

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica



**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA
EMMPRIN EN LA ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA ENDOTELIAL Y
EN LA INTEGRIDAD VASCULAR**

TESIS DOCTORAL

Vanessa Moreno Rodríguez

Madrid, 2012

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA EMMPRIN EN LA
ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA ENDOTELIAL Y EN LA INTEGRIDAD
VASCULAR**

**Memoria presentada por Vanessa Moreno Rodríguez para optar al grado
de Doctor.**

Licenciada en Ciencias Biológicas

Directora: Alicia García Arroyo

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TESIS

La doctora Alicia García Arroyo CERTIFICA que la doctoranda Vanessa Moreno Rodríguez ha desarrollado y concluido su trabajo de tesis doctoral sobre "CARACTERIZACION DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA EMMPRIN EN LA ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA ENDOTELIAL Y EN INTEGRIDAD VASCULAR", bajo su supervisión, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares.

La doctora Benilde Jiménez Cuenca, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, y tutora de la doctoranda, da el visto bueno a la presente Tesis Doctoral.

En Madrid a 30 de Mayo de 2012



Dra. Alicia García Arroyo
Jefe de Grupo Senior
Laboratorio de Metaloproteinasas de Matriz
Departamento de Biología Vascular e Inflamación
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
(CNIC)



Dra. Benilde Jiménez Cuenca
Profesora Titular
Departamento de Bioquímica
Universidad Autónoma de Madrid.

A MIS PADRES
A PABLO

Agradecimientos

Este trabajo de tesis ha sido realizado gracias a la supervisión de la Dra. Alicia García Arroyo y al apoyo de todos los compañeros del Laboratorio de "Metaloproteinasas de matriz" en el CNIC en especial Pilar Gonzalo y Angela Pollán, así como de las unidades técnicas de microscopía y celómica y a los técnicos de animalario del departamento de "Biología vascular e inflamación" del CNIC. Así mismo quería agradecer la ayuda a los laboratorios del Dr. Juan Miguel Redondo y de Miguel Angel del Pozo por compartir conmigo su experiencia y reactivos. Este trabajo ha sido realizado en parte en colaboración con el laboratorio del Dr. Sanchez-Madrid del CNIC y con los Drs. Kenji Kadomatsu en Japón y Elisabetta Dejana y Fabrizio Orsenigo en Italia.

RESÚMEN

Las adhesiones célula-célula son estructuras especializadas de la membrana celular a través de las cuales las células soportan y aplican fuerzas. En las células endoteliales estas fuerzas participan en la integridad vascular y en la regulación y dinámica de los complejos de adhesión ante diferentes estímulos, regulando así también la función de barrera del endotelio. Sin embargo, aún no están claramente establecidos los mecanismos por los cuales el citoesqueleto de actina y la tensión que este ejerce sobre las uniones regulan la formación de los complejos de adhesión, ni tampoco de cómo estos complejos a su vez influyen en la organización de la actina y la arquitectura celular. En esta tesis se caracteriza la expresión y regulación de EMMPRIN, una proteína transmembrana de la superfamilia de las inmonoglobulinas, en células endoteliales así como su localización en los contactos entre células endoteliales *in vitro* e *in vivo*. La ausencia de EMMPRIN produce alteraciones en la organización de las adhesiones dependientes de VE-cadherina y en la función de barrera de células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo* en los ratones deficientes en EMMPRIN. Estas alteraciones se deben a un desequilibrio en la tensión que soportan las uniones endoteliales, producido por una disminución en la actina organizada en las uniones y un aumento de las fibras contráctiles de actina-miosina en el interior celular; la relajación del citoesqueleto mediante inhibidores de la quinasa ROCK (Y27632) y de la unión de miosina a actina (Blebistatina) rescata el fenotipo de las uniones y de la función de barrera. Finalmente se identifica un nuevo complejo proteico formado por EMMPRIN y γ -catenina capaz de interactuar con el citoesqueleto de actina, que es reclutado de manera temprana a los contactos en formación entre células endoteliales, y que es necesario para la correcta organización del citoesqueleto de actina que sustenta los complejos de adhesión entre células endoteliales.

SUMMARY

Cell-cell adhesions are important sites through which cells experience and resist forces. In endothelial cells, these forces regulate junction dynamics and determine endothelial barrier fitness. But how the acto-myosin machinery organizes endothelial cell-cell junctions and how these adhesive structures orchestrate actin cytoskeleton organization is not fully understood. In this thesis it is studied the expression and regulation of EMMPRIN an Ig superfamily member, in endothelial cells and also its localization in endothelial cell junctions *in vitro* and *in vivo*. EMMPRIN-deficient mice show altered junctional structure and increased permeability. The absence of EMMPRIN unbalances the tension of the acto-myosin machinery at endothelial cell junctions, altering tugging forces and reducing VE-cadherin dimer formation. The inhibition of the acto-myosin machinery by an inhibitor of ROCK (Y27632) or an inhibitor of myosin II (Blebbistatin), rescues the alterations observed in VE-cadherin mediated adhesions and the increase in permeability *in vitro*. Finally, EMMPRIN ensures the maturation of competent endothelial junctions through the formation of a molecular complex with γ -catenin and actin at nascent junctions. These results show that EMMPRIN is required for proper functioning of the endothelial barrier and for the correct organization of the actin cytoskeleton which supports the adhesion complexes between endothelial cells.

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Uniones célula-célula endotelial.....	5
1.1.1. Estructura y componentes.....	5
1.1.2. Ensamblaje de las uniones adherentes.....	9
1.1.3. Regulación y dinámica de las uniones adherentes en endotelio: función de barrera.....	13
1.2.2. La proteína de membrana EMMPRIN.....	15
1.2.1. Estructura.....	16
1.2.2. Expresión de EMMPRIN en la membrana plasmática.....	17
1.2.3. Función.....	19
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Expresión y regulación de EMMPRIN durante la formación de la monocapa endotelial.....	41
4.1.1. La expresión de EMMPRIN varía en la superficie de las HUVEC durante la formación de la monocapa.....	41
4.1.2. La cantidad total y el estado de glicosilación de EMMPRIN varía a lo largo de la formación de la monocapa endotelial.....	42
4.1.3. EMMPRIN se recluta de manera temprana a los contactos intercelulares.....	42
4.2. Tráfico de EMMPRIN a los contactos celulares.....	44
4.3. Contribución de EMMPRIN a la formación de tubos y monocapas endoteliales.....	47
4.3.1. La expresión de EMMPRIN disminuye eficazmente en células HUVEC transfectadas con oligonucleótidos de ARN de interferencia.....	47
4.3.2. La ausencia de EMMPRIN afecta a la formación de tubos endoteliales.....	48
4.3.3. La deficiencia de EMMPRIN afecta a la estructura de los contactos endoteliales.....	49
4.3.4. Las monocapas formadas por células deficientes en EMMPRIN muestran una mayor permeabilidad.....	53
4.4. Expresión de EMMPRIN y efectos de su deficiencia en ratón, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	53

4.4.1. La expresión de EMMPRIN en células endoteliales de ratón también varía según su estado de confluencia.....	53
4.4.2. La ausencia de EMMPRIN en células endoteliales de ratón in vitro también afecta al establecimiento de las uniones adherentes.....	54
4.4.3. EMMPRIN se expresa de manera heterogénea en distintos lechos vasculares de ratón.....	55
4.4.4. Los ratones deficientes para EMMPRIN muestran alteraciones morfológicas de los vasos y una mayor permeabilidad vascular.....	56
4.5. Caracterización del mecanismo molecular por el que la deficiencia de EMMPRIN afecta a la estabilidad de las uniones endoteliales.....	63
4.5.1. La deficiencia en EMMPRIN provoca una mayor tensión en el citoesqueleto de actina miosina.....	63
4.5.2. La tensión en el citoesqueleto de actina-miosina correlaciona con el defecto observado en el patrón de VE-cadherina.....	68
4.5.3. EMMPRIN interacciona con γ -catenina a nivel de membrana.....	72
4.5.4. La deficiencia de EMMPRIN correlaciona con una disminución en la intensidad de γ -catenina en los contactos.....	73
4. DISCUSIÓN.....	75
6. CONCLUSIONES.....	89
8. BIBLIOGRAFÍA.....	93

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AJs: *Adherens Junctions*. Uniones adherentes.

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia.

BSA: *Bovine serum albumine*. Albúmina de suero bovino.

CHO: *Chinese ovary hamster cells*. Células de ovario de hamster chino.

EEA1: *Early endosome antigen 1*. Antígeno 1 de endosomas tempranos.

EMMPRIN: *Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer*. Inductor de metaloproteasas de matriz extracelular.

F-actina: Actina Filamentosa.

FAK: *Focal Adhesión Kinase*. Quinasa de adhesiones focales.

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*. Isotiocianato de fluoresceína.

FBS: *Fetal Bovine Serum*. Suero fetal bovino.

GGAs: *Golgi-localising Gamma-adaptins*. Gamma –adaptinas de localización en Golgi.

GTPases: *Guanosin-triphosphate hidrolases*. Hidrolasas de guanosin-trifosfato.

HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cells*. Células de la vena del cordón umbilical humano.

HBSS: *Hank's balanced salt solution*. Solución salina equilibrada de Hank.

ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule*. Molécula de adhesión intercelular.

JAM: *Junction adhesion molecule*. Molécula adhesión en uniones.

LFA1: *Lymphocyte function-associated antigen 1*. Antígeno asociado con la función de linfocito”.

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*. Proteín-quinasas activadas por mitógenos.

MCT: *Monocarboxylate transporter*. Transportador monocarboxílico.

MLC: *Myosin Light Chain*. Cadena ligera de la miosina.

MLEC: *Mouse lung endothelial cells*. Células endoteliales de pulmón de ratón.

PAK1: *Serine/threonine-protein kinase 1*. Proteín-quinasa de serina/treonina 1.

PBS: *Phosphate Buffer Saline*. Tampón salino fosfato.

PK1: *Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1*. Quinasa de la deshidrogenasa de piruvato 1.

PECAM-1: *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*. Molécula de adhesión endotelio y plaqueta 1.

PI3K: *Phosphoinositol 3 phosphate kinase*. Quinasa de fosfoinositol 3 fosfato.

PKC: *Protein kinase C*. Proteín-quinasa C.

pMLC: *Phospho myosin Light Chain*. Cadena ligera de la miosina fosforilada.

TIRTC: *Tetramethyl rhodamine isothiocyanate*. Isotiocianato de tetrametilrodamina.

TJs: *Tight Junctions*. Uniones estrechas

1. INTRODUCCIÓN

1.1 UNIÓN CÉLULA-CÉLULA ENDOTELIAL.

Las adhesiones célula-célula son regiones especializadas de la superficie celular donde las membranas de células eucariotas adyacentes conectan entre sí. Estas uniones se componen de diferentes complejos de proteínas muchos de los cuales se unen al citoesqueleto de actina, confiriendo así estabilidad mecánica a los diferentes tejidos. Pero la función de las uniones no es solo estructural, si no que además conforman plataformas de señalización al interior celular permitiendo que las células intercambien señales de supervivencia, proliferación o posición.

Entre los complejos de unión célula-célula más especializados se encuentran los que componen el epitelio y el endotelio. Ambos tipos de tejidos cumplen una función de barrera y precisan de unas uniones bien estructuradas que den integridad al tejido. Las uniones de estos tejidos comparten muchos de los componentes que las forman, pero existen diferencias en su organización y en su dinámica de formación. Esto es debido en parte a que las uniones de células endoteliales están expuestas a diferentes tipos de flujo y a que cumplen una función imprescindible para la homeostasis; previenen el paso de elementos de la sangre hacia el tejido intersticial de manera incontrolada evitando edema y hemorragia y controlando los procesos inflamatorios que podrían desencadenar. Pero a su vez también deben permitir el paso de nutrientes y oxígeno a través de los capilares a los diferentes tejidos y órganos, así como regular el paso de leucocitos a las zonas de inflamación cuando es necesario, de modo que necesitan de una regulación muy precisa.

1.1.1. Estructura y componentes.

Los complejos de adhesión entre dos células endoteliales adyacentes se agrupan en diferentes tipos de uniones. Así, podemos encontrar uniones en hendidura ("gap"), los "*Complexus Adherentes*" (Schmelz and Franke, 1993, Schmelz et al., 1994) y el complejo de unión Nectina-Afadina (Takai et al., 2008). Pero los principales complejos proteicos que integran la unión endotelial son las uniones estrechas (TJs) y las uniones adherentes (AJs). Aunque en células epiteliales las TJs y las AJs se encuentran claramente separadas a lo largo de la unión, en las células endoteliales es común que proteínas que pertenecen a estos tipos de uniones se intercalen (Simionescu, 2001).

Estos complejos están formados por proteínas transmembrana que funcionan como receptores de adhesión y proteínas adaptadoras al citoesqueleto de actina, contribuyendo así al mantenimiento de la arquitectura celular.

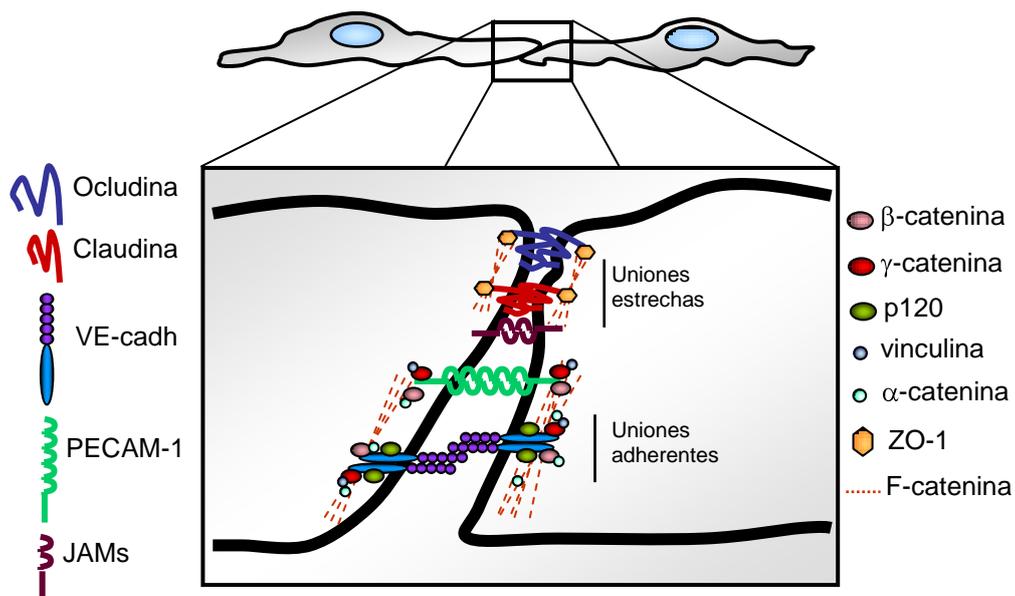


Figura 1. Principales tipos de uniones entre células endoteliales. Se muestran componentes representativos de cada tipo de unión.

Las **uniones estrechas** fueron las primeras uniones estudiadas, definidas en un principio mediante microscopía electrónica como una especialización de la membrana plasmática que fue denominada *zonula occludens*. Se han caracterizado más exhaustivamente en células epiteliales donde se localizan apicalmente en la unión ya que en células endoteliales no están bien definidas espacialmente. Se sabe que en células endoteliales la estructura de las TJs es más compleja en arterias y arteriolas que en venas y vénulas postcapilares (Bazzoni and Dejana, 2004) y también difiere entre órganos. Por ejemplo, en la barrera hematoencefálica de los vasos cerebrales éstas estructuras están bien desarrolladas, no siendo así en otros órganos caracterizados por una mayor tasa de intercambio (Simionescu et al., 1975).

Las proteínas transmembrana que forman las uniones estrechas son las claudinas (Morita et al., 2011); (Dejana, 2004), la ocludina (Furuse et al., 1993), las moléculas adhesivas de la unión o JAMs (Junction Adhesion Molecules) (Bazzoni et al., 2000) y las proteínas ESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule) (Nasdala et al., 2002). La principal proteína responsable de la unión del citoesqueleto de actina con el citoesqueleto de actina es la proteína zonula occludens-1 (ZO-1) ((Fanning et al., 1998) (Stevenson et al., 1986).

Las **uniones adherentes** son el tipo de unión más extensamente estudiado ya que son las primeras en reclutarse a los sitios de contacto entre células cuando la unión se está formando, desencadenando el reclutamiento del resto de componentes

necesarios para que la unión sea funcional. Por otro lado estos complejos parecen ser los responsables del dinamismo de las uniones endoteliales en respuesta a muchos de los agentes que afectan a la integridad de la barrera endotelial, transmitiendo señales de supervivencia, motilidad y polaridad al interior celular. Por último, las AJs son capaces de regular el ensamblaje o desensamblaje de las TJs (Taddei et al., 2008).

Estas uniones están formadas por proteínas de la familia de las **cadherinas**, una superfamilia de glicoproteínas que media interacciones homofílicas dependientes de calcio. El principal componente en uniones adherentes de células endoteliales es la proteína VE-cadherina (cadherina de clase II), que se expresa sólo en este tipo celular y está presente en el endotelio de cualquier tipo de vaso (Lampugnani et al., 1992). En células endoteliales también se expresa la N-cadherina (Clase I), pero de forma más difusa en membrana (Navarro et al., 1998) y las T-Cadherina (Rubin, 1992) y P-cadherina (Ivanov et al., 2001) dependiendo del tipo de endotelio. Se ha descrito otra VE-cadherina llamada VE-cadherina-2 (Telo et al., 1998), que posee alta homología con las otras cadherinas excepto en la cola citoplasmática. Por sus características estructurales ha sido incluida en la familia de las protocadherinas (Frank and Kemler, 2002).

Las cadherinas se asocian con el citoesqueleto a través de su interacción con otra familia de proteínas, las cateninas. **Las cateninas**, son proteínas de la familia *armadillo* y en endotelio se expresan α -catenina, β -catenina, γ -catenina y p120. β -catenina y γ -catenina son capaces de unirse directamente a la cola citosólica de la VE-cadherina y a α -catenina que a su vez puede unirse a actina (Vleminckx and Kemler, 1999, Ben-Ze'ev and Geiger, 1998). Estudios recientes han demostrado que α -catenina no puede unirse directamente a filamentos de actina a la vez que a β -catenina (Drees et al., 2005) pero sí de manera indirecta ya que α -catenina interacciona también con las proteínas vinculina (Watabe-uchida, 1998) proteína homóloga de α -catenina (Herrenknecht et al., 1991) y α -actinina (Knudsen et al., 1995, Nieset et al., 1997) las cuales pueden unirse también a actina. Además, la α -catenina es capaz de disminuir la actividad protrusiva de la membrana plasmática a través de la supresión de la polimerización y formación de cables de actina dependiente del nucleador de actina Arp2/3 (Drees et al., 2005, Kobielaak and Fuchs, 2004). Debido a esta interacción con el citoesqueleto, α -catenina inhibe el reciclamiento de VE-cadherina estabilizando su expresión en la superficie celular y regulando así la organización espacial del citoesqueleto de actina a nivel de las uniones (Xiao et al., 2005); (Drees et al., 2005).

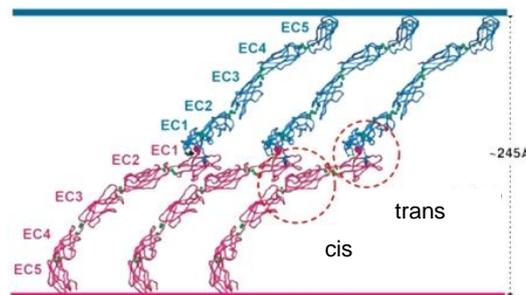
β -catenina y γ -catenina se unen al mismo dominio en la cola citosólica de la VE-cadherina a diferencia de la p120, y por lo tanto ambas podrían ser excluyentes (Prasain and Stevens, 2009). Aún no se ha descrito el requisito funcional para que la unión de una prevalezca sobre la otra, pero ambas impiden el procesamiento de la VE-cadherina por el proteasoma (Schnittler et al., 1997). Ambas proteínas son también capaces de actuar en complejo con otras proteínas como factores de transcripción, cuando están libres de la unión a VE-cadherina y no son degradadas en el citoplasma. (Miravet et al., 2002, Ben-Ze'ev and Geiger, 1998, Hatsell and Cowin, 2001).

En los contactos entre las células endoteliales también se pueden localizar otras proteínas que no pertenecen a ningún tipo de unión en concreto, como son MUC18/CD146 (Anfosso et al., 2001), endoglina (Bourdeau et al., 1999, McAllister et al., 1994), DEP-1/CD148 (Takahashi et al., 1999), VEPTP (vascular endothelial phosphotyrosine phosphatase) y PECAM-1/CD31, siendo estas dos últimas de especial relevancia. VEPTP es capaz de regular la función de VE-cadherina y se ha descrito su papel en la función de barrera (Nawroth et al., 2002, Nottebaum et al., 2008). PECAM-1 es una proteína de membrana perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas que se expresa en células endoteliales, leucocitos y plaquetas (Mamdouh et al., 2003, Newman, 1997). PECAM-1 puede interaccionar de manera homofílica y con otras proteínas en la superficie celular (Mamdouh et al., 2003) como por ejemplo la integrina $\alpha v \beta 3$ (Piali et al., 1995) y con γ -catenina, β -catenina y SHP2 por su parte intracelular (Ilan et al., 2000). PECAM-1 puede modular la actividad de las cadherinas señalizando a través de MAPKs (Sheibani et al., 2000) y dado que actúa como mecanotransductor sensible a cambios en el flujo sanguíneo (Tzima et al., 2005) podría modular la respuesta de las uniones adherentes en respuesta a estos cambios. Sin embargo el ratón deficiente de PECAM-1 no muestra cambios detectables en el desarrollo vascular en el embrión ni en permeabilidad basal (Duncan et al., 1999, Thompson et al., 2001) aunque sí se ha observado un incremento en la permeabilidad vascular en modelos de encefalomiелitis y en respuesta a histamina (Graesser et al., 2002).

1.1.2. Ensamblaje de las uniones adherentes.

Las primeras etapas de la formación de las uniones parecen ser similares en diferentes tipos celulares, pero no así su maduración ya que las células epiteliales y endoteliales requieren una adhesión polarizada mas fuerte que por ejemplo neuronas y fibroblastos (Mege et al., 2006)

Aunque existen muchos estudios al respecto aún queda por esclarecer la dinámica de formación de las uniones de cadherina. Según lo publicado hasta ahora parece ser que las proteínas iniciadoras de los contactos son las cadherinas, las cuales deben interaccionar entre sí de manera rápida y dinámica. Para ello es necesario que estas proteínas se encuentren en la superficie celular, que sean móviles en la membrana plasmática y que sus dominios extracelulares e intracelulares se encuentren en una conformación espacial capaz de formar uniones (Mege et al., 2006). Para que la adhesión quede establecida es necesaria la formación de homodímeros de cadherina formados en *trans*, es decir entre dos células adyacentes, que se agrupan lateralmente con otras cadherinas formando dímeros en *cis* (Boggon et al., 2002, Patel et al., 2003, Wu et al., 2010). Las uniones así formadas sufren un reciclaje continuo de moléculas de cadherina que parece depender de las diferentes conformaciones que pueden adquirir los dímeros formados por estas proteínas.



Adaptado de Wu, Y et al. PNAS. 2010.

Figura 2. Tipos de dímeros formados por las cadherinas. Las cadherinas pueden formar dímeros homofílicos en la misma superficie de membrana o entre proteínas que se encuentran en membranas de células adyacentes.

El citoesqueleto de actina y la tensión que éste ejerce sobre la membrana plasmática desempeñan un papel muy importante en el ensamblaje y organización de las uniones adherentes, y la actina unida a complejos de adhesión es esencial para mantener una barrera endotelial funcional (Dudek and Garcia, 2001, Lee and Gotlieb, 2002, Revenu et al., 2004). Pero si la polimerización activa de actina ocurre localmente de manera exclusiva por el ensamblaje de las cadherinas, o si las uniones de cadherinas se forman en regiones donde ya existía una dinámica activa de actina, sigue siendo objeto de discusión (Lambert et al., 2002).

Varios estudios realizados en **células epiteliales**, sugieren que los contactos iniciales entre dos células que están migrando se producen a través de lamellipodia y

filopodia (Mattila and Lappalainen, 2008). Por otro lado estudios realizados en queratinocitos primarios proponen que los complejos de unión se comienzan a establecer por interdigitación de filopodia, que establecerían una serie de contactos en forma de puntos que poco a poco se irían cerrando como una cremallera para formar una unión continua (Hoelzle and Svitkina, 2012). Estos complejos en forma de puntos se asocian a cortos paquetes radiales de actina (Vasioukhin et al., 2000) que van a favorecer la estabilización de las primeras uniones de cadherina facilitando su fusión en adhesiones continuas. Según se van ensamblando las cadherinas y a través de sus proteínas citoplasmáticas acompañantes que reclutan nucleadores de actina, se va ensamblando también el “cinturón de adhesión” de actina, que se localiza a lo largo de la línea de membrana donde las cadherinas y cateninas se concentran (Bershadsky, 2004). De esta manera la unión de las cadherinas con el citoesqueleto de actina es un requisito indispensable para el desarrollo de una unión fuerte (Vasioukhin et al., 2000).

