histamina induce el *shedding* del receptor de TNF- α (TNFR), sustrato de TACE (Peschon *et al.*, 1998) a causa de la movilización del receptor desde el complejo de Golgi hacia la membrana plasmática (Wang *et al.*, 2003). De acuerdo con estos resultados se ha descrito recientemente el efecto de ésteres de forbol e inhibidores del proteosoma en la estimulación de la movilización de TNF- α y TNFR, del complejo de Golgi hacia la membrana plasmática

(Peiretti *et al.*, 2005). Esta movilización no es consecuencia de un proceso general ya que la distribución intracelular de ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular-1), proteína que también sufre *shedding* aunque no es sustrato de TACE, no varía (Peiretti *et al.*, 2005). En conclusión, aunque este mecanismo de regulación parece actuar sobre algunos sustratos de TACE, la modificación de sustratos no parece un sistema general, ya que varía dependiendo del estímulo y del sustrato de la metaloproteasa que se analiza.

FACTORES IMPLICADOS

FACTORES QUE ACTÚAN EN TRANS

Proteína Kinasa C (PKC)

Los ésteres de forbol son activadores de la Proteína Kinasa C (PKC) y se han utilizado ampliamente para inducir el *shedding* de proteínas de la superficie celular (Arribas y Merlos-Suarez, 2003). La PKC, fue, por lo tanto, el primer factor propuesto para participar en la regulación del *shedding* activado (Buxbaum *et al.*, 1990; Pandiella y Massague, 1991). Posteriormente, el tratamiento de células con inhibidores de la PKC confirmaron esta hipótesis al bloquear el *shedding* de diferentes sustratos de TACE (ver por ejemplo Mullberg *et al.*, 1992). Algunos trabajos muestran el papel de diferentes isoformas de la PKC en el *shedding* de sustratos de TACE en distintas líneas celulares. La isoforma ϵ de la PKC está implicada en el *shedding* de TNF- α mediado por TACE e inducido por ésteres de forbol (Wheeler *et al.*, 2003) y también en el *shedding* de la APP inducido por Carbacol (Lanni *et al.*, 2004). La isoforma α de la PKC media el *shedding* de la APP inducido por ésteres de forbol (Lanni *et al.*, 2004) y la isoforma ζ y δ están implicadas en el *shedding* del receptor de la interleuquina-6 (IL-6R) (Thabard *et al.*, 2001). También se ha propuesto que la isoforma δ está implicada en la inducción del *shedding* de proteínas de la superficie celular (Izumi *et al.*, 1998). A partir de estas evidencias, es posible que diferentes isoformas de la PKC participen en la regulación de la actividad de TACE en distintas líneas celulares estimuladas con distintos compuestos, aunque no se conoce con exactitud.

Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Recientemente se ha descrito el papel que juegan las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el *shedding* de diferentes proteínas de transmembrana, al estimular las células con determinados compuestos. Estas proteínas son una familia de quinasas que transducen señales desde la membrana plasmática al núcleo en respuesta a una gran variedad de estímulos. Convencionalmente, esta familia se divide en tres subfamilias: las quinasas reguladas por señalización extracelular (ERKs), la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y p38-MAPKs (para una revisión reciente ver Wada y Penninger, 2004).

Trabajos recientes han mostrado que la vía de quinasas ERKs está implicada en el *shedding* de proHB-EGF, proTGF- α , L-selectina, TNF- α , NRG α 2c y TrkA inducido por PMA y suero fetal bovino (FBS) (Fan y Derynck, 1999; Gechtman *et al.*, 1999; Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2002). En todos los casos el *shedding* ocurre mediado por una metaloproteasa ya que inhibidores de metaloproteasas lo bloquean. Algunos autores proponen que el *shedding* de proTGF- α , NRG α 2c y TrkA inducido por PMA puede darse por una ruta alternativa e independiente de ERK que en cuyo caso estaría mediada por TACE (Montero *et al.*, 2002). Otros compuestos como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) también inducen a través de sus respectivos receptores (receptores tirosina-quinasa) el *shedding* de proTGF- α , L-selectina y TNF- α mediante la vía ERK (Fan y Derynck, 1999) y también en el caso concreto de la L-selectina por la vía MAPK p38 (Rizoli *et al.*, 1999). Recientemente se ha descrito que también la histamina y los inhibidores del proteosoma inducen el *shedding* de TNF- α y TNFR mediante la activación de las MAPKs (Wang *et al.*, 2003; Peiretti *et al.*, 2005). El sorbitol, la luz ultravioleta y el estrés inducen el *shedding* de proTGF- α y NRG α 2c principalmente vía p38-K y JNK y ligeramente mediante la vía ERK, este *shedding* es mediado por una metaloproteasa distinta de TACE (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2002). Recientemente se ha descrito que compuestos cannabinoides pueden activar las cascadas ERK a través de receptores asociados a proteína G e inducir el *shedding* de proAnfíregulina y proHB-EGF mediado por TACE (Hart *et al.*, 2004). En la Tabla 3 se clasifican algunos compuestos que estimulan el *shedding* de determinadas proteínas vía MAPKs.

En conclusión, son muchos los compuestos que activan el *shedding* de proteínas de transmembrana a través de las quinasas intracelulares. No sólo están implicada la vía de las MAPKs sino que también se ha visto la vía de la MAPK p38 y de igual manera, dependiendo del estímulo son otras metaloproteasas distintas a TACE las que se activan y son responsables del *shedding* en cada caso.

Compuestos	MAPK implicada	Enzima	Sustrato
PMA/FBS	Vía ERK	Metaloproteasa	proHB-EGF proTGF- α L-selectina TNF- α NRG α 2c TrkA
PMA	Vía independiente de ERK	TACE	L-selectina NRG α 2c TrkA
FGF PDFG	Vía ERK	Metaloproteasa	proTGF- α L-selectina TNF- α
	Vía P38 Kinasa		L-selectina
Inhibidores del proteasoma Histamina	Vía ERK	Metaloproteasa	TNF- α TNFR
Sorvitol Luz UV Estrés	Vía p38 Kinasa Vía JNK	Metaloproteasa	proTGF- α NRG α 2c
Cannabinoides	Vía ERK	TACE	HB-EGF proAnfiregulina

Tabla 3. Distintos estimuladores del *shedding* de proteínas de transmembrana y las vías que se activan así como las metaloproteasas responsables de este proceso.

Proteínas que interactúan con el dominio citosólico de TACE

El dominio citosólico de TACE consta de 130 aminoácidos y contiene tres dominios potencialmente implicados en interacciones tipo proteína-proteína: dominios de unión SH3, (PAPQTPGR⁷³⁸), dominios de fosforilación en tirosina (KKLDKQYESL⁷⁰⁵) y dominios de unión a proteínas de tipo PDZ (Milla *et al.*, 1999).

Mediante el ensayo de doble híbrido, se encontraron varias proteínas que interactúan con el dominio citosólico de TACE: la proteína deficiente en el arresto mitótico, MAD2 (Nelson *et al.*, 1999), la proteína tirosina fosfatasa, PTH-1 (Zheng *et al.*, 2002) y la proteína asociada a sinapsis 97, SAP97 (Peiretti *et al.*, 2003b), (Figura 6). La interacción entre el dominio citosólico de TACE con PTPH-1 y SAP97 es mediada por dominios PDZ. En general, los dominios PDZ interactúan con la región carboxilo terminal de proteínas que acaban en el aminoácido valina (revisado en Hung y Sheng, 2002). No obstante, TACE, que acaba en cisteína, también interactúa con proteínas PDZ tal y como ya se había sugerido para otras proteínas cuyo aminoácido final también es cisteína (ver por ejemplo, Borrell-Pages *et al.*, 2000).

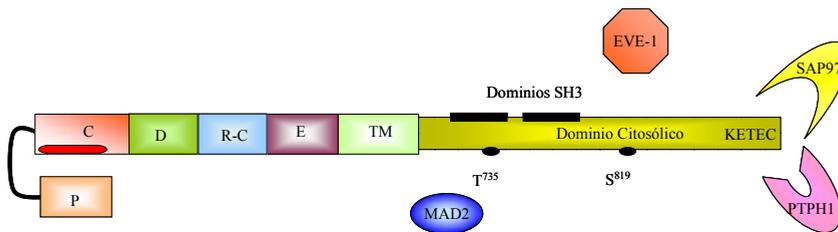


Figura 6 Dominios y proteínas que interactúan con TACE. C: Dominio catalítico, D: Dominio desintegrina, R-C: Dominio rico en cisteínas, E: Dominio EGF-like, TM: Dominio transmembrana, KETEC: Dominio de unión a proteínas PDZ

Mientras el efecto de MAD2 sobre el *shedding* de proteínas de la superficie celular no se ha descrito, PTPH-1 y SAP97 se han propuesto como reguladores negativos de la actividad de TACE. Por ejemplo, la sobre-expresión de PTPH-1 disminuye los niveles de TACE y del *shedding* de proTGF- α , indicando que la fosfatasa regula negativamente la actividad de TACE (Zheng *et al.*, 2002). Además, la interacción de la fosfatasa con TACE no es suficiente para disminuir la expresión de la metaloproteasa ya que debe ser catalíticamente activa para tener este efecto sobre TACE (Zheng *et al.*, 2002). De manera similar, la sobre-expresión de SAP97 disminuye el *shedding* de distintos sustratos de TACE (Peiretti *et al.*, 2003b). Estos datos sugieren que un secuestro intracelular de TACE modificaría sustancialmente la cantidad de la metaloproteasa en la membrana plasmática. Asimismo, los autores especulan que el ya

descrito papel de proteína adaptadora de SAP97 actuaría sobre el transporte y/o la organización de TACE, afectando la actividad de la metaloproteasa (Peiretti *et al.*, 2003b). Recientemente, se ha identificado en un ensayo de doble híbrido Eve-1, una proteína con motivos ricos en prolina y dominios SH3, que interacciona con la región que comprende desde el aminoácido 829 al 840 del dominio citosólico de ADAM 12 *in vitro* e *in vivo* (Tanaka *et al.*, 2004). Los autores muestran que una inhibición de la expresión de Eve-1 utilizando ARN de interferencia específico para esta proteína, disminuye considerablemente el *shedding* de proHB-EGF, proTGF- α , proEpiregulina y proAnfiregulina inducido por ésteres de forbol (Tanaka *et al.*, 2004). Aparentemente, Eve-1 también se asocia con el dominio citosólico de TACE, ADAM 9, ADAM 15 y ADAM 10 en células de mamífero, indicando que podría estar regulando el *shedding* de estas proteínas a través de su asociación con una o varias metaloproteasas (Tanaka *et al.*, 2004). Este resultado abre la posibilidad de que exista un regulador común necesario para la actividad de las metaloproteasas sobre el *shedding* de sus sustratos.

FACTORES QUE ACTÚAN EN CIS

Además de los dominios de unión a PDZ, existen evidencias de que el dominio citosólico de TACE y el dominio rico en cisteínas están implicados en la regulación de la actividad de la metaloproteasa.

La fosforilación de proteínas juega un papel crítico en la señalización intracelular y recientemente algunos autores han descrito que inductores del *shedding* de ectodominios, como ésteres de forbol o factores de crecimiento (FBS, TGF- α , NGF, FGF) que actúan vía MAPK (ver apartado de proteínas quinasas activadas por mitógenos), provocan la fosforilación del dominio citosólico de TACE (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003). Ambos trabajos han demostrado que la interacción de MAPK con el dominio citosólico de TACE causa la fosforilación de la metaloproteasa tanto *in vitro* como *in vivo*. No obstante, existe controversia acerca del lugar de fosforilación del dominio citosólico de TACE. Mientras unos autores han descrito que, cuando las células se estimulan con PMA o factores de crecimiento, TACE se fosforila en el residuo Treonina 735 y que la sustitución de este residuo por uno Alanina disminuye considerablemente la fosforilación (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002), otros autores encuentran que la fosforilación de TACE ocurre en el residuo Serina 819

y no en Treonina cuando las células se estimulan con PMA o factores de crecimiento (Fan *et al.*, 2003). A pesar de estos datos contradictorios, ambos trabajos coinciden en que en células donde no hay actividad de TACE (fibroblastos TACE^{ΔZn/ΔZn}) transfectadas con una construcción de TACE con el residuo Treonina 735 sustituido por Alanina (T⁷³⁵A) (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002) o con el residuo Serina 819 sustituido por Alanina (S⁸¹⁹A) (Fan *et al.*, 2003) se induce el *shedding* de proTGF- α y de TrkA, indicando que no es necesaria la fosforilación en estos residuos para la actividad de TACE (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que los cambios que inducen los factores de crecimiento y ésteres de forbol sobre la fosforilación de TACE en el dominio citosólico, no son responsables de la regulación de su actividad. En relación con estos resultados son los descritos sobre TACE sin el dominio citosólico que muestran que esta forma de la proteasa es capaz de inducir el *shedding* de TNF- α en células estimuladas con ésteres de forbol, sugiriendo que el dominio citosólico no se requiere para la actividad de TACE (Reddy *et al.*, 2000). De esta manera, aunque algunos estímulos regulen la fosforilación del dominio citosólico de TACE, el significado de esta fosforilación todavía no se conoce con claridad.

Recientemente se ha descrito que las MAPKs además actúan movilizandolos sustratos de TACE desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática lo que les hace más accesibles a la metaloproteasa (Wang *et al.*, 2003). Recientemente se ha encontrado una interacción funcional entre el dominio desintegrina y el dominio rico en cisteínas con la integrina $\alpha 5 \beta 1$ en la membrana plasmática y en las adhesiones focales (Bax *et al.*, 2004). Los autores han sugerido que esta interacción regularía o dirigiría la actividad de la metaloproteasa (Bax *et al.*, 2004). Ya que TACE interacciona con la integrina por su dominio desintegrina/rico en cisteínas, el análisis de la actividad de diferentes construcciones con mutaciones puntuales o deleciones en los distintos dominios de TACE serviría para confirmar esta hipótesis.

En conclusión, diferentes compuestos fisiológicos y no fisiológicos inducen el *shedding* de proteínas de la superficie celular. Recientemente se ha establecido que la vía de las MAPKs está implicada. No obstante, aunque se ha descrito que una de las dianas moleculares de esas quinasas puede ser el dominio citosólico de TACE, no se conocen cual es el papel de esta fosforilación en la regulación de su actividad. La identificación de los factores y los

mecanismos implicados en esta regulación está siendo el objetivo de muchos grupos de investigación.

CORTE PROTEOLÍTICO CONSTITUTIVO

El *shedding* de proteínas de transmembrana puede ocurrir de manera constitutiva sin necesidad de estimular las células con ningún compuesto.

Se ha descrito que el *shedding* de proTGF- α ocurre de forma basal y que en este mecanismo participa la vía p38 MAPK ya que inhibidores de esta quinasa bloquean el *shedding* basal de proTGF- α (Fan y Derynck, 1999). En algunos casos, este tipo de proteólisis es independiente de la actividad de TACE. Por ejemplo, el *shedding* basal de la APP no se inhibe en las células TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ (Buxbaum *et al.*, 1998). Otros candidatos implicados en el *shedding* de la β APP son ADAM 10 y ADAM 9 (Koike *et al.*, 1999; Lammich *et al.*, 1999). No obstante, experimentos procedentes de las células deficientes en la actividad de estas metaloproteasas muestran que el *shedding* basal de la β APP no se inhibe, indicando que estas metaloproteasas no están implicadas en el *shedding* basal (Hartmann *et al.*, 2002). Otros trabajos apuntan a ADAM 10 como la responsable del *shedding* constitutivo de una variedad de sustratos y a TACE como la responsable del *shedding* activado (Lammich *et al.*, 1999; Sahin *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la razón por la que TACE tiene una relativa inactividad en células no estimuladas es porque se encuentra acomplejada con moléculas de inhibidores, lo que indica que sólo cuando las células se estimulan con distintos compuestos, TACE se desacompleja y queda libre para cortar a sus sustratos (Doedens *et al.*, 2003).

INACTIVACIÓN DE TACE

Aproximadamente 3 horas después del tratamiento con ésteres de forbol, las células recuperan los niveles normales de proTGF- α en la superficie celular, indicando que la activación de TACE se elimina aproximadamente 2 horas después de su activación (Arribas *et al.*, 1997). Este resultado está en concordancia con aquellos que muestran que el tratamiento de células con ésteres de forbol durante 1.5 horas regula negativamente la cantidad de forma madura de TACE (Doedens y Black, 2000; Endres *et al.*, 2003). Este resultado parece mediado por el motivo de internalización (YESL) presente en el dominio citosólico de TACE ya que se inhibe al bloquear la endocitosis, indicando que el efecto de los ésteres de forbol sobre la

maduración de TACE depende de la formación de vesículas y de la endocitosis (Doedens y Black, 2000). No obstante, no está claro si el mecanismo de modulación negativa observado con tratamientos con ésteres de forbol es general dado que en células activadas con acetilcolina los niveles de TACE permanecen inalterados (Endres *et al.*, 2003).

PAPEL FISIOLÓGICO DE TACE

Además del bien caracterizado papel de TACE en el *shedding* de proTNF- α (revisado en Moss y Lambert, 2002), la caracterización de células TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ permitió demostrar la importancia de esta metaloproteasa en el *shedding* de los ligandos del receptor de EGF (EGFR) (Sunnarborg *et al.*, 2002). El fenotipo de ratones TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ es similar al observado en ratones con deficiencias para la actividad de TGF- α (TGF- α $^{-/-}$) y de EGFR (EGFR $^{-/-}$) (Luetkeke *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993; Miettinen *et al.*, 1995; Sibilia y Wagner, 1995; Peschon *et al.*, 1998) y consiste, de manera general, en deficiencias a nivel epitelial, así como defectos en la fusión de los párpados durante el desarrollo. El *shedding* de proTGF- α y de otros ligandos del EGFR es crucial para la activación del EGFR (Figura 7). Las similitudes fenotípicas entre TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$, EGFR $^{-/-}$ y TGF- α $^{-/-}$, muestran la importancia de la regulación de la actividad de TACE para la producción de ligandos solubles y accesibles al receptor de EGF.

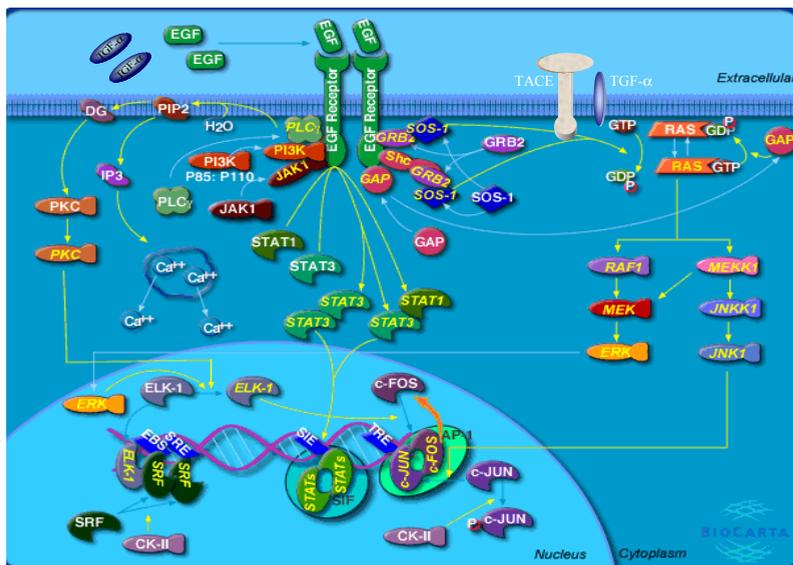


Figura 7. Vías de señalización del receptor del EGF. La actividad del EGFR requiere la unión de los ligandos solubles generados por la actividad de TACE, desencadenando una serie de vías de señalización que conducen a la transcripción de genes implicados en proliferación, supervivencia, división celular, apoptosis, etc.

TRANSACTIVACIÓN DEL EGFR

Además de los ligandos del EGFR, una variedad de estímulos externos como las radiaciones ultravioleta y γ , varios oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el permanganato, iones de metales pesados y la depolarización de la membrana plasmática, provocan la activación del EGFR (Knebel *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997; Zwick *et al.*, 1997). De manera similar, la activación de los receptores aparentemente no relacionados con el EGFR, también conducen a la activación de este receptor en un mecanismo denominado transactivación del EGFR. Así, la estimulación de determinadas células con agonistas de receptores asociados a proteína G (GPCR) como la Endotelina-1, el Ácido Lisofosfatídico (LPA), la Bradiquinina y la Trombina, activan rápidamente el EGFR, sugiriendo que existe un mecanismo de “cruce” (*cross-talk*) entre las vías de GPCR y EGFR (Daub *et al.*, 1996) (Figura 8).

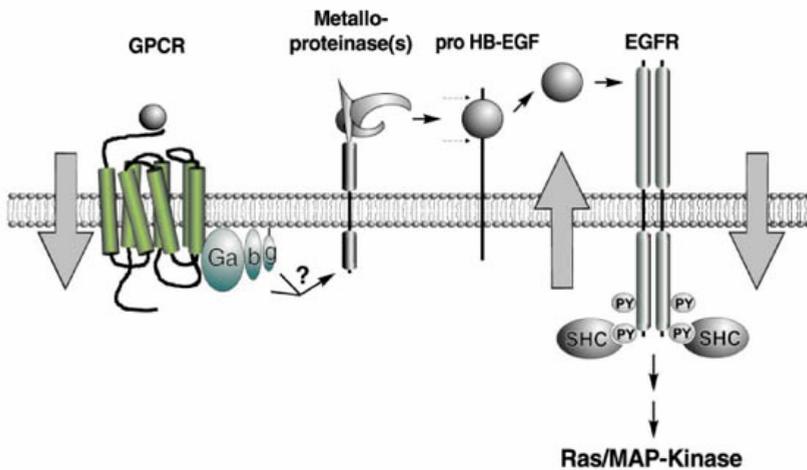


Figura 8. Vías de transactivación del receptor de EGF a través de GPCR. Agonistas del GPCR activan el receptor mediante señalización intracelular que llega a activar a la metaloproteasa que es la responsable del *shedding* de los ligandos del EGFR (modificado de Fischer *et al.*, 2003).

Las señales intracelulares producidas por la transactivación del EGFR son indistinguibles de aquellas producidas por la unión directa del ligando al receptor (Daub *et al.*, 1997). Hasta 1999, no se identificó que el mecanismo de transactivación de EGFR requiera el *shedding*

dependiente de metaloproteasa de proHB-EGF, un ligando de dicho receptor (Prenzel *et al.*, 1999). La identidad de la metaloproteasa implicada en el *shedding* de este ligando de EGFR, así como el mecanismo de activación después de la estimulación de GPCR, están aún por determinar. Aunque algunos trabajos han descrito que TACE no está implicada o al menos no es la única metaloproteasa que media la transactivación del EGFR (Yan *et al.*, 2002), otros apuntan a TACE como metaloproteasa principal en este proceso (Gschwind *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2004). Además y debido a que muchos trabajos muestran que TACE es la metaloproteasa responsable del *shedding* de los ligandos del EGFR en una variedad de líneas celulares, el papel de TACE en la transactivación del EGFR gana relevancia y es una hipótesis favorecida por varios autores (Peschon *et al.*, 1998; Merlos-Suarez *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004).

VÍAS DE TRANSACTIVACIÓN DEL EGFR ALTERNATIVAS

Se han descrito vías adicionales de transactivación del EGFR. El estrés osmótico y oxidativo activan TACE e inducen el *shedding* de proHB-EGF provocando la activación del EGFR (Fischer *et al.*, 2004). Generalmente, TACE aparece implicada en los procesos de proteólisis estimulados por estrés (Zhang *et al.*, 2001) pero el mecanismo por el que actúa es desconocido todavía. La estimulación de ciertas células con TNF- α induce la replicación de genes que, a su vez, causa la liberación de TGF- α que activa el EGFR, así como otras múltiples cascadas de señalización intracelulares que requieren la replicación de determinados genes (Argast *et al.*, 2004). Aunque la metaloproteasa implicada en estos procesos no ha sido todavía caracterizada, por los motivos ya expuestos, TACE es una candidata obvia.

CONCLUSIÓN

Desde su identificación, TACE se ha sometido a estudios intensos. Como resultado, se han desarrollado considerables avances en la determinación de su degradoma y ha quedado claro que la actividad esta metaloproteasa de la familia ADAM es esencial para el *shedding* de una gran variedad de proteínas de transmembrana. No obstante, otros aspectos importantes de la biología de TACE permanecen aún sin caracterizar. Particularmente, no se conoce cómo TACE selecciona a sus sustratos y a qué nivel se regula su actividad. La caracterización de los

ratones deficientes en la actividad de TACE muestran un papel clave de la metaloproteasa en el desarrollo así como en el *shedding* de una gran variedad de proteínas de transmembrana de función y estructura diferente. Diversas evidencias indican la participación de TACE en la progresión de determinadas enfermedades. La elucidación de los mecanismos que controlan la expresión y actividad de TACE resta pendiente y es de crítica importancia para el control de estas situaciones patológicas.

Objetivos

OBJETIVOS

Nuestro interés al iniciar este trabajo se centró en analizar algunos aspectos de la regulación del shedding de proteínas de la superficie celular mediante el estudio de la regulación de TACE, una metaloproteasa implicada en este proceso. Los objetivos fueron los siguientes:

- 1.- Caracterizar el defecto de una línea celular mutante aislada originalmente por su deficiencia en el *shedding* del factor de crecimiento de transmembrana proTGF- α .
- 2.- Estudiar posibles mecanismos de regulación de TACE y cómo estos afectan al *shedding* de ectodominios.
- 3.- Caracterizar el mecanismo que controla el tráfico intracelular de TACE, paso esencial para que la metaloproteasa se procese y, por tanto, se active.
- 4.- Analizar la regulación del procesamiento de TACE *in vivo* y cuáles son los posibles factores implicados.

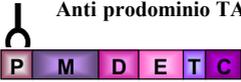
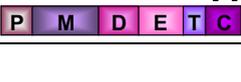
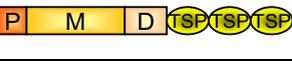
Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

ANTICUERPOS

En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos utilizados en este trabajo y algunas de sus características:

Nombre	Tipo	Epítipo	Origen
<p>Anti prodominio TACE</p> 	Policlonal	Aminoácidos 18-214 de TACE humana	Dr. Carl Blobel. Caracterizado en (Schlondorff <i>et al.</i> , 2000)
<p>Anti-metaloproteasa TACE</p> 	Policlonal	Aminoácidos 215-651 de TACE humana.	Dr. Carl Blobel. Caracterizado en (Schlondorff <i>et al.</i> , 2000)
<p>Anti-citosólico TACE</p> 	Policlonal	Aminoácidos 695-824 de TACE humana.	Dr. Carl Blobel. Caracterizado en (Lum <i>et al.</i> , 1999).
Anti-Actina	Monoclonal	No especificado. Reconoce las isoformas α -, β -, y γ de Actina.	Oncogene Research Products
<p>Anti-citosólico ADAM10</p> 	Policlonal	Aminoácidos 733-749 de ADAM 10 de ratón.	Dr. Paul Saftig
<p>Anti-citosólico ADAM9</p> 	Policlonal	Aminoácidos 741-849 de ADAM 9 de ratón.	Dr. Carl Blobel
<p>Anti-ADAMTS-1</p> 	Policlonal	Proteína completa ADAMTS-1 humana.	Dr. J.C. Rodríguez-Manzanque. Caracterizado en (Vazquez <i>et al.</i> , 1999)
<p>Anti-MT1-MMP</p> 	Monoclonal	Aminoácidos 122-316 de MT1-MMP humana	Dra. Alicia Arroyo. Caracterizado en (Galvez <i>et al.</i> , 2001).

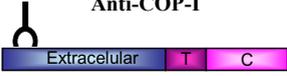
Nombre	Tipo	Epítotope	Origen
Anti-Furina 	Policlonal	Aminoácidos 741-797 de Furina bovina.	Dr. Wolfgang Garten. Caracterizado en en (Teuchert <i>et al.</i> , 1999).
Anti-KDEL	Monoclonal	KDEL	Stressgen
Anti-COP-I 	Policlonal	Aminoácidos 1-19 de la subunidad α de COP-I humana.	Affinity Bioreagents, Inc
Anti-Flag	Monoclonal	DYKDDDDK	Sigma
Anti-HA	Monoclonal	RYDVPDYASL	Babco, Richmon, California
Anti-myc (9E10)	Monoclonal	AYILSVQAEEL QKLISEEDLL	Hibridoma
Anti-α-1-Antitripsina 	Policlonal	α -1-Antitripsina humana	Sigma
GFP	Monoclonal	GFP	Roche
Anti-ratón IgG conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP)	Secundario	IgG de ratón	Sigma
Anti-conejo IgG conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP)	Secundario	IgG de conejo	Sigma
Alexa Fluor 568 anti-ratón	Secundario	IgG de ratón	Molecular Proves
Alexa Fluor 568 anti-conejo	Secundario	IgG de conejo	Molecular Proves
Alexa Fluor 488 anti-ratón	Secundario	IgG de ratón	Molecular Proves
Alexa Fluor 488 anti-conejo	Secundario	IgG de conejo	Molecular Proves
Anti-ratón conjugado a FITC	Secundario	IgG de ratón	BD Biosciences.