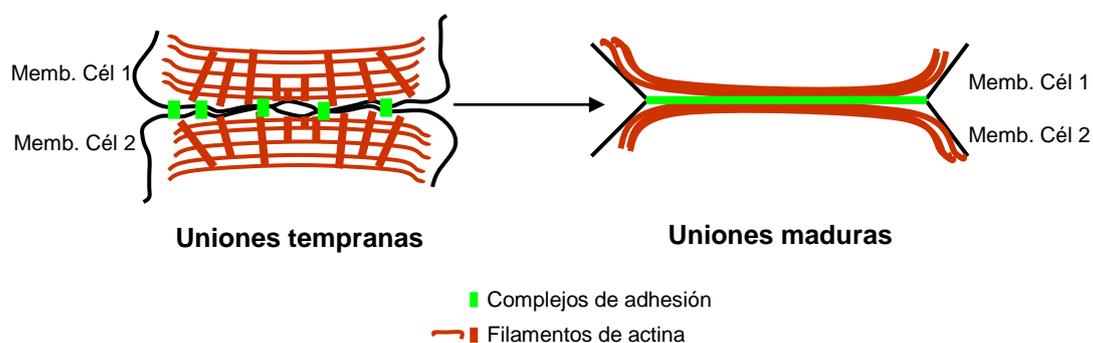


Figura 3. Organización del citoesqueleto de actina durante la formación de las uniones intercelulares. La actina que interacciona con los contactos intercelulares en formación tiene un patrón ramificado con haces de actina perpendiculares al eje de la unión. En contactos más maduros los cables de actina se colocan de manera paralela a lo largo de la unión.

Parece ser que el cambio entre los diferentes patrones de actina que rodean a la unión se produce por el reclutamiento de diferentes tipos de nucleadores de actina. Así, las uniones pasarían de los contactos tempranos, asociados con actina ramificada dependiente del nucleador de actina Arp2/3 y del reclutamiento de cortactina, a complejos de cadherina asociados a cables de actina con la presencia de proteínas de la familia Ena/VASP y la ausencia de Arp2/3 (Scott et al., 2006).

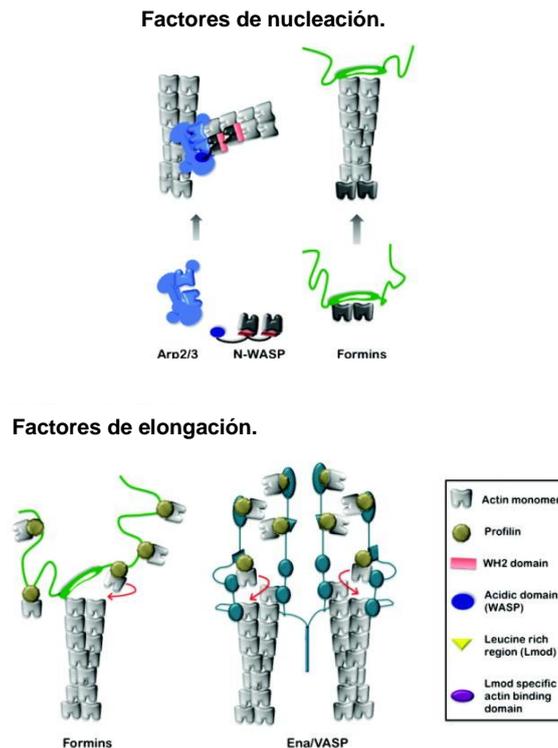


Figura 4. Mecanismos propuestos de polimerización de actina por diferentes factores. La formación de cables de actina puede darse a partir de fibras de actina ya formadas, como en el caso de arp2/3 y Ena/VASP o a partir de monómeros como es el caso de las forminas. Adaptado de Chesarone and Goode, 2009.

Recientemente se ha sugerido que la α -catenina podría estar mediando este cambio mediante su transición del estado monomérico que puede unirse a las cadherinas, al estado dimerico que se uniría a actina impidiendo la ramificación de ésta a través de Arp2/3 (Yamada et al., 2005, Drees et al., 2005). La proteína vinculina también podría mediar este cambio, ya que se localiza en uniones aún inmaduras (Janssen et al., 2006). Otro tipo de polimerización de actina catalizada por la proteína formina 1 (Kovar, 2006) genera largos filamentos sin ramificaciones y podría estar involucrada en la extensión de los contactos a través de la formación de filopodia. Además la formina-1 se une directamente a α -catenina en membrana, permitiendo la formación de cables radiales de actina en esos sitios y la estabilización de la unión (Kobielak et al., 2004).

Este reclutamiento de nucleadores de actina parece estar mediado también por proteínas de la familia de las proteínas guanosina trifosfatasa (GTPasas). Así por ejemplo según maduran los contactos se desencadena la señalización producida por las GTPasas Rac1 y Cdc42 lo que provoca un aumento en la fuerza de unión presumiblemente a través del citoesqueleto de actina (Mege et al., 2006) (Chu et al., 2004). Pero además, la GTPasa RhoA ayuda a mantener la adhesión mediada por E-

cadherina mediante la acción de una formina, la proteína Dia1 (Sahai and Marshall, 2002) y por la miosina II no muscular (Shewan et al., 2005).

La formación de las uniones entre **células endoteliales** sigue unas pautas similares a la de las epiteliales pero con algunas diferencias. Al igual que en células epiteliales, en las primeras fases de la formación de las uniones endoteliales, los filamentos de actina se organizan perpendicularmente a la membrana a través de la acumulación local de complejos de nucleación de actina (Ridley, 2006). En fases posteriores, las fibras de actina se posicionan de manera paralela a la membrana para formar un anillo periférico de actina (Niessen and Gottardi, 2008). Pero recientemente se ha publicado un estudio en el que parece que primero hay contacto entre lamelipodia, retracción y formación de puentes similares a filopodia (Hoelzle and Svitkina, 2012). En el centro de estos puentes se formarían las uniones. Estos puentes están formados por actina pero no por microtúbulos y en ellos se localizan VE-cadherina y fascina, una proteína de unión a actina. En el 68% de estos puentes también se localiza VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Hoelzle and Svitkina, 2012) un marcador de filopodia que también localiza en lamelipodia, adhesiones focales y uniones adherentes (Krause et al., 2003), aunque parece que su requerimiento es transitorio. La vinculina también podría estar implicada en la transición entre los diferentes patrones de la actina en endoteliales, ya que se ha descrito que puede encontrarse en filopodia formados en las uniones en respuesta a ciertos estímulos, en los que también ocurre remodelación del citoesqueleto de actina (Huveneers et al., 2012).

Además parece que las diferentes tensiones que el citoesqueleto de actina ejerce en las uniones son importantes para la formación de éstas y una evidencia de ello es que el reclutamiento de la VE-cadherina es estimulado por tensión dependiente de la proteína miosina II no muscular (Liu et al., 2010). Esta proteína se une a actina y es capaz de regular su contractilidad, siendo esta función regulada por la fosforilación de su cadena ligera (pMLC) (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Estos datos apuntan a que en las uniones en formación existe una red muy dinámica de filamentos de actina que provocan la tensión necesaria para formar y estabilizar las uniones.

1.1.3. Regulación y dinámica de las uniones adherentes en endotelio: función de barrera.

Como se mencionó anteriormente, las uniones endoteliales deben ser capaces de reaccionar y modificar su composición ante determinadas situaciones pero a su vez deben ser estructuras estables capaces de resistir el flujo al que están continuamente sometidas. Su respuesta ante diferentes estímulos debe ser controlada en intensidad pero también en el tiempo ya que un incremento de permeabilidad mantenido puede desencadenar un proceso de inflamación crónica. De esta manera el endotelio cumple una función de barrera esencial para la homeostasis vascular.

El mecanismo mejor caracterizado por el que las AJs son remodeladas cambiando su estructura y composición es el de la fosforilación de sus componentes principalmente a través de la vía de señalización de la quinasa Src en residuos de tirosina, aunque en algunos casos la VE-cadherina también puede fosforilarse en el residuo Ser665 (Allingham et al., 2006) (Gavard and Gutkind, 2006). Así por ejemplo, ciertas sustancias liberadas en condiciones de inflamación como son el factor de crecimiento endotelial (VEGF de Vascular Endotelial Growth Factor), la trombina o la histamina pueden inducir la fosforilación de ciertos residuos de la cola citosólica de la VE-cadherina induciendo su internalización y produciendo un aumento en la permeabilidad de los vasos (Bazzoni and Dejana, 2004). Este aumento de permeabilidad en ausencia de patología es transitorio y las uniones se reestablecen cuando el estímulo que lo ha provocado deja de estar presente (Chavez et al., 2011). La fosforilación de la VE-cadherina también puede ser inducida en células endoteliales en cultivo por células leucocitarias, provocando un debilitamiento de la unión y favoreciendo la transmigración del leucocito a través de la barrera endotelial (Dejana et al., 2008).

Las cateninas p120, β -catenina y γ -catenina también pueden fosforilarse en residuos específicos de tirosina por los mismos agentes capaces de fosforilar a la VE-cadherina. Se ha observado en varios modelos que esta fosforilación afecta a la afinidad de β -catenina y de p120 por VE-cadherina induciendo su internalización. (Huber and Weis, 2001, Lilien and Balsamo, 2005). A su vez cuando estas cateninas pierden su afinidad por la cola citosólica de la VE-cadherina y por tanto su unión a membrana, pueden degradarse en el citoplasma o ser translocadas al núcleo, donde forman complejos con factores de transcripción como Lef-1/TCF (T cell factor) o FOXO1 (Dejana et al., 2009).

El estado de fosforilación de los diferentes componentes de las AJs es regulado a su vez por la inhibición de fosfatasas asociadas a ellas, como por ejemplo

la fosfatasa VE-PTP que se asocia con VE-cadherina y la defosforila (Baumer et al., 2006). La sobreexpresión de esta fosfatasa es capaz de aumentar la interacción entre VE-cadherina y γ -catenina aumentando así la estabilización de la unión (Vestweber et al., 2009). Por otro lado el procesamiento de la VE-cadherina por metaloproteasas (Herren et al., 1998, Luplertlop et al., 2006) o por otras proteasas como elastasa, catepsina G o tripsina también puede producir desestabilización de las AJs (Lampugnani et al., 2006, Lampugnani and Dejana, 2007). Los leucocitos y las células tumorales pueden secretar grandes cantidades de estas enzimas, induciendo el procesamiento de VE-cadherina y aumentando así la extravasación celular y la permeabilidad vascular (Dejana et al., 2009).

Otras vías de señalización implicadas en desestabilización de AJs son la desencadenada por PAF (platelet-activating factor) (Hudry-Clergeon et al., 2005) y la del AMPc (adenosil monofosfato cíclico) que a través de la GTPasa Rap1 controla la organización de las uniones y de actina (Bos, 2005) y aumenta la capacidad “adhesiva” de la VE-cadherina (Kooistra et al., 2007).

Además de los factores que afectan directamente a los componentes de las uniones, las alteraciones producidas en la estructura del citoesqueleto de actina también pueden provocar el desensamblaje de las uniones, así como de la función de barrera. La desestabilización del anillo cortical de actina por diferentes agentes, produce un aumento de la permeabilidad endotelial (Shasby et al., 1982, Bogatcheva and Verin, 2008), mientras que la estabilización de este anillo previene la ruptura de la barrera frente a agonistas inflamatorios (Bogatcheva and Verin, 2008, Phillips et al., 1989). Asimismo, se ha descrito que la excesiva polimerización de actina en fibras de estrés puede causar alteraciones en la barrera endotelial, pero la depolimerización extrema también altera la estructura de las uniones endoteliales (Bogatcheva et al., 2003, Moy et al., 2004). Por ello es necesario el equilibrio entre la “tensión centrípeta” (generada principalmente por las fibras de estrés) y la “tensión centrífuga” (generada por el anillo cortical de actina y los complejos de adhesión) para mantener la morfología de la célula y la función de barrera endotelial intactas (Bogatcheva and Verin, 2008).

Este equilibrio está sujeto a la regulación por parte de diferentes vías de señalización (Lee and Gotlieb, 2003, Mehta and Malik, 2006, Jacobson and Garcia, 2007). Las Rho GTPasas, por ejemplo, y sus dianas las ROCKs (rho Serine/threonine kinases) estimulan la contractilidad basada en la actina-miosina, generando fibras de estrés y adhesiones focales y aumentando la permeabilidad endotelial en respuesta a trombina e histamina (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002, Braga, 2002, Gavard and Gutkind, 2008). Las fibras de estrés generadas en respuesta a estos estímulos son

capaces de reorganizar los complejos de adhesión (Lim et al., 2001, Kouklis et al., 2003). Estas fibras influyen dramáticamente en la tasa y tamaño de los huecos intercelulares que se forman cuando las células se retraen (Dudek and Garcia, 2001, Patterson and Lum, 2001) generando tensión centrípeta que contraresta la tensión centrifuga establecida por el anillo de actina.

Otra manera de alterar la permeabilidad vascular es inhibiendo aquellos mediadores que aumentan la estabilidad de la barrera endotelial, causando así la pérdida de la integridad vascular. Ejemplos de estos estabilizadores de las uniones son el factor de crecimiento de fibroblastos, FGF (Fibroblasts Growth Factor) que aumenta la estabilización de VE-cadherina en la unión a través de la modulación de su unión a p120 (Murakami et al., 2008); la esfingosina-1-fosfato (S1P, Sphingosine-1-Phosphate) que induce la reorganización del citoesqueleto de actina en cables corticales (Dudek et al., 2004, Shikata et al., 2003) y el aumento de VE-cadherina en la superficie celular (Lee et al., 1999); y la angiopoyetina I, que inhibe la activación de la quinasa Src inducida por VEGF, inhibiendo de este modo la internalización de VE-cadherina (Gavard et al., 2008).

1.2. LA PROTEÍNA DE MEMBRANA EMMPRIN.

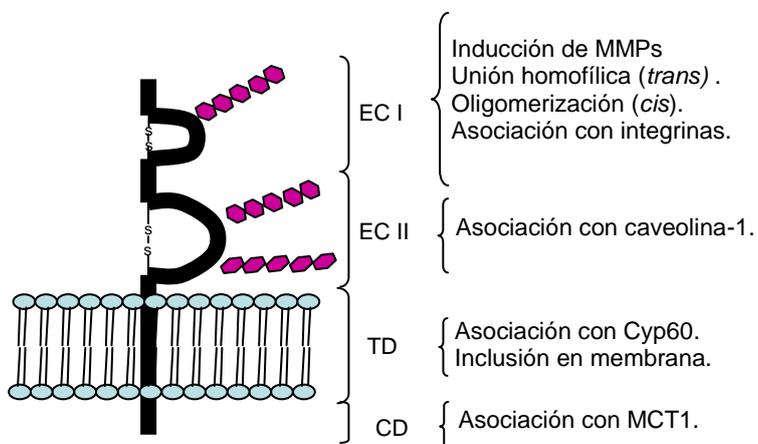
EMMPRIN (del inglés Extracellular Matrix MetalloPRoteases INducer), también denominada basigina (ratón), CD147, neurotelina (pollo), M6 Ag, 5A11, OX (rata) fue descubierta por primera vez en humanos como TCSF (Biswas, 1982, Biswas, 1984, Yurchenko et al., 2010). Es una glicoproteína transmembrana de tipo I con un tamaño aparente de 50-60 KDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Fossum et al., 1991, Miyauchi et al., 1995, Kasinrerck et al., 1992, Biswas et al., 1995). Existen cuatro isoformas (Belton et al., 2008) dos de las cuales son las más estudiadas; la isoforma I que posee tres dominios de tipo inmunoglobulínico y cuya expresión está restringida al epitelio de la retina (Hanna et al., 2003, Ochrietor et al., 2003) y la isoforma II que posee dos dominios Ig (Kasinrerck et al., 1992) y se expresa en varios tejidos y tipos celulares.

En un principio se atribuyó a esta proteína la función de antígeno o portador de antígenos como en el caso de antígeno Lewis X en teratocarcinomas (Miyauchi et al 1990), pero posteriormente han sido identificadas múltiples funciones de esta proteína en diferentes escenarios biológicos, que se detallan a continuación.

1.2.1. Estructura.

La primera en descubrirse y la más extensamente estudiada es la isoforma II. El esqueleto proteico de esta isoforma tiene un tamaño de 28KDa (humano), pero al ser una proteína susceptible de glicosilarse el tamaño puede oscilar entre 43 y 66 KDa, dependiendo del tejido donde se esté expresando (Kanekura et al., 1991). Está conformada por dos dominios de tipo inmunoglobulina (Ig) en la parte extracelular que comprenden los tres sitios de glicosilación de la proteína (Miyachi et al., 1990). Estos dominios son capaces de interactuar con otros como ellos o entre ellos, lo que sugiere que EMMPRIN puede formar dímeros con proteínas EMMPRIN de la misma membrana o de membranas adyacentes (Yu et al., 2008, Sun and Hemler, 2001).

El C2-I (el primer dominio Ig de la isoforma 2) tiene 4 conformaciones posibles lo que podría explicar las diversas funciones que adopta esta proteína en distintos contextos celulares y que podrían ser dependientes de su diferente oligomerización (Yu et al., 2008, Sun and Hemler, 2001). Este dominio puede formar estructuralmente un tipo de dímero que se asemeja a los formados por la familia de las cadherinas (Luo et al., 2009). Esta conformación rara vez ocurre en dominios de inmunoglobulina (Hatherley et al., 2008) y aunque parece poco probable que ocurra en solución (Schlegel et al., 2009) podría venir dada por algún mediador (Luo et al., 2009).



(Adaptado de (Nabeshima et al., 2006a))

Figura 5. Esquema de la estructura proteica de la isoforma II de EMMPRIN. Se muestran las funciones que se han descrito para los diferentes dominios de la proteína EMMPRIN.

El dominio transmembrana de 29 aminoácidos es el responsable de la mayor parte de las interacciones descritas de EMMPRIN con otras proteínas. Este dominio posee un ácido glutámico en la posición central, conservado en todos los miembros de la familia de la basigina y parece ser el responsable de que EMMPRIN necesite asociarse a otras proteínas transmembrana para poder estabilizarse en la membrana y realizar su función (Miyachi et al., 1991). La mutación de este ácido glutámico impide

que EMMPRIN alcance la membrana plasmática (Wilson et al., 2002) lo cuál indicaría que EMMPRIN sólo se encuentra en la superficie celular en forma de complejos consigo misma o con otras proteínas transmembrana.

Después del dominio transmembrana se encuentra la región citoplasmática de 40 aminoácidos que parece estar implicada en señalización al interior celular (Ruiz et al., 2008) pero sobre la que no existen muchos estudios.

El dominio citoplasmático y el transmembrana son los que tienen un mayor grado de conservación entre especies (Miyachi, Masuzawa et al. 1991)(Muramatsu and Miyachi, 2003) existiendo un 70% de homología entre humano y ratón en el dominio citoplasmático (Muramatsu and Miyachi 2003). Esta conservación correlaciona con otros estudios en los que se observa que los dominios citoplasmático y transmembrana son críticos para la interacción de EMMP con otras proteínas dentro de la membrana plasmática (Kirk et al., 2000).

1.2.2. Expresión de EMMPRIN en la membrana plasmática.

Uno de los mecanismos que existen para regular la función de las proteínas de la superficie celular y la señalización que pueden desencadenar hacia el citoplasma de manera rápida y concreta, es mediante la regulación de su expresión en membrana. No se conocen en detalle los mecanismos del tráfico de EMMPRIN a la superficie celular ni de su reciclaje en ésta, pero existen algunos estudios en los que se demuestra que su estructura, así como su interacción con otras proteínas, pueden alterar la expresión de EMMPRIN en la membrana celular.

Así, se ha demostrado que EMMPRIN tiene un residuo Leucina en la cola citosólica conservada entre diferentes especies responsable de regular su tráfico a la zona basolateral de la membrana y aunque parece que los cuatro aminoácidos anteriores también son importantes para esta localización basolateral, la mutación de este único residuo es suficiente para que EMMPRIN se exprese en la parte apical de la membrana (Deora et al., 2004). Esta señal basolateral se ha descrito tan sólo en otra proteína, el factor de células madre SCF (stem cell factor) (Wehrle-Haller and Imhof, 2001). Sin embargo, en algunas situaciones pueden prevalecer las señales apicales, probablemente situadas en la parte extracelular de la proteína, sobre esta señal basolateral, y aún en presencia de la estructura intacta, EMMPRIN puede expresarse en la parte apical de la membrana en ciertos tipos celulares (Castorino et al., 2011).

Existe otro residuo en la secuencia aminoacídica de EMMPRIN, que también parece afectar a su tráfico a membrana, la prolina 211 que forma parte del dominio

transmembrana. Este dominio está relacionado con la expresión de EMMPRIN en la superficie celular regulada por ciclofilinas (Yurchenko et al., 2005). Éstas son proteínas que se unen a ciclosporinas (un tipo de inmunosupresores) y que tienen actividad peptidilprolilisomerasa, que favorece el plegamiento de otras proteínas (Jorgensen et al., 2003). Se ha descrito que la ciclofilina A puede catalizar la isomerización de la prolina 211 de EMMPRIN favoreciendo su conformación para estabilizarse en membrana (Schlegel et al., 2009). Las ciclofilinas están implicadas en la secreción de varios tipos de proteínas de membrana a través de la red trans-golgi, aunque aún se desconoce el mecanismo (Shiraishi et al., 2000, Chklovskaya et al., 2001, Pushkarsky et al., 2005). La ciclofilina 60 también podría estar regulando la expresión de EMMPRIN en la membrana, pero se desconoce el mecanismo (Pushkarsky et al., 2005).

No se han hallado evidencias de que EMMPRIN pueda estar interaccionando con las adaptinas GGAs (Golgi-localising Gamma-adaptins), responsables de llevar proteínas del aparato del Golgi a la red endosomal, y tampoco parece que la adaptina AP1B, responsable del tráfico de vesículas de clatrina a la zona basolateral, sea la responsable de conducir a EMMPRIN a esta zona de la membrana (Castorino et al., 2011). De esta manera se ha sugerido que EMMPRIN pueda estar interaccionando directamente con una proteína motora como ocurre con la rodopsina (Tai et al., 1999) Deora et al. 2004).

También se ha observado que en células tumorales el transportador de lactato MCT4 (MonoCarboxylate Transporter 4) es necesario para la expresión de EMMPRIN en membrana (Gallagher et al., 2007). Cuando se silencia MCT4 la proteína EMMPRIN no se glicosila lo suficiente y no se expresa en membrana.

Por otro lado, EMMPRIN es capaz de interaccionar con una de las proteínas estructurales de las caveolas, la caveolina-1. La interacción entre EMMPRIN y cav-1 parece tener lugar en regiones de membrana ricas en colesterol, como son las caveolas. Sin embargo hay algo de controversia en relación a la funcionalidad de esta interacción. Algunos estudios apuntan a que la sobreexpresión de cav-1 disminuye la agregación de EMMPRIN en membrana, así como su glicosilación en células tumorales, y su inhibición las aumenta (Tang and Hemler, 2004). Sin embargo esta interacción parece no darse en células epiteliales de alveolo en pulmón de ratón, y los ratones deficientes en cav-1 no muestran diferencias en el patrón de expresión de EMMPRIN en estas células (Barth et al., 2006). En otros estudios se ha observado que cav-1 induce la glicosilación de EMMPRIN, y por tanto su homodimerización y expresión en membrana (Jia et al., 2006, Du et al., 2009), que en células tumorales está ligada a inducción de MMPs e invasión tumoral (Sun and Hemler, 2001).

1.2.3. Función

Se ha descrito la expresión de EMMPRIN en varios tipos celulares así como en diferentes tejidos en humano y ratón. Así por ejemplo EMMPRIN se expresa en células hematopoyéticas, epiteliales y endoteliales (Fossum et al., 1991, DeCastro et al., 1996, Nehme et al., 1995) en linfocitos T y B activados, así como en células dendríticas, monocitos y macrófagos (Koch et al., 1999). También se ha descrito su expresión en diferentes tejidos como son el corazón, la placenta, el tiroides (Gabison et al., 2005), el sistema nervioso central (Fan et al., 1998) y se sobreexpresa en útero de ratón en la etapa en la que el blastocisto se implanta en el endometrio (Xiao et al., 2002). Además, parece tener un papel importante en desarrollo, diferenciación y remodelamiento de varios tipos de tejidos como son pulmón, timo, retina, piel, cornea y sistema nervioso (Renno et al., 2002, Betsuyaku et al., 2003, Gabison et al., 2005, Nabeshima et al., 2006b).

Pero EMMPRIN también ha sido estudiada en diferentes escenarios patológicos como inflamación y tumorigénesis dónde sus niveles de expresión son más altos que en condiciones basales en diferentes tipos celulares (DeCastro et al., 1996, Muraoka et al., 1993, Polette et al., 1997).

Por otro lado, se han descrito diversas alteraciones en los ratones deficientes en EMMPRIN. La mayoría de los embriones deficientes en EMMPRIN mueren en el momento de la implantación (Igakura et al., 1996, Igakura et al., 1998). Además tienen varios defectos relacionados con el sistema nervioso: déficit en aprendizaje y memoria, son más sensibles en el modelo de "impulsos eléctricos en los pies" ("electric foot shock") (Naruhashi et al., 1997) y son menos sensibles a los olores irritantes (Igakura et al., 1996). También poseen defectos en la respuesta linfocitaria (Igakura et al. 1996), y en diferentes funciones neuronales en las primeras etapas del desarrollo (Naruhashi et al. 1997). Estos ratones son también deficientes para los transportadores de lactato MCT1, MCT2 y MCT3 en el epitelio pigmentario, lo que produce un defecto en la función de los fotorreceptores y una posible ceguera (Hori et al., 2000, Ochrietor et al., 2002, Philp et al., 2003).

Además los ratones deficientes para EMMPRIN de ambos sexos son estériles. Los machos debido a una espermatogénesis defectuosa y las hembras son estériles debido a la implantación fallida (Igakura et al. 1998).

El fenotipo observado en estos ratones puede ser la consecuencia de la alteración de diversos procesos biológicos en los que EMMPRIN parece ser importante. Algunos de ellos se describen a continuación.

Inducción de metaloproteasas de matriz extracelular.

En diversos estudios se ha observado que EMMPRIN en diferentes escenarios es capaz de inducir la expresión y actividad de metaloproteasas de matriz (MMPs). Así por ejemplo la EMMPRIN secretada por células tumorales provoca la inducción de la expresión de MMPs en los fibroblastos normales que rodean el tejido tumoral, lo que provoca un aumento de la invasividad del tumor (Biswas et al., 1995). En concreto EMMPRIN puede inducir MMP1, MMP2 y MMP9 en fibroblastos (Li et al., 2001, Sun and Hemler, 2001, Kanekura et al., 2002). Parece ser que tanto la adición de EMMPRIN soluble al cultivo como la inducción de su expresión en las propias células, produce un aumento en la actividad metaloproteasa de fibroblastos (Li et al. 2001). EMMPRIN también estimula la producción de MMPs en las propias células tumorales (Sun and Hemler 2001). También se ha observado que además de la proteína soluble y la sobreexpresada en las células, EMMPRIN puede secretarse en microvesículas induciendo la expresión de MMPs en otras células, como por ejemplo endoteliales, induciendo en éstas una mayor capacidad angiogénica (Millimaggi et al., 2007). Parece ser además que el incremento de EMMPRIN y MMP2 en diferentes tipos de tumores se asocia con un mal pronóstico. Los tumores más agresivos son también los que mayor expresión de EMMP muestran (Iacono et al., 2007). Debido a que EMMPRIN se expresa aunque en menor cantidad en células normales sin capacidad tumorigénica, se piensa que la inducción de la producción de MMPs podría explicarse por un diferente estado de glicosilación o diferente procesamiento de la proteína en diferentes ambientes celulares (Muramatsu and Miyauchi, 2003).

La inducción de MMPs dependiente de EMMPRIN también se ha observado en otros contextos biológicos, como en la remodelación del endometrio (Braundmeier et al., 2006, Noguchi et al., 2003), en arteriosclerosis donde se relaciona la expresión de EMMPRIN con la expresión de MT1-MMP y MMP9 (Seizer et al., 2009) y en artritis reumatoide donde la ciclosporina A aumenta la activación de MMP9 *in vitro* en monocitos/macrófagos provenientes del fluido sinovial de artritis reumatoide, mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-EMMPRIN disminuye esta activación (Yang et al., 2008).

Adhesión celular.

EMMPRIN desempeña un papel importante en diferentes mecanismos de adhesión celular, ya sea en la unión a la matriz extracelular o a otras células. Así por ejemplo EMMPRIN estimula la migración e invasión en diferentes células tumorales a través de su interacción con las integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ (Fossum et al., 1991, Tang et al., 2008, Dai et al., 2009). Las integrinas son los principales mediadores de la adhesión de la célula con la matriz extracelular, pero además se ha demostrado que algunas de ellas, como por ejemplo $\alpha 3\beta 1$ también participan en la adhesión célula-célula en células epiteliales y endoteliales (Larjava et al., 1990, Lampugnani et al., 1991, Yanez-Mo et al., 1998). Esta interacción de EMMPRIN con integrinas está conservada en *Drosophila* durante el desarrollo (Reed et al., 2004) y parece ser responsable de mantener la arquitectura celular a través del citoesqueleto (Curtin et al., 2005).

EMMPRIN también es importante en la adhesión célula-célula en otros tipos celulares. En células tumorales forma un complejo con la proteína de membrana CD98 (Xu and Hemler, 2005) la cual regula fusión celular (Tsurudome and Ito, 2000) y la adhesión dependiente de integrinas (Miyamoto et al., 2003, Fenczik et al., 2001). Este complejo también parece estar implicado en la agregación celular de la línea celular mielóide U937 dependiente de CD98 (Cho et al., 2001). Sin embargo esta agregación a través de EMMPRIN también puede estar relacionada con la adhesión entre el “antígeno asociado con la función de linfocito”, LFA1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) y la molécula de adhesión endotelial ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) (Kasinrerk et al., 1999).

EMMPRIN es ligando para la E-selectina, una de las principales proteínas de adhesión en leucocitos. Así, la ausencia de EMMPRIN reduce la infiltración de neutrófilos al riñón después de isquemia/reperfusión, así como a través de monocapas formadas por células endoteliales en cultivo (Kato et al., 2009). Pero también parece implicada, a través de su interacción con la proteína sindecan-1, en la adhesión y quimiotaxis de linfocitos T (Pakula et al., 2007), y en la adhesión entre células dendríticas y linfocitos T (Woodhead et al., 2000).

EMMPRIN también se expresa en plaquetas y participa en la interacción plaqueta-monocito en aterosclerosis, estimulando la expresión de MMPs por parte de estos últimos (Schmidt et al., 2008) y su reclutamiento a la pared vascular (Schulz et al., 2011). Asimismo parece estar implicada en el “rolling” de plaquetas bajo condiciones de flujo arterial (Seizer et al., 2009).

EMMPRIN podría ser importante por sí misma en la adhesión célula-célula entre células endoteliales y epiteliales, ya que se ha descrito como un marcador de la

barrera hematoencefálica en pollo (Risau et al., 1986, Seulberger et al., 1990) y se localiza en los contactos célula-célula en diferentes tipos de epitelio (Deora et al., 2004, Ma et al., 2010, Schreiner et al., 2007), aunque no se ha descrito su función en estas uniones.

EMMPRIN también está implicada en la adhesión del *Plasmodium falciparum* (organismo causante de la malaria) a los eritrocitos (Crosnier et al., 2011) y en la adhesión e internalización del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en los linfocitos T (Pushkarsky et al., 2007, Pushkarsky et al., 2001).

Inflamación.

En la literatura existen varios ejemplos de la interacción de EMMPRIN con diferentes ciclofilinas y se ha observado que tanto en leucocitos de ratón como en humano es necesaria la expresión de EMMPRIN para que la quimiotaxis dependiente de ciclofilinas extracelulares ocurra. EMMPRIN interacciona con la ciclofilina A, quimioatrayente de neutrófilos, eosinófilos y células T. La unión a esta quimioquina desencadena una cascada de señalización que induce la quimiotaxis de la célula que expresa EMMPRIN en su superficie celular (Yurchenko et al., 2010). Existe correlación entre el aumento en la quimiotaxis dependiente de ciclofilinas de linfocitos T activados y el aumento en la expresión de EMMPRIN en estas células (Gwinn et al., 2006, Damsker et al., 2007). Además, parece que EMMPRIN tiene un papel importante en la última etapa de maduración (expansión) de linfocitos T (Renno et al., 2002). En el linfocito ya maduro la expresión de EMMPRIN es más baja, pero vuelve a inducirse cuando éste es activado (Zhang et al., 2002). Otros estudios muestran que la activación de linfocitos T dependiente de EMMPRIN parece estar causada por la interacción de éstos con las células presentadoras de antígeno (Stonehouse et al., 1999, Woodhead et al., 2000).

Se ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos contra EMMPRIN reducen la respuesta inflamatoria en modelos inflamatorios de ratón, como son la inflamación aguda inducida por LPS (Arora et al., 2005), la inflamación asmática aguda (Gwinn et al. 2006), la artritis reumatoide inducida por colágeno (Damsker et al. 2009)(Jia et al., 2009) la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Agrawal et al., 2011) y la inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Jia et al. 2009).

Existen también varias patologías con un componente inflamatorio que se relacionan con un aumento en la expresión de EMMPRIN en tejidos y células. Entre las que se encuentran enfermedades inflamatorias de pulmón (Hasaneen et al., 2005, Foda et al., 2001); lupus eritematoso sistémico (Pistol et al., 2007); enfermedad crónica de hígado inducida por el virus de la hepatitis C (Shackel et al., 2002); aterosclerosis

(Siwik et al., 2008, Yoon et al., 2005, Spinale et al., 2000, Choi et al., 2002); Isquemia (Waldow et al., 2009, Boulos et al., 2007). En muchas de estas patologías existe una correlación entre la expresión de EMMPRIN y la de ciclofilina A (Yurchenko et al., 2010).

EMMPRIN como chaperona.

Las chaperonas son proteínas que ayudan al plegamiento, ensamblaje y transporte de otras proteínas. Se ha descrito que EMMPRIN es capaz de interactuar con los transportadores MCT1, MCT3 y MCT4 facilitando su expresión y ensamblaje en membrana (Kirk et al., 2000, Philp et al., 2003). Se piensa que esta interacción es la responsable de que los ratones deficientes en EMMPRIN tengan una visión limitada, ya que estos transportadores se expresan en la superficie de las células de Müller y en las células fotorreceptoras, y están estrechamente relacionados con el metabolismo celular y la producción de energía, debido a que su principal sustrato es el lactato. Además EMMPRIN parece ser importante en la polarización en membrana de estos transportadores, en diferentes epitelios (Deora et al., 2005, Castorino et al., 2011).

Transducción de señales y angiogénesis.

Una función importante de las proteínas de membrana es la transducción de señales, por la que estímulos del exterior son recibidos, procesados y transmitidos al interior celular, provocando una respuesta a ese estímulo en concreto. EMMPRIN se ha relacionado con varias de las rutas de señalización de la célula. Así por ejemplo se ha relacionado la expresión de EMMPRIN en membrana con la vía de Vav/Rac/Pak en células T (Ruiz et al., 2008), las vías dependientes de Rac-1, PI3K/Akt/IKK/NF-kappaB y MKK7/JNK/AP-1 en cardiomiocitos (Venkatesan et al., 2010), la señalización desencadenada por fosfolipasa A2/5-lipoxigenasa en fibroblastos (Taylor et al., 2002) y la ruta canónica de Wnt/ β -catenina, la ruta de FAK-paxillin y FAK-PI3K-ca²⁺ y de la MAPK (mitogen-activated protein kinases) p38 en células tumorales (Lim et al., 1998). También se ha correlacionado con la expresión de otras proteínas MAPKs en diferentes tipos de tumores (Davidson et al., 2003). EMMPRIN también parece estar implicada en la señalización a través de ERK y Ca²⁺ en relación a su función como receptora de ciclofilinas (Yurchenko et al., 2001, Yurchenko et al., 2002, Boulos et al., 2007, Yang et al., 2008).

Existen varios estudios relacionando la actividad de EMMPRIN con la formación de nuevos vasos a partir de los ya establecidos, proceso conocido como angiogénesis. Por un lado la producción de metaloproteasas por parte de las células endoteliales es uno de los primeros pasos en angiogénesis, ya que son esenciales

para la remodelación de la matriz extracelular y la migración e invasión necesarias para la formación del nuevo vaso (Senger and Davis, 2011, Handsley and Edwards, 2005). En concreto se ha observado que EMMPRIN procedente de tumores es capaz de aumentar la capacidad angiogénica de células endoteliales in vitro a través de la producción de MMPs (Millimaggi et al., 2007, Caudroy et al., 2002). Además varias de las rutas de señalización descritas dependientes de EMMPRIN impactan de manera directa angiogénesis. Así, se ha descrito por ejemplo que EMMPRIN es capaz de regular la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor), ya señalización es esencial para el inicio de la angiogénesis (Gerhardt et al., 2003). Se han descrito dos vías a través de las cuales EMMPRIN induce la expresión de VEGF en células endoteliales; a través de la vía de señalización de PI3K-Akt (Tang et al., 2006); (Dai et al., 2011, Chen et al., 2009) y a través de la inducción del factor de transcripción HIF-2 α que a su vez induce la expresión del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) y de las isoformas solubles de VEGF 121 y 165, pero no de la isoforma insoluble 189, (Bougatef et al., 2009).

Por último EMMPRIN puede estimular su propia expresión a través de una retroalimentación positiva induciendo la producción de VEGF (Tang et al., 2005) así como de la forma soluble de EMMPRIN (Tang et al., 2004b).

2. OBJETIVOS

1. Caracterizar la expresión y la localización subcelular de la proteína transmembrana EMMPRIN durante la formación de monocapas endoteliales.

2. Analizar los mecanismos de reclutamiento de EMMPRIN a los contactos célula-célula endotelial.

3. Estudiar el impacto funcional de la deficiencia de EMMPRIN en la integridad vascular *in vitro* e *in vivo*.

4. Caracterizar los mecanismos moleculares por los que EMMPRIN regula la formación de los contactos endoteliales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos utilizados.

Anticuerpos primarios	Origen	Compañía
Caveolin-1	Conejo	BD Transduction Laboratories
Clatrina	Ratón	BD Transduction Laboratories
m-VE-cadherina	Cabra	Santa Cruz Biotechnology
Flag	Ratón	Sigma
HA	Ratón	Covance
hEMMP (VJ/9.1)	Ratón	Cedido por el laboratorio del Dr. Francisco Sanchez Madrid
hPECAM-1(TP1/15)	Ratón	Cedido por el laboratorio del Dr. Francisco Sanchez Madrid
hVE-cadherina (TEA1/31)	Ratón	Cedido por el laboratorio del Dr. Francisco Sanchez Madrid
mEMMP	Rata	eBiosciences
mPECAM-1	Hamster Armenio	Millipore
mVE-cadherina	Rata	BD Transduction Laboratories
pMLC	Ratón	Cell signalling
Rab11	Conejo	Sigma
β -Actin	Ratón	Sigma-Aldrich
γ -catenina	Ratón	BD Transduction Laboratories

Anticuerpos secundarios	Origen	Company
Anti ratón/ conejo/ rata conjugado con peroxidasa	Cabra	Jackson Immunoresearch Laboratories
Anti ratón/ conejo/ rata conjugado con Alexa 488, 594 o 647	Cabra	Molecular Probes (Invitrogen)
Anti ratón / cabra conjugado con Alexa 594 o 647	Burro	Molecular Probes (Invitrogen)
Anti Hamster Armenio conjugado con FITC	Cabra	Jackson Immunoresearch Laboratories

Cultivos celulares.

Las HUVEC (Human umbilical vascular endothelium cells) fueron obtenidas de la casa comercial Lonza o extraídas de cordones umbilicales cedidos por la Clínica del Rosario en Madrid. En este caso fueron extraídas y cultivadas según lo descrito en (Arroyo et al., 1992). Brevemente, la vena umbilical de los cordones se lavó con solución salina Hank's (HBSS) (Lonza) y se incubó con Colagenasa P (Roche) al 0,1% en HBSS durante 20min a 37°C. Posteriormente se perfundió la vena con medio 199 para extraer las células separadas de la matriz y neutralizar la digestión enzimática. Las células así extraídas o descongeladas en el caso de las comerciales, fueron

crecidas en medio 199 (Lonza) suplementado con suero fetal bovino (SFB, GIBCO) al 20%, penicilina (100U/ml, Lonza), estreptomicina (100 μ g/ml, Lonza), L-Glutamina (2mM Lonza), Hepes (10mMLonza), Heparina (10U/ml, Chiesi) y factores de crecimiento de cerebro bovino preparados en el laboratorio (0.05mg/ml). Las células fueron cultivadas sobre plástico o cristal ambos recubiertos con una matriz de gelatina (sigma) al 0,5% y para los experimentos con una matriz de colágeno bovino (10 μ g/mL, PureCol). Para los experimentos de cinética y formación en tubos de colágeno, se utilizó el medio HE-SFM (GIBCO) suplementado de la misma manera pero sin SFB.

Las células endoteliales de pulmón MLEC (Mice lung endotelial cells) de los ratones de genotipo silvestre o deficientes en EMMPRIN se obtuvieron como se describe en (Oblander et al., 2005). Brevemente, los pulmones de ratones de 4 a 8 semanas y después de homogeneizarlos mecánicamente con un bisturí fueron tratados con Colagenasa tipo I (0,4% en HBSS, GIBCO) 1h a 37°C. Posteriormente la reacción enzimática fue neutralizada con medio DMEM-F12 y la solución de células obtenida se pasó por un filtro de 70 μ m. La solución filtrada se centrifugó 5min a 1200rpm y el pellet se resuspendió en DMEM-F12 suplementado con SFB al 20%, antibióticos (Penicilina y estreptomicina), L-Glutamina, Hepes, Heparina y factores de crecimiento de cerebro bovino. Las células fueron crecidas sobre plástico con una matriz mezcla de colágeno bovino (30 μ g/mL), Fibronectina (10 μ g/mL) y Gelatina (0,1%) y seleccionadas para purificar el cultivo de células endoteliales.

Para extraer células endoteliales de aorta de ratón MAEC (Mice aortic endotelial cells) se extrajo la aorta de al menos 6 animales de cada genotipo y después de limpiar la grasa subyacente se digirieron en una solución de colagenasa/elastasa (1980U/ml de colagenasa tipo I y 11.3U/ml de elastasa, ambas de Worthington) durante 5min a 37°C. Transcurrido ese tiempo se separó la adventicia con unas pinzas y el tejido restante se digirió en colagenasa tipo I (1100U/ml) 45min a 37°C. La digestión se neutralizó con medio de cultivo y la suspensión resultante fue centrifugada 5min a 1200rpm. El pellet fue resuspendido en medio DMEM (Lonza) y las células así obtenidas se sembraron sobre placas de plástico recubiertas con una matriz de 0,02% de gelatina. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina), l-glutamina, Hepes y 10% de SFB y una vez crecidas se seleccionaron las células endoteliales mediante el uso de un imán con un anticuerpo anti-ICAM2 y un anticuerpo secundario unido a bolas magnéticas (anti rata hecho en oveja, Dako).

Las células CHO (Chinese Hamster Ovarium) fueron crecidas con DMEM-F12 suplementado con SFB al 5%, antibióticos (Penicilina y estreptomina), L-Glutamina y Hepes.

Todas las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% de CO₂.

Mantenimiento de la colonia de ratones deficientes en EMMPRIN.

Los ratones heterocigotos en fondo BL6 para el gen Bsg fueron cedidos por el Dr Kadomatsu. La colonia se mantuvo en heterocigosis ya que los ratones homocigotos deficientes en éste gen son estériles. Estos ratones además nacen en una frecuencia muy baja cuando están en fondo puro BL6, (Chen et al., 2004). Para optimizar la obtención de ratones homocigotos deficientes en Bsg se procedió a cruzar ratones heterocigotos en EMMPRIN con fondo C57/BL6 (Charles River) con ratones de genotipo silvestre 129sv (Charles River). Los heterocigotos descendientes de este cruce se cruzaron para obtener los ratones homocigotos deficientes en EMMPRIN que fueron empleados en los diferentes experimentos de esta tesis. Los animales fueron alimentados ad libitum con una dieta estándar (2018 Teklad global, Harlan Interfauna Ibérica S.L.). El mantenimiento de los animales se realizó siguiendo la normativa internacional. Se realizaron periódicamente informes de seguimiento sanitario, en los que consta la ausencia de organismos patógenos de acuerdo a las recomendaciones de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Silenciamiento de EMMPRIN en células primarias mediante ARNi y transfección.

Se sembraron 300000 HUVEC por pocillo de placa de p6 el día anterior a la transfección. Transcurridas de 18h a 20h las células fueron transfectadas con oligonucleótidos de pequeño tamaño (50 nucleótidos) de ARN prediseñado (Ambion) capaz de interferir la expresión de EMMPRIN a través de la degradación de su RNA mensajero. Para la introducción de los oligonucleótidos en las células se utilizó oligofectamina (invitrogen) en medio optimem (Gibco). Se incubaron las células con los complejos de siRNA y oligofectamina durante 4h en un volumen total de 800µl y después se añadieron 400µl de Optimem con SFB al 30% de modo que la concentración final de este último quedó al 10%. A las 24h se procedió a utilizar las células para los diferentes experimentos.

Para la realización de los experimentos de video-microscopía con “LifeAct” las HUVEV se silenciaron para EMMPRIN como se acaba de describir y 24h después de

añadir el ARNi y manteniéndolas en Optimem se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las indicaciones facilitadas por el fabricante. Después de 20h las células se levantaron mediante tripsina y se sembraron en una placa de 35mm de diámetro con fondo de cristal. A las 6h después de sembradas se pusieron en el microscopio confocal a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% de CO₂ y se tomaron fotos en diferentes posiciones de la placa cada 5min durante 15h.

Citometría de flujo.

Las HUVEC fueron cultivadas como se ha indicado anteriormente y despegadas del sustrato en presencia de tripsina (Gibco) 5min a 37°C. Las células fueron centrifugadas 5min a 1200rpm a RT resuspendidas en PBS con BSA al 2% y contadas. Se utilizaron 100000 células para cada tipo de tinción y después de centrifugarlas de nuevo en las mismas condiciones se resuspendieron en el sobrenadante del hibridoma VJ1/9.1 para analizar la expresión de EMMPRIN en la superficie celular y en el sobrenadante del hibridoma TP1.15 para ver expresión de PECAM-1, que se empleó como control positivo o en PBS como control negativo. Las células se incubaron con el sobrenadante 20min a 4°C, después de lo cual se lavaron con PBS-BSA 2%, se centrifugaron y se resuspendieron en esta misma solución con un anticuerpo anti-ratón conjugado con Alexa 488 diluido en PBS-BSA. Las células se incubaron con el anticuerpo secundario 20min a 4°C y a continuación se lavaron con PBS-BSA se centrifugaron y se resuspendieron en una dilución de Ioduro de Propidio en PBS-BSA. Las células así resuspendidas se analizaron en el citómetro (FACs-Canto, Becton Dickinson) descartando las células teñidas con Ioduro de Propidio como células muertas.

Análisis de proteínas mediante western blot.

Para la separación de proteínas por electroforesis y su posterior análisis mediante western blot se desnaturalizaron cantidades iguales de proteínas (10-30µg) a 95°C en tampón Laemmli y se cargaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de diferentes porcentajes. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C; Amersham Pharmacia Biotech, UK). Las membranas se bloquearon durante 1h en una solución de BSA al 5% en PBST (PBS con Tween-20 al 0,1%). Posteriormente se incubaron 1h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario y después de lavarlas en PBST se

incubaron 1h a temperatura ambiente en anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

Para el análisis de proteínas en condiciones nativas se empleó el kit comercializado por invitrogen, NativePAGETM y se siguieron las indicaciones facilitadas en el kit.

Immunofluorescencia in vitro.

Para el análisis de inmunofluorescencia, se sembraron 80000 células por pocillo de p24 con cristal, recubierto de la matriz requerida. Las células se dejaron crecer hasta el punto de confluencia de interés y posteriormente fueron fijadas en una solución de PFA al 4% y Sacarosa al 2% en PBS y lavadas tres veces en PBS. Posteriormente se bloquearon con BSA al 2% en PBS. En algunos casos las células fueron permeabilizadas durante 10min en una solución de TX100 al 1% en PBS. Posteriormente se incubaron en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en PBS durante 1h a 37 °C o durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron 3 lavados de 5min en PBS y los cristales fueron incubados con el anticuerpo secundario diluido en PBS 1h a 37°C en cámara húmeda. Después de la incubación, se realizaron tres lavados de 5min en PBS y finalmente los cristales fueron montados sobre portaobjetos con medio de montaje Prolong (invitrogen) y sellados con Dpx (Fluka).

Geles de colágeno.

Las HUVEC se sembraron sobre un primer gel de colágeno compuesto por colágeno diluido en medio HE-SFM (o EBM)+ 0,5% NaOH quedando el colágeno a una concentración final de 1,2 mg/ml. Posteriormente las células se incubaron sobre este gel en su medio durante 30min- 1h hasta que se observó en el microscopio de contraste de fases que las células ya se habían adherido al primer gel. En ese momento se retiró el medio y se añadió un segundo gel de colágeno sobre las células ya adheridas. Se incubó 1h a 37°C en el incubador para permitir la gelificación del colágeno. Una vez transcurrido ese tiempo se añadió 1ml de HE-SFM con 10% de SFB y factores de crecimiento. Transcurridas 24h se tomaron fotos en microscopía de contraste para observar la morfología general de los tubos y con el objetivo de analizar el número de tubos formados por pocillo. Posteriormente los geles se fijaron en Paraformaldehído al 4% durante 20min a T^a ambiente, y se analizó la distribución de EMMPRIN mediante inmunofluorescencia (descrita anteriormente) y microscopía confocal.

Immunofluorescencia de tejidos *ex vivo*.