Tabla 4: Descripción de los anticuerpos utilizados y epítotope que reconocen. P: prodominio, **M:** dominio metaloproteasa, **D:** dominio desintegrina, **E:** dominio EGF-like, **T:** dominio transmembrana, **C:** dominio citosólico, **TSP:** dominio tromboespondina, **Cat:** dominio catalítico.

REACTIVOS

- **Concavalina A sefarosa (ConA)**: Compuesto que une moléculas que contienen α -D-manosa o α -D-glucosa. ConA está inmovilizada a un polímero de sefarosa que facilita su purificación. Es de Amersham Pharmacia Biotech.
- **Proteína A**: La proteína A se une a la región F_c de las inmunoglobulinas a través de interacciones con la cadena pesada. Está inmovilizada a un polímero de sefarosa. Es de Amersham Biosciences
- **Proteína G**: La proteína G se une a la región F_c de las inmunoglobulinas igual que la proteína A aunque tiene especificidades distintas dependiendo del origen de la IgG. Está inmovilizada a un polímero de sefarosa. Es de Pharmacia Biotech.
- **GM 130**: Proteína que interacciona a través de su dominio amino-terminal con las membranas del complejo de Golgi, reconociendo la región *cis* de este complejo. Es de BD Biosciences.
- **Biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin)**: Reconoce los grupos amino de las proteínas. Se utiliza para marcar proteínas de la superficie celular. Es de Pierce
- **Neutravidina inmovilizada**: La neutravidina es un derivado de la avidina que se une a la biotina. La neutravidina está conjugada a un polímero de agarosa para facilitar su purificación. Es de Pierce.
- **Estreptavidina conjugada a peroxidasa**: La estreptavidina, de igual forma que la neutravidina, reconoce y se une a la biotina. Es de Pierce
- **Endoglicosidasa H (EndoH)**: Enzima aislada de una cepa de *E.coli* recombinante que lleva el gen de *Streptomyces plicatus* en un plásmido. Su actividad consiste en hidrolizar N-glicanos de tipo manosa de glicoproteínas. Es un producto de Roche.
- **N-glicosidasa F (N-Glic-F)**: Enzima recombinante que elimina residuos asparragina unidos a N-glicanos. Esta enzima elimina completamente los azúcares de las glicoproteínas. Es de Roche.
- **Glutation sefarosa**: Designado para purificar proteínas asociadas a GST (Glutation S-transferasa). Está unido a un polímero para facilitar su purificación. Es un producto de Pharmacia Biotech.
- **Aprotinina**: Inhibidor de proteasas de tipo serina, su unión es reversible. Es de Sigma.

- **1,10-Fenantrolina:** Es un inhibidor de metaloproteasas. Es de Sigma.
- **PMSF:** Inhibidor irreversible de proteasas tipo serina. El PMSF (Fenil Sulfonil Fluoruro) provoca sulfonilación de los residuos serina activos. Es de Calbiochem.
- **DTT (Ditiotreitol):** Agente reductor que protege los grupos SH libres y reduce los puentes disulfuro. Es de Roche.
- **APS:** Persulfato de amonio. Catalizador de los geles de acrilamida. Es de Sigma
- **TEMED:** N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina. Compuesto utilizado para catalizar la formación de radicales libres del persulfato de amonio. Los radicales libres provocan que la acrilamida y bisacrilamida polimerice para formar una matriz de gel que sirva de criba para las macromoléculas. Es de Sigma.
- **Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1):** Polímero utilizado en electroforesis para generar un tamaño de poro dependiendo de la cantidad utilizada. Es de Boehringer mannheim.
- **Rojo Ponceau S:** Colorante de unión reversible que tiñe proteínas después de una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Es de MERCK.
- **Brilliant Blue R:** Azul brillante para hacer Comassie. Colorante que tiñe proteínas en un gel de SDS-poliacrilamida. Es de Sigma
- **Translabel:** Reactivo de marcaje metabólico derivado de hidrolizado de *E. coli* que contiene un 70% de L-metionina [³⁵S] y un 30% de L-cisteína [³⁵S]. Es de Biolink, 2000.

LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 5, así como el tipo celular y la especie a la que corresponden:

Nombre	Tipo celular	Origen	Especie
MDAMB 231	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
MDAMB 361	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
MDAMB 435S	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
MDAMB 453	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
MDAMB 468	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
MCF7	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
SKBR3	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
T47D	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
BT474	Epitelial. Glándula mamaria	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
NCIH292	Epitelial. Pulmón	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
NIH3T3	Fibroblastos de embriones	Dr. F. López-Casillas	<i>Mus musculus</i> (Ratón)
MDCK	Epitelial. Riñón	ATCC	<i>Canis familiaris</i> (Perro)
COS-7	Fibroblastos. Riñón	ATCC	<i>Cercopithecus aethiops</i> (Mono africano verde)
CHO	Epiteliales. Ovario	ATCC	<i>Cricetulus griseus</i> (Hamster chino)
HELA	Epitelial. Cérvix	Dr. F. López-Casillas	<i>Homo sapiens</i> (humana)
CACO	Epitelial. Colon	Dr. Senén Vilaró	<i>Homo sapiens</i> (humana)
LOVO	Epitelial. Colon	ATCC	<i>Homo sapiens</i> (humana)
RPE40	Derivan de las CHO (ver Spence <i>et al.</i> , 1995)	Dr. Joseph F. Sucic	<i>Cricetulus griseus</i> (Hamster chino)
293T	Epitelial. Riñón de embrión	Dr. A Pandiella	<i>Homo sapiens</i> (humana)

Tabla 5: Líneas celulares utilizadas en este trabajo. En la tabla se describe el nombre, el tejido del que provienen y el tipo celular, así como su especie y su origen.

Además, para la realización de este trabajo hemos obtenido otras líneas celulares derivadas de transfecciones en estable con distintas construcciones de cADN. Las líneas se muestran en la Tabla 6 y los medios de cultivo para mantener todas las líneas en la Tabla 7.

Otras líneas celulares transfectadas en estable
CHOT: CHO con HA-proTGF- α resistentes a G418 descritas en (Arribas y Massague, 1995)
CHOT/PDX: CHO con la proteína α 1-Antitripsina portland (PDX). Resistente a G418 y a Higromicina B
MDAMB 435S/ARNi TACE: MDAMB 435S con el ARNi de TACE. Resistentes a Puromicina.
SKBR3/ARNi TACE: SKBR3 con el ARNi de TACE. Resistentes a Puromicina.
M2: CHOT deficientes en el <i>shedding</i> de proTGF- α descritas en (Arribas <i>et al.</i> , 1996; Arribas <i>et al.</i> , 1997)

Tabla 6: Otras líneas celulares utilizadas en este trabajo. Líneas celulares transfectadas en estable.

Líneas celulares	Medios de Cultivo
MDAMB 231, MDAMB 361, MDAMB 435S, MDAMB 453, MDAMB 468, MCF7, SKBR3, T47D	D-MEM/F-12 (1:1). No tiene L-glutamina. Se suplementa con L-glutamina 2mM + 10% de FBS
BT474	D-MEM/F-12 (1:1). No tiene L-glutamina. Se suplementa con L-glutamina 2mM, 10% + de FBS + insulina 0,01 μ g/ml.
NCIH292	RPMI 1640. No tiene L-Glutamina. Se suplementa con L-glutamina 2mM + 10% de FBS
NIH3T3, MDCK, COS-7, CHO, HELA, CACO, 293T	D-MEM. Tiene L-glutamina. Se suplementa con 10% FBS.
RPE40	D-MEM/F-12 (1:1). No tiene L-glutamina. Se suplementa con L-glutamina 2Mm + 10% de FBS + 100 μ M de aminoácidos no esenciales
LOVO	F-12 (Ham) con L-glutamina. Se suplementa con 10% FBS
CHOT, M2, CHO/PDX	DMEM. Se suplementa con 500 μ g/ml G418 + 10% FBS
MDAMB 435S/ARNi TACE	D-MEM/F-12 (1:1). Se suplementa con L-Glutamina 2mM + 10% FBS + 1 μ g/ml Puromicina
SKBR3/ARNi TACE	D-MEM/F-12 (1:1). Se suplementa con L-Glutamina 2mM + 10% FBS + 1 μ g/ml Puromicina

Tabla 7: Medios de cultivo. En esta tabla se describe el medio necesario para el mantenimiento de las líneas celulares así como los suplementos que requieren.

REACTIVOS DE CULTIVO CELULAR

- **Plasmocín:** Se utiliza para tratar el micoplasma. Contiene dos componentes bactericidas: uno actúa sobre la maquinaria de síntesis proteica y el otro sobre la replicación del ADN. Se utiliza para tratamiento 25 µg/ml y para mantenimiento 5 µg/ml. Es de In vivo Gen.
- **L-Glutamina:** Aminoácido que complementa medios de cultivo. Es de GIBCO BRL.
- **Insulina:** Se utiliza 0,01 µg/ml. Es de GIBCO BRL.
- **PBS:** Tampón fosfato salino (Phosphate buffer saline). No contiene ni calcio ni magnesio. Es de PAA LABORATORIES.
- **FBS:** Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum). Es de GIBCO BRL.
- **Tripsina:** Contiene EDTA. Es de GIBCO BRL.
- **Penicilina/Estreptomicina:** Antibiótico contra bacterias gram-negativas y gram-positivas. 1000 unidades/ml de penicilina y 1000 unidades/ml de estreptomicina. Es de GIBCO BRL.
- **Fungizona:** Antimicótico. Contiene anfotericina B. Es de GIBCO BRL.
- **Aminoácidos no esenciales:** Suplemento de aminoácidos para células en cultivo (sobre todo si son auxotróficas para algún aminoácido). Es de GIBCO BRL.
- **Dulbecco's Modified Eagle Medium:** Medio de cultivo DMEM que contiene L-Glutamina y 4,5mg/L de D-Glucosa. Es de PAA-LABORATORIES.
- **Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12(1:1):** Medio de cultivo sin L-glutamina. Es de GIBCO-BRL.
- **Dulbecco's Modified Eagle Medium (w/o cys, met):** Medio de cultivo que contiene 4,5 mg/L de D-Glucosa y no contiene L-glutamina, L-cisteína ni L-metionina. Es de GIBCO-BRL.
- **Geneticin (G418):** Antibiótico utilizado para seleccionar células que expresan el gen de resistencia a geneticina. Es de GIBCO BRL.
- **Puromicina:** Antibiótico que inhibe la síntesis proteica previniendo el crecimiento de bacterias, protozoos, algas y células de mamífero. Es de Sigma.
- **Higromicina B:** Antibiótico utilizado para seleccionar células que expresen el gen de resistencia a la higromicina. Es de GIBCO BRL.
- **FuGENE 6:** Compuesto avanzado no liposomal que transfecta un amplio rango de líneas celulares distintas con elevada eficiencia y mínima toxicidad. Es de Roche.

• **DEAE dextrano:** Compuesto cargado positivamente a pH fisiológico que se acompleja al ADN facilitando su adhesión a la membrana celular así como la entrada dentro de la célula. Es de Sigma.

VECTORES PLASMÍDICOS

Los vectores de expresión utilizados en este trabajo se muestran en las Tabla 8 y 9, reflejándose su origen y su resistencia. Esta tabla se divide en dos: vectores plasmídicos vacíos y vectores de expresión con distintas construcciones de cADN:

VECTORES DE EXPRESIÓN VACÍOS:

Nombre	Origen	Resistencia
pREP 4	Invitrogene	Higromicina
pcDNA NEO	Invitrogene	Neomicina
pLZR-IRES-GFP	Dr. Atanasio Pandiella	-
pNGVL-MLV-gag-pol	Dr. Atanasio Pandiella	-
pMD-G (VSV-G)	Dr. Atanasio Pandiella	-
pcDNA3.1z(+)	Invitrogene	Neomicina
pSUPER. retro	Dr. René Bernards	Puromicina
pGEX-4T-1	Amersham Biosciences	-

Tabla 8: Plásmidos vacíos que se expresan en células eucariotas y procariotas. Descripción de los plásmidos de expresión utilizados en este trabajo.

VECTORES DE EXPRESIÓN CON DISTINTOS cADN

Nombre	Esquema	Origen	Resistencia
pcDNA3.1z(+) TACE (ratón).		Immunex	Neomicina
pcDNA3.1 z(+) TACE (ratón) myc		Descrito en (Merlos-Suarez <i>et al.</i> , 1998)	Neomicina
pcDNA3.1z(+) myc TACE (ratón)		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) HA TACE (ratón)		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina

Nombre	Esquema	Origen	Resistencia
pcDNA3 MDC9 (ratón)		Dr. Carl Blobel	Neomicina
pcDNA3.1z(+) MDC9 (ratón) myc		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) MDC9 (ratón) ΔCT myc		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) (ratón) TACE(p+m)/MDC9 myc		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) myc TACE ΔCT (ratón)		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) myc TACE ΔCT/ΔTM (ratón)		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) myc TACE ΔCT/ΔTM/ΔEGF (ratón).		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) myc TACE (ratón) ΔCT/ΔTM/ΔDES/ΔEGF		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) myc TACE ΔMET (ratón).		Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) α1-AT Portland PDX (humano)		Dr. Gary Thomas	Neomicina
pSG5new Furina (bovina)		Dr. Gary Thomas	-
pcDNA3.1z(+) (ratón) Flag PC6B		Dr. Gary Thomas. Descrito en (Xiang <i>et al.</i> , 2000)	Neomicina
pcDNA3.1z(+) PC7 (humano) HA		Dr. Gary Thomas	Neomicina
pcDNA3.1z(+) PACE4 (humano) HA		Dr. Joseph Sucic.	Neomicina

Nombre	Esquema	Origen	Resistencia
pcDNA3.1z(+) ADAMTS-1 (humano)		Dr. JC Rodríguez-Manzaneque. Descrito en (Rodríguez-Manzaneque <i>et al.</i> , 2000)	Neomicina
pcDNA3.1z(+) TACE (ratón) + 3'UTR (I)	 Contiene la región 3' UTR (I) que va del nucleótido 2643 al 3759	Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) TACE (ratón) + 3'UTR (I+II) + 5'UTR	 Contiene la región 5' UTR que va del nucleótido 1 al 162 y la 3'UTR (I+II) que va del nucleótido 2643 al 4306.	Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) TACE (ratón) + 3'UTR + 5'UTR	 Contiene la región 5' UTR que va del nucleótido 1 al 162 y la 3'UTR que va del nucleótido 2643 al 4406.	Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pcDNA3.1z(+) TACE (ratón) + 5'UTR	 Contiene la región 5' UTR que va del nucleótido 1 al 162.	Técnicas de clonaje estándar	Neomicina
pSUPER.retro ARNi TACE humano (I)	Nucleótido 247 al 268 de TACE (humano)	Técnicas de clonaje estándar	Puromicina
pSUPER.retro ARNi TACE humano (II)	Nucleótido 118 al 139 de TACE (humano)	Técnicas de clonaje estándar	-
pSUPER.retro ARNi TACE humano (III)	Nucleótido 146 al 167 de TACE (humano)	Técnicas de clonaje estándar	-
pLZR-IRES-GFP Furina myc (Bovina)		Técnicas de clonaje estándar	-
pcDNA3.1 z (+) myc Notch		Dr. Raphael Kopan	-
pLZR-IRES-GFP TACE (humano)		Dr. Atanasio Pandiella	-
pGEX-4T-1 GST- TACE(CT)		Técnicas de clonaje estándar	-

Tabla 9: Plásmidos con distintos cADNs que se expresan en células eucariotas y procariotas. Descripción de los vectores de expresión utilizados en este trabajo y esquema de las proteínas que expresan.

MUESTRAS TUMORALES

Muestras de los tejidos de tumores de mama de distintos pacientes: Los tejidos de mama tumorales y sanos fueron generosamente cedidos por el Hospital Vall d'Hebrón siguiendo las pautas institucionales.

MÉTODOS

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (Método ULTRASPEC de Biotecx):

La obtención de ARN total a partir de líneas celulares se realiza empleando placas de 10 cm de diámetro y el Kit de *ULTRASPEC RNA isolation system* siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el ARN, se determina su concentración mediante absorción espectrofotométrica a 260nm así como la presencia de proteínas contaminantes estableciendo la relación A_{260nm}/A_{280nm} .

TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT):

A partir del ARN obtenido se sintetiza cADN mediante el proceso denominado Transcripción Reversa (RT, *Reverse Transcription*). Para ello se toma 1µg de ARN total en un volumen de 13µl, se añade 1µl de cebador oligo-dT 50 µM (Applied Biosystems) y se eliminan las estructuras secundarias del ARN incubando a 65°C durante 5 minutos. La muestra se pasa inmediatamente a hielo y se incuban otros 5 minutos. A continuación se añaden los siguientes reactivos: 2µl de 10x tampón de RT¹, 2µl de DTT 100mM, 1µl dNTPs 100mM (cada uno a una concentración de 25mM), 0,5µl de inhibidor de RNasa 20U/µl (Applied Biosystems) y 0,5µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/µl (Applied Biosystems). La reacción se incubó primero a 42°C durante 1 hora y a continuación a 70°C durante 15 minutos. La amplificación del cADN se realiza por PCR empleando el producto de la RT como molde.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación por PCR de cADN de interés se toman 3µl de la mezcla que proviene de una RT-PCR o de un vector de expresión y se le añaden 5µl de 10x tampón de PCR², 1,5µl de MgCl₂ 50mM, 1µl de dNTPs 100mM (cada uno a una concentración de 25mM), 50pmoles de cada cebador y 0,5µl de Taq Polimerasa 5U/µl (Ecogen), en un volumen final de 50µl.

En todos los casos el programa de amplificación consiste en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguida de una repetición de ciclos consistentes en un paso de

¹ **10x Tampón de RT:** Tris-HCl 500mM pH 8,3, KCl 500mM, MgCl₂ 30mM, DTT 50mM.

² **10x Tampón de PCR:** Tris-HCl 670mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 160mM, Tween-20 0,1%(v/v)

desnaturalización, un paso de hibridación de los cebadores con el molde y un paso de extensión de la cadena naciente. Una vez completado el número necesario de ciclos, se realiza una extensión final de 5 minutos a 72°C. Las condiciones de hibridación y de extensión, el número de ciclos y la secuencia de los cebadores utilizados se especifican en la Tabla 10.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Hibridación	Extensión	Ciclos
MDC9 myc	F: CACATGTCAGATGGCAG R: CACGGCTCCAGCGCGGCCGCTCATAGGTCTTCTTC TGATATCAGTTTTTGGGTGAGGGAGCTATATAAAG	38°C 1 min	72°C 30 seg	35
MDC9 Δ CT myc	F: GGTGACAGATTGGC R: CACGGCTCCAGCGCGGCCGCTCATAGGTCTTCTTC TGATATCAGTTTTTGTTCGGATCCTTCATCTCTCTT GATAAAGAG	50°C 30 seg	72°C 1 min	40
TACE(p+m)/ MDC9 myc	F: CACATGTCAGATGGCAG R: CACGGCTCCAGCGCGGCCGCTCATAGGTCTTCTTC TGATATCAGTTTTTGGGTGAGGGAGCTATATAAAG	38°C 1 min	72°C 30 seg	35
mycTACE Δ CT	F: GAGCGATTTTTGGGAT R: GCGCCCTCTAGATTACAGTTTCTTATCCACACAGTG	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
mycTACE Δ CT/ Δ TM	F: GGTCTGACTAGTACAAAAATTAT R: GGCTAGATTAGTTGTCTGCCAAAACTTCCC	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
mycTACE Δ CT/ Δ TM/ Δ EGF	F: GAGGACCAAGGAGGAAAG R: GGGCTAGATTAAGAAAGTTCCTGCAGCACAC	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
mycTACE Δ CT/ Δ TM/ Δ EGF/ Δ DES	F: AACCCAACTGTGAAG R: GGGCTAGATTAGCCACACACCTTGTGCT	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
3'UTR (I)	F: AGCTGCCGGGCATGCGCGGCCGCTGGGGAACCTTG GCCTG R: CACGCGCTCTAGATCAGGCTAATGGCATTATTTC	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
3'UTR (II)	F: GAAGAGGGGGTGGGAGTG R: TTGGTAGCCACAAACATTC	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
3'UTR completo	F: AGCTGCCGGGCATGCGCGGCCGCTGGGGAACCTTG GCCTG R: CACGCGCTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTGGTAGC CACAAACATTC	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
5'UTR	F: GTAGCTAGGGTACCGCCGCTGCACTTTCGGG R: CCTTATGGAGTGCTGC	50°C 1 min	72°C 30 seg	40
GST- TACE(CT)	F: GGGTGTGGAATTCACCACCACCACCACGAT AAGAAAGTGGACAAGCAGTAA R: CCCCGGACTCGAGCTCTTGTGCTCGACTCG	45°C 1 min	72°C 30 seg	35

Tabla 10: Cebadores utilizados. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación para cada construcción que se ha realizado por PCR.

Una vez terminada la amplificación, se toma una alícuota de la reacción y se le añade tampón de carga para ácidos nucleicos³. Esta muestra se carga en geles de agarosa de una

³ **5x Tampón de carga para ácidos nucleicos:** Azul de bromofenol 0.25% (p/v), azul de xileno 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)

concentración del 1% (p/v). La electroforésis se lleva a cabo en tampón TAE⁴ que contiene 0,2 µg/ml del agente intercalante fluorescente bromuro de etidio.

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN.

Los vectores de expresión utilizados en este trabajo se han realizado utilizando 3 técnicas distintas:

1.- Clonaje unidireccional a partir de productos de PCR: Los productos de PCR obtenidos contienen los sitios para distintas endonucleasas de restricción que servirán para clonarlos en el vector digerido con las mismas endonucleasas. Las digestiones de los productos de PCR y del vector se llevan a cabo durante 1 hora a 37°C, con BSA 10X y el tampón adecuado para la actividad de las enzimas de restricción. Una vez comprobada la digestión, el inserto y vector se purifican con el kit comercial *QIAquick gel extraction* de Quiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Este es el caso de las siguientes construcciones:

MDC9 myc



MDC9 ΔCT myc



TACE (p+m)/MDC9 myc



myc TACE ΔCT



myc TACE ΔCT/ΔTM



myc TACE ΔCT/ΔTM/ΔDES



myc TACE ΔCT/ΔTM/ΔDES/ΔEGF



myc TACE 3'UTR (I)



HA TACE 5'UTR + 3'UTR (I+II)



HA TACE 5'UTR + 3'UTR Completo



⁴ TAE: Tris base 89mM, ácido acético 89mM, EDTA 2mM, pH 8,3

HA TACE 5'UTR



GST-TACE (CT)



2.- Clonaje de insertos que no proceden de PCR: En algunas ocasiones, el inserto que se utiliza son los propios cebadores anillados que se introducen en la construcción en forma de “cassette”. Para ello los cebadores se anillan calentándose durante 5 minutos a 98°C y dejándose enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente se fosforilan con polinucleótido Kinasa (Roche) durante 30 minutos a 37°C.

El vector apropiado para estas construcciones se digiere con las endonucleasas de restricción adecuadas y se trata con fosfatasa alcalina (Roche) para defosforilar sus extremos durante 1 hora a 37°C. La fosfatasa alcalina se inhibe 10 minutos a 75°C. El vector preparado se purifica con el kit comercial *QIAquick gel extraction* de Quiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados para este tipo de construcciones se describen en la Tabla 11:

Epítoto HA
CGA TAT GAC GTA CCA GAC TAC GCT AGC CTA CGT AGG CTA GCG TAG TCT GGT ACG TCA TAT
Epítoto Myc
CGA GAA CAA AAA CTG ATA TCA GAA GAA GAC CTA CGT AGG TCT TCT TCT GAT ATC AGT TTT TGT TCT
ARNi TACE (I)
GAT CCC CCT GAC ATC AAG TAC TGA ACG TTT CAA GAG AAC GTT CAG TAC TTG ATG TCA GTT TTT GGA AA AGC TTT TCC AAA AAC TGA CAT CAA GTA CTG AAC GTT CTC TTG AAA CGT TCA GTA CTT GAT GTC AGG GG
ARNi TACE (II)
GAT CCC CTC AGA CTA CGA TAT TCT CTC TTT CAA GAG AAG AGA GAA TAT CGT AGT CTG ATT TTT GGA AA AGC TTT TCC AAA AAT CAG ACT ACG ATA TTC TCT CTT CTC TTG AAA GAG AGA ATA TCG TAG TCT GAG GG
ARNi TACE (II)
GAT CCC CTA TCC AGC AGC ATT CGG TAA GTT CAA GAG ACT TAC CGA ATG CTG CTG GAT ATT TTT GGA AA AGC TTT TCC AAA AAT ATC CAG CAG CAT TCG GTA AGT CTC TTG AAC TTA CCG AAT GCT GCT GGA TAG GG

Tabla 11: Cebadores utilizados para generar construcciones sin hacer PCR. Todos los cebadores están orientados 5'-3'.

Este es el caso de las siguientes construcciones:

myc TACE



HA TACE



TACE ARNi (I)

TACE ARNi (II)

TACE ARNi (III)

3.- Construcción de vectores a partir de otros ya existentes: En algunas ocasiones se puede generar una nueva construcción a partir de una ya existente y sin necesidad de ningún inserto. Para ello se digiere el vector con las enzimas de restricción necesarias para cortar la región del vector que queremos eliminar. Una vez el vector está digerido se trata con la polimerasa Klenow 2U/μl (Roche) durante 30 minutos a 37°C, con el objetivo de completar los extremos que han quedado cohesivos después de la digestión. Una vez los extremos están completos el vector se purifica con el kit comercial *QIAquick gel extraction* de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Este es el caso de la construcción de *myc TACE* que carece del dominio metaloproteasa (Ile 852 a Leu-1258):

myc TACE ΔMET



LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

Una vez se purifica el vector y el inserto, se someten a una reacción de ligación en una proporción 1:3 de vector respecto a inserto, empleando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche). La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 16-18 horas. Como control de autoligación del vector se realiza una reacción paralela en la que el inserto se omite. El resultado de la ligación se transforma en bacterias competentes de la cepa DH5-α de *E.coli* (Hanahan, 1983) en medio SOC⁵, siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell, 2001.

⁵ **Medio SOC:** 500 ml de medio SOB + 4,5 ml Glucosa 40% (Merck). Medio SOB: Para 500ml de medio: 450 ml de H₂O estéril + 10g de Triptona (Pronadisa) + 2,5g de Extracto de levadura (Sigma) + 1,25ml KCl (1M) (Merck) + 5ml MgCl₂ (1M) (Merck) + MgSO₄ (1M) (Merck)+ 1ml NaCl (5M) (Sigma)

Una vez las bacterias se han transformado, se siembran en medio LB⁶ sólido (con 15g/l de agar bacteriológico, Difco) con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma) durante 16-18 horas. Posteriormente, se inoculan varias colonias obtenidas a partir de la transformación en 5ml de medio TB⁷ con 100 µg/ml ampicilina durante 16-18h a 37°C para poder aislar el ADN plasmídico que han incorporado estas bacterias.

AISLAMIENTO DEL ADN PLASMÍDICO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

El ADN plasmídico se extrae utilizando el Kit de Quiagen de minipreparaciones o maxipreparaciones de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras obtener los plásmidos, se comprueba la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos de interés se secuencian con los cebadores adecuados para examinar la región clonada, utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 310, (Applied Biosystems).

TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES.

Las construcciones mencionadas anteriormente se utilizaron para transfectar distintas líneas celulares. Las transfecciones que realizamos fueron transitorias y estables utilizando distintos métodos.

TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

ELECTROPORACIÓN: Las células crecen en placas de 10 cm hasta llegar a la confluencia. Posteriormente se lavan 2 veces con PBS, se tripsinizan con 1ml de Tripsina, se recuperan y se centrifugan durante 5 minutos a 1000 rpm.

Las células se resuspenden en 200 µl de medio sin FBS y se depositan en una cubeta para electroporar (Bio-Rad), la cual contiene, 5 µg del ADN de interés y 5 µl de NaCl 1,5M. Las condiciones de electroporación son 200V y 960 µF. Una vez las células se han electroporado, se siembran en placas de 10 cm con el medio de cultivo adecuado para las células suplementado con 20% de FBS y Penicilina/Estreptomina. Se incuban a 37°C y con un

⁶ **Medio LB:** Para 1 litro de medio: 10 g de Tristona (Pronadisa) + 5g de extracto de levadura (Sigma) + 10g NaCl (Sigma).