Para el análisis de EMMPRIN y de diferentes marcadores de los contactos celulares entre células endoteliales en vasos de diferentes tejidos de ratón, se utilizaron ratones de 4-8 semanas de edad, que fueron perfundidos con PFA al 1% con una tasa de perfusión de 4ml/min. Posteriormente se extrajeron la tráquea, la aorta y el diafragma y fueron sometidos a otra fijación *ex vivo* con PFA 1% durante 1h a RT. Después, los tejidos fueron lavados en PBS y limpiados bajo la lupa para retirar restos de grasa y otros tejidos que pudieran dificultar la visualización de los vasos. Una vez limpios los tejidos se incubaron en el anticuerpo primario diluido en PBS con TX100 al 0,3% y suero del cabra o de burro al 2% durante toda la noche a T^a ambiente o a 4°C dependiendo del anticuerpo y en agitación suave. Al día siguiente se realizaron 6 lavados de 30min seguidos de dos de 1h con PBS TX100 0,3% y posteriormente los tejidos fueron incubados en el anticuerpo secundario diluido en PBS TX100 al 0,3% durante toda la noche a RT o a 4°C. Finalizada la incubación con el secundario se realizaron otra vez 6 lavados de media hora en PBS TX100 0,3% y 2 de una hora en PBS para retirar los restos de detergente. Una vez lavados, los tejidos fueron fijados de nuevo durante 2min a RT en PFA al 1% y montados con Vectashield (VectorLabs) sobre portaobjetos que posteriormente fueron sellados con Dpx.

Ensayo de permeabilidad *in vitro*.

Con el objetivo de analizar la integridad de la monocapa formada por las HUVEC deficientes en EMMPRIN, se sembraron células control, interferidas con ARNi Neg y con dos ARNi diferentes para EMMPRIN sobre pocillos con una membrana permeable recubierta de Col I (Millipore). Las células se cultivaron durante 72h en medio 199 complementado para permitir la maduración de la monocapa. Transcurridas esas horas, se añadió dextrano fluorescente (FITC) de bajo peso molecular (70KDa) en la parte superior del pocillo y se fueron recogiendo muestras de medio de la parte inferior del pocillo a diferentes tiempos. Posteriormente estas muestras se analizaron en el espectrofluorímetro con un filtro de excitación de 488nm y de emisión de 538nm.

Ensayo de Permeabilidad *in vivo*.

Se realizaron dos tipos de ensayos de permeabilidad vascular *in vivo* y todos se realizaron con ratones de 5-6 semanas de edad de fenotipo silvestre o deficientes en EMMPRIN.

1. Permeabilidad vascular en estado basal: Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Zoletil/Domtor y posteriormente fueron inyectados vía intravenosa en la vena yugular izquierda externa, con una solución de azul de Evans en suero fisiológico, a una concentración de 30mg/kg del animal en un volumen de 150 μ l. Los animales fueron reanimados con antisedan y se sacrificaron mediante cámara de CO₂ transcurridas las 24h. Posteriormente se perfundieron con suero fisiológico a una tasa de 4ml/min y los órganos fueron extraídos y deshidratados a 55°C 24h. Una vez secos fueron pesados y el azul de Evans fue extraído del tejido por inmersión del órgano en 500 μ l de formamida durante 48h a RT. Se tomaron muestras del colorante diluido en la formamida de cada órgano y éstas fueron analizadas en el espectrofotómetro a 600nm y los datos normalizados con respecto al peso en seco de cada órgano.

2. Permeabilidad vascular en condiciones de inflamación: Los ratones fueron anestesiados e inyectados como se acaba de describir en el párrafo anterior. Transcurridos 5 min después de la inyección se aplicó en la oreja derecha del animal aceite de mostaza (diluida al 5% en aceite mineral) y en la oreja izquierda aceite mineral. Después de 30 min se sacrificó a los animales mediante cámara de CO₂. Se extrajeron las orejas, y se procesaron como se ha explicado antes para los órganos. Este mismo ensayo se realizó pinchando Dextrano conjugado con TIRTC de 4KDa o 70KDa en lugar de azul de Evans. En este caso las orejas fueron procesadas según lo descrito en el apartado de inmunofluorescencia de tejidos *ex vivo*.

Microscopía electrónica de aorta de ratón.

Para el análisis de la ultraestructura de los contactos endoteliales en aorta de ratón se emplearon ratones de 5 semanas tanto de fenotipo salvaje como deficientes en EMMPRIN. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Zoletil/Domtor. Una vez dormidos los animales fueron perfundidos por el ventrículo izquierdo con PFA 4% y Glutaraldehído al 1% a una tasa 4mL/min. Una vez perfundidos los animales se

les extrajeron las aortas, se retiró la grasa subyacente se trocearon en anillos de 5mm y fueron incluidas en resina y procesadas para realizar cortes ultrafinos.

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE EMMPRIN DURANTE LA FORMACIÓN DE LA MONOCAPA ENDOTELIAL.

Con el objetivo de analizar la expresión y localización subcelular de la proteína de membrana EMMPRIN en células endoteliales se emplearon como modelo de estudio células endoteliales de cordón umbilical humano (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) y se analizaron a diferentes tiempos durante la formación de la monocapa endotelial en cultivo (1, 24, 48 y 72h después de la siembra).

4.1.1. La expresión de EMMPRIN se regula en la superficie de las HUVECs durante la formación de la monocapa.

Mediante el empleo de citometría de flujo se observó que aproximadamente el 100% de las HUVECs expresaban EMMPRIN en su superficie celular y que esta expresión variaba a lo largo de la formación de la monocapa (Figura 6).

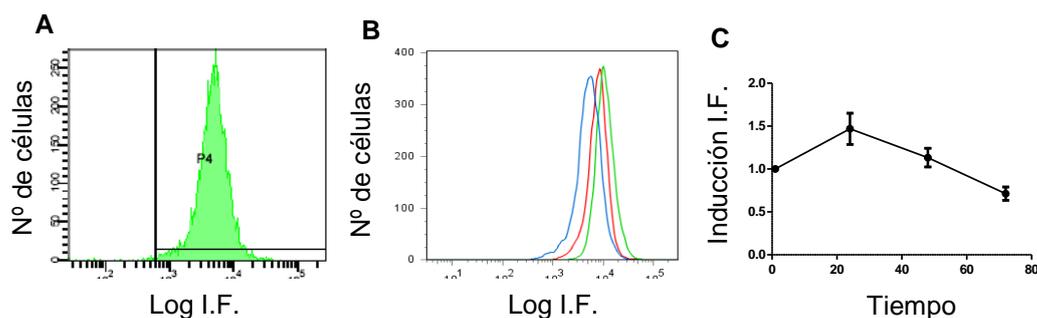


Figura 6. La expresión de EMMPRIN varía en la superficie celular a lo largo de la formación de la monocapa endotelial. A. Patrón de expresión de EMMPRIN en membrana en HUVEC en confluencia, analizado por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia se da en escala logarítmica. EMMPRIN se expresa en el 100% de las HUVEC en cultivo. **B.** Expresión de EMMPRIN en membrana, analizada por citometría de flujo a 1h, 24h, 48 y 72h después de la siembra. **C.** Representación del cambio en la intensidad de fluorescencia de EMMPRIN en membrana a lo largo del establecimiento de la monocapa mediante inducción total con respecto a 1h. Media aritmética \pm s.e.m. (n=3).

De esta manera la expresión de EMMPRIN en superficie aumentaba de 1h a 24h coincidiendo con el momento en que las células empiezan a establecer las uniones y a adquirir confluencia en cultivo. La expresión disminuía a las 48h y 72h, coincidiendo con la adquisición del estado quiescente de la monocapa. Esta regulación de la expresión podría sugerir un posible papel de EMMPRIN en la formación de las uniones.

4.1.2. La cantidad total y el estado de glicosilación de EMMPRIN varía a lo largo de la formación de la monocapa endotelial.

El análisis bioquímico mediante “western blot” mostró una regulación en la cantidad de EMMPRIN en lisados totales similar a la observada en la superficie celular (Figura 7). Asimismo la movilidad electroforética de EMMPRIN cambiaba de 1h a 24h, lo que podría corresponder según trabajos publicados anteriormente con un cambio en el estado de glicosilación de la proteína (Tang et al., 2004a).

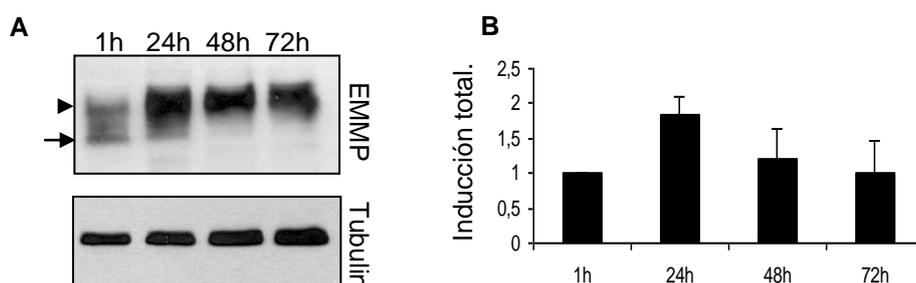


Figura 7. La expresión total de EMMPRIN varía a lo largo de la formación de la monocapa de HUVEC en cultivo. A. Western blot de lisados totales de HUVEC a 1, 24, 48 y 72h postsiembra mostrando la expresión de EMMPRIN a estos tiempos. Se muestra también el cambio en la glicosilación de EMMPRIN a lo largo de la formación de la monocapa. (flecha, EMMPRIN con bajo nivel de glicosilación y cabeza de flecha, EMMPRIN altamente glicosilada). **B.** Cantidad de proteína total de EMMPRIN en relación a la expresión de tubulina. Los datos se muestran como la media aritmética ± s.e.m. (n=3)

Como ya se ha comentado en la introducción, la glicosilación de EMMPRIN puede afectar a su homodimerización en membrana, así como a su interacción con otras proteínas. De modo que este cambio en la movilidad electroforética observado en las primeras etapas de la formación de la monocapa así como el cambio en su expresión podrían suponer una diferente regulación del tráfico de EMMPRIN o de su localización subcelular.

4.1.3. EMMPRIN se recluta de manera temprana a los contactos intercelulares.

La localización subcelular de EMMPRIN fue analizada durante la formación de la monocapa en cultivo mediante microscopía confocal (Figura 8). Se pudo observar que en los primeros estadios de la formación de la monocapa (1h y 24h) EMMPRIN se localizaba de manera difusa en la membrana y en pequeñas vesículas en la parte apical de la superficie celular. Asimismo EMMPRIN aparecía enriquecida en protrusiones de membrana como filopodia y lamelipodia entre células adyacentes.

Algunas de estas estructuras en las que se vio un enriquecimiento de EMMPRIN no eran positivas para el marcaje de la VE-cadherina, lo que sugiere un reclutamiento más temprano de EMMPRIN en la formación de los nuevos contactos intercelulares. Según transcurría la maduración de la monocapa (48h y 72h) se vio cómo EMMPRIN se reclutaba principalmente a estos contactos.

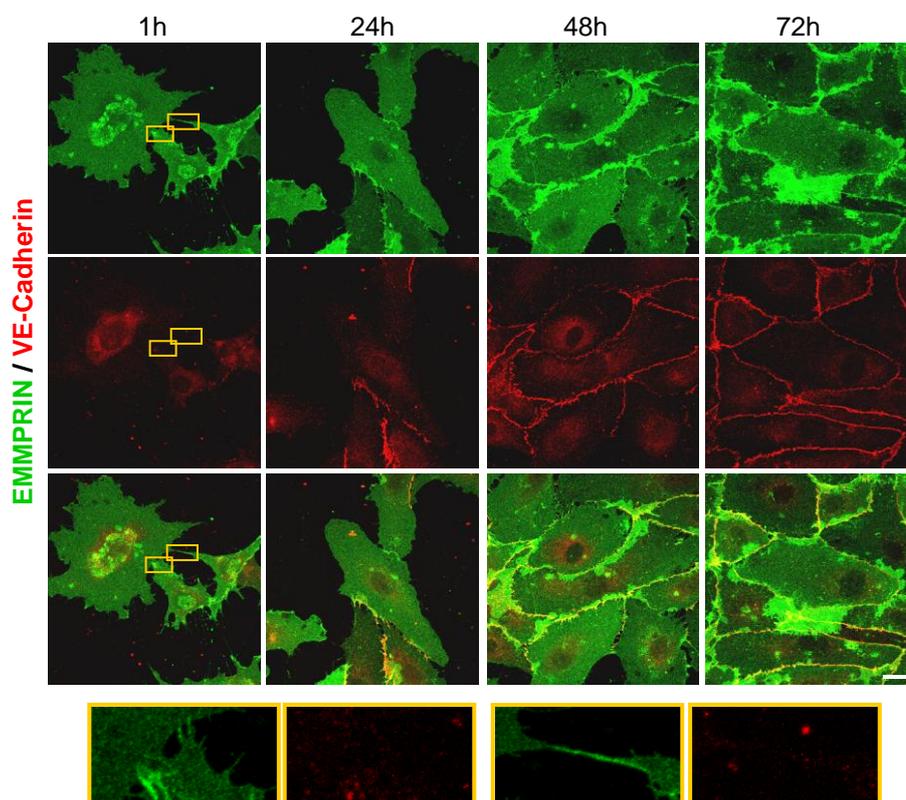


Figura 8: EMMPRIN se recluta en protusiones de membrana que inician los contactos entre células endoteliales y decora las uniones entre estas células cuando han alcanzado la confluencia. Tinción mediante inmunofluorescencia de EMMPRIN (verde) y de VE-cadherina (rojo) a lo largo del establecimiento de la monocapa de HUVEC. Se muestran proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3µm. Escala 20µm. En los detalles se muestra a mayor magnificación cómo EMMPRIN se recluta de manera temprana a regiones de membrana donde se está iniciando el contacto entre dos células sin tinción positiva para VE-cadherina.

Una vez confirmada la presencia de EMMPRIN en los contactos formados entre células endoteliales, se analizó su colocalización con marcadores de diferentes tipos de unión de las células endoteliales una vez establecida la monocapa (Figura 9). Se vio que EMMPRIN colocalizaba con las proteínas VE-cadherina (uniones adherentes), JAM-A (uniones estrechas) y PECAM-1 en un 47,82%, 74% y 95% respectivamente.

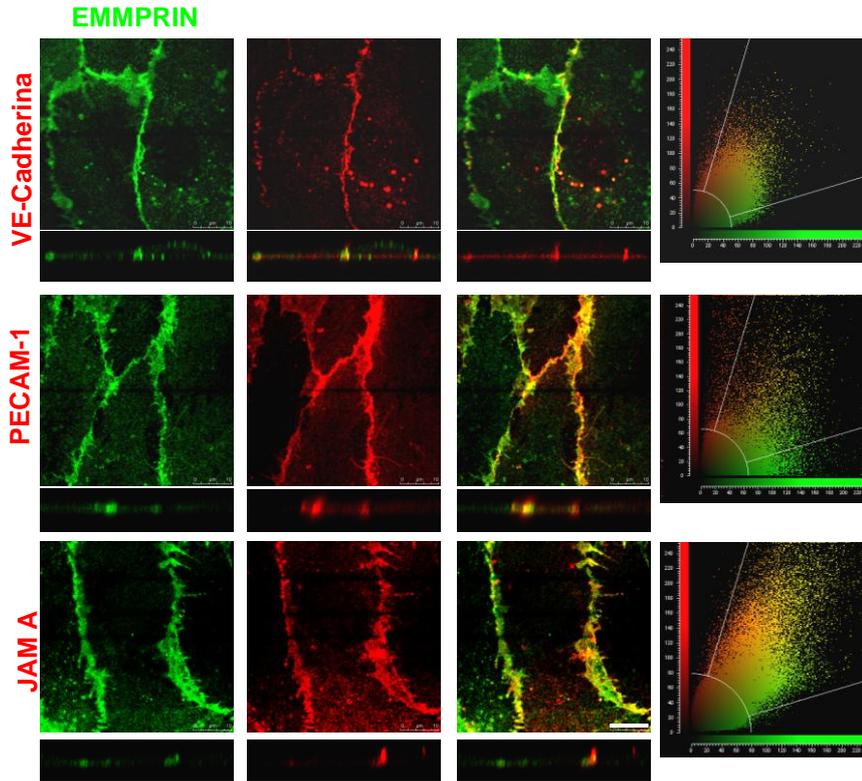


Figura 9: EMMPRIN colocaliza principalmente con PECAM-1 en los contactos intercelulares de HUVEC en cultivo. Se muestran secciones confocales de 0,3 μ m de dobles tinciones mediante inmunofluorescencia de EMMPRIN con otras proteínas de los contactos celulares, en concreto VE-cadherina (Colocalización: 47,82% \pm 13,71%) perteneciente a uniones adherentes, JAM A (Colocalización: 80,74% \pm 7,91%) de uniones estrechas y PECAM-1 (Colocalización: 95,00% \pm 3,54%). Escala 10 μ m. A la derecha se muestra un patrón representativo del análisis de colocalización.

Estos datos indicaban a que EMMPRIN muestra un tipo de distribución en las uniones endoteliales más similar a JAM-A y principalmente a PECAM-1 el cuál no se asocia a ningún tipo de unión en concreto.

4.2. TRÁFICO DE EMMPRIN A LOS CONTACTOS CELULARES.

Habiéndose observado que la localización de EMMPRIN variaba durante el establecimiento y maduración de la monocapa y cómo parte del estudio de la regulación de EMMPRIN en células endoteliales, se decidió investigar qué rutas de tráfico celular podrían estar implicadas en el reclutamiento de EMMPRIN a los contactos intercelulares. Para ello se analizó mediante microscopía confocal la colocalización de EMMPRIN con marcadores implicados en reciclamiento y tráfico celular cómo son clatrina, el marcador de endosomas tempranos EEA1 (early endosome antigen 1) y las GTPasas de pequeño tamaño Rab11 y Rab8 (Figura 10).

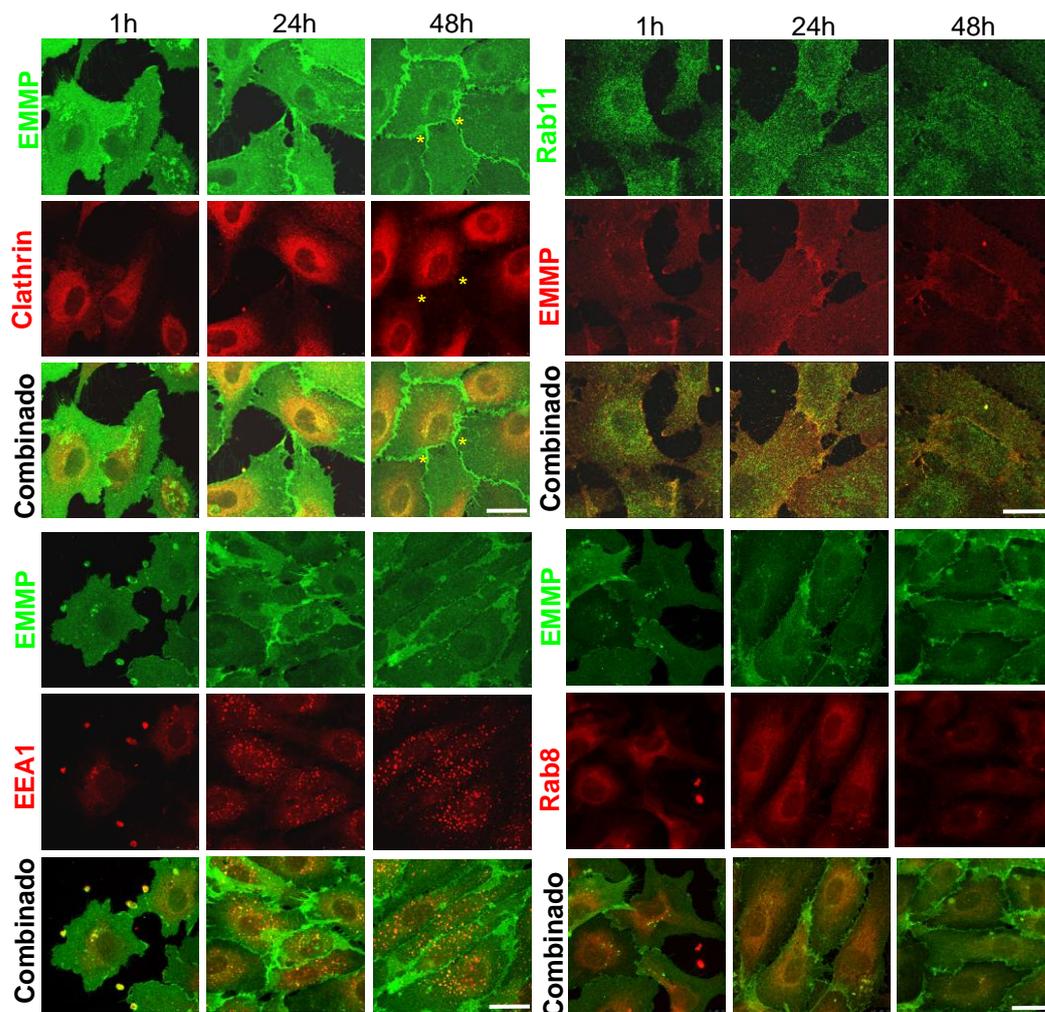


Figura 10: EMMPRIN colocaliza parcialmente con vesículas positivas para Rab11 y clatrina en los contactos. Se muestran dobles inmunofluorescencias de EMMPRIN con diferentes marcadores de vesículas implicadas en tráfico celular. Rab11 y clatrina son marcadores de vesículas de reciclaje, Rab8 de vesículas de tráfico de la red trans-golgi a membrana y EEA1 es marcador de endosomas tempranos. Las fotos muestran secciones de 0, 3µm tomadas mediante microscopía

Mediante este análisis se vio que EMMPRIN colocalizaba parcialmente con clatrina en la zona perinuclear principalmente y en algunas zonas de membrana dónde dos células contactaban (asteriscos). EMMPRIN también localizaba parcialmente Rab11 en el interior celular y también en zonas de los contactos. Sin embargo la localización con Rab8 se restringía a la zona perinuclear principalmente a 1h y 24h mientras que la localización con EEA1 quedaba restringida a algunas vesículas a 1h (Figura 10). También se analizó la colocalización de EMMPRIN con la proteína de caveolas caveolina-1 (cav-1), ya que se ha descrito la interacción entre estas dos proteínas en otros tipos celulares (Tang et al., 2004a). Las caveolas se han implicado principalmente en endocitosis, pero también se ha descrito su papel en transporte desde la red transgolgi a la parte apical de la membrana principalmente (Scheiffele et

al., 1998). A 1h y 24h después de la siembra se observó como EMMPRIN colocalizaba principalmente con vesículas ricas en Cav-1, disminuyendo esta colocalización a 48h cuando la monocapa ya estaba formada (Figura 11).

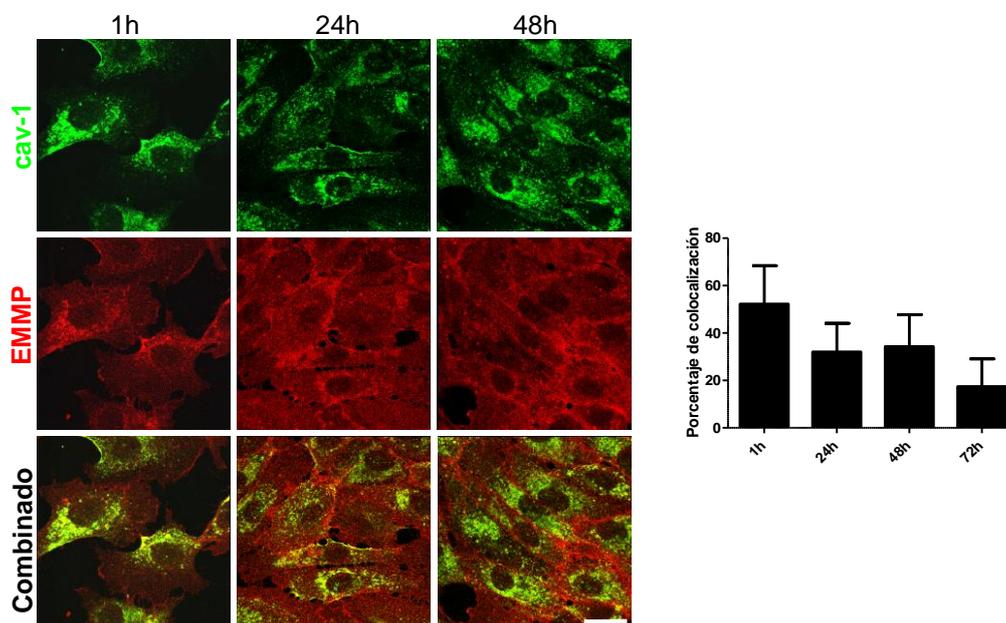


Figura 11. EMMPRIN colocaliza con caveolina-1 al principio de la formación de la monocapa. A. Tinción mediante inmunofluorescencia de EMMPRIN (rojo) y cav-1 (verde). Se muestran secciones confocales de 0,3 μ m. Escala 20 μ m **B.** Gráfico mostrando el análisis de colocalización. Los datos se dan como la media aritmética \pm s.e.m. (n=3).

Este cambio en la colocalización de EMMPRIN y Cav-1 correlaciona con el cambio en la glicosilación de EMMPRIN observado mediante bioquímica. Estos datos coinciden con lo publicado en trabajos anteriores en los que se demuestra la interacción entre EMMPRIN poco glicosilada y Cav-1 (Tang et al., 2004a).

A continuación se decidió estudiar si el estado de glicosilación de EMMPRIN podía influir en el tráfico de ésta a los contactos celulares. Para ello se empleó una construcción de EMMPRIN en la que se mutaron los aminoácidos susceptibles de glicosilación por aminoácidos que no pudieran glicosilarse. Esta construcción se transfeció en células epiteliales de ovario de hámster chino (CHO) que no expresan EMMPRIN en condiciones basales, eliminando así el efecto que pudiera tener la posible interacción de la EMMPRIN endógena con la EMMPRIN mutada (Figura 12). Se observó que las células transfectadas con el mutante mostraban una mayor acumulación de la proteína en la parte apical de la célula, mientras que en las células transfectadas con la EMMPRIN silvestre, esta proteína se localizaba en las uniones entre las células.

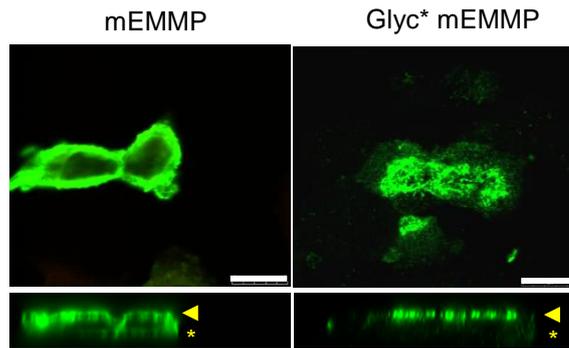


Figura 12. La mutación de los sitios de glicosilación de EMMPRIN impide su reclutamiento a las uniones. Se muestran proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3μm de células transfectadas con EMMPRIN silvestre de ratón (mEMMP) y EMMPRIN de ratón mutado en sus sitios de glicosilación (Glyc*mEMMP). Escala 10μm. Debajo se muestran las proyecciones en Z. (asterisco, parte basal; cabeza de flecha, parte apical). La tinción se hizo mediante inmunofluorescencia de los epítomos HA (mEMMP) y FLAG (Glyc*mEMMP).

4.3. CONTRIBUCIÓN DE EMMPRIN A LA FORMACIÓN DE TUBOS Y MONOCAPAS ENDOTELIALES.

Con el objetivo de conocer el papel que EMMPRIN podría desempeñar en la formación de tubos capilares y monocapas endoteliales y más en concreto en los contactos entre las células endoteliales, se utilizaron células deficientes en esta proteína en diferentes modelos funcionales.

4.3.1. La expresión de EMMPRIN disminuye eficazmente en células HUVEC transfectadas con oligonucleótidos de ARN de interferencia.

Para reducir la expresión de EMMPRIN en HUVEC se emplearon oligonucleótidos de ARN de interferencia (ARNi) específicos para esta proteína. Después del silenciamiento se recogieron lisados proteicos a diferentes tiempos y se observó una disminución de un 50% a un 80% de EMMPRIN a nivel de proteína total que se mantenía hasta las 72h postsiembra (Figura 13). Como control se incubaron células sólo con oligofectamina (CN) ó con un ARNi del que no existe diana en el genoma humano (Neg).

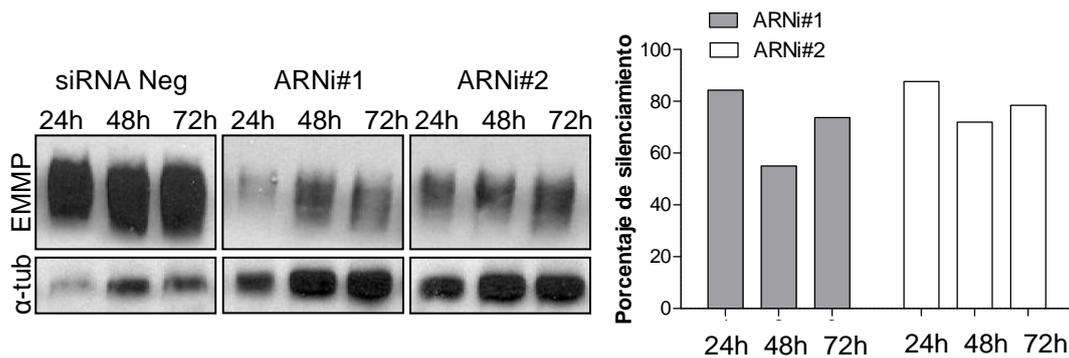


Figura 13. EMMPRIN se silencia eficientemente con oligonucleótidos de ARNi. **A.** Western blot mostrando la banda de EMMPRIN en células incubadas con un oligonucleótido sin diana (Neg) o con dos oligonucleótidos capaces de interferir la expresión de EMMPRIN. Los lisados se tomaron a 1h, 24h y 48h después de sembrar las células. Se muestra como control de carga la α -tubulina. **B.** El histograma de barras representa la cuantificación de la expresión de EMMPRIN en relación a la expresión de tubulina. El valor es dado como porcentaje de silenciamiento respecto del control (Neg).

4.3.2. La ausencia de EMMPRIN afecta a la formación de tubos endoteliales.

Para evaluar el efecto funcional de la disminución de EMMPRIN en HUVEC, se analizó la formación de tubos tridimensionales formados por estas células cuando son embebidas en geles de colágeno tipo I (Figura 14).

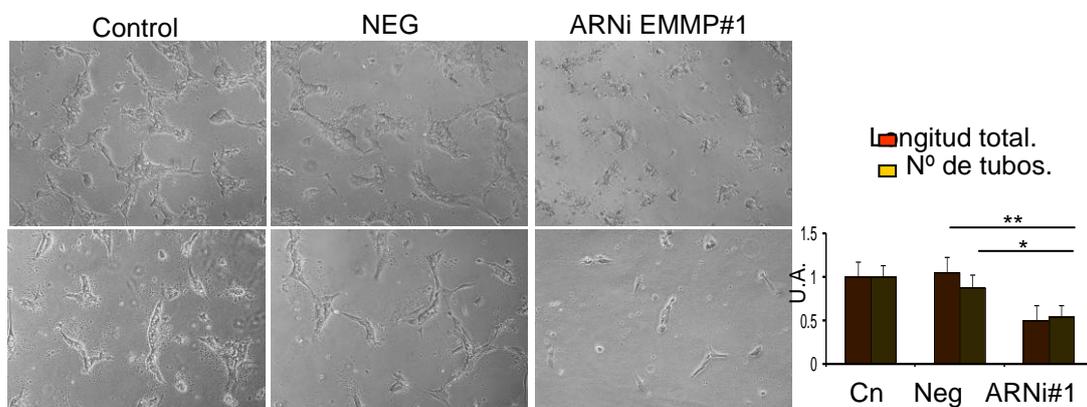


Figura 14. Las HUVEC silenciadas para EMMPRIN forman menos tubos en geles de colágeno. **A.** Microscopía de fase mostrando los tubos formados en geles de colágeno por HUVEC control, Neg o silenciadas para EMMPRIN. (Magnificación 20x) **B.** Cuantificación de los tubos formados. Las barras del histograma representan la media aritmética \pm s.e.m. en inducción total con respecto a la media control. * $P=0,044$; ** $P=0,017$. (t de student, $n=3$).

Se observó una reducción en el número de estructuras tubulares en HUVEC silenciadas en EMMPRIN, y en su lugar se observaron restos celulares conformando una especie de estructura tubular. Esto podría indicar que las estructuras tubulares formadas por las células deficientes en EMMPRIN eran más inestables. La tinción de

EMMPRIN mediante inmunofluorescencia confirmó que esta proteína también se expresa en los contactos entre las células endoteliales formando estas estructuras (Figura 15).

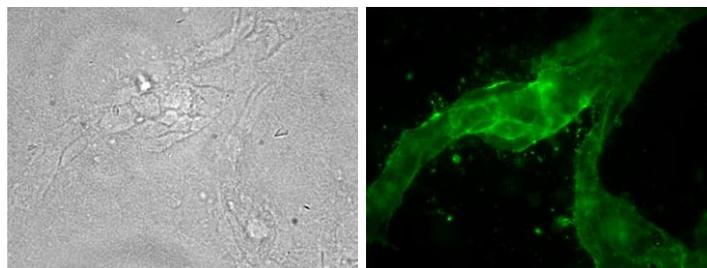


Figura 15. EMMPRIN se expresa también en los contactos entre HUVEC formando tubos en geles de colágeno I. Microscopía de fase e inmunofluorescencia de EMMPRIN (verde) mediante microscopía de epifluorescencia de un tubo formado por HUVEC embebidas en un gel de colágeno I

Una de las causas que puede afectar a la estabilidad de los tubos en tres dimensiones es la formación y maduración de los contactos intercelulares. Por esta razón y habiendo observado que EMMPRIN se localizaba en las uniones endoteliales también en estos tubos, se procedió a analizar si las HUVEC silenciadas para EMMPRIN eran capaces de formar correctamente los contactos entre ellas.

4.3.3. La deficiencia de EMMPRIN afecta a la estructura de los contactos intercelulares.

Para evaluar el impacto de la ausencia de EMMPRIN en la estabilización de las uniones endoteliales, se sembraron células control y silenciadas y se cultivaron hasta llegar a la confluencia (48h-72h). Las células observadas por contraste de fase mostraban indicios de alguna alteración en los contactos, ya que las células interferidas para EMMPRIN tenían una mayor retracción de la membrana en los contactos intercelulares (Figura 16A). Una vez fijadas las células se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de diferentes proteínas de las uniones. Se observó que en las células interferidas para EMMPRIN decrecía la intensidad de PECAM-1 y JAM-A (Figura 16B).

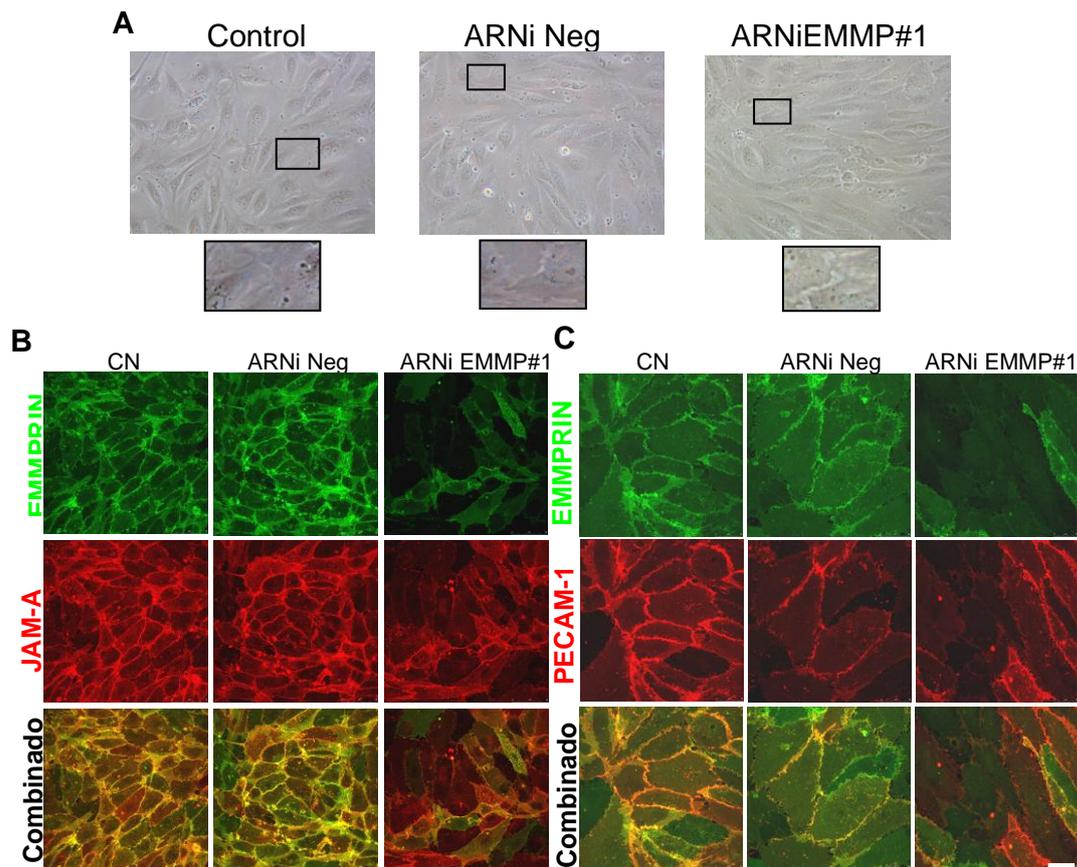


Figura 16: El silenciamiento de EMMPRIN en HUVEC altera la expresión de proteínas de las uniones célula-célula. A. Microscopía de contraste de fases mostrando monocapas formadas por HUVEC control o interferidas con un ARNi Neg o ARNi para EMMP. Se muestra a mayor magnificación la retracción de algunos de los contactos. **B.** Inmunofluorescencia de JAM A (rojo) y EMMPRIN (verde) en células confluentes. Proyecciones máximas de secciones en Z de 0,3 μm . Escala 50 μm . **C.** Inmunofluorescencia para la proteína de uniones PECAM-1 (rojo) y EMMPRIN (verde). Proyecciones máximas de secciones en Z de 0,3 μm . Escala 25 μm .

Además la VE-cadherina, componente principal de las uniones adherentes, mostraba un patrón diferente al observado en las células control. Mientras que en las células control o transfectadas con el ARNi negativo, la VE-cadherina aparecía como una línea que recorría el borde entre las dos células, los contactos entre células interferidas mostraban un patrón más ancho y desordenado. (Figura 17A). Este patrón fue cuantificado mediante el programa de análisis de imagen Image J (Figura 17B), y se observó que había un aumento en la anchura de la unión teñida con VE-cadherina estadísticamente significativo entre las células silenciadas para EMMPRIN respecto a las células control (Figura 10C).

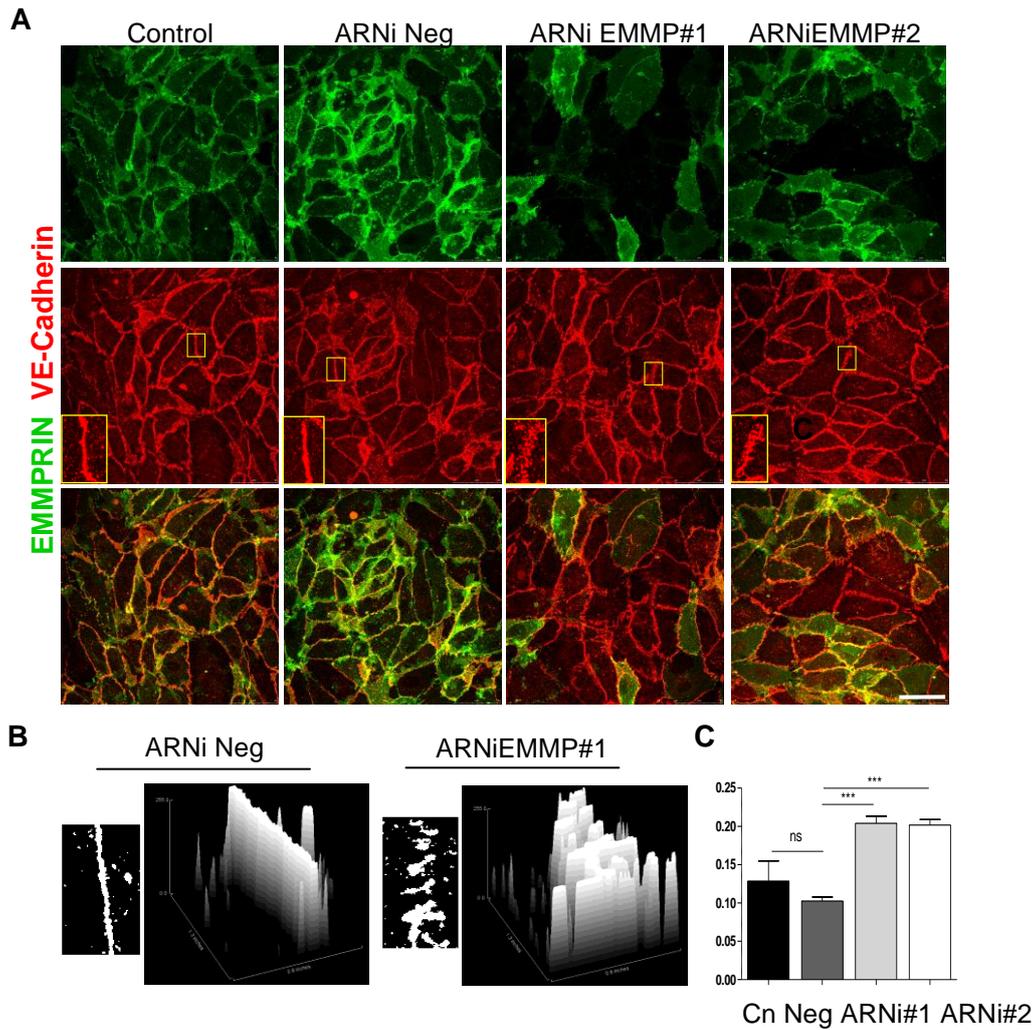


Figura 17: El silenciamiento de EMMPRIN en HUVEC altera el patrón de la VE-cadherina en los contactos célula-célula. A. Tinción mediante Immunofluorescencia de VE-Cadherina. Proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m. **B.** Trazado en superficie de la señal de VE-Cadherina en los contactos. **C.** Anchura media de los contactos delimitados por VE-Cadherina. Se cuantificaron de 4-6 contactos por campo y 5 campos por cada experimento (n=4). *** P<0,0001; ANOVA de un factor.

En concordancia con una alteración en el patrón de la VE-cadherina en los contactos, se observó una disminución en la formación de dímeros de VE-cadherina mediante geles de electroforesis en condiciones nativas y “western blot” (Figura18). Esto podría estar indicando una maduración incorrecta de las adhesiones célula-célula mediadas por VE-cadherina.

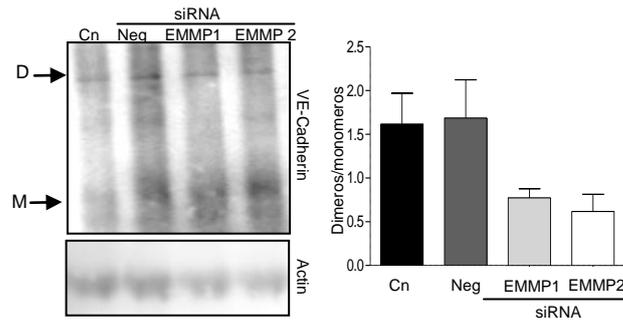


Figura 18. El silenciamiento de EMMPRIN en HUVEC provoca una disminución en la formación de dímeros de la VE-cadherina. A. Se muestra un gel representativo en condiciones nativas en el que se pueden observar los dímeros (D) y los monómeros (M) formados por la VE-Cadherina. **B.** Cuantificación de la proporción de dímeros respecto de monómeros. Los datos se dan como la media aritmética \pm s.e.m. (n=3).

Dado que un aumento en la inestabilidad de VE-cadherina en membrana puede afectar al reclutamiento de β -catenina a los contactos, se analizó el patrón de distribución de esta proteína en HUVEC silenciadas para EMMPRIN y se observó un cambio en el patrón de la β -catenina en los contactos similar al observado con VE-cadherina. La anchura del contacto delimitado por la β -catenina era mayor en el caso de las células silenciadas para EMMPRIN y en algunas células silenciadas se observaba un aumento de la señal de β -catenina en el interior celular (Figura 19).

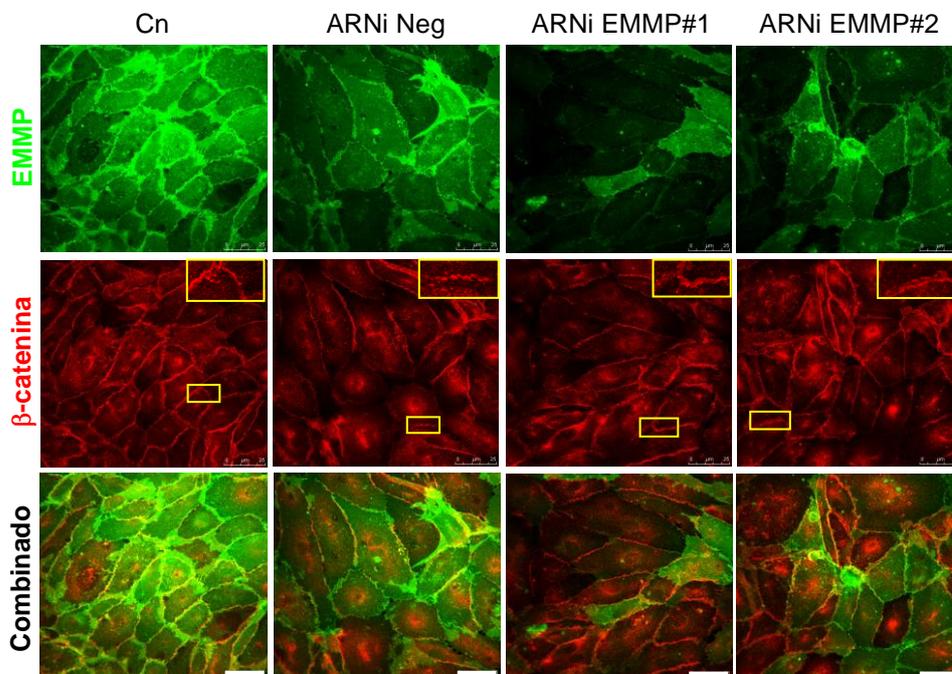


Figura 19: El patrón de la β -catenina también es más ancho en los contactos célula-célula de células silenciadas en EMMPRIN. Tinción mediante Immunofluorescencia de β -catenina (rojo) y de EMMPRIN (verde). Proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m. Escala 25 μ m.

4.3.4. Las monocapas formadas por células deficientes para EMMPRIN muestran una mayor permeabilidad.

Para definir si estos efectos en las uniones de células endoteliales silenciadas para EMMPRIN presentaban algún impacto funcional, se analizó la función de barrera de las monocapas establecidas por células control o células silenciadas. Para ello se sembraron las células sobre membranas semipermeables de 0,3 μm de tamaño de poro y se cuantificó la cantidad de dextrano fluorescente de alto peso molecular (70KDa) que era capaz de atravesar estas monocapas (Figura 20). Con este ensayo se verificó que la ausencia de EMMPRIN afectaba la función de barrera ya que las monocapas formadas por las células silenciadas mostraban una mayor permeabilidad al paso del dextrano fluorescente en comparación con los controles.

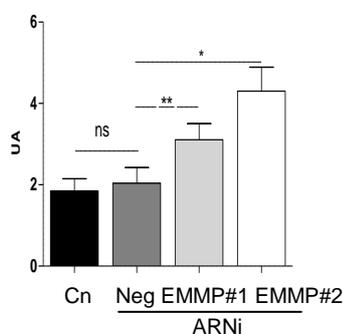


Figura 20: Las HUVEC silenciadas para EMMPRIN presentan un aumento en la permeabilidad de la monocapa. El gráfico muestra la cantidad de dextrano marcado con FITC de 70KDa recogido en la parte inferior de pocillos “transwell” después de atravesar la monocapa formada por HUVEC. Los datos se dan como la media aritmética \pm s.e.m. ** P= 0,0023 (n=3).

4.4. EXPRESIÓN DE EMMPRIN Y EFECTOS DE SU DEFICIENCIA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE RATÓN, *IN VITRO* E *IN VIVO*.

3.4.1. La expresión de EMMPRIN en células endoteliales de ratón también varía según su estado de confluencia.

Para comprobar si la regulación de la expresión de EMMPRIN *in vitro* se observaba también en células primarias de ratón, se extrajeron células endoteliales de aorta de ratones de genotipo silvestre y se tiñieron mediante inmunofluorescencia para EMMPRIN (Figura 21).

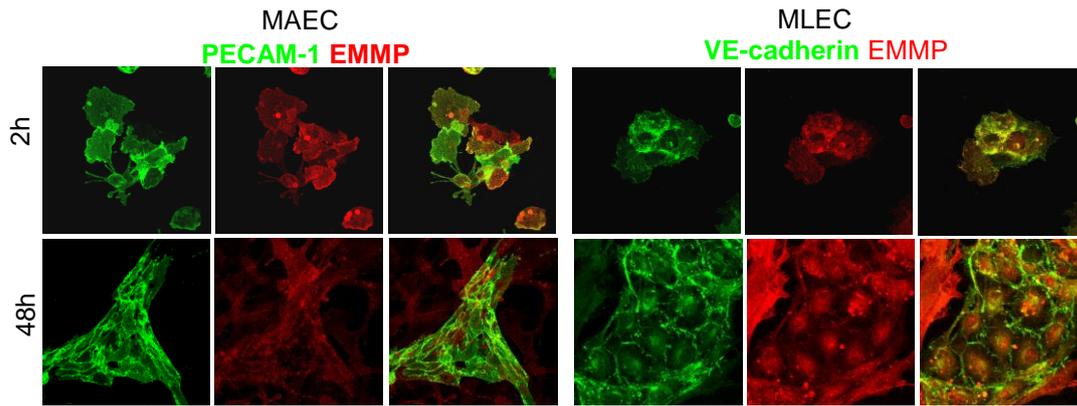


Figura 21. La expresión de EMMPRIN cambia a lo largo de la formación de la monocapa en células endoteliales de ratón. Se muestran proyecciones máximas de inmunofluorescencia para EMMPRIN (rojo) y PECAM-1 (verde) en células endoteliales primarias de aorta de ratón (MAEC) o EMMPRIN (rojo) y VE-cadherina (verde) en células endoteliales primarias de pulmón de ratón.