⁷ **Medio TB (Terrific Broth):** Para 1 litro de medio: 900ml de H₂O estéril + 12g de Triptona (Pronadisa) + 24g de Extracto de levadura (Sigma)+ 4ml de glicerol (Sigma).

atmósfera del 5% de CO₂. A las 24h se sustituye el medio de las células por medio fresco y a las 48h se puede analizar la expresión del plásmido transfectado.

DEAE-DEXTRANO (Dietilaminoetil-dextrano): Las células se siembran el día anterior en placas de 10 cm con el objetivo de que presenten una confluencia del 50-60% en el momento de la transfección. Las células se lavan 2 veces con PBS y se les añade la solución de transfección. Esta solución consiste en 3,96 ml de medio de cultivo sin FBS con 40 µl de cloroquina (Sigma), 160 µl de DEAE-Dextrano (Sigma) y 8 µg del ADN de interés. Tras 2 horas de incubación se retira la solución de transfección y se añade 2ml de DMSO (Merck) al 10% en PBS durante 1,5 minutos. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron durante 48h con su medio de cultivo suplementado con 20% de FBS y Penicilina/Estreptomicina.

FUGENE 6: Las células se siembran el día anterior en placas de cultivo de 6 pocillos con el objetivo de que presenten una confluencia del 60-70% en el momento de la transfección. Las células se lavan 2 veces con PBS y se incuban durante 1 hora con medio fresco. Mientras se prepara la solución de transfección que consiste en una relación 1:2,5 (p/v), entre el ADN de interés y Fugene 6 (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La solución de transfección debe incubarse entre 15 y 45 minutos, para posteriormente añadirse a las células que se incuban durante 48h.

RETROVIRUS: Se necesitan dos líneas celulares, las células 293T que serán las encargadas de empaquetar y generar los virus y aquellas células que se quieran infectar con los virus producidos por las células 293T. El día 0, se siembran de $1,8 \cdot 10^6$ células 293T en placas de 6 cm. El día 1, se añade cloroquina a las células a una concentración de 25 µM, 5 minutos antes de la transfección. Se prepara la solución de transfección que contiene: 2, 5 µg de pMD-G (VSV), que es el plásmido que se encarga de sintetizar la cubierta del virus, 5 µg de pNGVL-MLV-gag-pol, que es el plásmido que se encarga de empaquetar el virus y 3 µg de pLZR-IRES-GFP con la construcción de interés que queramos infectar, 61 µl de CaCl₂ (2-2,5M) y H₂O destilada hasta 500 µl. Esto se mezcla bien y se añade 500 µl de 2*HBS⁸ rápidamente. Toda la solución de transfección se añade gota a gota sobre las células que se

⁸ 2xHBS: NaCl 274 mM, HEPES 50mM (Sigma), Na₂HPO₄ 1.5mM

incubadas durante 8 horas a 37°C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo se retira la solución de transfección y se añade medio fresco a las células. El día 2 (≈ 30 horas post-transfección), se sustituye el medio por el aquel en el que crezcan las células que serán infectadas, de las cuales se siembran 500.000 en placas de 6 cm. El día 3 (≈ 54 horas post-transfección), se recoge el sobrenadante de las células transfectadas (el cual contiene retrovirus que expresan la construcción de interés) y se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm. A este medio se le añade 6 µg/ml de polibreno (Sigma) que incrementa la eficiencia de la infección. Se sustituye el medio de las células que se quieren infectar por el medio que contiene retrovirus y se incuban durante 16-18 horas. El día 4 se sustituye el medio por medio fresco y el día 5 se analiza la expresión del DNA de interés.

TRANSFECCIONES ESTABLES

FOSFATO DE CALCIO: Las células se siembran el día anterior en placas de 10 cm con el objetivo de que estén a un 50-60% de confluencia en el momento de la transfección. Se prepara la solución de transfección con 8 µg del ADN de interés y 0,8 µg del ADN de resistencia (relación 10:1) y H₂O hasta llegar a 450 µl. A esto se le añade 50 µl de CaCl₂ 2,5M. Una vez bien mezclado se añade 500 µl de 2*HBS⁸. La solución de transfección se añade a las células que se incuban de 16-18 horas. Posteriormente, se retira el medio y se añade 5ml de Glicerol (Sigma) al 10% en PBS durante 1,5 minutos. Se elimina el glicerol y se hacen 3 lavados con PBS. Se añade medio fresco suplementado con 20% de FBS y se incuban las células durante 12 horas. Tras la incubación se añade el medio con la droga que eliminará todas aquellas células que no hayan incorporado el ADN de resistencia. Las células que sobrevivan serán clones que expresarán en estable el ADN de resistencia y por extensión el ADN de interés, que está 10 veces concentrado.

FUGENE 6: Se trata del mismo tipo de transfección que la transitoria, pero seleccionando aquellas células que son resistentes a la droga que añadimos al medio.

TRATAMIENTOS CELULARES.

MARCAJE CON BIOTINA

Para la biotinización de las proteínas de la superficie celular, las células se lavan 3 veces con PBS a 4°C y se incuban en el mismo tampón que contiene 1mg/ml de biotina durante 1 hora a 4°C. El exceso de la biotina se elimina lavando las células 3 veces con un tampón de TrisHCl 2,5 mM pH 7 en PBS a 4°C.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células crecen en cristales de 12 mm de diámetro y se fijan durante 30 minutos a 4°C con Paraformaldehído al 2%. Tras la fijación, las células se permeabilizan con Saponina al 0,1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente con Albúmina de Suero Bovina (BSA, Sigma) al 5% en PBS y durante 1 hora con 1% de BSA en PBS y la dilución del anticuerpo primario que corresponda. Después de esta incubación, se lavan las células con PBS y se incuban 10 minutos con BSA al 5% en PBS y durante 1 hora con 1% de BSA en PBS y la dilución del anticuerpo secundario fluorescente que corresponda. Tras estas incubaciones, las células se lavan con PBS, se montan en medio de montaje y se observan en un microscopio confocal Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik). En la Tabla 12 se especifican las diluciones de los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

Para teñir sólo las proteínas de la superficie celular, las células se incuban con el anticuerpo primario a 4°C antes de fijarlas y permeabilizarlas. Posteriormente, las células se fijan y se incuban con el anticuerpo secundario fluorescente que corresponda, a temperatura ambiente.

Nombre	Dilución
Anti-HA, Anti-myc	1/100
Anti-TACE	1/200
Anti-KDEL	1/50
Anti-GM130	1/20
Alexa Fluor 568 anti-ratón	
Alexa Fluor 568 anti-conejo	1/500
Alexa Fluor 488 anti-ratón	
Alexa Fluor 488 anti-conejo	

Tabla 12: Anticuerpos para inmunofluorescencia y su dilución

OBTENCIÓN DE LISADOS

Los lisados con los que trabajamos se obtienen a partir de muestras de tumores, de distintos tejidos y de células en cultivo. Para ello se necesita un tampón de lisis⁹ capaz de romper las células suplementado con inhibidores de proteasas¹⁰ para evitar la degradación de las proteínas de la muestra. Los lisados se centrifugan a 12.300-14000 rpm durante 15-20 minutos a 4°C y se valora la cantidad de proteína total con el Kit de valoración de proteínas (Bio-Rad), un ensayo colorimétrico para determinar la cantidad de proteína después de solubilización en detergente. Está basado en el método Lowry.

Una vez se han obtenido y valorado los lisados se pueden someter a distintos tratamientos:

Concavalina A (ConA): Los lisados se incuban con 25 µl de Con A (equilibrada al 30%, según las recomendaciones del fabricante) durante 1 hora a 4 °C. Con la incubación se pretende concentrar las glicoproteínas del lisado, luego se lavan 3 veces con el tampón de lisis y se resuspende en tampón de carga para proteínas¹¹.

Endoglicosidasa H (EndoH) y N-glicosidasa F: Los lisados previamente concentrados con ConA se hierven durante 2 minutos para separar las muestras de la ConA. Posteriormente, se incuban con el tampón de deglicosilación¹² y con o sin EndoH y N-glicosidasa F según corresponda de 12-16 horas a 37°C. Tras la incubación, se añade tampón de carga para proteínas¹¹.

ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE LAS MUESTRAS.

Los lisados previamente cuantificados y con el tampón de carga para proteínas se incuban a 100°C durante 5 minutos y las proteínas de los lisados se separan en función de su tamaño mediante electroforesis¹³ en geles de poliacrilamida utilizando el equipo Mini-*PROTEAN* (Bio-Rad). Se realizaron geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS, APS y TEMED (desnaturalizantes) según el método descrito Laemmli (Laemmli, 1970). A la vez que se

⁹ **Tampón de lisis:** 1% Nonidet NP-40 (Roche), 5mM EDTA, en PBS.

¹⁰ **Inhibidores de proteasas:** 1,10-fenantrolina 10mM, 20µM BB-94.

¹¹ **Tampón de carga para proteínas:** TrisHCl 40mM, glicerol al 6,25%, DTT 32mM (Gibco), SDS al 1,5%, azul bromofenol al 0,025% (Sigma), pH 6,8.

¹² **Tampón de deglicosilación:** Citrato de sodio 0,15 M, pH 5,5, 1mM de fenilmetilsulfonil fluorado (PMSF), 0,25% SDS (Tampón para la EndoH) o bien 20mM de fosfato de sodio, pH 8,3, 10mM de EDTA y 1% Nonidet NP-40 (Tampón para N-glicosidasa F).

¹³ **Tampón de electroforesis:** Tris 25mM, Glicina 190mM, SDS ,1% (p/v)

cargan las muestras en el gel también se cargan marcadores de peso molecular preteñidos y estándares de alto rango (Bio-Rad).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm (Bio-Rad) en tampón de transferencia¹⁴ a 100mA y 4°C de 3-10 horas.

INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).

Tras la transferencia, las membranas se tiñen con el colorante de unión reversible *Ponceau S*¹⁵ con el fin de comprobar la eficiencia de la transferencia y la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Las membranas se bloquean a temperatura ambiente de 1 hora a 16 horas en solución de bloqueo para Western blot¹⁶ e incubadas con el correspondiente anticuerpo primario durante 1 hora empleando la dilución indicada en la Tabla 13 en la misma solución de bloqueo. Tras 3 lavados de 10 minutos cada uno con la misma solución de bloqueo, las membranas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP).

Anticuerpos	Dilución
Anti-prodominio de TACE	1/2000
Anti-citosólico de TACE	1/5000
Anti-Actina	1/7000
Anti-citosólico de ADAM10	1/200
Anti-citosólico de ADAM9	1/1000
Anti-ADAMTS-1	1/2000
Anti-MT1-MMP	1/1000
Anti-Furina, Anti-GFP	1/2000
Anti-COP-I, Anti-Flag	1/1000
Anti-HA, Anti-myc	1/20
Anti- α -1-Antitripsina Portland	1/1000
Anti-RatónHRP/Anti-conejo HRP	1/2000
Anti-APP	1/2000

Tabla 13. Anticuerpos utilizados para Western-blot y su dilución

¹⁴ **Tampón de transferencia:** Tris 25mM, Glicina 190mM, metanol 20% (v/v).

¹⁵ **Ponceau S:** Ponceau S 0,5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).

¹⁶ **Solución de bloqueo para Western-blot:** Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 75mM, Tween-20 0,2% (v/v), 5% leche en polvo (p/v)

Las membranas son lavadas de nuevo 3 veces durante 10 minutos cada vez con la solución de bloqueo. Finalmente se añade el sustrato quimioluminiscente basado en luminol *Super signal West Dura* (Pierce) durante 4 minutos.

Las bandas correspondientes a las proteínas inmunoreactivas se detectan por su emisión de quimioluminiscencia utilizando el sistema de análisis de imágenes Image Gauge V4.0 (Fuji Film).

MARCAJE METABÓLICO E INMUNOPRECIPITACIÓN

Para analizar la biosíntesis de una proteína, se realizan experimentos de marcaje metabólico. Las células se lavan 2 veces con PBS y se incuban durante 40 minutos con medio sin metionina ni cisteína. Posteriormente, se marcan metabólicamente con 1mCi/ml de Translabel durante 1 hora en el mismo medio. Tras el marcaje, las células se incuban a diferentes tiempos con medio fresco que contiene todos los aminoácidos con el objetivo de perseguir la vida de la proteína desde que se sintetiza hasta que se degrada. Posteriormente, las células se lisan con el tampón de lisis⁹ y los lisados que se someten a inmunoprecipitación con el anticuerpo adecuado para la proteína que queremos estudiar. Los inmuno-complejos se recuperan con proteína A o proteína G (según convenga) y se lavan 3 veces con tampón de lavado¹⁷. Las muestras se hierven con tampón de carga para proteínas y se someten a una electroforesis en un gel SDS de poliacrilamida desnaturalizante. Una vez las muestras han corrido, el gel se trata 10 minutos con solución de desteñidora¹⁸ y 10 minutos con solución Amplificadora (Amersham Biosciences) que aumenta la eficiencia de detección de muestras marcadas con ³⁵S. El gel se seca en un seca-geles (Bio-Rad) y se expone en una película de rayos X (Fuji-Film), para posteriormente, ser cuantificado utilizando el programa MacBas-1800 (Fuji-Film).

OBTENCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

La cepa de E.coli BL21 se transforma con el vector de expresión en bacterias pGEX-4T-1 que contiene el promotor Taq inducible y expresa GST y pGEX-4T-1 con GST-TACE (CT) que contiene GST (Glutation-S-Transferasa) unida al dominio citosólico de TACE (Asp 695-Cys 827). Tras la transformación y el crecimiento de las bacterias en medio M9, el cultivo se

¹⁷ **Tampón de lavado:** 0,1% de Triron X-100 (Roche), 0,1% de SDS, en PBS

¹⁸ **Solución desteñidora:** 10% ácido acético, 30% de metanol en H₂O

induce con 0,1mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) que induce la expresión de GST y de GST-TACE (CT) durante 3 horas. Tras la inducción, las bacterias se recuperan por centrifugación (10 minutos a 9000 rpm a 4°C) y se lisan con tampón de lisis que contiene PBS e inhibidores de proteasas¹⁰ y sonicación durante 5 minutos. Los lisados se centrifugan a 13200 rpm durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se purifican con Glutation-sefarosa. Para cuantificar la cantidad de GST y GST-TACE (CT) purificadas, se cargan las muestras con tampón de carga para proteínas¹¹ en un gel de poliacrilamida y se someten a electroforesis. Posteriormente, se tiñe el gel con azul *Comassie* (*Comassie Brilliant* al 0,05% en metanol al 50% y ácido acético al 10%) durante 20 minutos. El gel se destiñe durante varios lavados de 10 minutos cada uno con solución desteñidora¹⁸. Posteriormente, el gel se seca y se cuantifica la cantidad de proteína recombinante purificada.

ENSAYO DE PRECIPITACIÓN (*PULL DOWN*)

Para realizar este ensayo de precipitación o *pull down*, utilizamos las células MDAMB 435S y SKBR3 que crecen en placas de 10 cm de diámetro. Las células se lavan 2 veces con PBS y se lisan con tampón de lisis⁹ e inhibidores¹⁰. Una vez se clarifican los lisados se incuban con 10 μ g de GST y GST-TACE (CT) inmovilizadas con glutation unidos a polímeros de sefarosa, desde 2 horas a 16 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras se lavan 3 veces con PBS y se cargan en un gel de poliacrilamida sometándose a electroforesis. Una vez la electroforesis ha finalizado, el gel se tiñe con plata siguiendo el protocolo de Amersham Biosciences adaptado a Espectrometría de Masas, para detectar las proteínas unidas a GST y GST-TACE (CT). Aquellas proteínas que se unen a GST-TACE (CT) y no a GST se seleccionan y se identifican como se describe en (Shevchenko *et al.*, 1996) en el servicio de proteómica del Hospital Vall d'Hebrón.

En otras condiciones, el gel no se tiñe con plata sino que se transfiere y se hace un ensayo de Western-blot con anticuerpos específicos contra proteínas que se hayan unido a GST y GST-TACE (CT).

Resultados

RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR MUTANTE DEFECTIVA EN EL SHEDDING DE proTGF- α .

DETECCIÓN DE TACE EN LA LÍNEA CELULAR M2

El *shedding* de dominios extracelulares modifica de manera considerable las propiedades de las células y afecta a una gran cantidad de moléculas de función y estructura diferente. Una de las proteínas de transmembrana que sufre *shedding* es proTGF- α . Con el objetivo de caracterizar los componentes de la maquinaria del *shedding*, se aisló una línea celular mutante (células M2) deficiente en el *shedding* de proTGF- α inducido por PMA (Arribas y Massague, 1995; Arribas *et al.*, 1996). Tras el aislamiento de las células M2, se identificó TACE como la proteasa responsable del *shedding* de proTGF- α (Buxbaum *et al.*, 1998).

Con la finalidad de caracterizar el componente afectado en la línea celular mutante M2, analizamos las formas de TACE en estas células mediante análisis por Western blot. Para ello utilizamos como herramienta dos anticuerpos policlonales, uno contra el dominio citosólico de TACE y otro contra su prodominio (Figura 9).

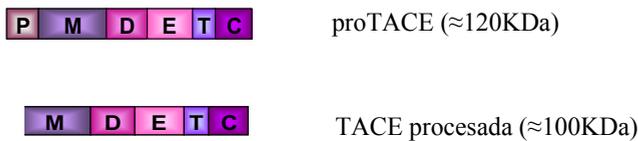
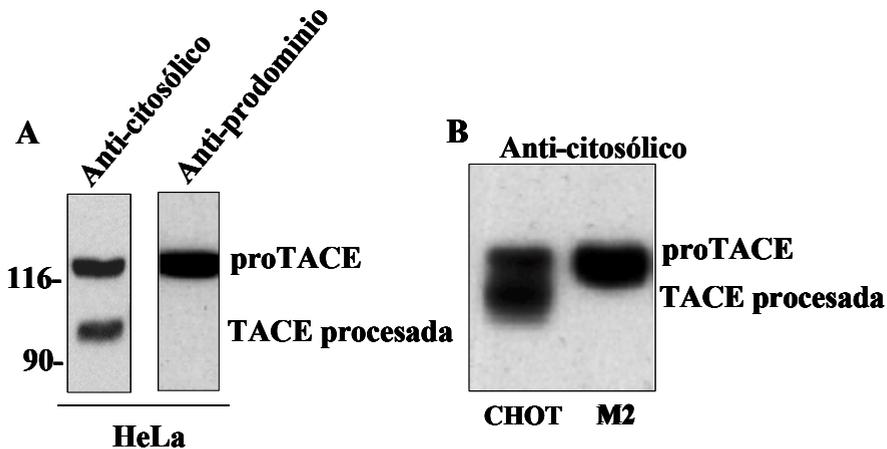


Figura 9. Esquema de las formas de TACE. La forma proTACE contiene el prodominio y es inactiva, la forma de TACE procesada, no tiene prodominio. El anticuerpo anti-prodominio sólo detecta la forma proTACE mientras que el anti-citosólico detecta las dos formas de TACE.

De acuerdo a resultados previos (Schlondorff *et al.*, 2000), el anticuerpo anti-dominio citosólico detecta las dos formas de TACE en células HeLa (la proforma inactiva y la forma procesada), mientras que el anticuerpo anti-prodominio sólo detecta la proforma de la proteasa (Figura 10A). En las células mutantes M2, la única forma que se detecta utilizando el anticuerpo anti-citosólico es proTACE (Figura 10B). Estos resultados indican que las células

mutantes tienen un defecto en el procesamiento de TACE, o bien que esta forma es rápida y específicamente degradada de tal manera que no se detecta en situación de equilibrio. Para distinguir entre estas dos posibilidades realizamos experimentos de marcaje metabólico y cazas a distintos tiempos. Como se observa en la Figura 10C, en las células M2 la forma proTACE tiene una vida media muy larga ($t_{1/2} \sim 20h$) comparada con la vida media de TACE en las células CHOT ($t_{1/2} < 12h$). En estas células, el predominio de proTACE es eliminado y a tiempos largos (12 horas o más) sólo se observa la forma procesada que nunca llega a observarse en las células M2. Curiosamente, a tiempos más largos (24h), la migración electroforética de la forma procesada de TACE en las células CHOT se enlentece (ver Figura 10C carriles 12h y 24h de las células CHOT). Esta diferencia podría explicar la migración en forma de varias bandas de la forma procesada de TACE en las células CHOT observada por Western blot (Figura 10B).

Estos resultados muestran que las células M2 tienen un defecto en el procesamiento de TACE que explica su defecto en el shedding de proTGF- α .



C

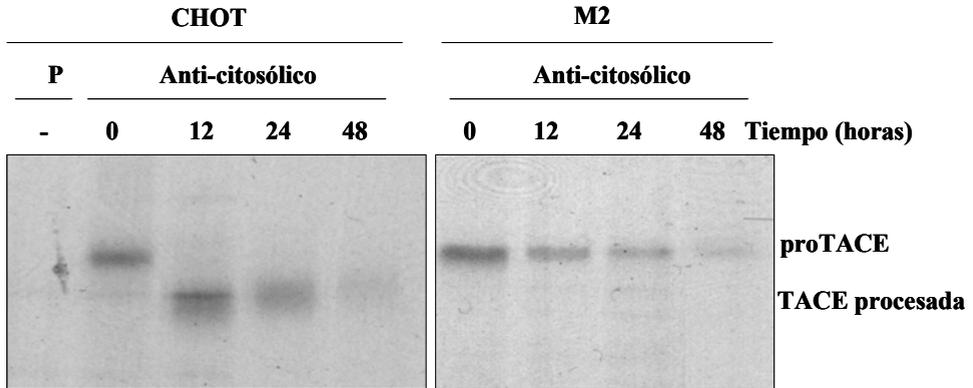


Figura 10. Biosíntesis y procesamiento de TACE en células CHOT y mutantes M2. A: glicoproteínas de células HeLa se analizaron por Western blot con los anticuerpos policlonales anti-citosólico y anti-prodominio como se indica. B: glicoproteínas de células CHOT y M2 se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal anti-dominio citosólico. C: Las células CHOT y M2 se marcaron durante 1 hora con [³⁵S] Translabel y se cazaron a diferentes tiempos como se indica. Una vez las células se marcan, se lisan y los lisados se inmunoprecipitaron con 2 µl del anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y con 2 µl de un suero pre-inmune para detectar las bandas inespecíficas, como control negativo (P).

PROCESAMIENTO DE TACE POR PROPROTEÍNAS CONVERTASAS

El prodominio de TACE está unido al dominio metaloproteasa mediante una secuencia consenso típica de corte por proproteínas convertasas (RVKR↓R). Ese tipo de secuencia rica en aminoácidos básicos es reconocida por proproteínas convertasas que actúan en la vía secretora (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997; Schlondorff *et al.*, 2000). Hasta la fecha se han identificado siete miembros de la familia de las convertasas en células de mamífero: Furina, PC1, PC2, PACE4, PC4, PC6 y PC7. Algunas proproteínas convertasas como la Furina se expresan en un amplio rango de tejidos y líneas celulares (Hatsuzawa *et al.*, 1990), otras, como PC1, PC2 (Seidah *et al.*, 1991) y PC4 (Seidah *et al.*, 1992), son específicas de tejido.

Las células LoVo son células derivadas de carcinoma de colon y se caracterizan por poseer mutaciones que inactivan la Furina (Takahashi *et al.*, 1995). Por este motivo, esta línea celular ha sido ampliamente utilizada para caracterizar si el procesamiento de una determinada

proteína requiere la actividad de esta convertasa. Con el objetivo de examinar si para el procesamiento de proTACE es necesaria la actividad de Furina, analizamos por Western blot las formas de TACE en las células LoVo y en las células CaCo que, aunque también derivan de carcinoma de colon, no tienen mutaciones en Furina. Como se observa en la Figura 11A, proTACE se procesa tanto en las células LoVo como en las CaCo. No obstante, el procesamiento de proTACE en las células LoVo es menor (comparar los primeros dos carriles de la izquierda de la Figura 11B). Esta ineficiencia en el procesamiento de proTACE sugiere que aunque la Furina probablemente participe en el procesamiento de la metaloproteasa, en su ausencia, otras convertasas pueden procesar proTACE, aunque menos eficientemente.

La migración electroforética de la proforma de TACE es claramente más lenta en las células LoVo comparadas con otras líneas celulares como por ejemplo las células HeLa, CHOT y CaCo (comparar las figuras 10A, 10B y 11A). Debido a que las proteínas se glicosilan diferencialmente según el tipo celular y la glicosilación altera el peso molecular, realizamos experimentos de de-glicosilación tratando los lisados celulares de células CaCo y LoVo con Endoglicosidasa H (EndoH) y N-glicosidasa F (N-glic.-F), (Figura 11B). El tratamiento de los lisados celulares de células LoVo y CaCo con N-glic.-F confirma que las diferencias de peso molecular de la proforma de TACE son debidas a una glicosilación diferencial ya que las diferencias desaparecen después del tratamiento (Figura 11B). El tratamiento con EndoH es una técnica comúnmente utilizada para examinar la localización subcelular de una proteína. La endoH hidroliza oligosacáridos de manosa que están presentes en proteínas ubicadas en el Retículo Endoplasmático y en el *cis*-Golgi (Kornfeld y Kornfeld, 1985). Por lo tanto, la sensibilidad de proteínas al tratamiento con EndoH muestra que estas proteínas residen en estos compartimentos tempranos de la vía secretora. Concretamente, la forma proTACE es sensible a este tratamiento (Schlondorff *et al.*, 2000). Como muestra la Figura 11B, la proforma de TACE, como se esperaba, es sensible al tratamiento con EndoH en las células CaCo indicando que esta forma se encuentra en compartimentos anteriores al *trans*-Golgi. En contraste, en las células LoVo, que carecen de Furina, se detecta una fracción de proTACE resistente a EndoH, indicando que pueden existir formas de proTACE en compartimentos posteriores al *cis*-Golgi. Estos resultados indican que tan pronto proTACE sale del RE es procesada en células que tienen Furina de manera rápida y eficaz, mientras que en células carentes de la convertasa el procesamiento de proTACE es menos eficiente y más lento. Algunas moléculas de proTACE escapan al procesamiento en estas células y son resistentes al

tratamiento con EndoH, sugiriendo que proTACE progresa a través de la vía secretora y procesándose sólo parcialmente por la ausencia de Furina.

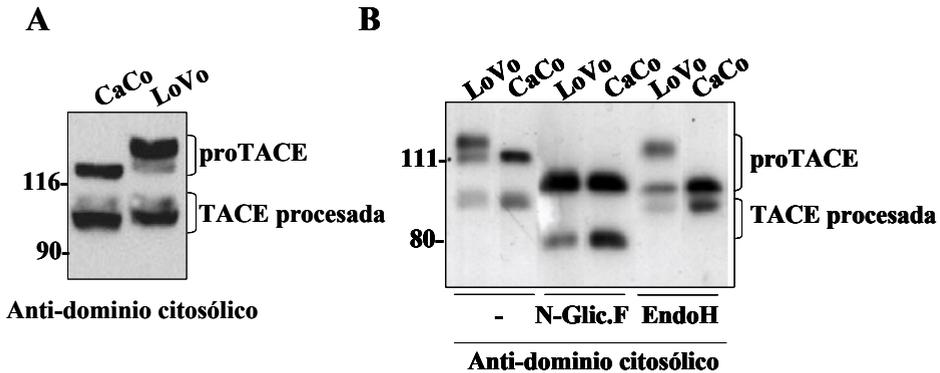


Figura 11. Formas de TACE en células LoVo y CaCo antes y después del tratamiento con EndoH y N-glicosidasa-F. A: glicoproteínas de células CaCo y LoVo se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal anti-dominio citosólico de TACE. B: glicoproteínas de células LoVo y CaCo se trataron con y sin EndoH y N-Glicosidasa-F como se indica y las muestras se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE.

Estos resultados indican que las diferencias en el peso molecular de las formas de TACE entre las células LoVo y CaCo se deben a diferencias en glicosilación y que el procesamiento de proTACE en células LoVo es poco eficiente.

Hemos observado que los niveles de la forma de TACE procesada son inferiores en las células LoVo comparados con los observados en otros tipos celulares. Con el objetivo de analizar si la ineficiencia en el procesamiento de proTACE es debida a la deficiencia en Furina de las células LoVo, analizamos el efecto de la expresión de Furina en estas células (Figura 12). Los resultados muestran que después de infectar las células LoVo con el retrovirus que expresa Furina, proTACE aumenta su procesamiento en aproximadamente un 30% comparándolo con el procesamiento de la metaloproteasa en células LoVo sin Furina.

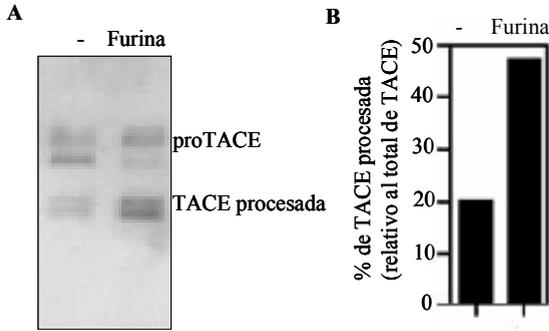


Figura 12. Procesamiento de TACE en células LoVo infectadas con Furina. A: Lisados de células LoVo infectadas con retrovirus que expresan Furina se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE. B: Cuantificación de los resultados mostrados en A.

De manera complementaria al uso de células deficientes en Furina, inhibidores específicos de convertasas, como por ejemplo el α_1 -PDX (variante del α_1 Antitrypsin Portland), un péptido que bloquea la actividad de Furina y PC6B (Jean *et al.*, 1998), ha sido también ampliamente utilizado para determinar si el procesamiento de proteínas requiere la actividad de convertasas (ver por ejemplo, Bergeron *et al.*, 2003). Para determinar el efecto de α_1 -PDX sobre el procesamiento de TACE, transfectamos las células CHOT con α_1 -PDX de manera estable. Después de esta transfección obtenemos distintos clones que expresan el inhibidor y examinamos el procesamiento de TACE en ellos (Figura 13).

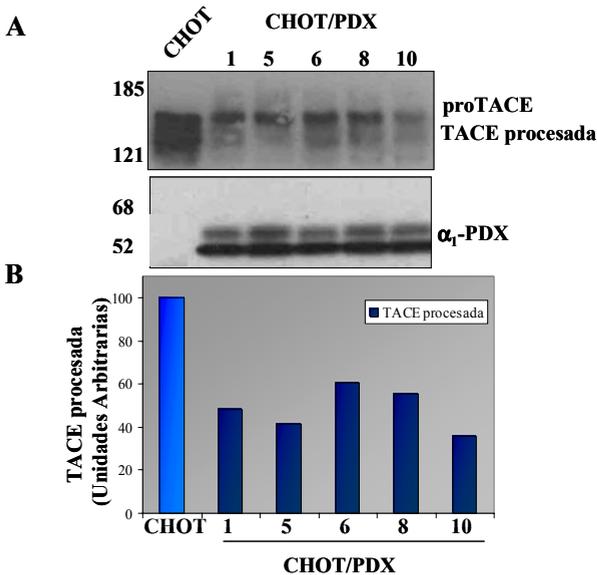


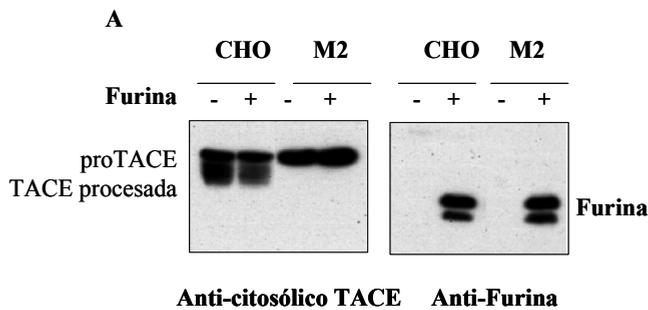
Figura 13. Expresión de α_1 -PDX en clones estables de CHOT y su efecto sobre el procesamiento de TACE. A: Lisados de células transfectadas en estable con el inhibidor de convertasas α_1 -PDX se analizaron por Western blot con un anticuerpo policlonal contra α_1 -PDX y con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE, como se indica. B: Cuantificación de los resultados mostrados en A.

El procesamiento de TACE disminuye sustancialmente en las células transfectadas en estable con el inhibidor α_1 -PDX comparadas con las células parentales. No obstante, el descenso en el procesamiento de TACE no es total lo que indica que TACE puede procesarse por otras convertasas alternativas a Furina o PC6B. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos con las células LoVo (comparar figuras 11 y 13).

Globalmente estos resultados muestran que la Furina participa en el procesamiento de proTACE. En ausencia de Furina otras convertasas pueden eliminar el prodominio de proTACE, aunque con menor eficiencia.

EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE PROPROTEÍNAS CONVERTASAS EN LAS CÉLULAS M2

Debido a que TACE se procesa por Furina y, alternativamente por otras convertasas, una o más de estas convertasas podrían estar alteradas en las células M2. Para investigar esta posibilidad analizamos si la sobre-expresión de diferentes convertasas (Furina, PC6B, PC7 y PACE4) aumenta el procesamiento de TACE en las células M2. Elegimos estas convertasas porque tienen un amplio rango de distribución tisular (Thomas, 2002), (Figura 14).



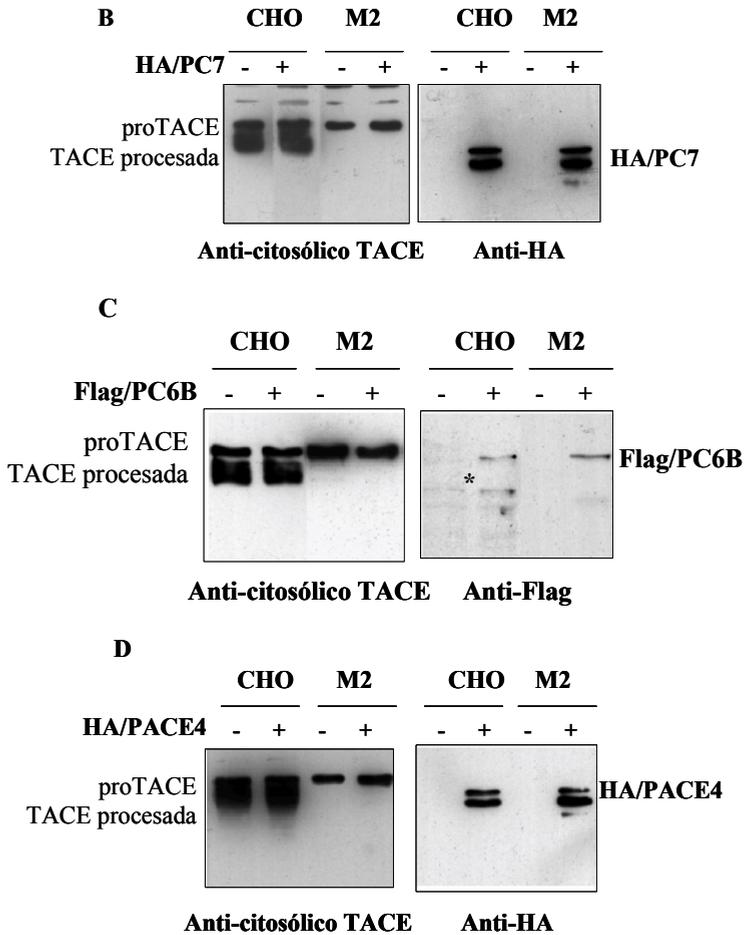


Figura 14. Transfección de proproteínas convertasas en células CHOT y M2.

A: Lisados de células M2 y CHOT transfectadas con Furina se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y el anticuerpo policlonal anti-Furina como se indica. B: lisados de células M2 y CHOT transfectadas con HA/PC7 se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y con el anticuerpo monoclonal anti-HA como se indica. C: Lisados de células M2 y CHOT transfectadas con Flag/PC6B se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y con el anticuerpo monoclonal anti-Flag como se indica. (*) Banda inespecífica observada en ciertas preparaciones. D: lisados de células M2 y CHOT transfectadas con HA/PACE4 se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y con el anticuerpo monoclonal anti-HA como se indica.

Como se observa en la Figura 14, el procesamiento de proTACE se mantiene invariable en las células CHOT y M2 aunque las células se transfecten con las distintas proproteínas convertasas Furina, PC7, PC6B y PACE4. Estos resultados muestran que en las células CHOT, la cantidad de convertasa expresada no es limitante: el porcentaje de TACE que se procesa no aumenta cuando se sobre-expresan las convertasas. En las células M2, la cantidad de TACE procesada es indetectable incluso cuando se sobre-expresan las convertasas indicando que un defecto en estas proteínas no es el responsable de la falta de procesamiento de TACE en esta línea celular. Para comprobar que la construcción de Furina sobre-expresada es activa, como control positivo analizamos el procesamiento de Notch, un sustrato de Furina descrito previamente (Logeat *et al.*, 1998) en células M2 y CHOT transfectadas con Furina. Como se observa en la Figura 15 y a diferencia de lo que sucede con proTACE, el procesamiento de Notch aumenta cuando se sobre-expresa Furina en células M2, confirmando que la construcción de Furina es activa.

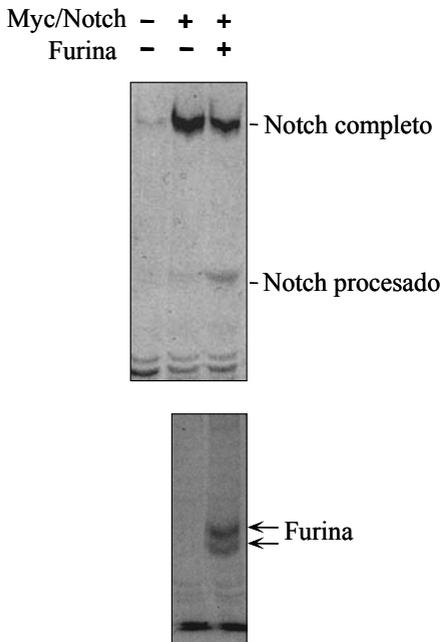
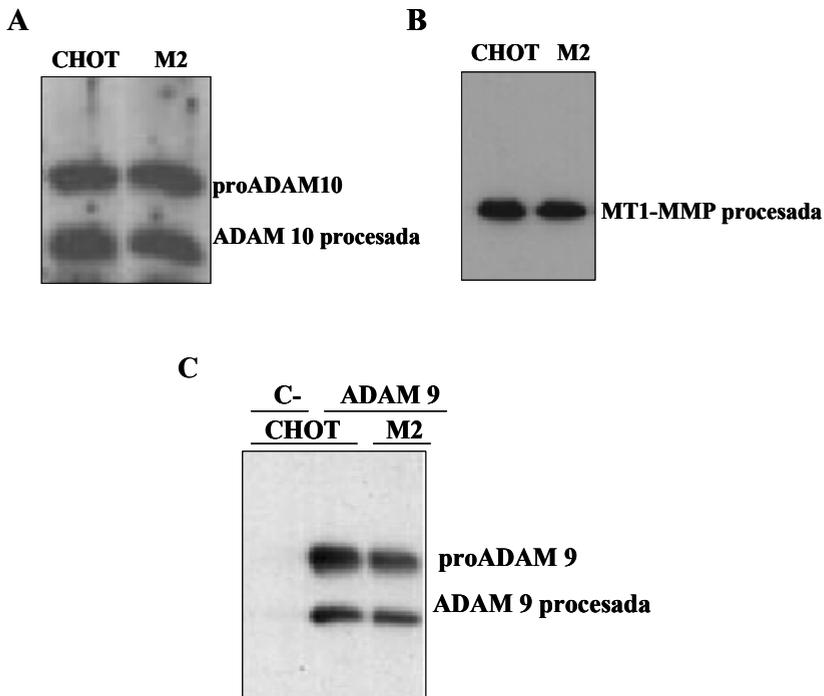


Figura 15. Procesamiento de Notch en células M2 que sobre-expresan Furina. Las células M2 se transfectaron con una construcción con Myc/Notch en presencia o en ausencia de Furina. Se marcaron metabólicamente con Translabel ^{35}S durante 1 hora y se cazaron durante 1 hora. Las células se lisaron y los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-myc o anti-Furina. Los inmunoprecipitados se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida.

Para complementar los resultados anteriores y con el objetivo de mostrar directamente si las proproteínas convertasas de las células M2 son activas, examinamos en estas células el procesamiento de distintos sustratos bien caracterizados de Furina y otras proproteínas convertasas como PC7 y PC6B (Kuno *et al.*, 1999; Roghani *et al.*, 1999; Yana y Weiss, 2000; Anders *et al.*, 2001; Lopez-Perez *et al.*, 2001; Longpre y Leduc, 2004). Concretamente elegimos una serie de metaloproteasas, algunas de ellas implicadas en el *shedding* de proteínas (Izumi *et al.*, 1998; Gutwein *et al.*, 2003). Utilizando anticuerpos específicos, identificamos por Western blot las formas endógenas de las metaloproteasas ADAM 10 y MT1-MMP en células CHOT. Sin embargo, para otras metaloproteasas como ADAM9, aunque su expresión es muy ubicua (Weskamp *et al.*, 1996) y ADAMTS-1, no podemos detectarlas en las células CHOT con los anticuerpos de que disponemos por lo que las transfectamos con el cADN correspondiente. Como se observa en la Figura 16, el procesamiento de todas estas proteasas es normal en las células M2 y es indistinguible del procesamiento observado en las células CHOT, mostrando que no existe un defecto en la actividad de Furina, PC7 o PC6B en las células M2.



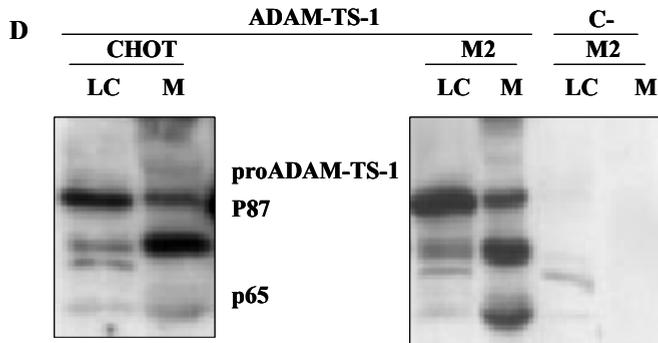


Figura 16. Procesamiento de ADAM 10, MT1-MMP, ADAM 9 y ADAMTS-1 en células M2. Lisados de células CHOT y M2 se analizaron por Western blot con A: un anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de ADAM 10 y B: un anticuerpo monoclonal contra MT1-MMP (ver materiales y métodos). Las células CHOT y M2 se transfectaron de manera transitoria con el cADN de ADAM 9 y ADAMTS-1 y tras 48h los lisados de estas células se analizaron por Western blot con C: un anticuerpo policlonal con ADAM 9 y D: un anticuerpo policlonal contra ADAMTS-1. C-: control negativo (células sin transfectar), LC: Lisado Celular, M: Medio.

Estos resultados muestran que ninguna de las proproteínas convertasas sobre-expresadas tiene un efecto sobre el procesamiento de TACE en las células M2 y que en estas células las convertasas son activas. En conjunto los datos indican que un defecto en la actividad de proproteínas convertasas no es la causa de que TACE no se procese en las células M2.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TACE EN LAS CÉLULAS M2

Puesto que las evidencias presentadas indican que TACE se procesa por proproteínas convertasas y que estas son activas en las células M2, parece lógico suponer que el defecto en estas líneas mutantes pueda afectar al acceso de TACE a dichas convertasas, que normalmente se encuentran en el *trans*-Golgi.

Con el objetivo de examinar si TACE progresa adecuadamente a través de la ruta secretora en las células M2 y alcanza el compartimento donde las convertasas actúan, analizamos la localización subcelular de TACE en estas células mutantes, comparándolas con las CHOT. Para ello realizamos ensayos de biotilización celular, donde se detectan las proteínas que están en la superficie celular. Los experimentos de biotilización de las células M2 y CHOT mostrados en las Figura 17 indican que, como era de esperar, únicamente la forma procesada

de TACE se detecta específicamente en la superficie celular en las células CHOT. En las células M2, no puede detectarse TACE en la superficie celular, lo que indica que la metaloproteasa no llega a la membrana plasmática (Figura 17A).

Con el propósito de seguir caracterizando la localización subcelular de TACE en las células M2, tratamos los lisados de estas células y de células CHOT con EndoH. Como se esperaba, en células CHOT la forma proTACE es sensible a este tratamiento. En las células M2 no se aprecia ninguna fracción de proTACE resistente a EndoH, indicando que esta forma reside íntegra en el RE y/o en el *cis*-Golgi (Figura 17B).

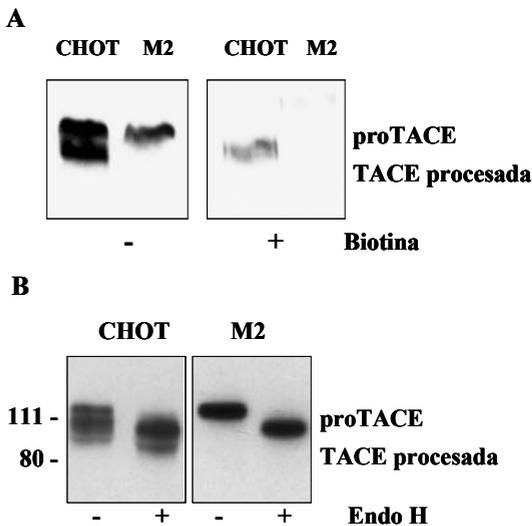


Figura 17. Tratamiento de las células mutantes M2 y CHOT con Endoglicosidasa H y Biotina. A: Las células M2 y CHOT se trataron con o sin biotina como se indica (1mg/ml) y se lisaron (ver materiales y métodos). Los lisados se concentraron con avidina (+ biotina) o con concavalina (- biotina) y se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE. B: Glicoproteínas de células CHOT y M2 se trataron sin y con EndoH (durante 16-18h) como se indica. Las muestras se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE.

Anteriormente hemos mostrado que el procesamiento de otras metaloproteasas es normal en las células mutantes. Con el propósito de examinar si la llegada a la superficie celular está afectada en estas células, analizamos el transporte de ADAM 10 y MT1-MMP en células CHOT y M2. Mediante ensayos de biotilización se observa que las formas procesadas de estas metaloproteasas se detectan específicamente en la superficie celular de las células M2, indicando que el defecto observado en estas células es específico de TACE (Figura 18A y B)

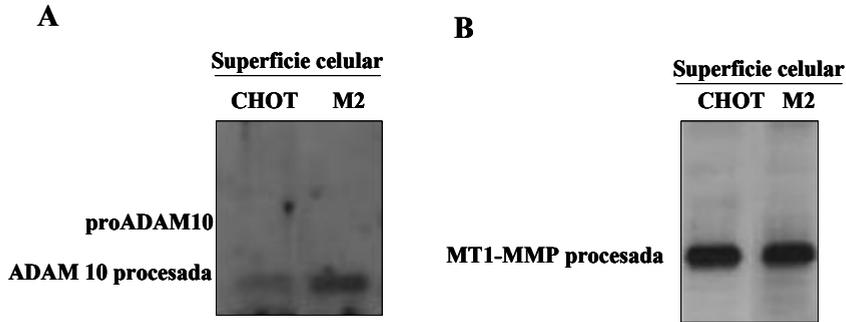


Figura 18. Llegada a la superficie celular de ADAM 10 y MT1-MMP en las células CHOT y M2. Células CHOT y M2 se trataron con biotina y los lisados se analizaron por Western blot con A: un anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de ADAM10 y B: un anticuerpo monoclonal contra MT1-MMP (ver materiales y métodos).

Consistentes con estos resultados son los obtenidos mediante experimentos de inmunofluorescencia en los cuales analizamos la localización de TACE en las células M2 y CHOT con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE. Como control utilizamos anticuerpos que reconocen una proteína residente en el complejo *cis*-Golgi (gm-130) y otra residente en el retículo endoplasmático (KDEL), (Figura 19).

El análisis por inmunofluorescencia de TACE en las células CHOT muestra un marcaje intracelular que colocaliza parcialmente con el RE y el complejo *cis*-Golgi (Figura 19A y 19B), así como marcaje en la superficie celular que colocaliza con HA-proTGF- α expresado por las células CHOT (Figura 19C). En las células M2 el marcaje por inmunofluorescencia de TACE es similar al de las CHOT, quizá con una menor colocalización con gm-130 (Figura 19D y 19E), sin embargo, en estas células no se detecta ningún marcaje en la superficie celular (Figura 19F).

Todos estos datos indican que el mecanismo que regula el tráfico de otras metaloproteasas distintas a TACE es normal en las células mutantes M2, mientras que el mecanismo que regula el tráfico de TACE es defectuoso. Este defecto es la causa de que no exista la forma procesada de TACE en la línea celular M2. La proforma de TACE queda retenida en compartimentos tempranos de la vía secretora (en el RE y/o *cis*-Golgi) y no alcanzando la superficie celular.

En global los resultados mostrados indican que en las células M2 existe un mecanismo que controla específicamente el tráfico y consecuentemente el procesamiento de proTACE. Este defecto en el transporte podría ser debido a un defecto en la propia metaloproteasa o en algún factor que este implicado en su tráfico y afecte a su actividad. Este defecto provocaría una deficiencia en el *shedding* de numerosas proteínas de transmembrana, entre ellas proTGF- α .

II. TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES.

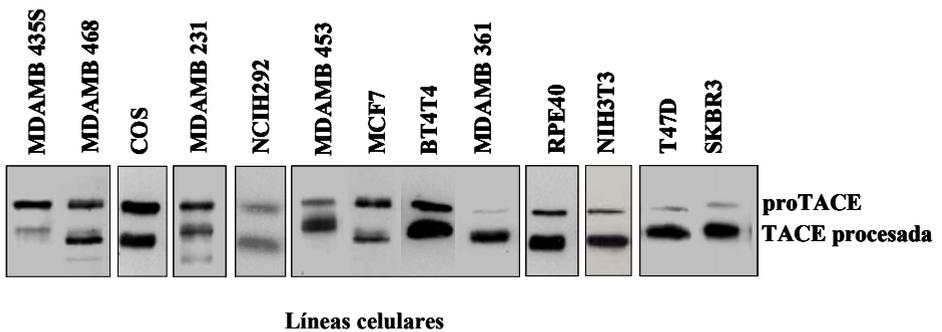
PROCESAMIENTO DE ADAM_s EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES

A pesar de que la progresión de proTACE desde el RE hasta el complejo de Golgi, donde la proforma es procesada, es un paso indispensable para su actividad (Schlondorff *et al.*, 2000), se conoce muy poco acerca de los mecanismos que regulan este tráfico.

Los resultados previos indican que un defecto en el transporte de proTACE a través de la ruta secretora explicaría la ausencia de procesamiento y actividad de la metaloproteasa en la línea celular mutante M2, abriendo la posibilidad de que el tráfico de proTACE sea un punto importante en su regulación.

Con el objetivo de analizar el tráfico de proTACE en distintas líneas celulares, examinamos las formas de la metaloproteasa mediante Western blot con el anticuerpo contra el dominio citosólico de TACE (Figura 21).

A



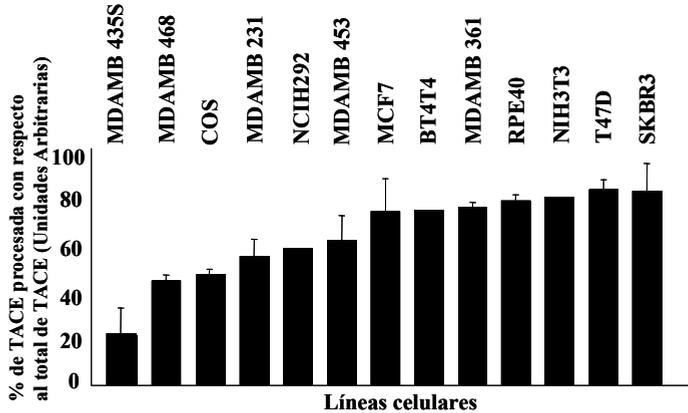
B

Figura 21. Formas de TACE expresadas por distintas líneas células A: Lisados de distintas líneas celulares se analizan por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE. B: Cuantificación de los resultados obtenidos en A. Los resultados muestran el porcentaje de TACE procesada con respecto al total de TACE y son medias aritméticas \pm S.D. de tres experimentos independientes.

Los niveles de procesamiento de TACE no son constantes en las distintas líneas analizadas (Figura 21). Las líneas celulares MDAMB 468, COS, MDAMB 231 y NCI-H292 expresan aproximadamente la misma cantidad de la proforma de TACE que de la forma procesada de la metaloproteasa. Las líneas celulares MDAMB 453, MCF7, BT474, MDAMB 361, RPE40, NIH-3T3, T47D y SKBR3 expresan mayoritariamente la forma procesada de la metaloproteasa mientras que en la línea celular MDAMB 435S esta forma es minoritaria. En la línea celular LoVo, TACE se procesa menos eficientemente que en la línea celular CaCo (ver Figuras 11 y 12). No obstante, estas variaciones son debidas a la deficiencia en actividad de Furina de las células LoVo, ya que cuando las células LoVo se transfectan con Furina aumenta el nivel de procesamiento de TACE. Sin embargo, para la mayoría de las líneas celulares mostradas en la Figura 19 se ha descrito la expresión de Furina y otras convertasas así como su actividad (Imai *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1997; Yana y Weiss, 2000). Se ha descrito que el procesamiento de algunas metaloproteasas de matriz extracelular aumenta al aumentar los contactos célula-célula (Ahmad *et al.*, 1997). Para descartar que las variaciones observadas en el procesamiento de proTACE sean debidas a diferencias en la

confluencia de las células o en los contactos entre las célula, analizamos las formas de TACE en células MDAMB 231, MDAMB 435S y SKBR3 a dos confluencias distintas. En la confluencia 1 (15-25%) hay un claro predominio de células aisladas. En la confluencia 2, (50-60%) existen numerosos contactos célula-célula. El análisis de las formas de TACE muestra que el procesamiento no depende del estado de confluencia e indican que el nivel en el procesamiento de TACE es una propiedad de cada línea celular (Figura 22).

A

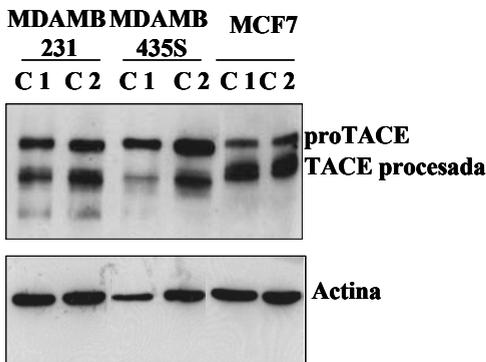
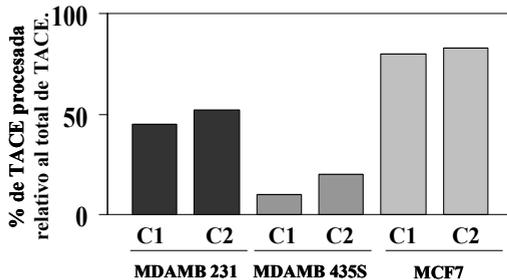


Figura 22. Formas de TACE en distintas células a distintas confluencias. A: Lisados de células MDAMB 231, MDAMB 435S y MCF7 se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y con el anticuerpo monoclonal anti-Actina como control de carga. C1: confluencia 1 (15-25%), C2: confluencia 2 (45-50%). B: cuantificación de los resultados mostrados en A y normalizados con respecto a actina. Los resultados indican el porcentaje de TACE procesada con respecto al total de TACE (son unidades arbitrarias)

B

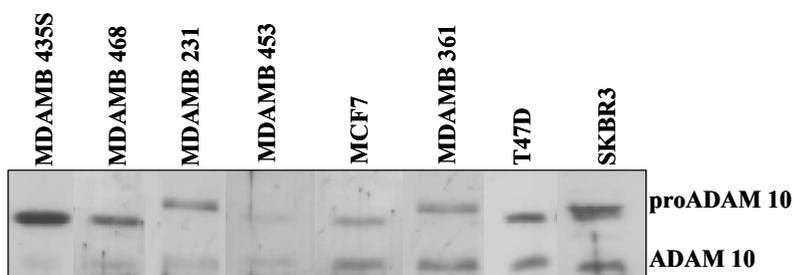


Estos datos indican que los niveles de procesamiento de TACE varían dependiendo del tipo celular. Esta variación es una característica de cada línea celular y no está mediada por su densidad celular.

EXPRESIÓN DE ADAM 10 EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES.

Los datos anteriores muestran que el procesamiento de proTACE es claramente más eficiente en unas líneas celulares que en otras. Con el objetivo de caracterizar si este mecanismo de procesamiento afecta a otras metaloproteasas, examinamos las formas de ADAM 10 (Kuzbanian) en un panel similar de líneas celulares (Figura 23).