La expresión de EMMPRIN, fue analizada mediante inmunofluorescencia, en células recién adheridas al sustrato (2h) y en células confluentes (48-72h). Al igual que se había observado previamente en HUVEC la intensidad de EMMPRIN decaía cuando las células habían alcanzado la confluencia.

4.4.2. La ausencia de EMMPRIN en células endoteliales de ratón *in vitro* también afecta al establecimiento de las uniones adherentes

Para comprobar si las uniones dependientes de VE-cadherina estaban afectadas en las células endoteliales de ratones deficientes en EMMPRIN se analizó el patrón de expresión de VE-cadherina en MLEC y MAEC de ratones de genotipo silvestre o deficientes mediante inmunofluorescencia (Figura 22). Al igual que en HUVEC interferidas, en las células obtenidas de ratones deficientes para EMMPRIN, la VE-cadherina mostraba un patrón más irregular en los contactos y una menor formación de dímeros de VE-cadherina que en las células obtenidas de genotipo silvestre.

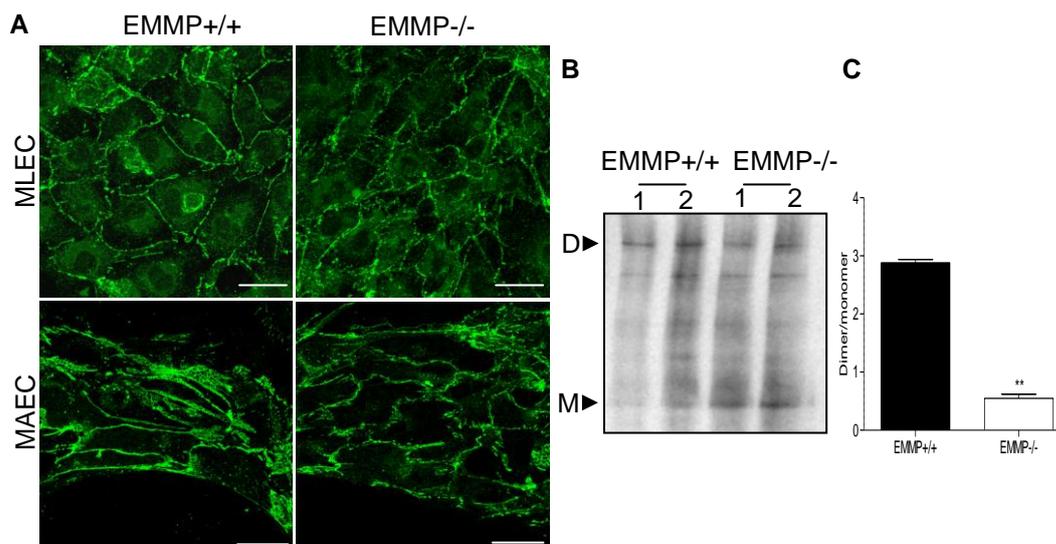


Figura 22: Las células endoteliales de ratones deficientes en EMMPRIN muestran una reducción de dímeros de VE-cadherina. **A.** Imágenes representativas del patrón de VE-cadherina teñida por inmunofluorescencia en MLEC y MAEC de ratones de genotipo silvestre y deficientes en EMMPRIN. Se puede observar cómo el patrón de la VE-cadherina en los contactos es más ancho en las células deficientes en EMMPRIN. Escala 20 μ m. **B.** Gel representativo en condiciones nativas mostrando la presencia de dímeros y monómeros de VE-Cadherina extraídos de MLEC. **C.** Cuantificación de la proporción de dímeros respecto de monómeros en MLEC. Los datos se dan como la media aritmética \pm s.e.m. ** P=0,0016 (t de Student, n=3).

4.4.3. EMMPRIN se expresa de manera heterogénea en distintos lechos vasculares de ratón.

La expresión de EMMPRIN *in vivo* se analizó mediante inmunofluorescencia tanto en cortes histológicos como en tinción de aorta *in toto*. De esta manera se observó que EMMPRIN se expresaba en vasos grandes de pulmón delimitando la zona de los contactos endoteliales, así como en vasos de cerebro formando la barrera hematoencefálica. Sin embargo, apenas se podía detectar tinción de EMMPRIN en el endotelio de los vasos formados en el glomérulo en el riñón (Figura 23 asterisco), constituidos por endotelio de tipo fenestrado (más permeable al paso de líquidos de la sangre), pero sí en otro tipo de vasos del riñón (Figura 23 flecha). En oreja teñida *in toto* se pudo observar la tinción de EMMPRIN delimitando las zonas de unión entre células endoteliales de la microvasculatura. En aorta, también teñida *in toto*, la expresión de EMMPRIN era más difusa pero en algunas zonas de las uniones se podía distinguir la localización de EMMPRIN en los contactos, coincidiendo con la tinción de PECAM-1.

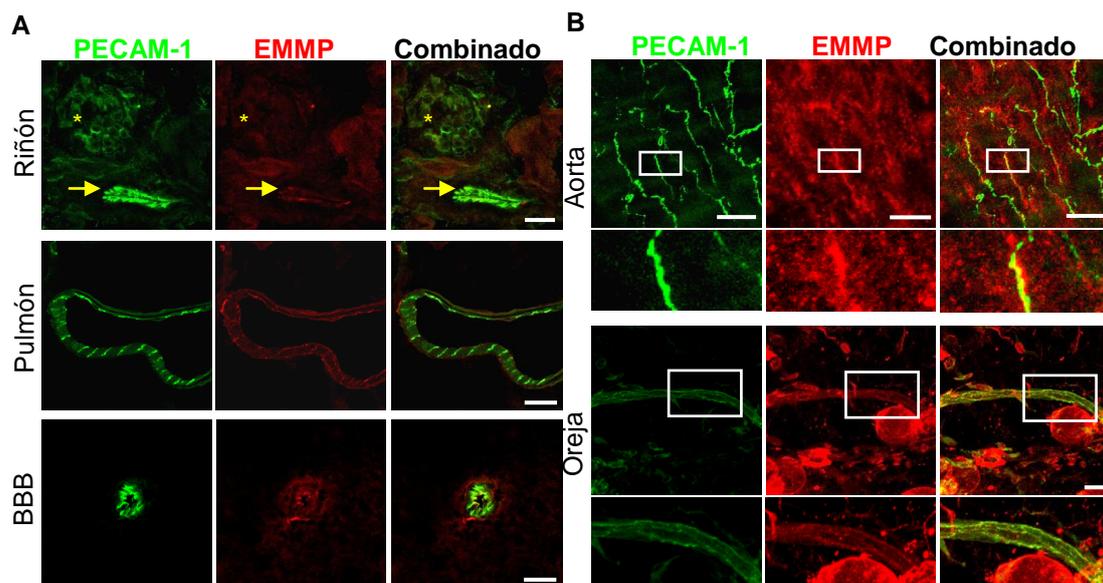


Figura 23: EMMPRIN se localiza en los contactos de vasos vasculares in vivo, y su expresión varía en diferentes lechos vasculares. A. Inmunofluorescencia de EMMPRIN (rojo) y PECAM-1 (verde) en vasos vasculares de diferentes tejidos (criosecciones). BBB: Barrera hematoencefálica. Se puede observar que la tinción de EMMPRIN es más baja en los vasos que conforman el glomérulo del riñón (asterisco) que en otro tipo de vasos dentro del riñón (flecha) o en en vasos de otros órganos como pulmón y cerebro. Proyecciones máximas de secciones en Z de 0,3μm. Escalas 20μm. **B.** Inmunofluorescencia *in toto* de EMMPRIN (rojo) y de PECAM-1 (verde) en aorta y oreja de ratón. En las magnificaciones se puede observar como EMMPRIN se localiza en los contactos marcados por PECAM-1. Proyecciones máximas de secciones en Z de 0, 8μm. Escalas 20μm

4.4.4. Los ratones deficientes en EMMPRIN muestran alteraciones morfológicas de los vasos y una mayor permeabilidad vascular.

Una vez observada que la deficiencia de EMMPRIN en células endoteliales afectaba a la formación de estructuras tridimensionales así como a la estabilización de los contactos intercelulares *in vitro*, se decidió analizar si su deficiencia podía repercutir *in vivo* en la arquitectura vascular de los ratones deficientes en EMMPRIN.

Los ratones deficientes para EMMPRIN no muestran ninguna alteración vascular aparente. La coloración de piel y órganos es similar a la del ratón de genotipo silvestre, lo que indica que no hay aumento de hemorragia o una diferente irrigación sanguínea. Asimismo tampoco muestran presencia de edema puesto que recuperan la tonificación normal de la piel, después de aplicar un punto de presión. Tampoco se observaba edema en cortes histológicos de la piel (Figura 24).

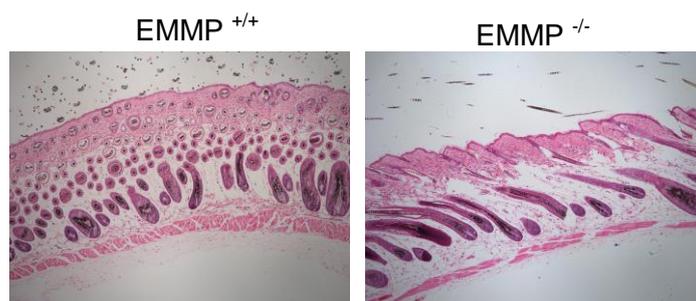


Figura 24. Los ratones deficientes en EMMPRIN no muestran señales de edema. Cortes de piel en parafina de ratones silvestres o deficientes en EMMPRIN y teñidos con hematoxilina-eosina. El grosor de las pieles es similar entre ratones de genotipo salvaje y ratones deficientes en EMMPRIN. Magnificación 10x.

El análisis en detalle de la vasculatura se realizó mediante inmunofluorescencia *in toto* de diferentes tejidos de ratón y su posterior análisis por microscopía confocal (Figura 25).

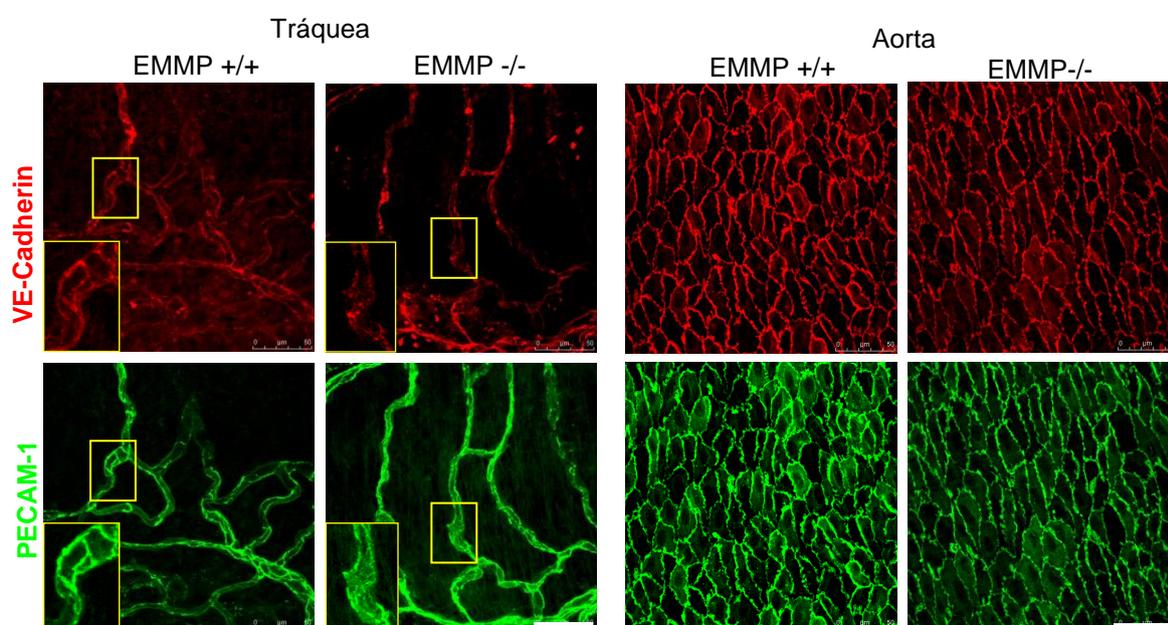


Figura 25. Los ratones deficientes en EMMPRIN muestran alteraciones en los contactos entre células endoteliales. A. Proyecciones máximas de secciones confocales en Z de 0,8 μm de vasos sanguíneos de tráquea y de 0,3 μm en aorta de ratones de genotipo silvestre (EMMP+/+) y de ratones deficientes en EMMPRIN (EMMP-/-). Escala 50 μm.

Se observó que la microvasculatura de los ratones deficientes para EMMPRIN presentaba pequeñas dilataciones principalmente en los puntos de ramificación y que los plexos vasculares de estos ratones eran más densos y menos organizados. La inmunodetección de la VE-cadherina y de PECAM-1 determinó que los contactos intercelulares también estaban afectados en los vasos de los ratones deficientes para EMMPRIN. Estas proteínas mostraban un patrón más punteado en las uniones de las células endoteliales de la microvasculatura de la tráquea en comparación con el patrón

observado en los ratones de genotipo silvestre, que era más lineal (Figura 25). Por el contrario no se detectaron alteraciones en el patrón de ambos marcadores en aorta de los ratones deficientes en EMMPRIN. Un análisis ultraestructural de los contactos entre las células endoteliales de la aorta mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 26) mostró sin embargo que a diferencia de los ratones de genotipo silvestre, donde apenas se podían diferenciar los bordes de las membranas entre dos células en contacto, en los ratones deficientes para EMMPRIN estos contactos aparecían más separados, especialmente en los solapamientos que se dan entre membranas de células adyacentes a nivel de estos contactos.

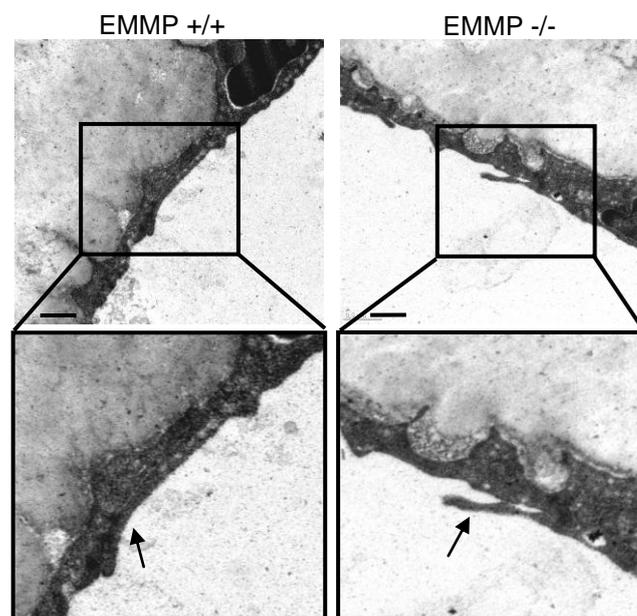


Figura 26. La ausencia de EMMPRIN produce alteraciones ultraestructurales de los contactos endoteliales de aorta. Se muestran imágenes representativas de secciones ultrafinas de aorta de ratón tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión. En las magnificaciones se puede observar como las uniones entre células endoteliales de ratones de genotipo silvestre apenas son distinguibles, mientras que en las de ratones deficientes en EMMPRIN se puede observar una separación entre dos membranas solapantes. Escala 0,5 μ m.

Teniendo en cuenta el aumento de permeabilidad de la barrera endotelial observado *in vitro* en HUVEC silenciadas para EMMPRIN así como las alteraciones vasculares que presentaban los ratones deficientes para EMMPRIN, se analizó la permeabilidad vascular en estos ratones. Para ello se inyectó en los animales por vía intravenosa una solución de azul de Evans, un colorante capaz de unirse a la albúmina existente en sangre (Figura 27). Transcurridas 20h se perfundieron los animales y se extrajeron cerebro, corazón, pulmones y riñón. El colorante extravasado después de ese tiempo fue extraído y cauntificado mediante absorción colorimétrica. Pese a lo

esperado en relación a los datos obtenidos *in vitro*, no se observó un aumento de la cantidad del colorante Azul de Evans presente en el tejido.

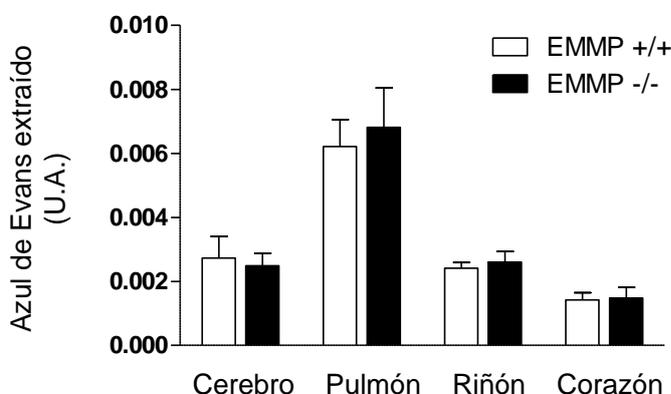


Figura 27. Los ratones deficientes en EMMPRIN no muestran un aumento en la permeabilidad vascular en estado basal. Se muestra la cuantificación de azul de Evans extraído de diferentes órganos en ratones de genotipo salvaje y deficientes en EMMP. Los datos son dados como media \pm s.e.m.

In vivo no sólo las uniones regulan la permeabilidad vascular, si no que hay multitud de factores que regulan este proceso. Además, en un organismo vivo se pueden crear mecanismos de compensación que atenúen el efecto que pueda causar la deficiencia de una determinada proteína. Por ello, se analizó la permeabilidad de los ratones deficientes para EMMPRIN en una situación en la que la homeostasis de los vasos es interrumpida, como es la inflamación, donde existe un aumento de permeabilidad mantenido en el tiempo mientras exista el estímulo inflamatorio. Cabría esperar que unas uniones más débiles puedan mantener la homeostasis, pero su reacción ante estímulos inflamatorios fuera diferente. Así, se inyectó azul de Evans en ratones de genotipo silvestre ó deficientes para EMMPRIN y transcurridos unos minutos se generó una inflamación local en una de las orejas de cada animal mediante la aplicación de aceite de mostaza. Pasados 30 minutos los animales fueron sacrificados y se extrajo y cuantificó el colorante presente en las dos orejas de los animales (Figura 28). Se observó de esta manera que los ratones deficientes en EMMPRIN presentaban una mayor permeabilidad en condiciones de inflamación que sus hermanos de genotipo silvestre.

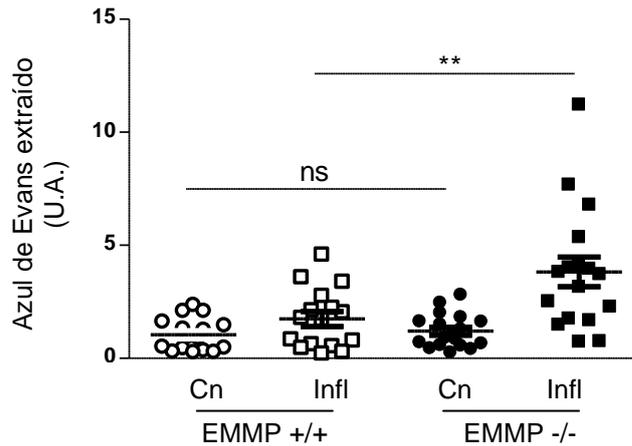


Figura 28. Los ratones deficientes en EMMPRIN muestran un mayor incremento de la permeabilidad vascular en respuesta a un estímulo inflamatorio. El gráfico muestra la cantidad de Azul de Evans extraído de orejas de ratones de genotipo silvestre ó deficientes en EMMPRIN tratadas o no con aceite de mostaza. ** P<0,0001 (ANOVA de un factor, n=4).

La permeabilidad se analizó también mediante inmunofluorescencia, inyectando esta vez dextrano fluorescente de bajo (Figura 29) ó alto peso molecular (Figura 30), en vez de azul de Evans. Transcurridos los 30 minutos después de la aplicación del aceite de mostaza, se perfundieron los animales con PFA y las orejas fueron teñidas *in toto* con PECAM-1 para la detección de los vasos. Se observó un aumento de la presencia de dextrano fluorescente en el tejido de los ratones deficientes. Dada la mayor sensibilidad de la fluorescencia frente a la absorbancia colorimétrica, también se pudo detectar permeabilidad en la oreja no tratada con aceite de mostaza, es decir en condiciones basales, de los ratones deficientes para EMMPRIN. Este aumento de la permeabilidad en los ratones deficientes en EMMPRIN se observó tanto con el dextrano de bajo peso molecular siendo en este caso más claro el aumento de permeabilidad en condiciones basales, como con el dextrano de alto peso molecular.

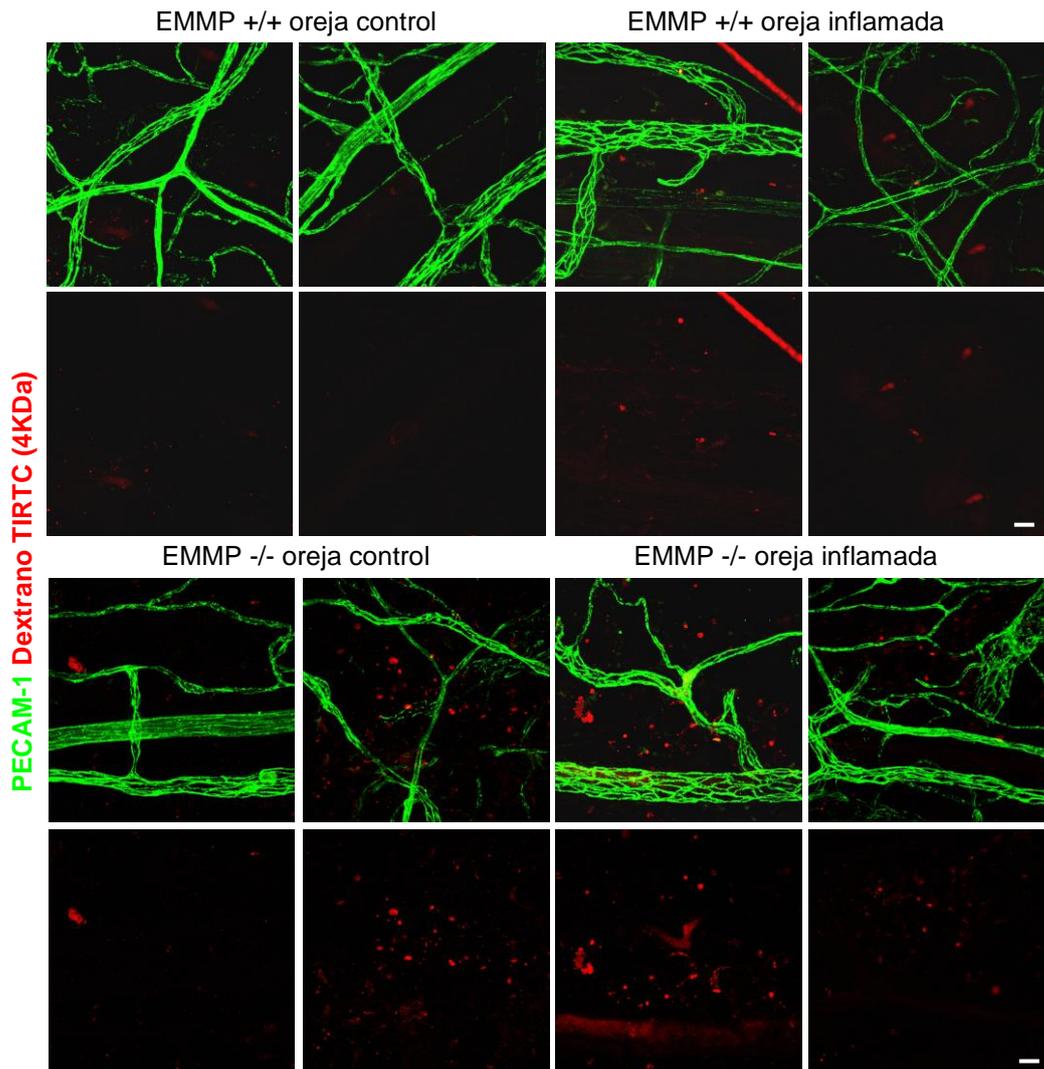


Figura 29. Los ratones deficientes en EMMPRIN muestran un aumento de permeabilidad a dextrano fluorescente de bajo peso molecular (4KDa). Vasos de orejas de ratones de genotipo silvestre o deficientes en EMMPRIN inyectados con dextrano TIRTC (rojo) de 4KDa, tratadas o no con aceite de mostaza. Se muestran proyecciones máximas de secciones confocales de 0,8 μ m de grosor. Escala 20 μ m.