A



B

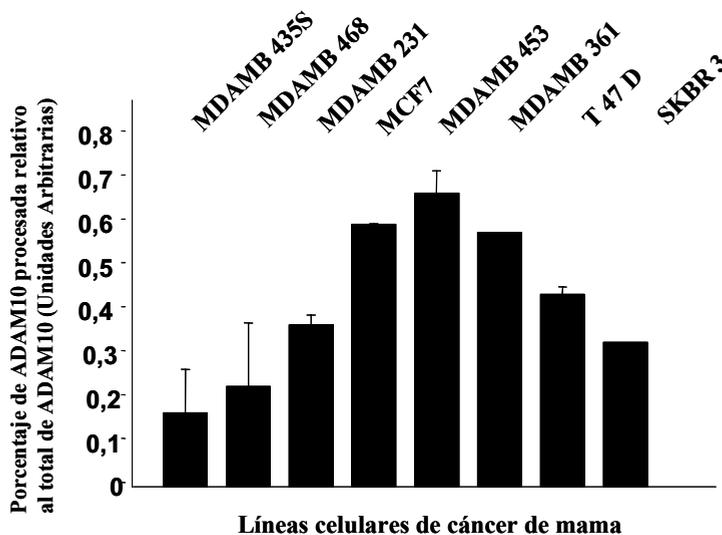


Figura 23. Formas de ADAM 10 expresadas por un panel de líneas celulares de cáncer de mama. A: Lisados de células de cáncer de mama se analizaron por Western blot con un anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de ADAM 10. B: Cuantificaciones de los resultados mostrados en A. los resultados se indican como el porcentaje de ADAM 10 procesado con respecto al total de la proteasa y se expresan las medias \pm S.D. de tres experimentos independientes.

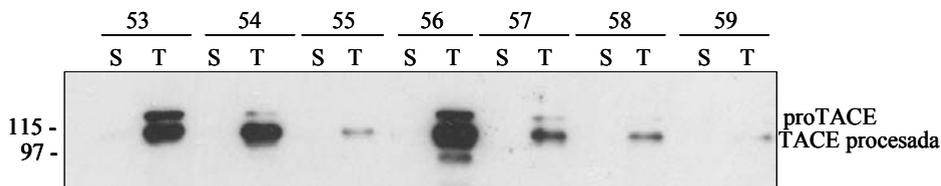
ADAM 10 se expresa en todas las líneas celulares analizadas, detectándose dos formas, proADAM 10 que corresponde a la forma inactiva de la proteasa, de mayor peso molecular (≈ 100 KDa) y ADAM 10 procesada de menor peso molecular (≈ 70 KDa) que corresponde a la forma procesada (carente de prodominio). Como en el caso de TACE, el procesamiento de ADAM10 es diferente en las distintas líneas celulares analizadas (Figura 23A y 23B). Aparentemente, el procesamiento de proADAM 10 es, en general, menos eficiente que el de proTACE. Por ejemplo, la forma procesada de TACE puede llegar a ser hasta del 90% del total de TACE (en células SKBR3, T47D, MDAMB 361, ver figura 20), mientras que la forma procesada de ADAM 10 alcanza el 70% del total de la metaloproteasa en las células MDAMB 453 (Figura 23). A pesar de esta diferencia, en la mayor parte de las líneas celulares analizadas existe una concordancia entre los niveles de procesamiento de TACE y los de ADAM 10 (comparar Figuras 20 y 23).

Estos resultados abren la posibilidad de que tanto TACE como ADAM 10 se procesen mediante un mecanismo regulado de manera común y coordinada.

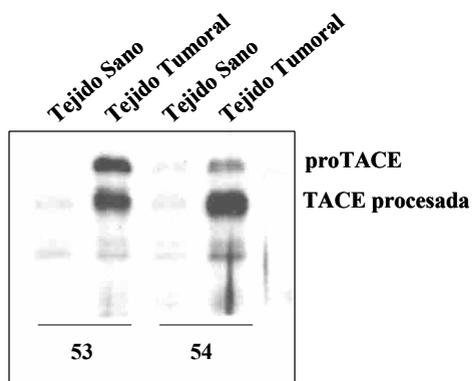
EXPRESIÓN DE TACE EN TEJIDOS TUMORALES DE MAMA

Con el objetivo de extender los resultados observados en líneas celulares, analizamos la expresión de las formas de TACE *in vivo*. Mediante análisis por Western blot de distintas muestras tumorales de mama, pudimos comprobar que, al igual que en líneas celulares, existen diferencias claras en los niveles de procesamiento de TACE (Figura 24). Como se muestra en la Figura 24A, de acuerdo con publicaciones recientes (Borrell-Pages *et al.*, 2003), en las muestras de tejido tumoral, se observa la sobre-expresión de TACE con respecto al tejido sano. Repitiendo el experimento con sólo dos de las muestras tumorales en un gel de mayor resolución para separar bien los dos formas de TACE (Figura 24B) se observa que mientras que en una de las muestras (n°53) la forma procesada de TACE es aproximadamente del 60% del total de la metaloproteasa, en la otra muestra (n°54) la forma procesada llega hasta el 90% del total. Esta diferencia en los niveles de procesamiento de TACE no está descrita y podría indicar una regulación diferencial de la maduración de TACE en un trastorno tumoral *in vivo*.

A



B



C

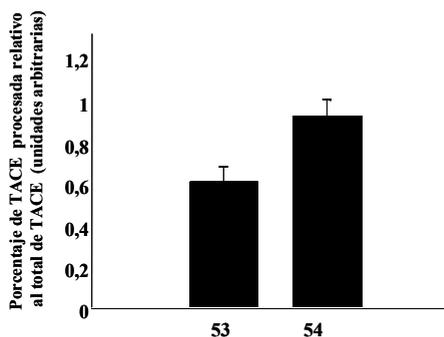


Figura 24. Formas de TACE expresadas en tejidos de tumor mamario humanos. A: lisado total de proteínas obtenidas de tejido sano y tumoral de mama de distintos pacientes de cáncer de mama (n° 53-59), analizadas por Western blot con el anticuerpo policlonal anti dominio citosólico de TACE. B: El mismo experimento que en A pero sólo con dos muestras de pacientes (n° 53 y n° 54). C: Cuantificación de la expresión de TACE en las muestras descritas en B. La cuantificación se refiere a el porcentaje de TACE procesada con respecto al total de la cantidad de TACE expresada.

EXPRESIÓN DE TACE EN TEJIDOS DE RATÓN

Nuestros resultados han mostrado que existe una variación en los niveles del procesamiento de TACE en muestras de tumores mamarios (Figura 24) y distintas líneas celulares procedentes de tumores (Figura 21). Una posibilidad que podría explicar este fenómeno es que el mecanismo que regula el procesamiento de TACE se encuentra alterado en determinadas situaciones que conducen a la sobre-expresión de TACE, como en tumores. Con el objetivo de analizar el procesamiento de TACE en muestras con niveles de expresión

normales, analizamos las formas de la metaloproteasa por Western blot en distintos tejidos sanos de ratón (Figura 25).

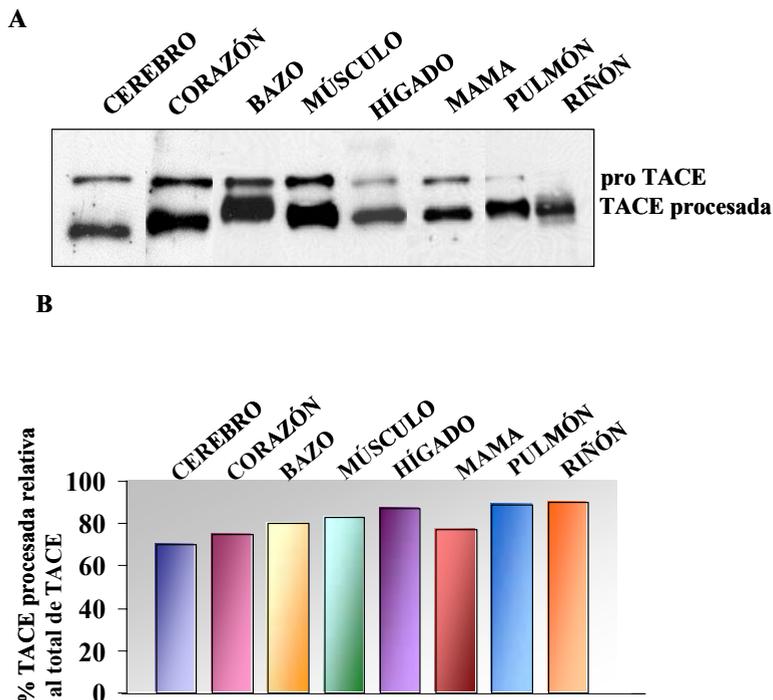


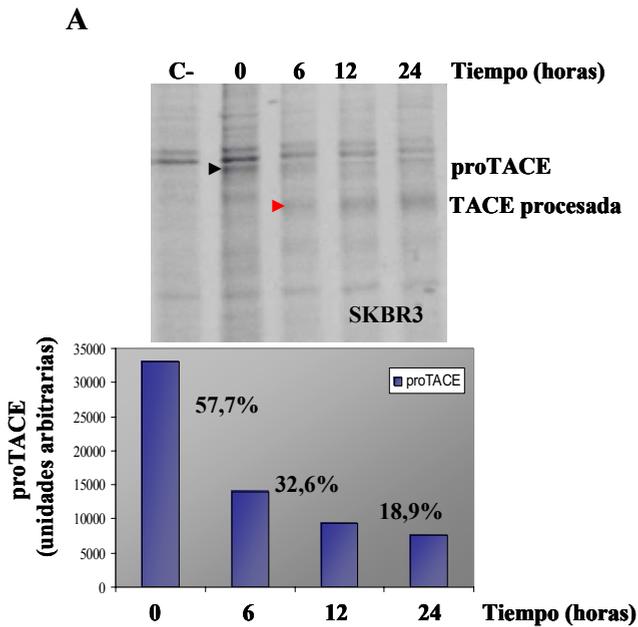
Figura 25. Formas de TACE en muestras de tejidos sanos de ratón. A: Lisados de diferentes tejidos de ratón se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE. B: cuantificación de los resultados mostrados en A. Los resultados indican el porcentaje de TACE procesada con respecto al total de TACE (son unidades arbitrarias).

Estos resultados muestran que los niveles del procesamiento de TACE son elevados (el nivel de procesamiento oscila entre el 75-85%) y se mantienen invariables en los distintos tejidos.

Estos datos indican que los niveles de procesamiento de TACE en distintos tipos celulares en condiciones normales son constantes. Sin embargo, en situaciones patológicas de sobre-expresión (tumores) los niveles de procesamiento de TACE varían.

BIOSÍNTESIS Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TACE EN LAS CÉLULAS SKBR3 Y MDAMB435S

Los datos anteriores se han obtenido de experimentos hechos con células en cultivo en condición de equilibrio. Una posibilidad a tener en cuenta es que en aquellas líneas celulares donde la forma procesada de TACE es apenas detectable (por ejemplo, las células MDAMB 435S) sea porque esta forma tenga una vida media corta y que rápida y específicamente se degrade. Para aclarar este punto usamos las líneas celulares SKBR3 y MDAMB 435S y analizamos la vida media de TACE mediante experimentos de marcaje metabólico y cazas a distintos tiempos (Figura 26).



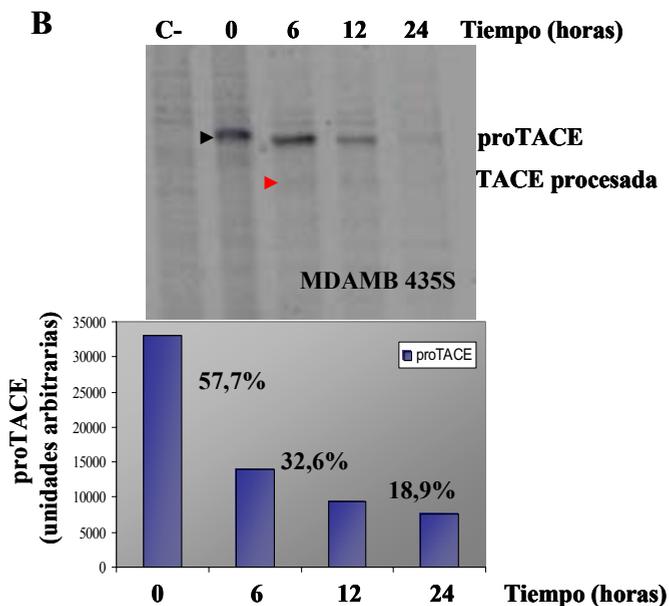


Figura 26. Biosíntesis de TACE en células SKBR3 y MDAMB 435S. Las células A: SKBR3 y B: MDAMB 435S, se marcaron durante 1 hora con [35 S] Translabel y se cazaron a diferentes tiempos como se indica. Los lisados de las células SKBR3 (A) y MDAMB 435S (B) se inmunoprecipitan con 2 μ l del anticuerpo policlonal contra el dominio metaloproteasa de TACE. La banda señalada con \blacktriangledown es proTACE mientras que la señalada con \blacktriangledown es TACE procesada. En cada caso se cuantifica la cantidad de proTACE (unidades arbitrarias) en los distintos tiempos.

La vida media de proTACE en las células MDAMB 435 es más larga ($t_{1/2} \sim 10$ h) comparada con las SKBR3 ($t_{1/2} \ll 8$ h). De manera similar a lo observado en las células M2, estos resultados indican que proTACE se procesa lentamente en las células MDAMB 435S (necesita más de 10h). Sin embargo proTACE se procesa en mucho menos de 8h en las SKBR3 sugiriendo que el tráfico de TACE está regulado de forma diferente en las distintas líneas celulares.

Con el objetivo de examinar si la proforma de TACE en las células MDAMB 435S no progresa de manera adecuada a través de la vía secretora y no alcanza el compartimento donde las convertasas actúan, realizamos ensayos de biotilización celular y tratamientos con EndoH (Figura 27).

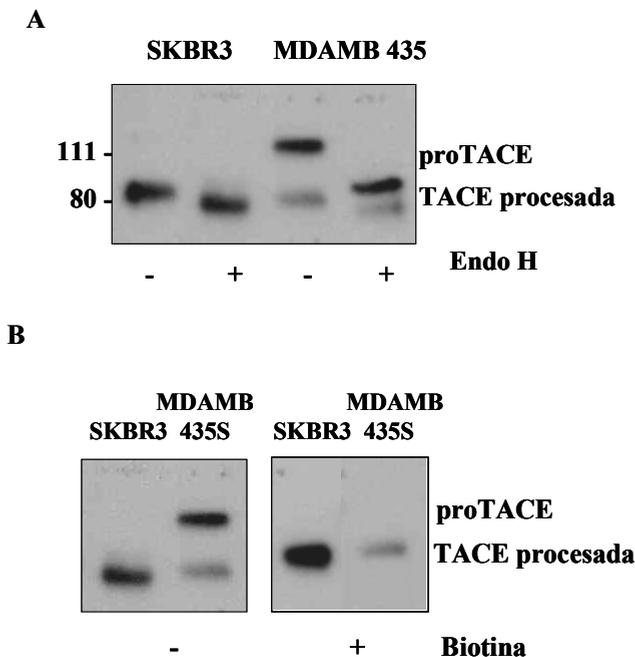


Figura 27. Tratamiento de las células SKBR3 Y MDAMB 435S con Endoglicosidasa H y Biotina. A: Glicoproteínas de células SKBR3 Y MDAMB 435S se trataron sin y con Endoglicosidasa H (durante 16-18h) como se indica. Las muestras se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE. B: Las células SKBR3 Y MDAMB 435S se trataron con o sin biotina como se indica (1mg/ml) y se lisaron (ver materiales y métodos). Los lisados se concentraron con avidina (+ biotina) o con concavalina (- biotina) y se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE.

Los resultados muestran que en las células MDAMB 435S la mayoría de TACE se encuentra en su proforma en compartimentos tempranos de la vía secretora (Figura 27A) y sólo se detecta en la superficie celular el pequeño porcentaje de la proteasa que se procesa (Figura 27B). En las células SKBR3, la mayoría de la proteasa se encuentra en forma procesada y toda ella se detecta en la superficie celular (Figura 27).

Globalmente estos resultados indican que TACE se transporta de manera ineficiente en las células MDAMB 435S quedándose retenida en compartimentos anteriores al complejo de Golgi donde la proteasa se procesa por convertasas.

III. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO QUE REGULA EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE.

PROCESAMIENTO DE DISTINTOS MUTANTES DE DELECCIÓN DE TACE.

El control de la salida de determinadas proteínas desde compartimentos tempranos de la vía secretora viene dirigido a menudo por señales en *cis* que las hacen progresar o las retienen en estos compartimentos tempranos. Con el objetivo de determinar si existen señales de retención o exportación en la secuencia de TACE que regulen la progresión de la metaloproteasa a través de la ruta secretora, generamos distintas construcciones con deleciones en las diferentes regiones de TACE (Figura 28)

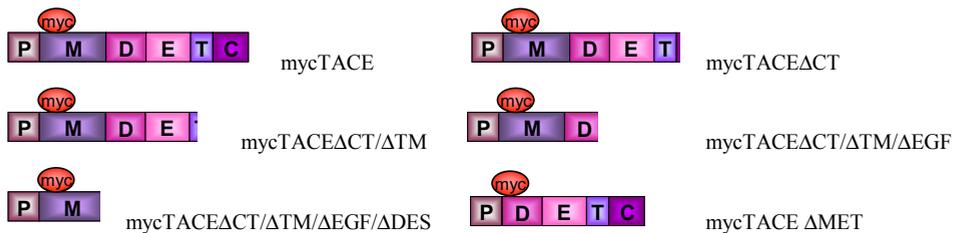


Figura 28. Esquema de las deleciones de TACE. Todas las construcciones tienen el epítipo myc entre el prodominio y el dominio metaloproteasa, excepto la que carece de este dominio que lo tiene entre el prodominio y el dominio desintegrina.

Para establecer si algún dominio de TACE es necesario para su retención en compartimentos tempranos de la ruta secretora, transfectamos de manera transitoria las distintas construcciones mostradas en la Figura 26 en células M2. Utilizamos esta línea celular por su defecto al procesar TACE. De esta manera sidetectamos la forma procesada de TACE será derivada de las construcciones transfectadas.

Después de 48h analizamos las formas de TACE expresadas por Western blot y su sensibilidad a EndoH (Figura 29).

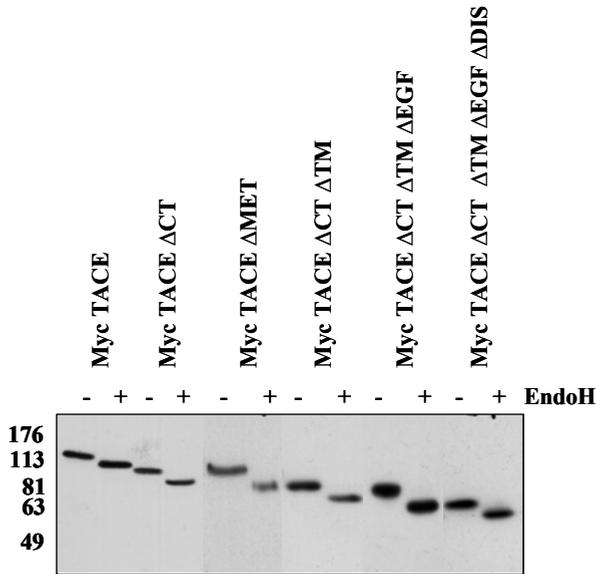


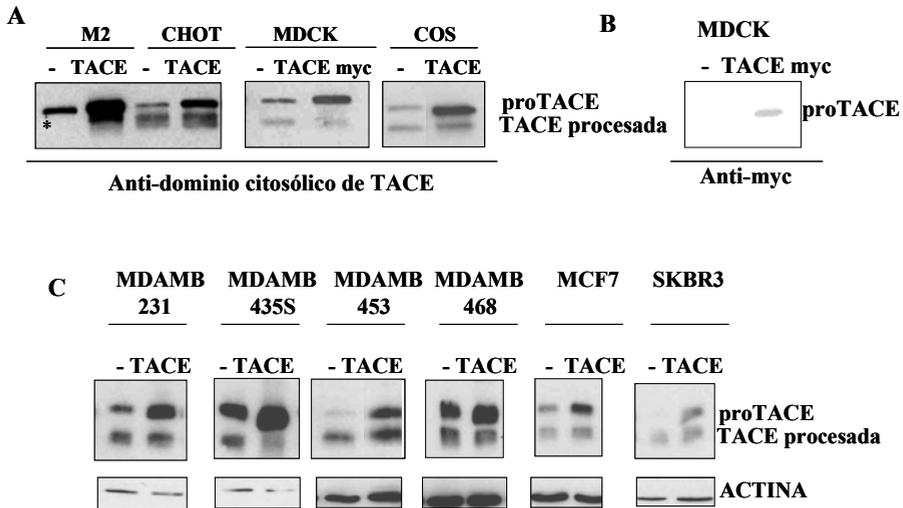
Figura 29. Análisis de la sensibilidad a EndoH de un panel de construcciones de deleciones de TACE transfectadas en las células M2. Las células M2 se transfectaron transitoriamente con diferentes construcciones de TACE como se indica. Todas ellas contienen un epítipo myc entre el prodominio y el dominio metaloproteasa menos TACE ΔMET donde el epítipo está entre el prodominio y el dominio desintegrina. Las células se lisaron y los lisados se concentraron con ConA. Las muestras se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-myc.

Todas las construcciones de TACE transfectadas, incluso la construcción completa, dan lugar a la proforma de la metaloproteasa, es decir, en ningún caso proTACE se procesa a niveles detectables por Western blot. Todas las formas detectadas son sensibles a EndoH, indicando que se encuentran en un compartimento anterior al *trans*-Golgi.

Estos resultados indican que no existe una señal de retención discreta en la secuencia de TACE, ya que deleciones que afectan al dominio citosólico y dominio transmembrana, dominios donde normalmente se encuentran las señales de retención, no son suficientes para que TACE progrese a través de la ruta secretora y se procese.

LA TRANSFECCIÓN DE TACE CAUSA SU RETENCIÓN EN COMPARTIMENTOS TEMPRANOS DE LA VÍA SECRETORA.

Con el objetivo de caracterizar el mecanismo de transporte de TACE y ampliar los resultados anteriores, transfectamos de manera transitoria distintas construcciones de TACE en distintas líneas celulares (Figura 30). Sorprendentemente, estos experimentos muestran que, independientemente de la línea celular analizada, la transfección de TACE conduce a un aumento sustancial de la proforma de la metaloproteasa, mientras que la forma procesada no aumenta (cuando el ensayo de Western blot se realiza con el anticuerpo contra el dominio citosólico) o no se detecta (cuando el ensayo de Western blot se realiza con el anticuerpo anti-myc). En todos los casos y a pesar de que algunas líneas celulares tienen la capacidad de procesar TACE endógena con elevada eficiencia, cuando aumenta el número de moléculas de la metaloproteasa el sistema que regula su transporte se bloquea. La cuantificación de la sobre-expresión se muestra en la Figura 31.



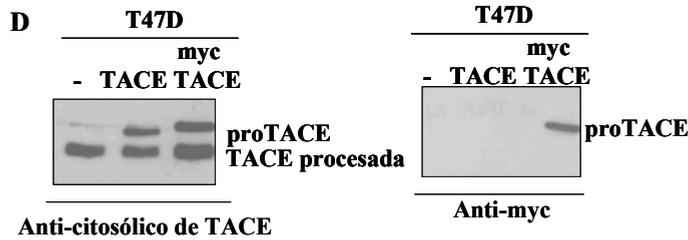


Figura 30. Transfección de TACE en distintas líneas celulares. Las células M2 y CHOT se transfectaron transitoriamente mediante el método DEAE-DEXTRAN y las células COS mediante electroporación con una construcción de TACE sin epítipo. Las células MDCK se transfectaron con FuGene 6 con una construcción de TACE con el epítipo myc en la posición C-terminal. Las células tumorales MDAMB 231, 435S, 453, 468, MCF7 y SKBR3 se infectaron con retrovirus que expresaban TACE sin epítipo. Las células T47D se transfectaron por electroporación con dos construcciones de TACE una sin epítipo y otra con el epítipo entre el prodominio y el dominio metaloproteasa. A: Lisados de células M2, CHOT, MDCK y COS transfectadas como se indica se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE como se indica. El * muestra una banda producto de degradación, no es la forma procesada de TACE. B: Lisados de células MDCK transfectadas como se indica se analizaron por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-myc. C: Lisados de células tumorales se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y con el anticuerpo monoclonal anti-Actina como control de carga como se indica. D: Lisados de células T47D se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y con el anticuerpo monoclonal anti-myc como se indica. Los carriles marcados con (-) son las células sin transfectar.

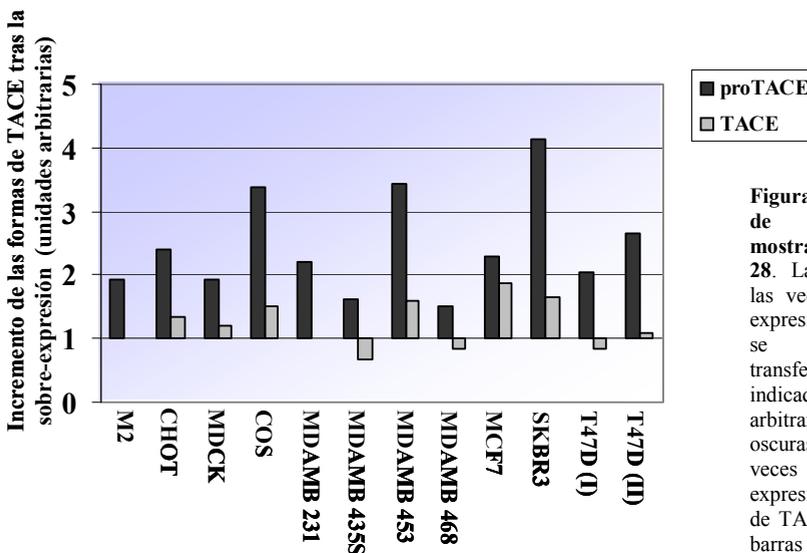


Figura 31. Cuantificación de los resultados mostrados en la Figura 28. La gráfica representa las veces que aumenta la expresión de TACE cuando se sobre-expresa al transfectar las células indicadas (unidades arbitrarias). Las barras oscuras representan las veces que aumenta la expresión de la proforma de TACE mientras que las barras claras representan las veces que aumenta la forma procesada de TACE.

La falta de procesamiento de TACE no se debe a un artefacto del sistema de transfección ya que se han utilizados más de cinco métodos distintos y tampoco se debe a la posición del epítipo porque se han obtenido los mismos resultados con construcciones de TACE con epítipo en 5 posiciones distintas (datos no mostrados).

La eliminación del dominio citosólico no altera este resultado (Figura 29 y 32). Como control usamos ADAM 9 marcada con el epítipo myc en la posición carboxilo terminal (Figura 32). Los resultados muestran que ADAM 9 se procesa correctamente cuando se transfecta de manera transitoria. La construcción de ADAM 9 sin el dominio citosólico también se procesa indicando que este dominio no es necesario para su procesamiento.

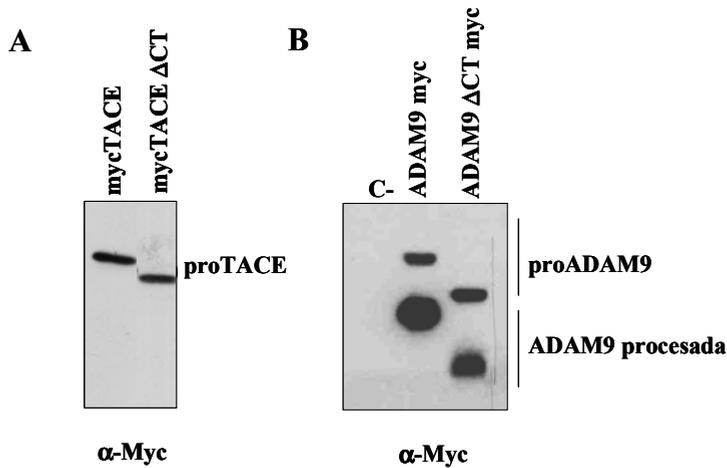


Figura 32. Transfección transitoria de TACE y ADAM 9 en células CHO. Células CHO transfectadas transitoriamente con dos construcciones de A: TACE y B: ADAM 9 con y sin dominio citosólico como se indica. Los lisados de las células se analizaron mediante Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-myc

Estos datos sugieren que el mecanismo que regula el procesamiento de TACE se ve afectado al sobre-expresarla y revelan la existencia de un componente saturable.

Para analizar la localización subcelular de la forma de TACE que no se procesa cuando transfectamos las células de manera transitoria, realizamos un ensayo de sensibilidad a EndoH. Para ello transfectamos células COS con una construcción de TACE con el epítipo

HA (el epítipo se encuentra entre el prodominio y el dominio metaloproteasa). Los lisados de estas células fueron tratados sin y con EndoH (Figura 33).