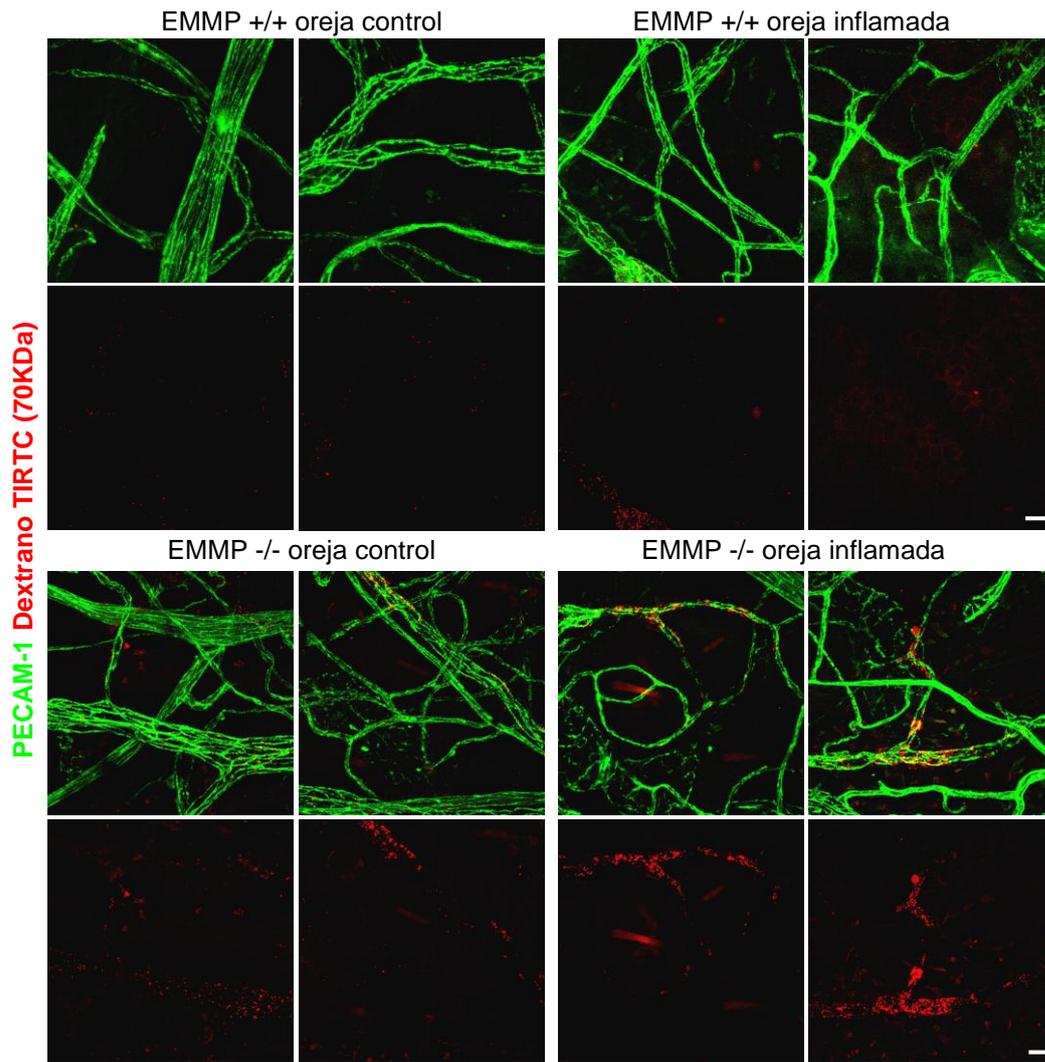


Figura 30: Los ratones deficientes en EMMPRIN muestran un aumento de permeabilidad a dextrano fluorescente de alto peso molecular (70KDa). Vasos de orejas de ratones de genotipo silvestre o deficientes en EMMPRIN inyectados con dextrano TIRTC de 70KDa, tratadas o no con aceite de mostaza. Se muestran proyecciones máximas de secciones confocales de 0,8 μ m de grosor. Inmunofluorescencia de PECAM-1 (verde). Escala 20 μ m.

El defecto observado en la vasculatura de los ratones homocigotos en EMMPRIN así como el aumento en la permeabilidad en condiciones de inflamación fue confirmado también en los ratones heterocigotos deficientes en esta proteína (Figura 31).

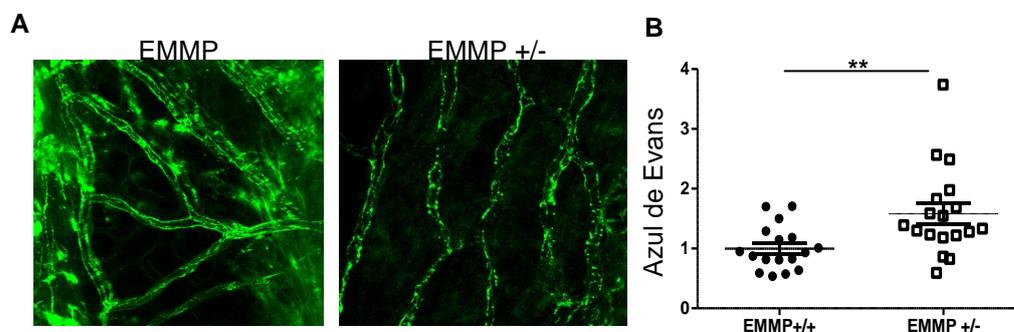


Figura 31. Los ratones heterocigotos deficientes en EMMPRIN también muestran alteraciones vasculares y aumento de la permeabilidad vascular. A. inmunofluorescencias de PECAM-1 en ratones de genotipo silvestre y heterocigotos para la deficiencia en EMMPRIN. **B.** El gráfico muestra la cantidad de Azul de Evans extraído de orejas de ratones de genotipo silvestre ó heterocigotos deficientes en EMMPRIN tratadas o no con aceite de mostaza. ** $P < 0,05$ (t de student, $n=3$).

4.5. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR POR EL QUE LA DEFICIENCIA DE EMMPRIN AFECTA A LA ESTABILIDAD DE LAS UNIONES ENDOTELIALES.

4.5.1. La deficiencia en EMMPRIN provoca alteraciones en el citoesqueleto de actina.

Un ensamblaje adecuado de las adhesiones requiere un equilibrio preciso entre la actina filamentosa (F-actina) de las uniones y la F-actina del interior celular. El patrón de la VE-cadherina observado *in vitro* en las HUVEC deficientes en EMMPRIN (Figura 17) y verificado en MLEC (Figura 22) parecía similar a otros caracterizados en la literatura en células endoteliales en respuesta a trombina (Vouret-Craviari, 1999) y a $TNF\alpha$ (Millán, 2010). En ambos casos este patrón en la VE-cadherina correlaciona con una mayor tensión del citoesqueleto de actina en el interior celular en forma de fibras de estrés, lo que indica una mayor actividad de la maquinaria de actomiosina en el interior celular. De esta manera nos planteamos analizar la organización del citoesqueleto de actina-miosina en las células deficientes en EMMPRIN.

Para ello se analizó la distribución de la F-actina mediante tinción con faloidina y análisis por microscopia confocal (figura 32).

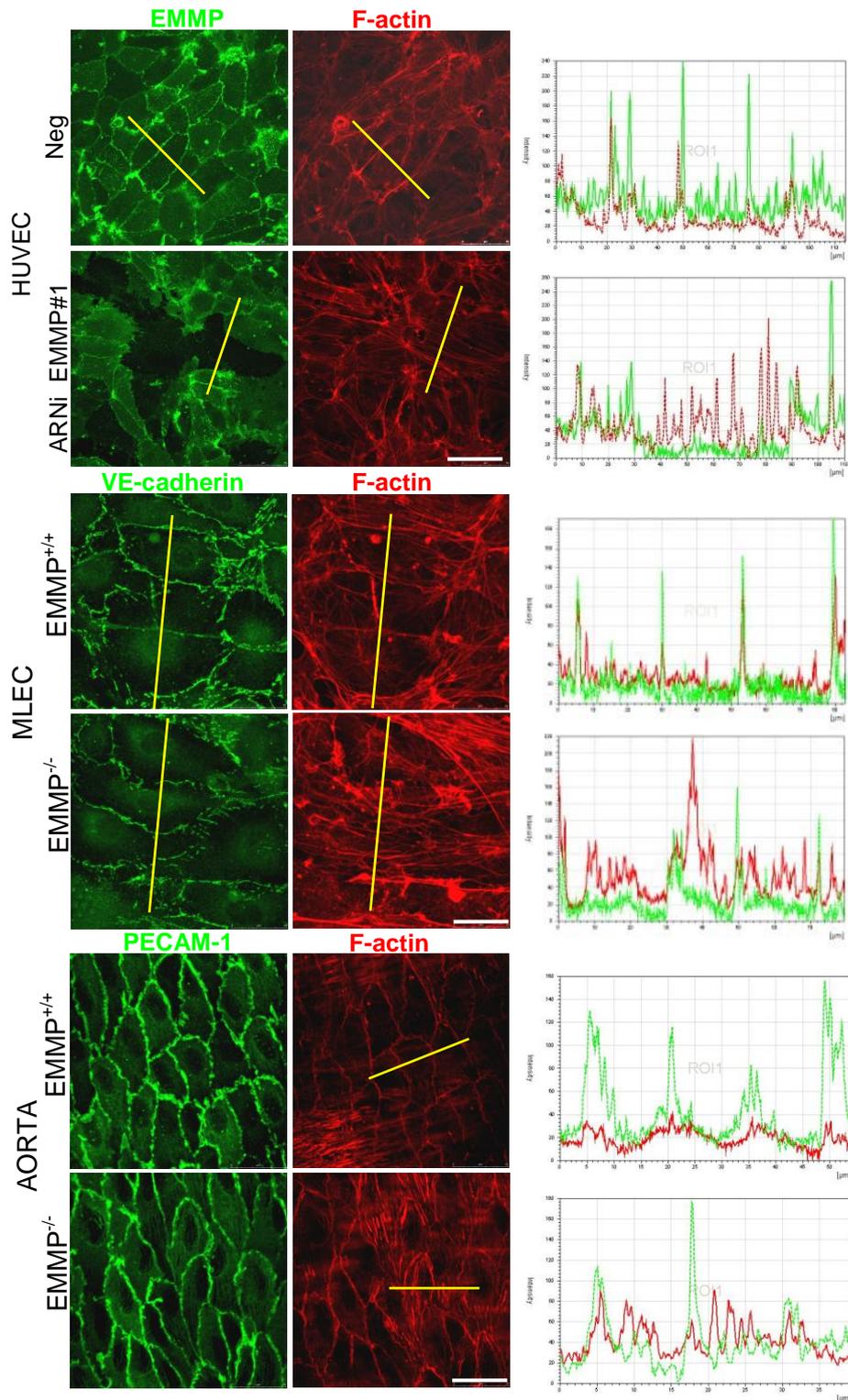


Figura 32. Las células deficientes en EMMPRIN presentan alteraciones en el citoesqueleto de actina. Tinción mediante inmunofluorescencia de EMMPRIN, VE-cadherina y PECAM-1 (verde) y tinción con faloidina (rojo) en HUVEC, MLEC y aorta *in toto*. Proyecciones máximas de secciones confocales en Z de 0,3µm. A la derecha se muestran los perfiles intensidad de los diferentes marcadores de uniones (verde) y de la F-actina (rojo). Se puede observar un cambio en la proporción de F-actina presente en los contactos y en el interior celular. Escalas: HUVEC, 50µm; MLEC, 25µm; Aorta, 25 µm.

Se observó mediante los perfiles de intensidad de actina de las monocapas que las células deficientes para EMMPRIN mostraban una mayor presencia de haces de F-actina en el interior de la célula con respecto a la F-actina presente en los contactos. Este patrón se verificó en MLEC y en aorta de ratones deficientes para EMMPRIN.

Además se pudo ver cómo a lo largo de la formación de la monocapa *in vitro* EMMPRIN colocalizaba con F-actina en zonas de contacto entre células, tanto en el momento en el que empiezan a formarse los contactos, como cuando éstos ya se han establecido. Se observó también que EMMPRIN colocalizaba con F-actina pero no con VE-cadherina en algunas protrusiones de membrana iniciando los contactos entre dos células, lo que podría indicar un reclutamiento más temprano de EMMPRIN y F-actina a estas estructuras (Figura 33).

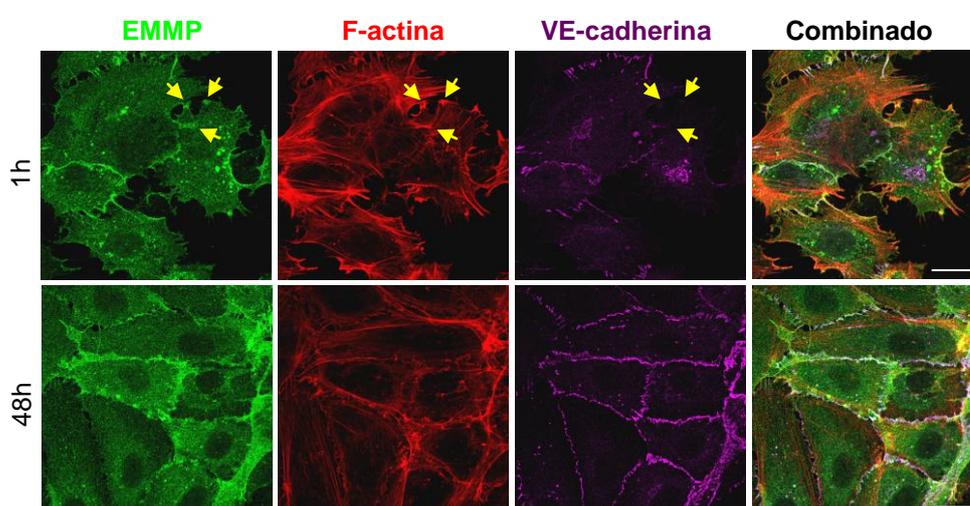


Figura 33. EMMPRIN colocaliza con F-actina en regiones de membrana donde se inician los contactos y en contactos ya maduros. Se muestran tinciones mediante inmunofluorescencia con EMMPRIN y tinción con faloidina en secciones confocales en Z de 0,3 μm de HUVEC, a 1h y a 48h después de la siembra. Las flechas señalan protrusiones de membrana en aproximación entre dos células adyacentes que presentan EMMPRIN y F-actina pero no VE-cadherina. Escala: 20 μm .

A continuación se analizó el patrón de F-actina en células deficientes en EMMPRIN desde el inicio de formación de los contactos endoteliales en HUVECs (Figura 34). Se observó, que mientras la mayoría de las células control a 1h después de la siembra mostraban una F-actina ramificada (con haces paralelos y perpendiculares) en la zona de los contactos, en las células deficientes la F-actina se organizaba principalmente en cables perpendiculares a estas zonas.

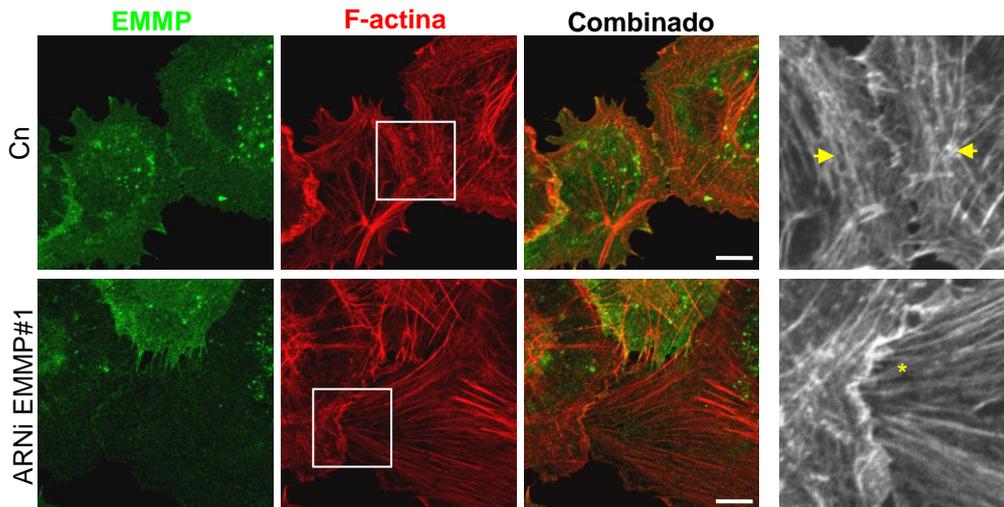


Figura 34. Las fibras de F-actina de los contactos en formación se organizan de diferente manera en las células deficientes para EMMPRIN. Se muestra inmunofluorescencia de EMMPRIN y tinción con faloidina en HUVEC 1h después de la siembra. En las magnificaciones se puede observar cómo en las células transfectadas con el ARNi negativo la F-actina se organiza con un patrón ramificado mientras que en las células silenciadas para EMMPRIN la F-actina aparece como fibras perpendiculares a la unión. Secciones de 0,3 μ m.

Para analizar la cinética de la actina polimerizada y de EMMPRIN durante la formación y establecimiento de los contactos, se transfectaron células silenciadas para EMMPRIN o con el oligonucleótido control y posteriormente transfectadas con “LifeAct” (Riedl J et al., 2008) construcción que permite observar la dinámica de la F-actina *in vivo* sin alterar su polimerización (figura 35). En las células control se pudo observar cómo zonas de membrana positivas para EMMPRIN colocalizaban con lo que parecían ser sitios de nucleación de actina. Además en estas células se observa cómo las fibras de F-actina pasaban de estar organizados perpendicularmente al eje de las uniones a ir organizándose en cables de F-actina paralelos a este eje. Sin embargo, la mayor parte de las células interferidas mostraban un retardo en la transición entre las fibras perpendiculares a las paralelas, y en algún caso la ausencia de éstas, lo que podría indicar que estas uniones tardan más en estabilizarse y que el refuerzo del citoesqueleto de actina en éstas es menor.

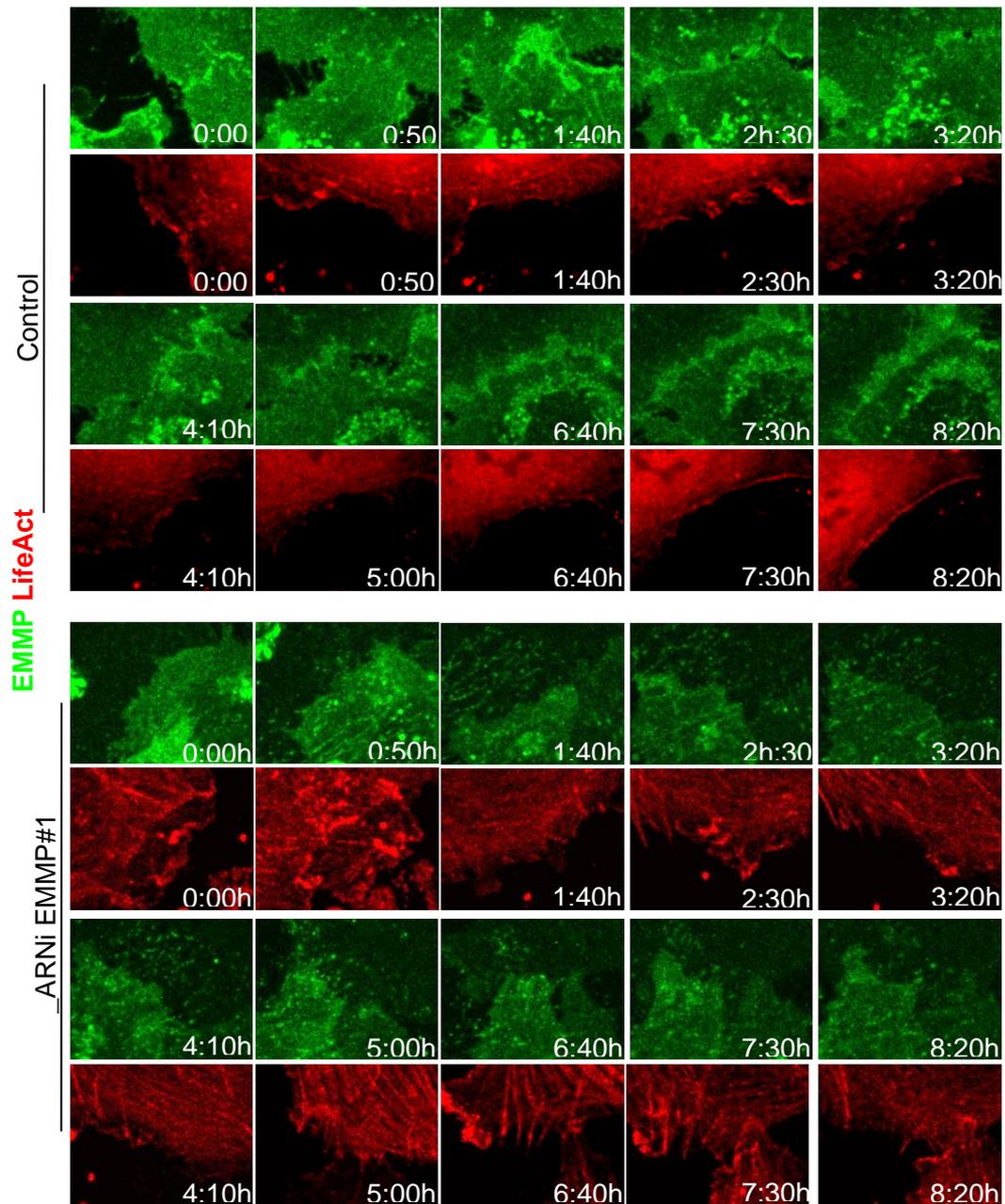


Figura 35. La ausencia de EMMPRIN altera la dinámica de la F-actina en las uniones en formación en HUVEC. Se muestran imágenes seleccionadas de videomicroscopía de células transfectadas con un marcador de F-actina. En verde inmunofluorescencia directa de EMMPRIN. Se puede observar a lo largo de la secuencia cómo en las células control la F-actina se coloca en fibras paralelas a lo largo de la unión mientras que en las células silenciadas para EMMPRIN estas fibras permanecen en dirección perpendicular ésta.

4.5.2. Un desequilibrio producido en la tensión en el citoesqueleto de actina-miosina en ausencia de EMMPRIN produce los efectos observados en los contactos entre células endoteliales.

Como el desequilibrio producido entre la actina organizada en las uniones y la actina del interior celular podría corresponderse con un aumento en la contractilidad de la célula, se analizó mediante inmunofluorescencia en las células deficientes en EMMPRIN, la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (pMLC), que es un indicador de la función contráctil de la miosina unida a actina (Figura 36). Tanto las HUVEC interferidas para EMMPRIN como las MLEC y MAEC obtenidas de ratones deficientes para EMMPRIN mostraban una disminución de la pMLC en las uniones intercelulares, así como un aumento de la pMLC en el interior celular, coincidiendo con los haces de actina anteriormente observados en las células en confluencia. Esto podría estar indicando que existe un desequilibrio en las fuerzas que actúan sobre las uniones endoteliales.

Para demostrar que este desequilibrio en las fuerzas ejercidas por el citoesqueleto de actina en las uniones pudiera estar provocando la desestabilización de los contactos intercelulares, se planteó un experimento en el cual se relajara la tensión producida por la actina-miosina analizando posteriormente el efecto producido en los contactos. Para ello se trataron HUVEC control o HUVEC silenciadas para EMMPRIN o MLEC obtenidas de ratones de genotipo silvestre o deficientes en EMMPRIN con el inhibidor de la ROCK quinasa Y27632, o con el inhibidor de la actividad de la miosina II, blebistatina (Figuras 30 y 31). Posteriormente se analizó el patrón de VE-cadherina en las uniones entre las células (Figuras 37 y 38) y se vio que en las células deficientes en EMMPRIN éste se hacía más lineal en el caso de las células tratadas con los inhibidores, revirtiendo así el efecto observado.

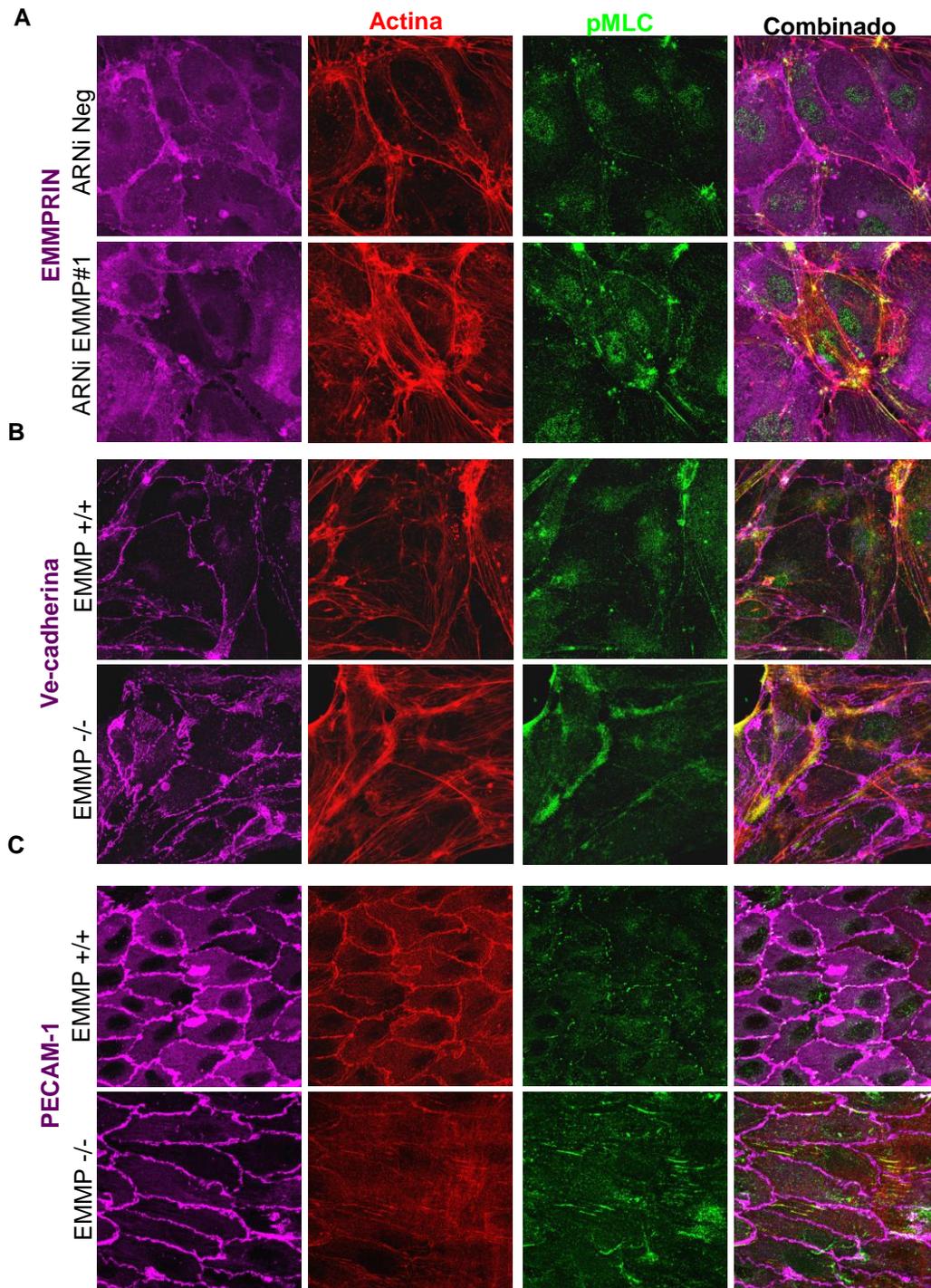


Figura 36. La ausencia de EMMPRIN provoca un aumento de la contractilidad de la actina-miosina. Se muestran inmunofluorescencias de EMMPRIN en HUVEC (A), de VE-cadherina en MLEC (B), de PECAM-1 en aorta *in toto* (C) y tinción con faloidina en proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m. Se puede observar cómo en las células deficientes en EMMPRIN existe un aumento en la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (pMLC) en fibras de actina en el interior celular y una disminución a nivel de las uniones entre las células.