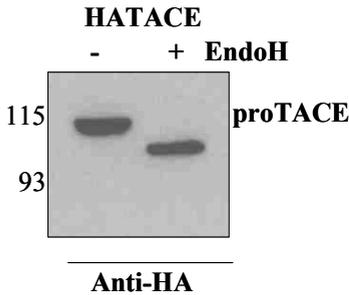


Figura 33. Sensibilidad a Endo H de las formas de TACE sobre-expresadas. Las células COS se transfectaron con una construcción de TACE con el epítipo HA. Los lisados de estas células se trataron con y sin Endo H durante 16-18h y se analizaron por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-HA contra este epítipo.

Estos resultados muestran, de nuevo, que la única forma de TACE que se detecta por Western blot cuando se transfectan las células es la proforma y que esta proforma reside en compartimento tempranos de la ruta secretora ya que es sensible al tratamiento con EndoH. Esto sugiere que no se procesa por una ineficiencia en el tráfico hacia el complejo de Golgi donde el procesamiento de la metaloproteasa tiene lugar.

Con el objetivo de abordar las posibles causas de la retención de TACE en compartimentos tempranos de la vía secretora, realizamos varias aproximaciones como control. Una posibilidad sería que la retención de las construcciones de TACE ocurra por un defecto en el plegamiento de la proteína. Otra posibilidad sería que la carencia de extremos no codificantes (3'UTR y 5'UTR) en el cADN que codifica para TACE y que se utiliza para transfectar las células, sea la causa de la retención de la metaloproteasa.

LOCALIZACIÓN DE TACE DEPENDIENTE DE TEMPERATURA

Para descartar la posibilidad de que la retención de TACE cuando se sobre-expresa se debiera a un problema de plegamiento de las construcciones transfectadas, analizamos si, como se ha descrito (Kagan *et al.*, 2000; Kjaer y Ibanez, 2003), la disminución de temperatura de incubación de las células modula el correcto plegamiento de las proteínas. Por tanto, comparamos el procesamiento de TACE y su sensibilidad a EndoH en células COS

transfectadas con una construcción de TACE con el epítipo myc e incubadas a 37°C y a 30°C (Figura 34)

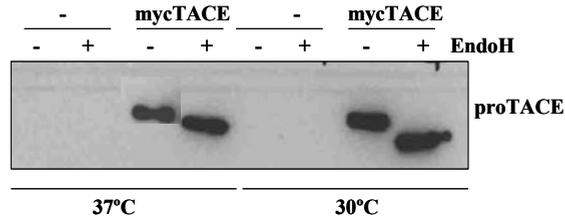


Figura 34. Sensibilidad a EndoH de las formas de TACE transfectadas en células COS a 37°C y 30°C. Las células COS se transfectaron por electroporación con una construcción de TACE con el epítipo myc entre el prodominio y el dominio metaloproteasa. Las células crecieron a 30°C y a 37°C como se indica. Los lisados se trataron con EndoH y se analizaron por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-myc.

Como muestra la Figura 31, la disminución de la temperatura no tiene ningún efecto sobre el procesamiento de las construcciones transfectadas de TACE.

LOCALIZACIÓN DE TACE DEPENDIENTE DE LOS EXTREMOS UTRs.

Existen cada vez más evidencias de que ciertas regiones no codificantes de los ARN mensajeros determinan la localización subcelular de algunas proteínas. Resultados recientes han mostrado que en las células de mamífero, algunos ARNm se localizan en determinadas zonas específicas del citoplasma. Esta localización, generalmente asociada con el citoesqueleto, permite la síntesis de proteínas en regiones cercanas al lugar donde actúan. En los casos estudiados, la señal de localización del ARNm se encuentra en la región no codificante 3'UTR (Veyrune *et al.*, 1996; Dalglish *et al.*, 1999). Resultados recientes (Tekotte y Davis, 2002), sugieren que el destino del ARNm depende de sus regiones no codificantes (3'UTR), también llamadas “zip codes”. Estas regiones son reconocidas por proteínas que actuando en *trans* determinan la correcta localización del ARNm y su destino en el citoplasma.

Dado que las construcciones que utilizamos para transfectar las células no contienen las regiones no codificantes nos planteamos si el defecto en la progresión de la metaloproteasa podría deberse a una localización incorrecta del ARNm de TACE. Para ello generamos distintas construcciones con las regiones no codificantes de la metaloproteasa que transfectamos en células COS. Un esquema de las construcciones que transfectamos se muestra en la Figura 35

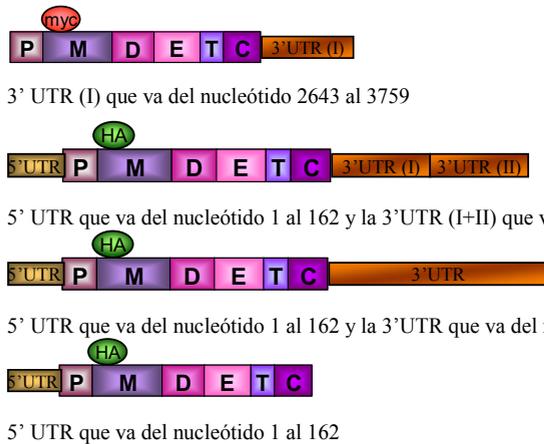


Figura 35. Esquema de las distintas construcciones con las regiones no codificantes de TACE. Todas ellas están clonadas en pcDNA3.1z(+) y tienen un epítipo myc o HA como se indica entre el prodominio y el dominio metaloproteasa.

Examinamos todas estas construcciones mediante análisis por Western blot con el objetivo de detectar los niveles de procesamiento de TACE con los distintos fragmentos de las regiones no codificantes (Figura 36).

El resultado de la Figura 36 muestra que ninguna de las construcciones con los extremos UTRs ya sean fragmentos parciales o totales hace que proTACE se procese más eficientemente. La cantidad de TACE procesada es la misma en células sin transfectar que en células transfectadas mientras que la cantidad de proTACE aumenta considerablemente indicando una vez más que cuando aumenta la cantidad de TACE en la célula se acumula en su proforma.

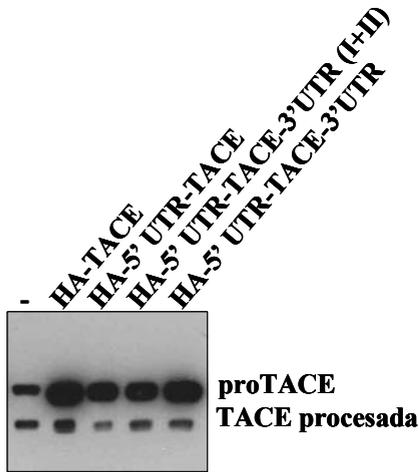


Figura 36. Papel de los extremos UTRs en el procesamiento de TACE. Las células COS se transfectaron con distintas construcciones como se indica. Los lisados de estas células se analizaron por western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE.

Anti-dominio citosólico de TACE

Estos resultados indican que el mecanismo que regula el tráfico de TACE a través de la ruta secretora es independiente de la temperatura y de los extremos UTRs.

EL MECANISMO QUE REGULA EL TRANSPORTE DE TACE ES SATURABLE

Los resultados anteriormente mostrados indican que la maquinaria que regula la progresión de TACE y consecuentemente su procesamiento no funciona cuando el número de moléculas de la metaloproteasa es mayor de la habitual en un determinado tipo celular. Con el propósito de examinar si se trata de un mecanismo saturable, realizamos un experimento aumentando progresivamente la cantidad de cADN que se transfecta en las células (Figura 37).

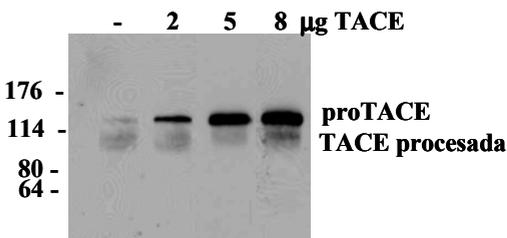


Figura 37. Sobre-expresión de distintas cantidades de cADN en células CHO. Las células CHO se transfectaron transitoriamente con distintas cantidades de cADN de TACE como se indica. Las células se lisaron y se realizó un Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE, una construcción de TACE

LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TACE AFECTA FUNDAMENTALMENTE A LA PROFORMA.

Los resultados hasta ahora mostrados sugieren que los factores implicados en el mecanismo que regula la salida de TACE de compartimentos tempranos de la vía secretora son limitantes y regulan la salida de un número determinado de moléculas. De forma que, cuando este número aumenta (lo que ocurre cuando las células se transfectan), los factores son limitantes y el mecanismo se satura, bloqueándose el tráfico intracelular de TACE.

Con el objetivo de examinar si el mecanismo que regula el tráfico de TACE es saturable, realizamos el experimento complementario al de sobre-expresión. Con este propósito generamos ARN de interferencia que se une específicamente al ARN mensajero de TACE provocando su degradación. De esta manera al disminuir la cantidad de ARNm, disminuye la expresión de TACE. En la Figura 38 se observa donde hibridan los 3 ARN de interferencia diseñados.

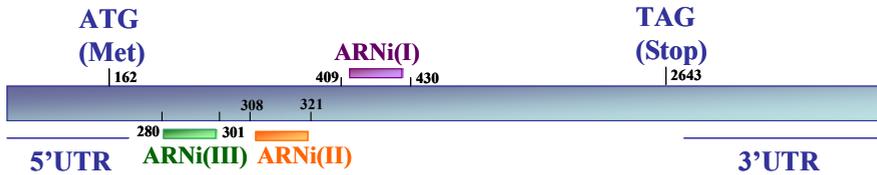


Figura 38. Esquema de la hibridación de los ARN de interferencia sobre el ARN de TACE. Se diseñaron 3 ARN de interferencia que hibridan en las regiones indicadas de ARNm de TACE (ver materiales y métodos).

Una vez generadas las 3 construcciones del ARN de interferencia, realizamos transfecciones estables en dos líneas celulares de cáncer de mama con distintos niveles de procesamiento de TACE: las células SKBR3 y las MDAMB 435S. Una vez seleccionadas las células estables que expresan el ARN de interferencia, se analiza la expresión de TACE mediante análisis por Western blot (Figura 39).

Como se observa en la Figura 39A, cuando las células MDAMB 435S se transfectan con ARN de interferencia de TACE, la cantidad de la metaloproteasa que se acumula en su proforma disminuye mientras que la forma procesada existente prácticamente se mantiene, indicando que el número de moléculas procesadas permanece constante. Los resultados se

confirman en las células SKBR3 que poseen un mecanismo eficiente de procesamiento de TACE, al disminuir la expresión con ARN de interferencia, del total de moléculas de TACE, las formas que disminuyen son las dos: la proforma y la forma procesada de TACE, indicando que en este tipo celular, el ARN de interferencia puede desbloquear el mecanismo implicado en la progresión de la proteasa al disminuir su expresión.

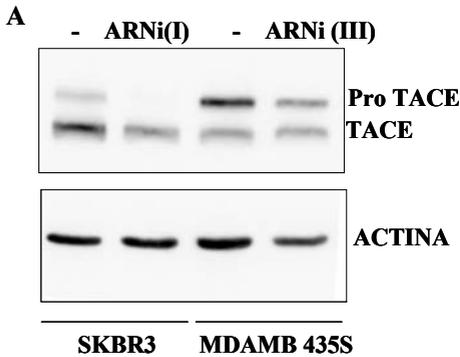
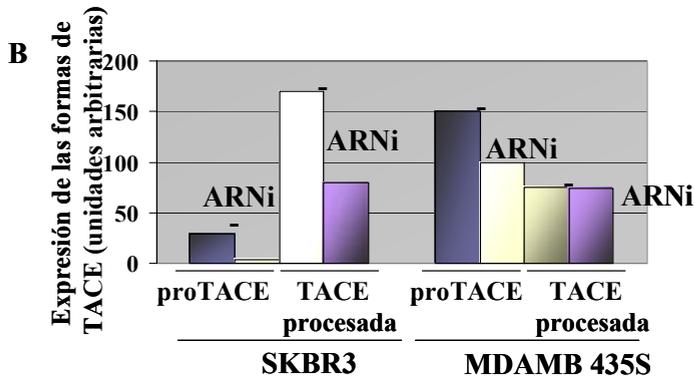


Figura 39. Disminución de las formas de TACE tras transfectar las células con ARN de interferencia. A: Las células SKBR3 y MDAMB 435S se transfectaron de manera estable con la construcción de ARNi (I) y ARNi (III) respectivamente. Los lisados de estas células se analizaron por Western blot con el anticuerpo policlonal contra el dominio citosólico de TACE y el anticuerpo monoclonal anti-Actina como control de carga. B: Cuantificación de los resultados mostrados en A. La gráfica muestra las veces que disminuyen las formas de TACE tras haber sido inhibida su síntesis con ARN de interferencia (unidades arbitrarias).



En conclusión las células analizadas tienen un mecanismo ineficiente de control de la progresión de TACE a través de la ruta secretora e independiente de los distintos dominios de la metaloproteasa. El mecanismo que regula el tráfico de TACE es un mecanismo altamente saturable, en distintos tipos celulares.

IV. POSIBLE MECANISMO QUE REGULA EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE.

POSIBLES FACTORES IMPLICADOS EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE

Los resultados mostrados hasta ahora sugieren la existencia de un mecanismo saturable que regula la progresión de TACE a través de la ruta secretora y sobre todo de su salida de compartimentos tempranos de la misma. TACE, como el resto de metaloproteasas de la misma familia, se empaqueta en las vesículas de transporte en el retículo endoplasmático y progresa hasta el complejo de Golgi donde se procesa. En este camino, probablemente, interaccionará con complejos moleculares que regularán su tránsito.

Frecuentemente el tráfico de proteínas de membrana de tipo I, está regulado por secuencias presentes en el dominio citosólico. Con el objetivo de identificar posibles proteínas que interaccionen con el dominio citosólico de TACE, realizamos un ensayo de purificación por afinidad (*pull down*) utilizando una construcción del dominio citosólico de TACE fusionada a la Glutathion-S-transferasa (GST) y lisados de las células SKBR3 y MDAMB 435S. Utilizamos estos dos tipos celulares porque son los que presentan un patrón de procesamiento de TACE más extremo: las células SKBR3 la forma mayoritaria de TACE es la procesada mientras que las células MDAMB 435S esta forma es la minoritaria.

Las proteínas recombinantes GST-TACE-dominio citosólico y GST (como control) se obtuvieron por inmovilización en una columna de glutation-sefarosa (ver materiales y métodos). Las proteínas recombinantes se cargan en un gel de electroforesis (SDS-poliacrilamida) que se tiñe con Comassie para detectar la cantidad obtenida (Figura 40)

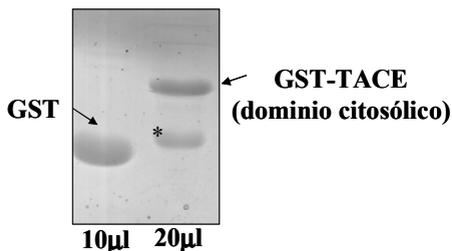


Figura 40. Detección de las proteínas recombinantes GST y GST-TACE (dominio citosólico). Proteínas recombinantes GST y GST-TACE (dominio citosólico) obtenidas por inmovilización mediante una columna de glutation sefarosa cargadas en un gel de electroforesis. El gel se tiñe con Comassie para visualizar las proteínas. La banda señalada con (*) es inespecífica.

Una vez obtenidas las proteína recombinantes y cuantificadas se incuban con lisados de células MDAMB 435S y células SKBR3 previamente marcados con ³⁵S. Nos interesará identificar aquellas proteínas de los lisados celulares que interaccionen con GST-TACE (dominio citosólico) y no con GST (se utiliza como control). Una vez acabada la interacción, las muestras se cargan en un gel de electroforesis y se analizan las bandas (Figura 41).

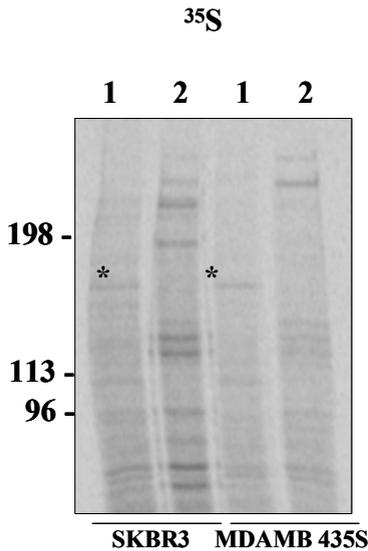


Figura 41. Proteínas marcadas metabólicamente que interaccionan con el dominio citosólico de TACE. Las células SKBR3 y MDAMB 435S se marcan con 1mCi de Translabel ³⁵S durante 1 hora. Lisados de estas células se incuban durante 14-16 horas con proteína recombinante GST (carriles 2) o GST-TACE (dominio citosólico) (carriles 1). Las muestras se cargan en un gel de electroforesis que se seca y se expone en una película FUJIFilm.

Como se muestra en la Figura 41 son muchas las proteínas que interaccionan exclusivamente con el dominio citosólico de TACE ya que aparecen en los carriles 1 mientras no aparecen en los carriles 2 donde están las proteínas que interaccionan sólo con GST (ver, por ejemplo, la banda marcada con un asterisco).

Con el objetivo de identificar estas bandas, seguimos el mismo protocolo pero utilizando lisados de células SKBR3 y MDAMB 435S sin marcar metabólicamente. Una vez concluida la interacción entre los lisados y la proteína recombinante, las muestras se cargan en un gel de electroforesis y se sigue un protocolo de tinción con plata (ver materiales y métodos).

Los resultados muestran que son muchas las bandas que interaccionan con la construcción del dominio citosólico de TACE fusionada a GST (Figura 42). Para descartar que las bandas que observamos en los carriles de proteínas que interaccionan con el dominio citosólico de TACE sean las mismas que las que interaccionan sólo con GST analizamos las bandas nº 4 y nº8 señaladas en el gel (Figura 42).

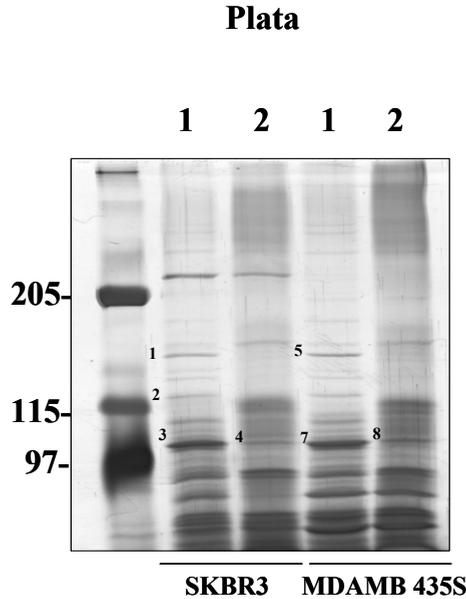


Figura 42. Proteínas de células MDAMB 435S y SKBR3 que interaccionan con el dominio citosólico de TACE. Lisados de células SKBR3 y MDAMB 435S se incubaron durante 16-18 horas con GST y GST-TACE (dominio citosólico) obtenidas por inmovilización con glutathion sefárosa. Las muestras resultantes de la incubación 1: GST-TACE (dominio citosólico) y 2: GST, se cargan en un gel de electroforesis que se tiñe con plata (ver materiales y métodos).

Se analizaron e identificaron las bandas señaladas en el gel, en el servicio de proteómica del Hospital Vall d'Hebron (Tabla 14).

Como se muestra en la Tabla 14, la mayoría de las proteínas identificadas son inespecíficas. Algunas de las bandas analizadas, como la n° 4 y la n° 8, resultaron ser una mezcla de más de una proteína (Tabla 14). Tan sólo dos de las bandas, la subunidad α y la subunidad β del complejo del coatómero son proteínas que tienen una afinidad por el dominio citosólico de TACE fusionado con GST y no sólo con GST. De las dos subunidades, la α es la que se identifica de manera independiente en las dos líneas celulares analizadas. Además la cantidad de péptidos identificados es elevado como se muestra en la Figura 43.

<i>Nº</i>	<i>Nombre de la proteína</i>	<i>Nº acceso</i>	<i>% Secuencia</i>	<i>Peso molecular</i>
1	Subunidad α del complejo del coatómero (Homo sapiens)	Q8IXZ9	31	139235
2	Subunidad β del complejo del coatómero (Homo sapiens)	COPP_HUMAN	8	102291
3	Metionina sintasa (E.coli)	METE_ECOL6	26	84507
4	Glutation-transferasa	AAA72682	38	26642
4	Metionina sintasa (E.coli)	METE_ECOLI	16	84490
5	Subunidad α del complejo del coatómero (Homo sapiens)	Q8IXZ9	18	139235
7	Metionina sintasa (E.coli)	METE_ECOL6	10	84507
8	GST-6his - Vector de expression pGEX-2T-6H.	AAB41882	33	30980
8	Metionina sintasa (E.coli)	METE_ECOL6	15	84507

Tabla 14. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas. En la tabla se representa el número de banda que se selecciona en el gel teñido con plata, el nombre de la proteína identificada, el número de acceso en el NCBI BLAST, el porcentaje de péptidos que hibridan con la secuencia de proteína y el peso molecular estimado. Nótese que este peso molecular no siempre corresponde con el peso reflejado en el gel. Esto puede ser debido a modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas, tales como glicosilación, fosforilación, agregados, etc. La banda nº4 y nº8 dieron lugar a dos proteínas distintas.

1 MLTKFETKSA RVKGLSFHPK RPWILTSLHN GVIQLWDYRM **CTLIDKFDEH**
51 **DGPVR**GIDFH **KQQLFVSGG** **DDYK**IKVWNY KLRRCFLTLL GHLDYIRTF
101 FHHEY PWILS ASDDQ TIRVW NWQSR TCVCV LTGHNHYVMC AQFHPTEDLV
151 VSASLDQTVR VWDISGLRKK **NLSPGAVESD** **VR**GITGVDLF GTTDAVVKHV
201 LEGHDR **GVNWA AFHPTMPLI** **VSGADDR**QVK IWRMNESKAW EVDTCR **GHYN**
251 **NVSCAVFHPR** QELILNSSED KSIRVWDM SK RTGVQTFRRD HDRFWVLA AH
301 PNLNLFAAGH DGGMIVFKLE **RERPAYAVHG** **NMLHYVKDRF** LRQLDFNSSK
351 DVAVMQLRSG SK **FPVFNMSY** **NPAENAVLLC** **TRASNLENST** **YDLYTIPKDA**
401 DSQNPDAPEG KRSSGLTAVW **VARNRFAVLD** RMHSLLIKNL KNEITKKVQV
451 PNCDEIFYAG TGNLLLR **DAD** **SITLFDVQQK** RTLASVKISK VKYVIWSADM
501 SHVALLAKHE HSCPLPLTAI VICNR **KLDAL** **CNIHENIRVK** **SGAWDESGVF**
551 IYTTSNHIKY AVTTGDHGII RTLDLPIYVT RVKGNNVYCL DRECRPRVLT
601 IDPTEFKFKL ALINRKYDEV LHMVRNAKLV GQSIIAYLQK KGYPEVALHF

651 VKDEKTRFSL ALECGNIEIA LEAAKALDDK NCWEKLGGEVA LLQGNHQIVE
701 MCYQRTKNFD KLSFLYLITG NLEKLRKMMK IAEIRKDMMSG HYQNALYLGD
751 VSERVRILKN CGQKSLAYLT AATHGLDEEA ESLKETFDPE KETIPDIDPN
801 AKLLQPPAPI MPLDTNWPLL TVSKGFFEGT IASKGKGGAL AADIDIDTVG
851 TEGWGEDAEL QLDEDFVEA TEGLGDDALG KGQEEGGWD VEEDLELPPE
901 LDISPGAAGG AEDGFFVPPT KGTSPTQIWC NNSQLPVDHI LAGSFETAMR
951 LLHDQVGVIQ FGPYKQLFLQ TYARGRTTYQ ALPCLPSMYG YPNRNWKDAG
1001 LKNGVPAVGL KLNDLIQRLQ LCYQLTTVGK FEEAVEKFRS ILLSVPLLVV
1051 DNKQEIAEAQ QLITICREYI VGLSVETERK KLPKETLEQQ KRICEMAAAYF
1101 THSNLQPVHM ILVLRALNL FFKLKNFKTA ATFARLLEL GPKPEVAQQT
1151 RKILSACEKN PTDAYQLNYD MHNPFDCAA SYRPIYRGKP VEKCPLSGAC
1201 YSPEFKGQIC RVTTVTEIGK DVIGLRISPL QFR

Figura 43. Secuencia de la subunidad α del complejo del coatómero. Los péptidos identificados que solapan con la secuencia se marcan en rojo.

Estos resultados nos encaminan al análisis del complejo del coatómero y a su interacción con TACE con el objetivo de examinar si este complejo, también denominado COP-I, tiene un papel en la función de TACE.

COP-I: ¿POSIBLE FACTOR IMPLICADO EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE?

La formación de vesículas de transporte así como la incorporación selectiva de proteínas (carga) dentro de estas vesículas son procesos mediados por proteínas específicas que recubren las membranas celulares, también llamadas “*protein coats*” (Bonifacino y Lippincott-Schwartz, 2003). COP-I es un complejo proteico formado por distintas subunidades que recubre las vesículas que se encargan del transporte retrógrado, es decir, transportan proteínas desde el complejo de Golgi de vuelta al retículo endoplasmático (Letourneur *et al.*, 1994).

Con el objetivo de comprobar la interacción real entre COP-I y el dominio citosólico de TACE y aunque tanto la subunidad α como la subunidad β parece que interaccionan con este dominio, conseguimos un anticuerpo que reconoce la subunidad α del COP-I y realizamos experimentos en los que incubamos GST y GST-TACE (dominio citosólico) con lisados de células SKBR3 y MDAMB 435S. El producto de la incubación concentrado con glutation seferosa se carga en un gel de electroforesis y se realiza un Western-blot con anticuerpos específicos anti-COP-I (Figura 44).

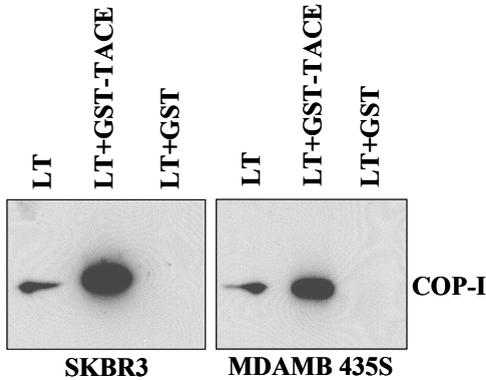


Figura 44 Interacción in vitro de COP-I y el dominio citosólico de TACE. Lisados de células MDAMB 435S y SKBR3 se incubaron con 10 μ l de GST y 20 μ l de GST-TACE (dominio citosólico) inmovilizadas con glutatión sefarosa. LT: lisado total previo a la incubación. LT+ GST-TACE: lisado total incubado con GST-TACE (dominio citosólico). LT+ GST: lisado total incubado con GST. Las muestras se cargaron en un gel de electroforesis y se analizaron por Western blot con un anticuerpo policlonal contra COP-I.

Los resultados muestran que existe una interacción in vitro entre el dominio citosólico de TACE unido a GST y COP-I de las células MDAMB 435S y SKBR3.

A partir de todos estos resultados, nuestro siguiente objetivo será analizar si la interacción entre COP-I y el dominio citosólico de TACE ocurre *in vivo*. También, delimitaremos la región del dominio citosólico que es la responsable de la interacción específica con COP-I y analizaremos el comportamiento de construcciones de TACE sin el dominio citosólico.

En el futuro se debería confirmar si la interacción entre COP-I y el dominio citosólico de TACE es clave para la regulación del tráfico intracelular de la metaloproteasa a través de la vía secretora.

Discusión

DISCUSIÓN

El fenotipo de los ratones TACE^{ΔZn/ΔZn} (con una delección en el gen de TACE generando una proteína inactiva) y las células que derivan de ellos, muestran que TACE es esencial en el desarrollo de estos animales y es responsable del *shedding* de un gran número de proteínas de membrana de función y estructuras muy distintas (Black *et al.*, 1997; Buxbaum *et al.*, 1998; Merlos-Suarez *et al.*, 1998; Peschon *et al.*, 1998; Althoff *et al.*, 2000; Garton *et al.*, 2001; Merlos-Suarez *et al.*, 2001). Dada esta variedad de sustratos, es razonable conjeturar que la actividad de TACE estará bajo un riguroso control para prevenir la proteólisis no deseada. No obstante, se conoce poco acerca de los mecanismos responsables de la regulación de la actividad de TACE. Asimismo, aunque se conoce desde hace mucho que el *shedding* es un proceso regulado (Pandiella y Massague, 1991), no se conoce a qué nivel (o niveles) se regula la actividad de TACE. Algunas evidencias muestran que TACE se regula a nivel transcripcional, detectándose un aumento del ARNm de la metaloproteasa en algunas enfermedades tales como artritis reumática, infarto agudo de miocardio y cáncer (Patel *et al.*, 1998; Amin, 1999; Akatsu *et al.*, 2003; Lendeckel *et al.*, 2005). Sin embargo, la gran mayoría de los trabajos apuntan a que la regulación de la actividad de TACE ocurre a nivel post-traduccional, aunque no se conoce exactamente como (para una revisión, ver Black, 2002). En este trabajo hemos descrito que el tráfico intracelular de TACE puede regular su actividad. Probablemente, este mecanismo regula el *shedding* de ectodominios mediado por TACE a través de la salida de la metaloproteasa de compartimentos tempranos de la vía secretora.

CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MUTANTE M2.

De entre los sustratos de TACE (ver degradoma, Tabla 2 de la introducción), el proTGF- α es uno de los más estudiados (para una revisión ver Arribas y Borroto, 2002). Con el objetivo de caracterizar los mecanismos que regulan el *shedding* de este factor de crecimiento, utilizamos como herramienta una línea celular denominada M2 cuyas características principales son la deficiencia en el *shedding* activado no sólo de proTGF- α (Arribas y Massague, 1995), sino de una gran variedad de proteínas de la superficie celular tales como la β -APP, L-selectina, IL-6R, proTNF- α , EGF, p75^{NTR}, Fracktalquina, proHB-EGF y PAR1 (Arribas y Massague,

1995; Arribas *et al.*, 1996; Merlos-Suarez *et al.*, 1998; Merlos-Suarez *et al.*, 2001; Tsou *et al.*, 2001; Borrell-Pages *et al.*, 2003; Le Gall *et al.*, 2003; Ludeman *et al.*, 2004; Weskamp *et al.*, 2004). Muchas de estas proteínas también tienen un *shedding* defectivo en las células derivadas de los ratones genéticamente modificados, que carecen de TACE activa (TACE ^{Δ Zn/ Δ Zn}) (Black *et al.*, 1997; Buxbaum *et al.*, 1998; Peschon *et al.*, 1998; Althoff *et al.*, 2000; Garton *et al.*, 2001; Merlos-Suarez *et al.*, 2001; Weskamp *et al.*, 2004). Dada la similitud entre el fenotipo de las células M2 y el de las células derivadas de los ratones TACE ^{Δ Zn/ Δ Zn}, el defecto en esta línea celular mutante podría estar relacionado directamente con TACE o con algún factor necesario para su actividad.

TACE EN LAS CÉLULAS M2

Generalmente, TACE se detecta como dos formas que corresponden a la proforma, inactiva que contiene el prodominio y que se encuentra en compartimentos tempranos de la vía secretora (proTACE) y la forma procesada, potencialmente activa, que es la única que se detecta en la superficie celular (TACE procesada) (Schlondorff *et al.*, 2000). La única forma que nosotros detectamos en la línea celular mutante M2 es la proforma de TACE. Los experimentos de marcaje metabólico y cazas a diferentes tiempos muestran que, a diferencia de la situación en células silvestres, en las células M2 la proforma de TACE se degrada con el tiempo y nunca llega a procesarse a niveles detectables. Este resultado sugiere que las células M2 tienen un defecto en el procesamiento de proTACE. Este resultado nos condujo a analizar si las proproteínas convertasas son las responsables del procesamiento de proTACE y si son éstas las que están alteradas en las células mutantes M2.

LAS PROPROTEÍNAS CONVERTASAS EN LAS CÉLULAS M2.

Se ha descrito que para muchas metaloproteasas de la familia ADAMs, la proforma se procesa por proproteínas convertasas tipo Furina (Loechel *et al.*, 1998; Lum *et al.*, 1998; Roghani *et al.*, 1999). El análisis que realizamos de las formas de TACE en las células LoVo (deficientes en la actividad de Furina) y en células que sobre-expresan un inhibidor de proproteínas convertasas (α_1 -PDX), mostró que el procesamiento de TACE ocurre principalmente por Furina y, en su ausencia, por otras proproteínas convertasas. Los experimentos realizados usando endoglicosidasa H, para diferenciar qué formas de TACE se

encuentran en el retículo endoplasmático y el *cis*-Golgi y cuales han alcanzado compartimentos posteriores al *trans*-Golgi, revelan que, en células que contienen Furina, el proTACE se procesa casi inmediatamente después de la salida de compartimentos tempranos de la vía secretora ya que no se detecta proTACE resistente a la glicosidasa. Sin embargo, en las células LoVo, una fracción de la proforma de TACE es resistente a EndoH, indicando que en ausencia de Furina, proTACE se procesa por otras convertasas, pero menos eficientemente. Todos estos datos indican que, al igual que otras ADAMs, TACE se procesa por Furina y en su ausencia por otras convertasa. Además, estos resultados están en concordancia con otros trabajos publicados posteriormente donde se describe que la Furina procesa *in vitro* e *in vivo* proTACE en la secuencia (Arg-Val-Lys-Arg-↓-Arg) (Peiretti *et al.*, 2003a) y que otras convertasas pueden eliminar el prodominio de TACE (Endres *et al.*, 2003; Srouf *et al.*, 2003). No obstante, nuestros resultados indican que el hecho de que proTACE no se procese en las células M2 no es debido a una deficiencia en la actividad de las proproteínas convertasas. Dos tipos de evidencias son las que muestran que estas convertasas no están alteradas en las células M2. En primer lugar, experimentos de transfecciones transitorias de diversas proproteínas convertasas en las células M2 no consiguen que proTACE se procese. En segundo lugar, otras metaloproteasas cuyo procesamiento es dependiente de la actividad de proproteínas convertasas tales como ADAM 10, ADAM 9, MT1-MMP o ADAM-TS1 (Roghani *et al.*, 1999; Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2000; Yana y Weiss, 2000; Anders *et al.*, 2001), se procesan correctamente en las células M2. Estos resultados indican que las proproteínas convertasas son activas en las células M2 y que por lo tanto el defecto en el procesamiento de TACE está relacionado con otro factor.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TACE EN LAS CÉLULAS M2

A continuación, decidimos analizar la localización intracelular de proTACE en células silvestres y M2 y observamos que se encontraba en compartimentos tempranos de la vía secretora a juzgar por la sensibilidad al tratamiento con EndoH. Estos resultados indican que el defecto de las células M2 afecta a la salida de proTACE de compartimentos tempranos de la vía secretora y sugieren que el defecto en las células M2 afecta directamente a proTACE o bien a algún factor necesario para su transporte intracelular.

Otras metaloproteasas con características similares a TACE como ADAM 10, ADAM 9, MT1-MMP y ADAMTS-1, (Roghani *et al.*, 1999; Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2000; Yana y Weiss, 2000; Anders *et al.*, 2001) se procesan correctamente y alcanzan la superficie celular en las células M2. Por lo tanto, el factor alterado en estas células mutadas no es un elemento común en el tráfico intracelular de distintas metaloproteasas sino que se trata de TACE o de un factor específico necesario para el tráfico correcto de TACE.

Recientemente, trabajos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que, aunque mediante secuenciación automática no se observaron diferencias en la secuencia de TACE entre las células CHO y M2, la inspección visual en detalle del electroforetograma mostró que en las células M2, TACE contiene dos mutaciones puntuales heterocigotas en las posiciones 674 y 1799, respectivamente. El análisis de los clones individuales mostró que las células M2 expresan dos formas mutantes de TACE que dan lugar a una sustitución de la Cys-225 a Tyr y de Cys-600 a Tyr, respectivamente. Estos resultados abren la posibilidad de que mutaciones puntuales en TACE son las responsables de la deficiencia en el tráfico intracelular de esta metaloproteasa (Villanueva de la Torre *et al.*, 2004). Además, estos resultados resaltan el hecho de que los primeros pasos de la progresión de TACE a través de la ruta secretora parecen ser críticos para la activación correcta de la metaloproteasa (Villanueva de la Torre *et al.*, 2004).

Todas estas observaciones avalan el uso de las células M2 como una herramienta para estudiar el tráfico intracelular de TACE, ya que la regulación de este tráfico es un punto esencial para controlar su actividad.

TRÁFICO INTRACELULAR DE TACE

Una vez caracterizado que en la línea celular mutante M2 no hay actividad de TACE debido a un defecto en su tráfico intracelular, decidimos estudiar si el transporte de la metaloproteasa está regulado *in vivo*. Teniendo en cuenta que la forma madura de TACE debe estar anclada en la superficie celular para cortar proteolíticamente sus sustratos (Reddy *et al.*, 2000), la regulación de podría ser crítica para la regulación de su actividad.

Recientemente se ha descrito un mecanismo de regulación de la actividad de una proteína a través del control de su tráfico intracelular, de manera similar al mecanismo propuesto en este trabajo. El nuevo mecanismo regula la actividad de dos receptores: Frizzle (con siete dominios transmembrana) y FGFR (receptor tirosina quinasa) que interactúan con sus ligandos Wnt y FGF respectivamente, (Yamamoto *et al.*, 2005). El descubrimiento de una nueva proteína llamada Shisa, que también tiene homólogos en humanos, actúa a través de la retención de estos receptores en el retículo endoplasmático inhibiendo la posibilidad de interactuar con sus ligandos y activarse (Yamamoto *et al.*, 2005). La sobre-expresión de Shisa causa el mismo fenotipo que inhibidores de Wnt o FGF. Shisa es una proteína que se encuentra en el retículo endoplasmático y que se secreta al medio extracelular. La inhibición del transporte de los receptores no sucede cuando shisa se secreta al medio sino cuando se expresa en la misma célula que los receptores.

REGULACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE TACE

Los resultados obtenidos al analizar un panel amplio de líneas celulares, mostraron que la relación entre las dos formas de TACE (proTACE y TACE procesada) es variable dependiendo del tipo celular. Algunas de estas líneas son de origen tumoral (MDA-MB 231, MDA-MB 361, MDA-MB 435S, MDA-MB 453, MDA-MB 468, MCF-7, T47-D, BT4T4, SKBR-3 y NCI-H292) mientras que otras no (COS, RPE 40 y NIH 3T3). La línea celular RPE 40 carece de Furina activa, pero como se ha descrito anteriormente, otras convertasas son capaces de procesar proTACE (resultados derivados de este trabajo y Endres *et al.*, 2003; Srouf *et al.*, 2003). En todas las líneas celulares analizadas la relación entre las formas de TACE es variable, mientras que en unas líneas la forma mayoritaria es la procesada (T47-D y SKBR-3), en otras es la proforma de TACE (MDA-MB 435S). Estas diferencias no se pueden asociar a diferencias en la actividad de las proproteínas convertasas como ocurría con las células LoVo ya que para la mayoría de estas líneas está descrita la actividad de Furina y otras convertasas (Imai *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1997; Yana y Weiss, 2000). También hemos observado estas diferencias entre las formas de TACE en distintas muestras de tejidos tumorales de mama humanos. Estas diferencias, que no son debidas a la confluencia, la presencia de UTRs o la temperatura, en los tipos celulares indican que el procesamiento de proTACE puede ser regulado *in vivo*. El papel de TACE en el desarrollo y progresión tumoral

se está llevando a cabo en nuestro laboratorio mediante la realización de ratones transgénicos que expresan la metaloproteasa en la glándula mamaria.

De acuerdo con nuestros experimentos de marcaje metabólico y cazas a distintos tiempos, las diferencias en el procesamiento de proTACE, se deben a diferencias en la velocidad de tráfico intracelular de la metaloproteasa. En determinadas líneas celulares, proTACE apenas se procesa porque se retiene en compartimentos tempranos de la vía secretora a juzgar por los experimentos de resistencia a EndoH. De nuevo, el mecanismo que regula la cantidad de TACE procesada mediante su retención en compartimentos tempranos de la ruta secretora se observa *in vivo*. El uso de las distintas líneas celulares donde se observa una regulación diferencial del procesamiento de TACE, que no es debida a la actividad de las convertasas, ni a mutaciones en TACE, son una herramienta para estudiar el tráfico intracelular de TACE.

REGULACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE ADAM 10

TACE comparte una gran similitud con ADAM 10, respecto a su secuencia (21% de homología), su estructura y funcionalidad (Fahrenholz *et al.*, 2000; Blobel, 2002). De manera similar a TACE, ADAM 10 se describió como una metaloproteasa implicada en el *shedding* de TNF- α (Lunn *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Como TACE y el resto de las ADAMs, proADAM 10 se procesa por proproteínas convertasas que reconocen la secuencia RKKR localizada entre el prodominio y el dominio metaloproteasa (Anders *et al.*, 2001). El mecanismo que controla el tráfico de TACE, podría ser común al que controla el de ADAM 10. Recientemente se ha descrito el papel de inhibidores de acetilcolinesterasas en la inducción del tráfico hacia la membrana plasmática de ADAM 10 y en la inducción del *shedding* de la β -APP en células de neuroblastoma (Zimmermann *et al.*, 2004). En nuestro trabajo realizamos un análisis de las formas de ADAM 10 en distintas líneas celulares sin estimular con ningún compuesto. El resultado de este estudio mostró que existe una relación variable entre las dos formas de ADAM 10 (proADAM 10 / ADAM 10 procesada) de manera similar a como ocurre con las formas de TACE, es decir, los niveles de ADAM 10 procesada correlacionan bien con los de TACE procesada. No obstante, ninguna de las células analizadas mostró niveles tan elevados de procesamiento de ADAM 10 como de TACE.

Estos resultados abren la posibilidad de que alguno(s) de los componentes de la maquinaria que regulan el transporte de proTACE y proADAM 10 sean comunes y apuntan a que las

metaloproteasas de la familia ADAMs regulen su actividad proteolítica a través de este mecanismo.

El efecto de distintos compuestos sobre el transporte de las ADAMs podrá ayudar a inducir si la regulación del tráfico puede ser activada.

CARACTERIZACIÓN DEL TRÁFICO DE TACE.

SOBRE-EXPRESIÓN DE TACE

Los resultados hasta ahora mostrados nos conducen a proponer que el tráfico de TACE está regulado *in vivo*. No obstante, se conoce poco acerca del mecanismo y de los factores que intervienen en este proceso. Los resultados que hemos obtenido al estudiar el funcionamiento de este mecanismo nos han mostrado que al menos alguno de los factores que regulan el transporte de TACE es altamente saturable. La sobre-expresión de la metaloproteasa causa un aumento dramático de la proforma, mientras que la forma procesada no varía apenas. La proforma se localiza invariablemente e independientemente de los niveles de expresión en compartimentos tempranos de la vía secretora, sugiriendo que el exceso de proTACE se queda retenido en el ER. Una hipótesis que explicaría estos resultados es que sólo un número, determinado por el factor saturable, de moléculas de la metaloproteasa pueden procesarse y ser potencialmente activas en un determinado tipo celular. La saturación del tráfico de TACE ha sido también descrita, además de por nuestro grupo, por otros autores (Slack *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2003; Peiretti *et al.*, 2003b; Li y Fan, 2004; Villanueva de la Torre *et al.*, 2004). Para determinar si TACE posee una secuencia responsable de su retención en el RE transfectamos diversas delecciones de TACE. Nuestros resultados muestran que cualquier construcción de TACE, con uno o más dominios delecionados se retiene en compartimentos tempranos de la vía secretora cuando se sobre-expresa de manera transitoria, sugiriendo que no existe una señal única en un dominio que sea la responsable de su retención. No obstante, se ha descrito que, a diferencia de la molécula completa, construcciones de TACE con delecciones del dominio citosólico y transmembrana se transportan eficientemente (Milla *et al.*, 1999). Sin embargo, estos experimentos se han realizado infectando células de insecto, un sistema ampliamente utilizado para la purificación de grandes cantidades de proteína pero que pudiera no reflejar la situación en mamíferos. De manera similar se consiguió cristalizar el dominio metaloproteasa de TACE, transfectando

una construcción de TACE que codifica únicamente el prodominio y el dominio metaloproteasa (Maskos *et al.*, 1998). Por este motivo y a diferencia de lo que nosotros detectamos, cabe la posibilidad de que la retención que detectamos cuando transfectamos de manera transitoria tenga que ver con el sistema de transfección, puesto que aparentemente en transfecciones en estable, TACE se comporta de manera más fisiológica. De todas formas, esto no afectaría a lo que le ocurre a la molécula completa de TACE.

Recientemente, trabajos realizados en este laboratorio han mostrado que el acúmulo de la proforma de TACE disminuye al transfectar las células de manera estable, indicando que el porcentaje de células transfectadas y los niveles de expresión determinan la actividad de la metaloproteasa en cada conjunto de experimentos. Así, en transfecciones que resultan en un alto porcentaje de células que expresan cantidades moderadas de la metaloproteasa, se detecta la forma procesada de TACE. Sin embargo, en transfecciones que resultan en un bajo porcentaje de células expresando elevados niveles de la metaloproteasa, no se detecta esta forma (Villanueva de la Torre *et al.*, 2004).

SOBRE-EXPRESIÓN DE OTRAS ADAMs

El hecho de que el mecanismo que controla la salida de compartimentos tempranos de la vía secretora de proTACE, pueda ser un mecanismo compartido con otras ADAMs, no implica que los factores involucrados en este proceso, tengan la misma afinidad por unas metaloproteasas que por otras. Esta diferencia en la afinidad podría explicar porqué los factores implicados en el transporte se saturan cuando se sobre-expresa TACE y no cuando se sobre-expresa otra metaloproteasa de la misma familia como ADAM 9.

INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TACE

Otros datos que refuerzan la hipótesis de que el mecanismo que regula el tráfico de TACE es saturable son los datos obtenidos de manera complementaria a los experimentos de sobre-expresión: la inhibición parcial de la síntesis de TACE mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi) disminuye fundamentalmente los niveles de proTACE, mientras que la forma procesada se mantiene invariable. De nuevo, estos resultados indican que en una determinada línea celular el mecanismo que controla la progresión de TACE es limitado de tal manera que sólo un número predeterminado de moléculas de la proteasa pueden procesarse y

llegar a la membrana plasmática. De esta manera, la célula controla el número de moléculas potencialmente activas evitando así una proteólisis no deseada. Si el número de moléculas de la proteasa aumenta o simplemente es mayor al número de moléculas que pueden salir de compartimentos tempranos de la vía secretora, la célula responde acumulando las moléculas en su proforma. Al disminuir la cantidad de moléculas de TACE, desaturamos el mecanismo de tal manera que el procesamiento es el mismo pero el acúmulo de proTACE disminuye. Con este tipo de experimentos no disminuimos la actividad de TACE porque la forma procesada es constante, pero nos sirve para explicar que el mecanismo de regulación se encuentra a nivel de su transporte y que es altamente saturable.

POSIBLES FACTORES IMPLICADOS EN EL MECANISMO DE RETENCIÓN DE TACE

El retículo endoplasmático y el complejo de Golgi comprenden los dos primeros pasos en la secreción de proteínas. Los transportadores vesiculares median un flujo continuo de proteínas y lípidos entre estos compartimentos, de tal manera que transportan las proteínas recién sintetizadas desde el retículo endoplasmático (transporte anterógrado) y la vuelta de la proteínas que se escapan del retículo endoplasmático (transporte retrógrado). El transporte anterógrado y retrógrado viene mediado por distintos tipos de vesículas cubiertas con distintas proteínas llamadas “*proteins coats*” COP-II y COP-I respectivamente, las cuales actúan sobre la membrana de las vesículas para capturar las proteínas del cargo.

COP-I

La interacción entre COP-I y el dominio citosólico de TACE *in vitro*, podría explicar porque el exceso de la metaloproteasa se queda retenido en compartimentos tempranos de la vía secretora. En situaciones de equilibrio, cada célula tiene la maquinaria capaz de hacer progresar a través de la ruta secretora un número determinado de moléculas de TACE. La hipótesis sería que el dominio citosólico de las moléculas de TACE interacciona con un factor desconocido limitante que impide que este interaccione con COP-I. Cuando el número de moléculas de TACE aumenta, el factor limitante se satura y el dominio citosólico queda libre para unirse a COP-I de tal manera que la proteasa vuelve al retículo endoplasmático (Figura 44).

Esta hipótesis explicaría porque en determinados tipos celulares tengan un mecanismo más o menos eficiente en la progresión de TACE a través de la ruta secretora.

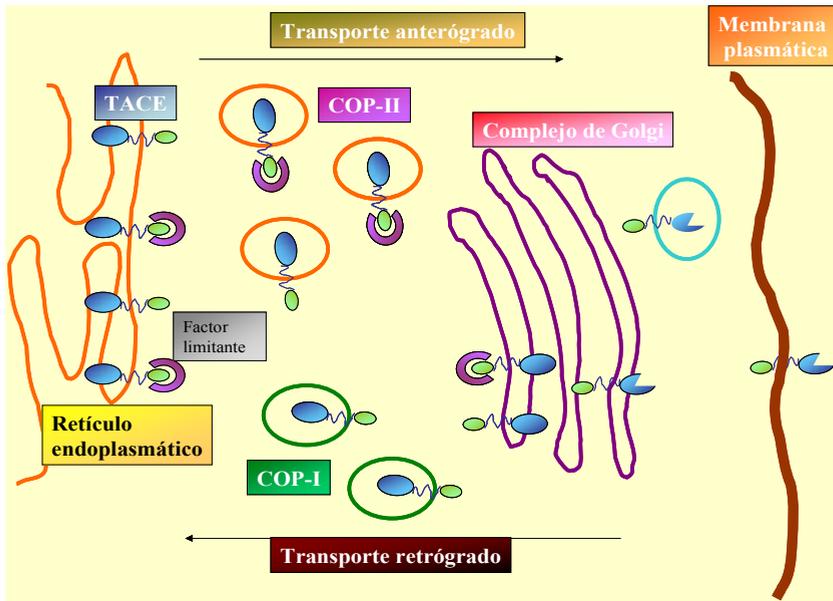


Figura 44. Posible mecanismo de regulación del transporte de TACE. Todas las moléculas de TACE que se sintetizan salen del retículo endoplasmático en vesículas COP-II (transporte anterógrado), pero sólo aquellas que no tienen el factor limitante unido al dominio citosólico de TACE vuelven al retículo endoplasmático en vesículas COP-I (transporte retrógrado). El factor que se une al dominio citosólico de TACE es un factor limitante que regula la salida y progresión de TACE a través de la ruta secretora. Cuando este factor se satura el dominio citosólico de TACE interactúa con COP-I y es transportado de vuelta al retículo endoplasmático.

En general, los resultados mostrados en este trabajo indican la existencia de un mecanismo que controla específicamente la actividad de TACE a través de su tráfico intracelular. Un aumento de la actividad de TACE supone un incremento en el corte proteolítico de sus sustratos como por ejemplo el proTGF- α lo que conduciría a una producción de TGF- α soluble que interactúa y activa al EGFR.

El control de la actividad de TACE impediría un exceso de proteólisis no deseada que es la causa de enfermedades inflamatorias, el Alzheimer y el cáncer. Obviamente, la identificación de los componentes que permiten la salida de TACE de compartimentos tempranos de la vía

secretora regulando consecuentemente su procesamiento y activación será el siguiente paso en entender este mecanismo de control.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1.- El defecto en la línea celular mutante M2, radica en un bloqueo del tráfico de proTACE, lo que conduce a un acúmulo de la metaloproteasa inactiva en compartimentos tempranos de la ruta secretora.
- 2.- La eficiencia del procesamiento de TACE varía en distintas líneas celulares. Invariablemente, el procesamiento parece estar acoplado a la salida de proTACE de compartimentos tempranos de la vía secretora, indicando que la progresión de la metaloproteasa a través de dichos compartimentos está regulada.
- 3.- El mecanismo que regula el tráfico intracelular de TACE está mediado por al menos un factor saturable.
- 4.- COP-I, una proteína de las cubiertas de vesículas de transporte retrógrado, interacciona *in vitro* con el dominio citosólico de TACE, sugiriendo su papel en el acúmulo de la metaloproteasa en compartimentos tempranos de la vía secretora.

Referencias

REFERENCIAS

- Ahmad, A., J. F. Marshall, P. Basset, P. Anglard y I. R. Hart (1997). "Modulation of human stromelysin 3 promoter activity and gene expression by human breast cancer cells." *Int J Cancer* **73**(2): 290-6.
- Akatsu, T., M. Nakamura, M. Satoh y K. Hiramori (2003). "Increased mRNA expression of tumour necrosis factor-alpha and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction." *Clin Sci (Lond)* **105**(1): 39-44.
- Allinson, T. M., E. T. Parkin, A. J. Turner y N. M. Hooper (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J Neurosci Res* **74**(3): 342-52.
- Althoff, K., P. Reddy, N. Voltz, S. Rose-John y J. Mullberg (2000). "Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins." *Eur J Biochem* **267**(9): 2624-31.
- Althoff, K., J. Mullberg, D. Aasland, N. Voltz, K. Kallen, J. Grotzinger y S. Rose-John (2001). "Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins." *Biochem J* **353**(Pt 3): 663-72.
- Amin, A. R. (1999). "Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* **7**(4): 392-4.
- Anders, A., S. Gilbert, W. Garten, R. Postina y F. Fahrenholz (2001). "Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases." *Faseb J* **15**(10): 1837-9.
- Argast, G. M., J. S. Campbell, J. T. Brooling y N. Fausto (2004). "Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication." *J Biol Chem*.
- Arribas, J. y J. Massague (1995). "Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism." *J Cell Biol* **128**(3): 433-41.
- Arribas, J., L. Coodly, P. Vollmer, T. K. Kishimoto, S. Rose-John y J. Massague (1996). "Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors." *J Biol Chem* **271**(19): 11376-82.
- Arribas, J., F. Lopez-Casillas y J. Massague (1997). "Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding." *J Biol Chem* **272**(27): 17160-5.
- Arribas, J. y A. Borroto (2002). "Protein ectodomain shedding." *Chem Rev* **102**(12): 4627-38.

- Arribas, J. y A. Merlos-Suarez (2003). "Shedding of plasma membrane proteins." *Curr Top Dev Biol* **54**: 125-44.
- Bax, D. V., A. J. Messent, J. Tart, M. Van Hoang, J. Kott, R. A. Maciewicz y M. J. Humphries (2004). "Integrin alpha 5beta 1 and TNFalpha converting enzyme (TACE/ADAM-17) interact in vitro and colocalise in migrating HeLa cells." *J Biol Chem*.
- Bergeron, E., A. Basak, E. Decroly y N. G. Seidah (2003). "Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage." *Biochem J* **373**(Pt 2): 475-84.
- Bergmeier, W., C. L. Piffath, G. Cheng, V. S. Dole, Y. Zhang, U. H. von Andrian y D. D. Wagner (2004). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/alpha shedding from platelets in vitro and in vivo." *Circ Res* **95**(7): 677-83.
- Biggs, J. R., J. E. Kudlow y A. S. Kraft (1996). "The role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the WAF1/CIP1 gene in U937 leukemic cells." *J Biol Chem* **271**(2): 901-6.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March y D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." *Nature* **385**(6618): 729-33.
- Black, R. A. y J. M. White (1998). "ADAMs: focus on the protease domain." *Curr Opin Cell Biol* **10**(5): 654-9.
- Black, R. A. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(1): 1-5.
- Blobel, C. P. (2000). "Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface." *Curr Opin Cell Biol* **12**(5): 606-12.
- Blobel, C. P. (2002). "Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding." *Inflamm Res* **51**(2): 83-4.
- Bonifacino, J. S. y J. Lippincott-Schwartz (2003). "Coat proteins: shaping membrane transport." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(5): 409-14.
- Bonifacino, J. S. y B. S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." *Cell* **116**(2): 153-66.
- Borrell-Pages, M., J. Fernandez-Larrea, A. Borroto, F. Rojo, J. Baselga y J. Arribas (2000). "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.

- Borrell-Pages, M., F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga y J. Arribas (2003). "TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors." *Embo J* **22**(5): 1114-24.
- Bosenberg, M. W., A. Pandiella y J. Massague (1992). "The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid specifies cleavage of membrane TGF alpha into soluble growth factor." *Cell* **71**(7): 1157-65.
- Brakebusch, C., E. E. Varfolomeev, M. Batkin y D. Wallach (1994). "Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptor." *J Biol Chem* **269**(51): 32488-96.
- Budagian, V., E. Bulanova, Z. Orinska, A. Ludwig, S. Rose-John, P. Saftig, E. C. Borden y S. Bulfone-Paus (2004). "Natural soluble IL-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)." *J Biol Chem*.
- Buxbaum, J. D., S. E. Gandy, P. Cicchetti, M. E. Ehrlich, A. J. Czernik, R. P. Fracasso, T. V. Ramabhadran, A. J. Unterbeck y P. Greengard (1990). "Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15): 6003-6.
- Buxbaum, J. D., M. Oishi, H. I. Chen, R. Pinkas-Kramarski, E. A. Jaffe, S. E. Gandy y P. Greengard (1992). "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.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti y R. A. Black (1998). "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.
- Bzowska, M., N. Jura, A. Lassak, R. A. Black y J. Bereta (2004). "Tumour necrosis factor-alpha stimulates expression of TNF-alpha converting enzyme in endothelial cells." *Eur J Biochem* **271**(13): 2808-20.
- Cheng, M., P. H. Watson, J. A. Paterson, N. Seidah, M. Chretien y R. P. Shiu (1997). "Protein convertase gene expression in human breast cancer." *Int J Cancer* **71**(6): 966-71.
- Contin, C., V. Pitard, T. Itai, S. Nagata, J. F. Moreau y J. Dechanet-Merville (2003). "Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling." *J Biol Chem* **278**(35): 32801-9.
- Cosson, P. y F. Letourneur (1994). "Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs." *Science* **263**(5153): 1629-31.
- Dalglish, G. D., J. L. Veyrone, N. Accornero, J. M. Blanchard y J. E. Hesketh (1999). "Localisation of a reporter transcript by the c-myc 3'-UTR is linked to translation." *Nucleic Acids Res* **27**(22): 4363-8.

- Datta, R., K. Yoshinaga, M. Kaneki, P. Pandey y D. Kufe (2000). "Phorbol ester-induced generation of reactive oxygen species is protein kinase cbeta -dependent and required for SAPK activation." *J Biol Chem* **275**(52): 41000-3.
- Daub, H., F. U. Weiss, C. Wallasch y A. Ullrich (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* **379**(6565): 557-60.
- Daub, H., C. Wallasch, A. Lankenau, A. Herrlich y A. Ullrich (1997). "Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor." *Embo J* **16**(23): 7032-44.
- Diaz-Rodriguez, E., J. C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste y A. Pandiella (2002). "Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding." *Mol Biol Cell* **13**(6): 2031-44.
- Doedens, J. R. y R. A. Black (2000). "Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." *J Biol Chem* **275**(19): 14598-607.
- Doedens, J. R., R. M. Mahimkar y R. A. Black (2003). "TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation." *Biochem Biophys Res Commun* **308**(2): 331-8.
- Dolnik, O., V. Volchkova, W. Garten, C. Carbonnelle, S. Becker, J. Kahnt, U. Stroher, H. D. Klenk y V. Volchkov (2004). "Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus." *Embo J*.
- Duden, R. (2003). "ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review)." *Mol Membr Biol* **20**(3): 197-207.
- Duffy, M. J., D. J. Lynn, A. T. Lloyd y C. M. O'Shea (2003). "The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications." *Thromb Haemost* **89**(4): 622-31.
- Endres, K., A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz y R. Postina (2003). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation." *Eur J Biochem* **270**(11): 2386-93.
- Fahrenholz, F., S. Gilbert, E. Kojro, S. Lammich y R. Postina (2000). "Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure." *Ann N Y Acad Sci* **920**: 215-22.
- Fan, H. y R. Derynck (1999). "Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades." *Embo J* **18**(24): 6962-72.

- Fan, H., C. W. Turck y R. Derynck (2003). "Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor- α converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide." *J Biol Chem* **278**(20): 18617-27.
- Fischer, O. M., S. Hart, A. Gschwind y A. Ullrich (2003). "EGFR signal transactivation in cancer cells." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 6): 1203-8.
- Fischer, O. M., S. Giordano, P. M. Comoglio y A. Ullrich (2004). "Reactive oxygen species mediate met receptor transactivation by GPCRs and the EGFR in human carcinoma cells." *J Biol Chem*.
- Franzke, C. W., K. Tasanen, H. Schacke, Z. Zhou, K. Tryggvason, C. Mauch, P. Zigrino, S. Sunnarborg, D. C. Lee, F. Fahrenholz y L. Bruckner-Tuderman (2002). "Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs." *Embo J* **21**(19): 5026-35.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, J. P. Albar, F. Sanchez-Madrid y A. G. Arroyo (2001). "Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling." *J Biol Chem* **276**(40): 37491-500.
- Garton, K. J., P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey y E. W. Raines (2001). "Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)." *J Biol Chem* **276**(41): 37993-8001.
- Garton, K. J., P. J. Gough, J. Philalay, P. T. Wille, C. P. Blobel, R. H. Whitehead, P. J. Dempsey y E. W. Raines (2003). "Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM 17)." *J Biol Chem* **278**(39): 37459-64.
- Gaynor, E. C., S. te Heesen, T. R. Graham, M. Aebi y S. D. Emr (1994). "Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast." *J Cell Biol* **127**(3): 653-65.
- Gaynor, E. C., T. R. Graham y S. D. Emr (1998). "COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way?" *Biochim Biophys Acta* **1404**(1-2): 33-51.
- Gechtman, Z., J. L. Alonso, G. Raab, D. E. Ingber y M. Klagsbrun (1999). "The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading." *J Biol Chem* **274**(40): 28828-35.
- Gomis-Ruth, F. X. (2003). "Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases." *Mol Biotechnol* **24**(2): 157-202.
- Gonzales, P. E., A. Solomon, A. B. Miller, M. A. Leesnitzer, I. Sagi y M. E. Milla (2004). "Inhibition of the TNF α converting enzyme (TACE) by its Pro domain." *J Biol Chem*.

- Gschwind, A., S. Hart, O. M. Fischer y A. Ullrich (2003). "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells." *Embo J* **22**(10): 2411-21.
- Guo, L., J. R. Eisenman, R. M. Mahimkar, J. J. Peschon, R. J. Paxton, R. A. Black y R. S. Johnson (2002). "A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases." *Mol Cell Proteomics* **1**(1): 30-6.
- Gutwein, P., S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel y D. P. Altevogt (2003). "ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles." *Faseb J* **17**(2): 292-4.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Hansen, H. P., S. Dietrich, T. Kisseleva, T. Mokros, R. Mentlein, H. H. Lange, G. Murphy y H. Lemke (2000). "CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme." *J Immunol* **165**(12): 6703-9.
- Hansen, H. P., A. Recke, U. Reineke, B. Von Tresckow, P. Borchmann, E. P. Von Strandmann, H. Lange, H. Lemke y A. Engert (2004). "The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5." *Faseb J* **18**(7): 893-5.
- Hart, S., O. M. Fischer y A. Ullrich (2004). "Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor." *Cancer Res* **64**(6): 1943-50.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura y P. Saftig (2002). "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.
- Hatsuzawa, K., M. Hosaka, T. Nakagawa, M. Nagase, A. Shoda, K. Murakami y K. Nakayama (1990). "Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells." *J Biol Chem* **265**(36): 22075-8.
- Hensley, L. L., G. Ranganathan, E. M. Wagner, B. D. Wells, J. C. Daniel, D. Vu, C. F. Semenkovich, R. Zechner y P. A. Kern (2003). "Transgenic mice expressing lipoprotein lipase in adipose tissue. Absence of the proximal 3'-untranslated region causes translational upregulation." *J Biol Chem* **278**(35): 32702-9.
- Hinkle, C. L., S. W. Sunnarborg, D. Loiselle, C. E. Parker, M. Stevenson, W. E. Russell y D. C. Lee (2004). "Selective roles for TACE/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family. The juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency." *J Biol Chem*.

- Hooper, N. M., E. H. Karran y A. J. Turner (1997). "Membrane protein secretases." *Biochem J* **321** (Pt 2): 265-79.
- Howard, L., X. Lu, S. Mitchell, S. Griffiths y P. Glynn (1996). "Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types." *Biochem J* **317** (Pt 1): 45-50.
- Hung, A. Y. y M. Sheng (2002). "PDZ domains: structural modules for protein complex assembly." *J Biol Chem* **277**(8): 5699-702.
- Imai, K., E. Ohuchi, T. Aoki, H. Nomura, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki y Y. Okada (1996). "Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2." *Cancer Res* **56**(12): 2707-10.
- Itai, T., M. Tanaka y S. Nagata (2001). "Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form." *Eur J Biochem* **268**(7): 2074-82.
- Izumi, Y., M. Hirata, H. Hasuwa, R. Iwamoto, T. Umata, K. Miyado, Y. Tamai, T. Kurisaki, A. Sehara-Fujisawa, S. Ohno y E. Mekada (1998). "A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor." *Embo J* **17**(24): 7260-72.
- Jean, F., K. Stella, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, A. J. Reason y G. Thomas (1998). "alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7293-8.
- Jolly-Tornetta, C. y B. A. Wolf (2000). "Protein kinase C regulation of intracellular and cell surface amyloid precursor protein (APP) cleavage in CHO695 cells." *Biochemistry* **39**(49): 15282-90.
- Kagan, A., Z. Yu, G. I. Fishman y T. V. McDonald (2000). "The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression." *J Biol Chem* **275**(15): 11241-8.
- Kahn, J., B. Walcheck, G. I. Migaki, M. A. Jutila y T. K. Kishimoto (1998). "Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism." *Cell* **92**(6): 809-18.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh y M. Seiki (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." *J Cell Biol* **153**(5): 893-904.
- Kjaer, S. y C. F. Ibanez (2003). "Intrinsic susceptibility to misfolding of a hot-spot for Hirschsprung disease mutations in the ectodomain of RET." *Hum Mol Genet* **12**(17): 2133-44.

- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich y P. Herrlich (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." *Embo J* **15**(19): 5314-25.
- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, T. C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki y S. Ishiura (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." *Biochem J* **343 Pt 2**: 371-5.
- Kornfeld, R. y S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* **54**: 631-64.
- Kozak, M. (1992). "Regulation of translation in eukaryotic systems." *Annu Rev Cell Biol* **8**: 197-225.
- Kuno, K., Y. Terashima y K. Matsushima (1999). "ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix." *J Biol Chem* **274**(26): 18821-6.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass y F. Fahrenholz (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3922-7.
- Lanni, C., M. Mazzucchelli, E. Porrello, S. Govoni y M. Racchi (2004). "Differential involvement of protein kinase C alpha and epsilon in the regulated secretion of soluble amyloid precursor protein." *Eur J Biochem* **271**(14): 3068-75.
- Laude, A. J. y I. A. Prior (2004). "Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking." *Mol Membr Biol* **21**(3): 193-205.
- Le Gall, S. M., R. Auger, C. Dreux y P. Mauduit (2003). "Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process." *J Biol Chem* **278**(46): 45255-68.
- Lee, M. C., E. A. Miller, J. Goldberg, L. Orci y R. Schekman (2004). "Bi-Directional Protein Transport between the Er and Golgi." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 87-123.
- Lendeckel, U., J. Kohl, M. Arndt, S. Carl-McGrath, H. Donat y C. Rocken (2005). "Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines." *J Cancer Res Clin Oncol* **131**(1): 41-8.
- Leonard, J. D., F. Lin y M. E. Milla (2004). "Chaperone-like properties of the prodomain of TACE and the functional role of its cysteine switch." *Biochem J*.

- Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman y P. Cosson (1994). "Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum." *Cell* **79**(7): 1199-207.
- Li, X. y H. Fan (2004). "Loss of ectodomain shedding due to mutations in the metalloprotease and cysteine-rich/disintegrin domains of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE)." *J Biol Chem*.
- Loechel, F., B. J. Gilpin, E. Engvall, R. Albrechtsen y U. M. Wewer (1998). "Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease." *J Biol Chem* **273**(27): 16993-7.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah y A. Israel (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8108-12.
- Longpre, J. M. y R. Leduc (2004). "Identification of prodomain determinants involved in ADAMTS-1 biosynthesis." *J Biol Chem* **279**(32): 33237-45.
- Lopez-Otin, C. y C. M. Overall (2002). "Protease degradomics: a new challenge for proteomics." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 509-19.
- Lopez-Perez, E., Y. Zhang, S. J. Frank, J. Creemers, N. Seidah y F. Checler (2001). "Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10." *J Neurochem* **76**(5): 1532-9.
- Ludeman, M. J., Y. W. Zheng, K. Ishii y S. R. Coughlin (2004). "Regulated shedding of PAR1 N-terminal exodomain from endothelial cells." *J Biol Chem* **279**(18): 18592-9.
- Luetkeke, N. C., T. H. Qiu, R. L. Peiffer, P. Oliver, O. Smithies y D. C. Lee (1993). "TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice." *Cell* **73**(2): 263-78.
- Lum, L., M. S. Reid y C. P. Blobel (1998). "Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15." *J Biol Chem* **273**(40): 26236-47.
- Lum, L., B. R. Wong, R. Josien, J. D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlondorff, P. Tempst, Y. Choi y C. P. Blobel (1999). "Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival." *J Biol Chem* **274**(19): 13613-8.
- Lunn, C. A., X. Fan, B. Dalie, K. Miller, P. J. Zavodny, S. K. Narula y D. Lundell (1997). "Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase." *FEBS Lett* **400**(3): 333-5.

- Mann, G. B., K. J. Fowler, A. Gabriel, E. C. Nice, R. L. Williams y A. R. Dunn (1993). "Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation." *Cell* **73**(2): 249-61.
- Maskos, K., C. Fernandez-Catalan, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, G. A. Ellestad, P. Reddy, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, B. J. Castner, R. Davis, H. R. Clarke, M. Petersen, J. N. Fitzner, D. P. Cerretti, C. J. March, R. J. Paxton, R. A. Black y W. Bode (1998). "Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3408-12.
- Massague, J. y A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." *Annu Rev Biochem* **62**: 515-41.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen y S. Rose-John (2003). "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)." *J Biol Chem* **278**(40): 38829-39.
- McGeehan, G. M., J. D. Becherer, R. C. Bast, Jr., C. M. Boyer, B. Champion, K. M. Connolly, J. G. Conway, P. Furdon, S. Karp, S. Kidao y et al. (1994). "Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor." *Nature* **370**(6490): 558-61.
- Merlos-Suarez, A., J. Fernandez-Larrea, P. Reddy, J. Baselga y J. Arribas (1998). "Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing." *J Biol Chem* **273**(38): 24955-62.
- Merlos-Suarez, A., S. Ruiz-Paz, J. Baselga y J. Arribas (2001). "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.
- Mezyk, R., M. Bzowska y J. Bereta (2003). "Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." *Acta Biochim Pol* **50**(3): 625-45.
- Miettinen, P. J., J. E. Berger, J. Meneses, Y. Phung, R. A. Pedersen, Z. Werb y R. Derynck (1995). "Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor." *Nature* **376**(6538): 337-41.
- Milla, M. E., M. A. Leesnitzer, M. L. Moss, W. C. Clay, H. L. Carter, A. B. Miller, J. L. Su, M. H. Lambert, D. H. Willard, D. M. Sheeley, T. A. Kost, W. Burkhart, M. Moyer, R. K. Blackburn, G. L. Pahel, J. L. Mitchell, C. R. Hoffman y J. D. Becherer (1999). "Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)." *J Biol Chem* **274**(43): 30563-70.
- Mizui, Y., K. Yamazaki, K. Sagane y I. Tanaka (1999). "cDNA cloning of mouse tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and partial analysis of its promoter." *Gene* **233**(1-2): 67-74.

- Mohan, M. J., T. Seaton, J. Mitchell, A. Howe, K. Blackburn, W. Burkhart, M. Moyer, I. Patel, G. M. Waite, J. D. Becherer, M. L. Moss y M. E. Milla (2002). "The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity." *Biochemistry* **41**(30): 9462-9.
- Montero, J. C., L. Yuste, E. Diaz-Rodriguez, A. Esparis-Ogando y A. Pandiella (2000). "Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." *Mol Cell Neurosci* **16**(5): 631-48.
- Montero, J. C., L. Yuste, E. Diaz-Rodriguez, A. Esparis-Ogando y A. Pandiella (2002). "Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases." *Biochem J* **363**(Pt 2): 211-21.
- Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer y et al. (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." *Nature* **385**(6618): 733-6.
- Moss, M. L., J. M. White, M. H. Lambert y R. C. Andrews (2001). "TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery." *Drug Discov Today* **6**(8): 417-426.
- Moss, M. L. y M. H. Lambert (2002). "Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases." *Essays Biochem* **38**: 141-53.
- Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P. C. Heinrich y S. Rose-John (1992). "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **189**(2): 794-800.
- Mullberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich y S. Rose-John (1994). "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site." *J Immunol* **152**(10): 4958-68.
- Mullberg, J., K. Althoff, T. Jostock y S. Rose-John (2000). "The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology." *Eur Cytokine Netw* **11**(1): 27-38.
- Murrell, G. A., D. Jang y R. J. Williams (1995). "Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage." *Biochem Biophys Res Commun* **206**(1): 15-21.
- Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara y H. Saya (2004). "Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca²⁺ influx and PKC activation." *J Cell Biol* **165**(6): 893-902.
- Nelson, K. K., J. Schlondorff y C. P. Blobel (1999). "Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor alpha convertase (TACE) with mitotic

arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2beta." *Biochem J* **343 Pt 3**: 673-80.

Nishimura, N. y W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." *Science* **277**(5325): 556-8.

Nufer, O., S. Guldbrandsen, M. Degen, F. Kappeler, J. P. Paccaud, K. Tani y H. P. Hauri (2002). "Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export." *J Cell Sci* **115**(Pt 3): 619-28.

Okamoto, T., T. Akaike, T. Nagano, S. Miyajima, M. Suga, M. Ando, K. Ichimori y H. Maeda (1997). "Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxyntirite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide." *Arch Biochem Biophys* **342**(2): 261-74.

Pagano, A., F. Letourneur, D. Garcia-Estefania, J. L. Carpentier, L. Orci y J. P. Paccaud (1999). "Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **274**(12): 7833-40.

Pandiella, A. y J. Massague (1991). "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.

Patel, I. R., M. G. Attur, R. N. Patel, S. A. Stuchin, R. A. Abagyan, S. B. Abramson y A. R. Amin (1998). "TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha." *J Immunol* **160**(9): 4570-9.

Peiretti, F., M. Canault, P. Deprez-Beauclair, V. Berthet, B. Bonardo, I. Juhan-Vague y G. Nalbone (2003a). "Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme." *Exp Cell Res* **285**(2): 278-85.

Peiretti, F., P. Deprez-Beauclair, B. Bonardo, H. Aubert, I. Juhan-Vague y G. Nalbone (2003b). "Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE." *J Cell Sci* **116**(Pt 10): 1949-57.

Peiretti, F., M. Canault, D. Bernot, B. Bonardo, P. Deprez-Beauclair, I. Juhan-Vague y G. Nalbone (2005). "Proteasome inhibition activates the transport and the ectodomain shedding of TNF- α receptors in human endothelial cells." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 1061-70.

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

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

- Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch y A. Ullrich (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." *Nature* **402**(6764): 884-8.
- Reddy, P., J. L. Slack, R. Davis, D. P. Cerretti, C. J. Kozlosky, R. A. Blanton, D. Shows, J. J. Peschon y R. A. Black (2000). "Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." *J Biol Chem* **275**(19): 14608-14.
- Rizoli, S. B., O. D. Rotstein y A. Kapus (1999). "Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils. A role for p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* **274**(31): 22072-80.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C., A. B. Milchanowski, E. K. Dufour, R. Leduc y M. L. Iruela-Arispe (2000). "Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms." *J Biol Chem* **275**(43): 33471-9.
- Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst y C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." *J Biol Chem* **274**(6): 3531-40.
- Sagone, A. L., Jr., R. Husney, H. Guter y L. Clark (1984). "Effect of catalase on the proliferation of human lymphocytes to phorbol myristate acetate." *J Immunol* **133**(3): 1488-94.
- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig y C. P. Blobel (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." *J Cell Biol* **164**(5): 769-79.
- Sambrook J y Russell RW (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schafer, B., B. Marg, A. Gschwind y A. Ullrich (2004). "Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein coupled receptor-induced cell proliferation and survival." *J Biol Chem*.
- Schantl, J. A., M. Roza, P. Van Kerkhof y G. J. Strous (2004). "The growth hormone receptor interacts with its sheddase, the tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)." *Biochem J* **377**(Pt 2): 379-84.
- Schapiro, F. B., T. T. Soe, W. G. Mallet y F. R. Maxfield (2004). "Role of cytoplasmic domain serines in intracellular trafficking of furin." *Mol Biol Cell* **15**(6): 2884-94.
- Schlondorff, J. y C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding." *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3603-17.

- Schlondorff, J., J. D. Becherer y C. P. Blobel (2000). "Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE)." *Biochem J* **347 Pt 1**: 131-8.
- Schlondorff, J., L. Lum y C. P. Blobel (2001). "Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase." *J Biol Chem* **276**(18): 14665-74.
- Seidah, N. G., M. Marcinkiewicz, S. Benjannet, L. Gaspar, G. Beaubien, M. G. Mattei, C. Lazure, M. Mbikay y M. Chretien (1991). "Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2." *Mol Endocrinol* **5**(1): 111-22.
- Seidah, N. G., R. Day, J. Hamelin, A. Gaspar, M. W. Collard y M. Chretien (1992). "Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase." *Mol Endocrinol* **6**(10): 1559-70.
- Seidah, N. G. y M. Chretien (1997). "Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins." *Curr Opin Biotechnol* **8**(5): 602-7.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm y M. Mann (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* **68**(5): 850-8.
- Sibilia, M. y E. F. Wagner (1995). "Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor." *Science* **269**(5221): 234-8.
- Sitia, R. y I. Braakman (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory." *Nature* **426**(6968): 891-4.
- Slack, B. E., L. K. Ma y C. C. Seah (2001). "Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme." *Biochem J* **357**(Pt 3): 787-94.
- Spence, M. J., J. F. Sucic, B. T. Foley y T. J. Moehring (1995). "Analysis of mutations in alleles of the fur gene from an endoprotease-deficient Chinese hamster ovary cell strain." *Somat Cell Mol Genet* **21**(1): 1-18.
- Srouf, N., A. Lebel, S. McMahon, I. Fournier, M. Fugere, R. Day y C. M. Dubois (2003). "TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity." *FEBS Lett* **554**(3): 275-83.
- Steiner, D. F., S. P. Smekens, S. Ohagi y S. J. Chan (1992). "The new enzymology of precursor processing endoproteases." *J Biol Chem* **267**(33): 23435-8.

- Stone, A. L., M. Kroeger y Q. X. Sang (1999). "Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review)." *J Protein Chem* **18**(4): 447-65.
- Sunnarborg, S. W., C. L. Hinkle, M. Stevenson, W. E. Russell, C. S. Raska, J. J. Peschon, B. J. Castner, M. J. Gerhart, R. J. Paxton, R. A. Black y D. C. Lee (2002). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability." *J Biol Chem* **277**(15): 12838-45.
- Takahashi, S., T. Nakagawa, K. Kasai, T. Banno, S. J. Duguay, W. J. Van de Ven, K. Murakami y K. Nakayama (1995). "A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation." *J Biol Chem* **270**(44): 26565-9.
- Tanaka, M., D. Nanba, S. Mori, F. Shiba, H. Ishiguro, K. Yoshino, N. Matsuura y S. Higashiyama (2004). "ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands." *J Biol Chem* **279**(40): 41950-9.
- Teixido, J., S. T. Wong, D. C. Lee y J. Massague (1990). "Generation of transforming growth factor-alpha from the cell surface by an O-glycosylation-independent multistep process." *J Biol Chem* **265**(11): 6410-5.
- Tekotte, H. y I. Davis (2002). "Intracellular mRNA localization: motors move messages." *Trends Genet* **18**(12): 636-42.
- Teuchert, M., W. Schafer, S. Berghofer, B. Hoflack, H. D. Klenk y W. Garten (1999). "Sorting of furin at the trans-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins." *J Biol Chem* **274**(12): 8199-207.
- Thabard, W., M. Collette, R. Bataille y M. Amiot (2001). "Protein kinase C delta and eta isoenzymes control the shedding of the interleukin 6 receptor alpha in myeloma cells." *Biochem J* **358**(Pt 1): 193-200.
- Thathiah, A., C. P. Blobel y D. D. Carson (2003). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding." *J Biol Chem* **278**(5): 3386-94.
- Thathiah, A. y D. D. Carson (2004). "MT1-MMP mediates MUC1 shedding independently of TACE/ADAM17." *Biochem J Pt*.
- Thomas, G. (2002). "Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(10): 753-66.
- Tsou, C. L., C. A. Haskell y I. F. Charo (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine." *J Biol Chem* **276**(48): 44622-6.
- Vazquez, F., G. Hastings, M. A. Ortega, T. F. Lane, S. Oikemus, M. Lombardo y M. L. Iruela-Arispe (1999). "METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are

members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity." *J Biol Chem* **274**(33): 23349-57.

Veyrune, J. L., G. P. Campbell, J. Wiseman, J. M. Blanchard y J. E. Hesketh (1996). "A localisation signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA targets c-myc mRNA and beta-globin reporter sequences to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes." *J Cell Sci* **109** (Pt 6): 1185-94.

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

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

von Tresckow, B., K. J. Kallen, E. P. von Strandmann, P. Borchmann, H. Lange, A. Engert y H. P. Hansen (2004). "Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30." *J Immunol* **172**(7): 4324-31.

Wada, T. y J. M. Penninger (2004). "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." *Oncogene* **23**(16): 2838-49.

Wang, J., R. S. Al-Lamki, H. Zhang, N. Kirkiles-Smith, M. L. Gaeta, S. Thiru, J. S. Pober y J. R. Bradley (2003). "Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool." *J Biol Chem* **278**(24): 21751-60.

Wang, K. Y., N. Arima, S. Higuchi, S. Shimajiri, A. Tanimoto, Y. Murata, T. Hamada y Y. Sasaguri (2000). "Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages." *FEBS Lett* **473**(3): 345-8.

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

Weiss, F. U., H. Daub y A. Ullrich (1997). "Novel mechanisms of RTK signal generation." *Curr Opin Genet Dev* **7**(1): 80-6.

Weskamp, G., J. Kratzschmar, M. S. Reid y C. P. Blobel (1996). "MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains." *J Cell Biol* **132**(4): 717-26.

Weskamp, G., H. Cai, T. A. Brodie, S. Higashiyama, K. Manova, T. Ludwig y C. P. Blobel (2002). "Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life." *Mol Cell Biol* **22**(5): 1537-44.

- Weskamp, G., J. Schlondorff, L. Lum, J. D. Becherer, T. W. Kim, P. Saftig, D. Hartmann, G. Murphy y C. P. Blobel (2004). "Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR)." *J Biol Chem* **279**(6): 4241-9.
- Wheeler, D. L., K. J. Ness, T. D. Oberley y A. K. Verma (2003). "Protein kinase Cepsilon is linked to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor-alpha ectodomain shedding and the development of metastatic squamous cell carcinoma in protein kinase Cepsilon transgenic mice." *Cancer Res* **63**(19): 6547-55.
- Xiang, Y., S. S. Molloy, L. Thomas y G. Thomas (2000). "The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments." *Mol Biol Cell* **11**(4): 1257-73.
- Yamamoto, A., T. Nagano, S. Takehara, M. Hibi y S. Aizawa (2005). "Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF." *Cell* **120**(2): 223-35.
- Yan, Y., K. Shirakabe y Z. Werb (2002). "The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors." *J Cell Biol* **158**(2): 221-6.
- Yana, I. y S. J. Weiss (2000). "Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases." *Mol Biol Cell* **11**(7): 2387-401.
- Zeng, Y. X., K. Somasundaram y W. S. el-Deiry (1997). "AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression." *Nat Genet* **15**(1): 78-82.
- Zhang, Z., J. K. Kolls, P. Oliver, D. Good, P. O. Schwarzenberger, M. S. Joshi, J. L. Ponthier y J. R. Lancaster, Jr. (2000). "Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide." *J Biol Chem* **275**(21): 15839-44.
- Zhang, Z., P. Oliver, J. J. Lancaster, P. O. Schwarzenberger, M. S. Joshi, J. Cork y J. K. Kolls (2001). "Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate." *Faseb J* **15**(2): 303-5.
- Zheng, Y., J. Schlondorff y C. P. Blobel (2002). "Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1." *J Biol Chem* **277**(45): 42463-70.
- Zhou, A., G. Webb, X. Zhu y D. F. Steiner (1999). "Proteolytic processing in the secretory pathway." *J Biol Chem* **274**(30): 20745-8.
- Zimmermann, M., F. Gardoni, E. Marcello, F. Colciaghi, B. Borroni, A. Padovani, F. Cattabeni y M. Di Luca (2004). "Acetylcholinesterase inhibitors increase ADAM10 activity by promoting its trafficking in neuroblastoma cell lines." *J Neurochem* **90**(6): 1489-99.

Zwick, E., H. Daub, N. Aoki, Y. Yamaguchi-Aoki, I. Tinhofer, K. Maly y A. Ullrich (1997). "Critical role of calcium- dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling." *J Biol Chem* **272**(40): 24767-70.