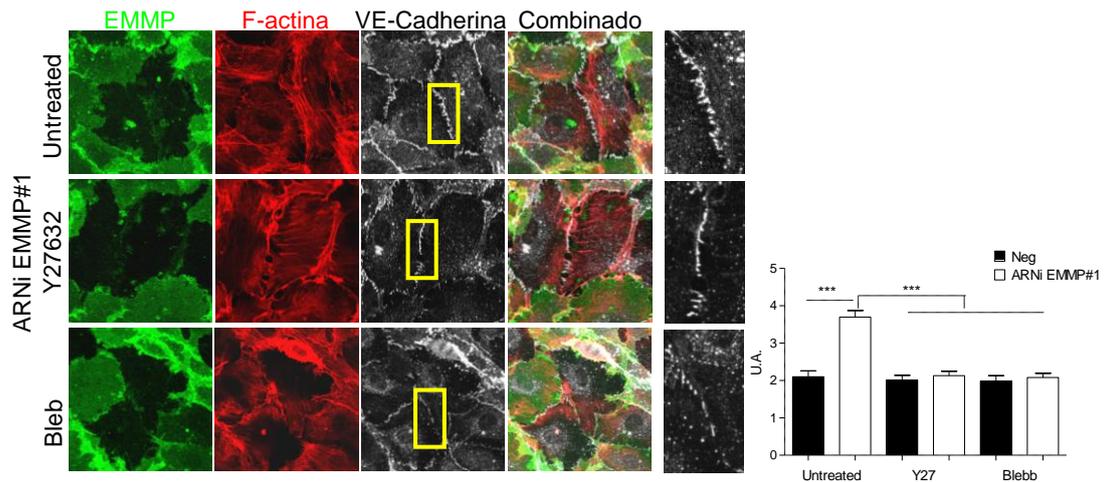


Figura 37. La relajación del citoesqueleto de actina recupera el fenotipo normal de las uniones en HUVEC silenciadas para EMMPRIN. Se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencias de EMMPRIN, VE-cadherina y tinción con faloidina en proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m. Se puede observar cómo disminuye la anchura de las uniones delimitadas por VE-cadherina en las células deficientes en EMMPRIN tratadas con el inhibidor de la quinasa ROCK Y27632 o el inhibidor de la miosina II blebistatina. **B.** El histograma de barras muestra la anchura media de los contactos marcados con VE-cadherina. Media aritmética \pm s.e.m. *** $P < 0,0001$ (ANOVA de un factor, $n=3$).

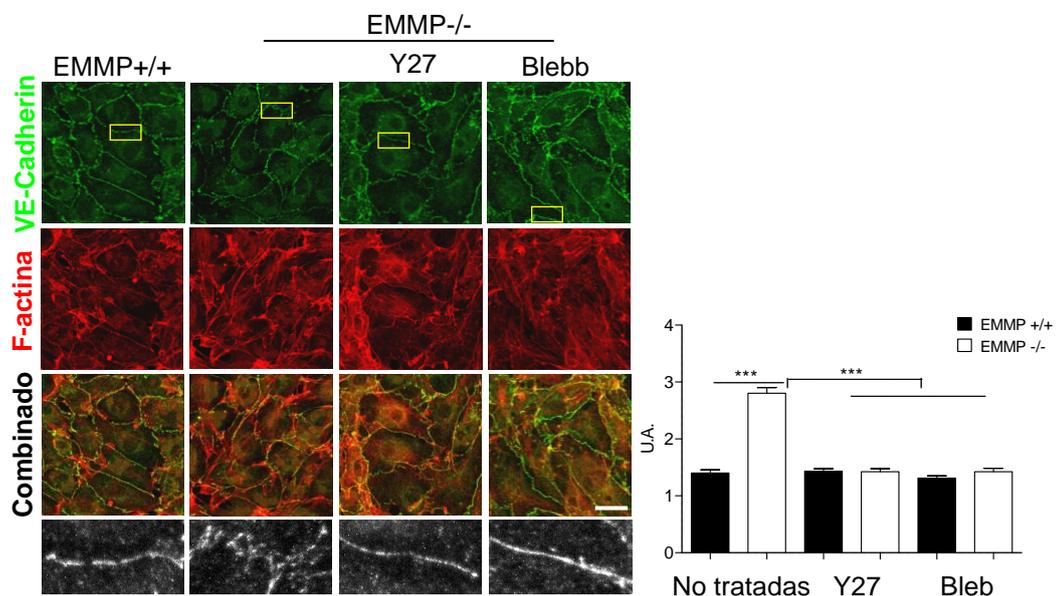


Figura 38. La relajación del citoesqueleto de actina recupera el fenotipo normal de las uniones en MLEC deficientes para EMMPRIN. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de VE-cadherina y tinción con faloidina en proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m. Se puede observar cómo disminuye la anchura de las uniones delimitadas por VE-cadherina en las células deficientes en EMMPRIN tratadas con el inhibidor de la quinasa ROCK Y27632 o el inhibidor de la miosina II blebistatina. **B.** El histograma muestra la anchura media \pm s.e.m de los contactos delimitados por la VE-cadherina. *** $P < 0,0001$ (ANOVA de un factor, $n=3$).

Asimismo, la permeabilidad de las monocapas formadas por las HUVEC interferidas para EMMPRIN disminuía en presencia del inhibidor Y27632 (Figura 39).

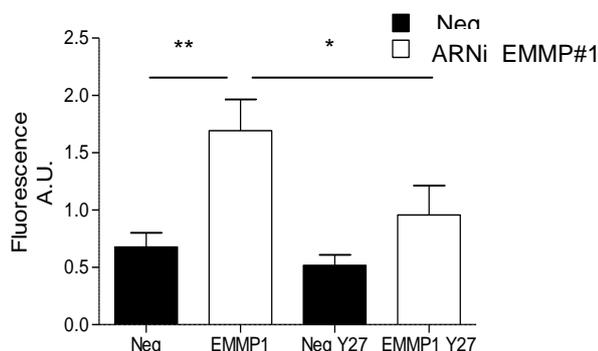


Figura 39. El inhibidor de la maquinaria contráctil de la célula inhibe el aumento de permeabilidad producido por la ausencia de EMMPRIN. El gráfico muestra la cantidad de Dextrano FITC de 70KDa recogido de la parte inferior de pocillos “transwell” después de atravesar la monocapa formada por HUVEC silenciadas para EMMPRIN y tratadas o no con el inhibidor de la quinasa ROCK Y27632. Los datos se dan como la media aritmética \pm s.e.m. ** P=0,0093 (ANOVA de un factor, n=3).

Una de las principales vías de señalización responsable de la activación de ROCK es la de la vía de la GTPasa Rho. Por ello se analizó la actividad de esta proteína mediante ELISA en HUVEC interferidas así como en MLEC de ratones deficientes (Figura 40). Se demostró que no existía un aumento en la actividad de Rho en ausencia de EMMPRIN que pudiera estar provocando el aumento de la fosforilación de la MLC a través de ROCK, por lo que es posible que este aumento sea debido a otras vías de señalización o un aumento en la polimerización de la actina (Tojkander et al., 2011).

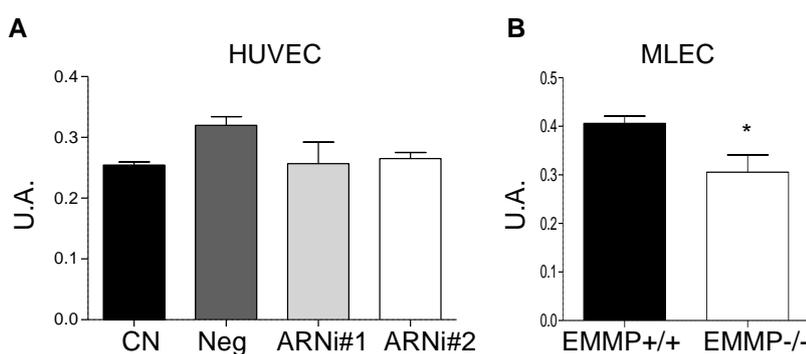


Figura 40. La ausencia de EMMPRIN no provoca un aumento en la actividad de la GTPasa Rho. **A.** Actividad de Rho medida por ELISA en HUVEC confluentes silenciadas o no para EMMPRIN. **B.** Actividad de Rho medida por ELISA en MLEC confluentes de ratones de genotipo salvaje y deficientes en EMMPRIN. En estas últimas se observa una disminución significativa en la actividad de Rho. *P= x (n=3).

En MLEC deficientes en EMMPRIN se observó una disminución significativa en la actividad de la GTPasa Rho (Figura 40), lo que podría deberse a un efecto de compensación en estas células para contrarrestar la alteración en el citoesqueleto de actina.

4.5.3. EMMPRIN interacciona con γ -catenina a nivel de membrana.

Los datos obtenidos hasta ahora mostraban que la alteración en el patrón de los contactos y el defecto en la función de barrera tanto de las células endoteliales en cultivo como de los ratones deficientes en EMMPRIN, podían ser debidos a un desequilibrio en la tensión que el citoesqueleto de actina causado por una disminución en los haces de actina-miosina que sustentan la unión. Esto junto con que EMMPRIN colocalizaba en algunos sitios de la membrana celular con F-actina parecía indicar que EMMPRIN interaccionaba con el citoesqueleto de actina de manera directa o indirecta. Para ello y en colaboración con el laboratorio del Dr. Sánchez-Madrid se analizaron las proteínas que interaccionaban con el dominio citoplasmático unido a GST de EMMPRIN mediante precipitación en células Hela y se detectó la presencia de la proteína γ -catenina. Mediante coimmunoprecipitación en HUVEC se pudo confirmar que EMMPRIN interaccionaba con γ -catenina así como con α -actina, sin embargo no se detectó la presencia de VE-cadherina en los precipitados (figura 41 A). Asimismo se observó mediante microscopía confocal que EMMPRIN colocalizaba con γ -catenina y F-actina en los contactos entre HUVEC tanto al inicio de la formación de éstos, como en contactos ya maduros (figura 41 B).

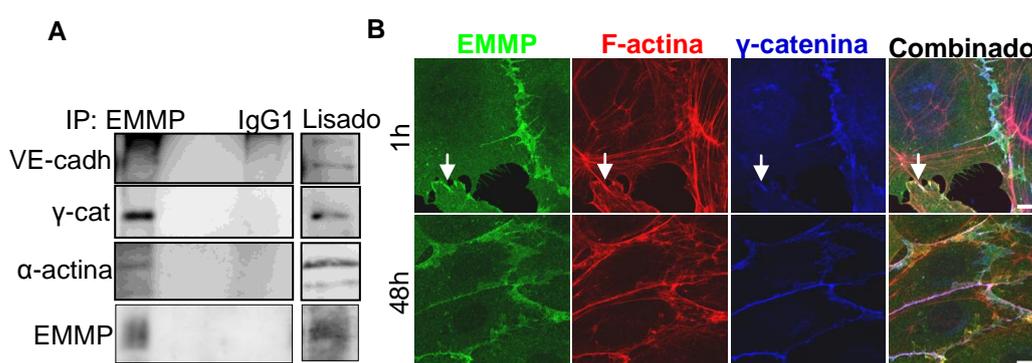


Figura 41. EMMPRIN interacciona con γ -catenina y con α -actina en los contactos endoteliales. **A.** Se muestra la coimmunoprecipitación de EMMPRIN con γ -catenina y α -actina en HUVEC en confluencia. VE-cadherina no coimmunoprecipita con este complejo. **B.** Secciones confocales de 0,3 μ m de inmunofluorescencias para EMMPRIN (verde) y γ -catenina (azul) y tinción con faloidina (rojo) en HUVEC 1h y 48h después de la siembra. Las flechas muestran las regiones de membrana positivas para EMMPRIN, γ -catenina y F-actina, donde dos células están empezando a tomar contacto. Escala

4.5.4. La deficiencia de EMMPRIN correlaciona con una disminución en la intensidad de γ -catenina en los contactos.

Para comprobar si la deficiencia en EMMPRIN producía algún tipo de alteración en el reclutamiento de γ -catenina a los contactos entre células endoteliales, se analizó mediante microscopía confocal la expresión de γ -catenina en HUVEC interferidas para EMMPRIN y en aorta y orejas de ratones deficientes en EMMPRIN (Figura 42). En todos los casos se pudo observar cómo la intensidad de γ -catenina decrecía a nivel de los contactos, de lo que se podría inferir que existe una disminución en su reclutamiento a las uniones debido a la deficiencia en EMMPRIN.

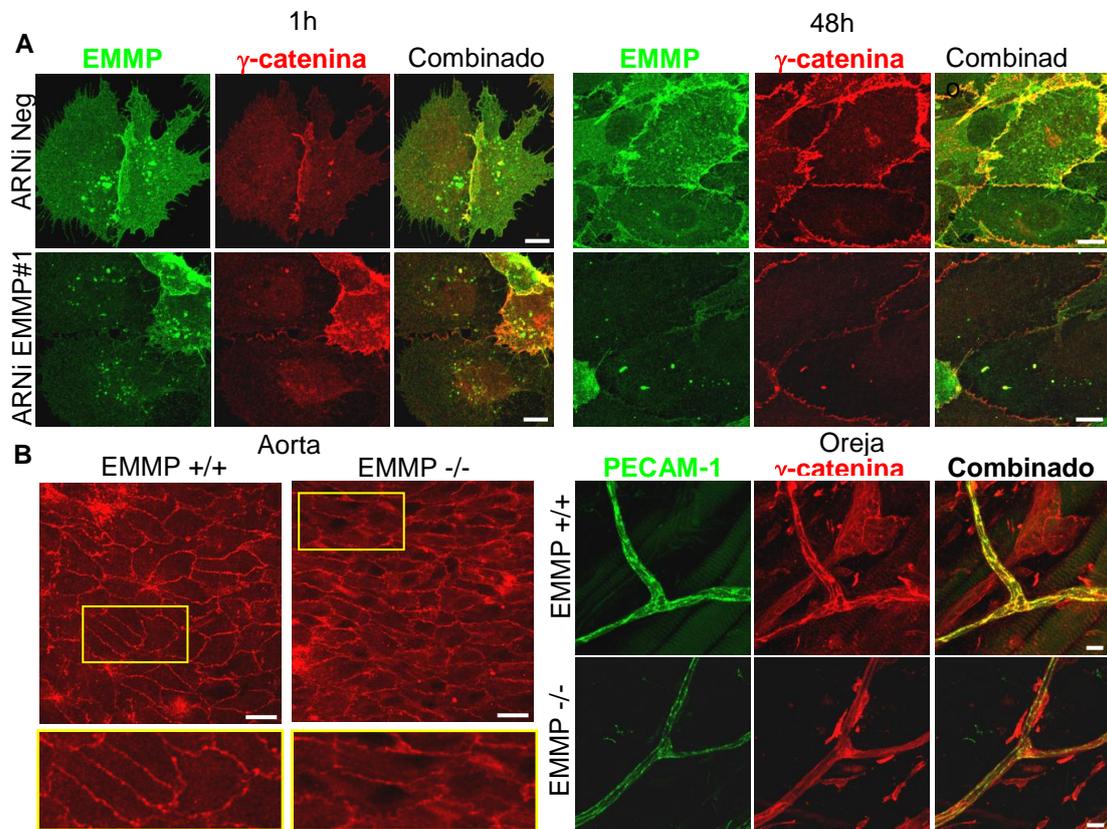


Figura 42: La expresión de γ -catenina en las uniones disminuye en ausencia de EMMPRIN. A. Tinción mediante inmunofluorescencia de EMMPRIN (verde) y γ -catenina (rojo) en HUVEC con ARNi Neg o silenciadas para EMMPRIN a 1h y 48h después de la siembra. Proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m. Escala 10 μ m. **B.** Inmunofluorescencia *in toto* de γ -catenina (rojo) en aorta y de γ -catenina (rojo) y PECAM-1 (verde) en oreja de ratones de genotipo silvestre o deficientes para EMMPRIN. Proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m en aorta y de 0,8 μ m en oreja. Escala 10 μ m.

Para comprobar que esta disminución de γ -catenina en las uniones de células deficientes para EMMPRIN no era debida a los cambios producidos en el citoesqueleto de actina-miosina (Tinsley et al., 2000), se realizó una tinción mediante inmunofluorescencia de γ -catenina en HUVEC silenciadas para EMMPRIN y tratadas con los inhibidores Y27632 y blebistatina (Figura 43). Así, se demostró que la relajación de la maquinaria de actina-miosina no era suficiente para recuperar totalmente la tinción de γ -catenina a las uniones, y aunque se veía un ligero incremento en su intensidad en estos sitios esto podría ser debido a un aumento en la estabilización de las adhesiones dependientes de VE-cadherina que también reclutan γ -catenina.

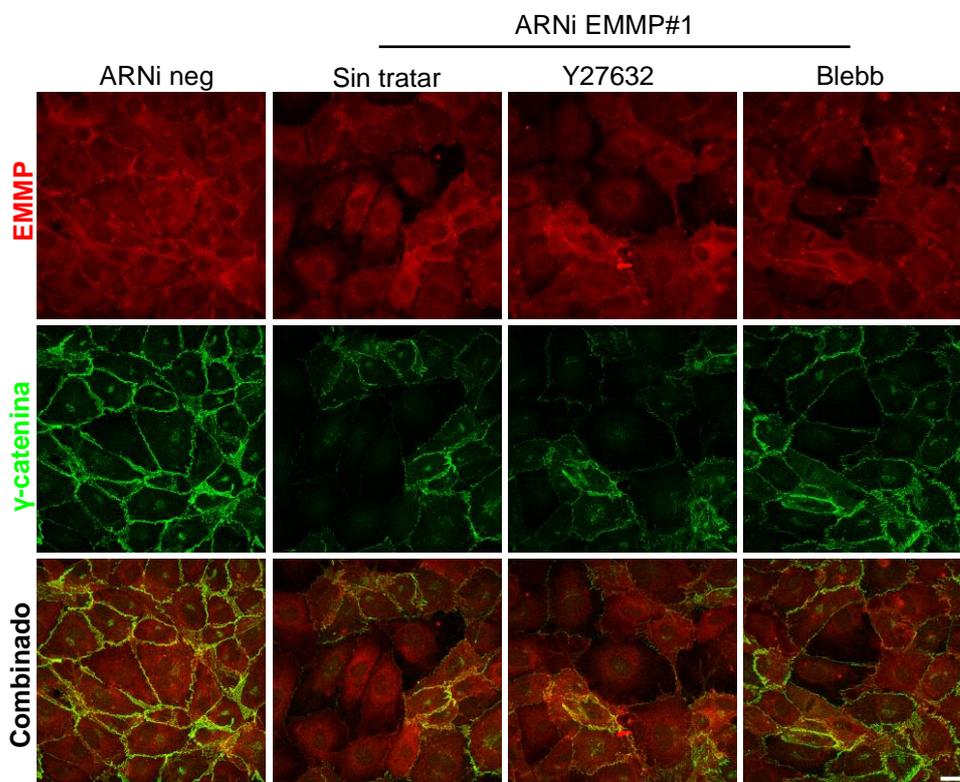


Fig 43: La relajación de la actina-miosina no recupera totalmente la expresión de γ -catenina en las uniones de HUVEC silenciadas para EMMPRIN. Tinción mediante inmunofluorescencia de EMMPRIN (rojo) y γ -catenina (verde) en HUVEC con ARNi Neg o silenciadas para EMMPRIN en confluencia (48h). Proyecciones máximas de secciones confocales de 0,3 μ m. Escala 10 μ m.

5. DISCUSIÓN

La proteína transmembrana EMMPRIN ha sido ampliamente estudiada en ciertas patologías como cáncer, aterogénesis e inflamación, y se había descrito también su localización en uniones célula-célula en epitelio y en la barrera hematoencefálica. Sin embargo hasta ahora no existían estudios detallados sobre su expresión y localización en uniones en otros tipos de endotelio ni sobre su función en dichas uniones. En esta tesis se describe la regulación de la expresión de EMMPRIN en células endoteliales de humano y de ratón durante el establecimiento de la monocapa en cultivo y se observa como EMMPRIN se localiza en los contactos entre células endoteliales desde el principio de la formación de éstos incluso antes que la VE-cadherina. Además su expresión aumenta en el momento en que los contactos entre células endoteliales están estabilizándose. La localización de EMMPRIN en estos contactos se detecta también *in vivo* en ratón en los diferentes tejidos analizados. La presencia de EMMPRIN en estas estructuras parece ser necesaria para el correcto funcionamiento de la barrera endotelial, ya que en ausencia de EMMPRIN la estabilidad de las uniones entre células endoteliales se altera y aumenta la permeabilidad vascular. Los defectos observados en EMMPRIN son debidos a un desequilibrio producido en las diferentes tensiones que la actina-miosina ejerce sobre las uniones endoteliales y este desequilibrio viene dado por la ausencia del complejo EMMPRIN/ γ -catenina que interacciona con F-actina a nivel de las uniones.

Queda por esclarecer el mecanismo por el cual EMMPRIN se recluta de manera dirigida a los contactos. Se sabe que EMMPRIN posee un dominio de Leucina que señala para su localización basolateral en uniones intercelulares en células epiteliales. Cuando este dominio no está presente, EMMPRIN se deslocaliza de los contactos y se estabiliza en la parte apical de la membrana (Deora et al., 2004). Sin embargo en algunos tejidos como en el epitelio pigmentario de la retina, esta señal en la cola citosólica de la EMMPRIN no es reconocida y prevalecen otro tipo de señales, como podría ser la glicosilación, que dirigen su localización a la parte apical de la membrana (Deora et al., 2004). De este modo, la localización de EMMPRIN en membrana puede depender del tejido o del tipo celular en el que se esté expresando y de otros dominios en su estructura así como de su glicosilación. Aún se desconoce que tipo de vesículas y de transportadores pueden estar dirigiendo esta localización. Otras proteínas poseen un dominio diLeucina que suele ser marcador de transporte basolateral independiente de la adaptina AP-1B (Folsch et al., 1999, Gan et al., 2002), principal proteína adaptadora de la clatrina y la única de su familia que parece implicada hasta el momento en transporte basolateral (Gonzalez and Rodriguez-Boulan, 2009, Folsch et al., 1999). En el caso de EMMPRIN esta adaptina tampoco parece implicada en su transporte basolateral (Deora et al., 2004). Por otro lado hay

evidencias de que parte del transporte basolateral de EMMPRIN sea debido a clatrina de manera independiente de AP1B, ya que en presencia de ARNi de clatrina la proporción de EMMPRIN basolateral:apical cambia a 1:2 (Deborde et al., 2008). En esta tesis se observa que una parte de las vesículas positivas para EMMPRIN, localizadas en los contactos entre células son positivas para clatrina. Esta colocalización se da principalmente cuando las células ya han tomado contacto, y por la tanto en estadios más maduros de las uniones, por lo que esta vía podría ser importante para el reciclaje de EMMPRIN en membrana.

Por otro lado, también se observa colocalización parcial con la proteína Rab11. Las proteínas Rab son GTPasas de pequeño tamaño que pertenecen a la superfamilia de la proteína Ras y que están implicadas en tráfico vesicular, interacciones citoesqueleto-membrana y transducción de señales (Takai et al., 2001, Wennerberg et al., 2005). Contribuyen a la especificidad del tráfico de membrana regulando formación de vesículas, transporte, anclaje y fusión en transporte vesicular y estableciendo dominios de membrana (Zerial and McBride, 2001, Pfeffer, 2003). En concreto Rab 11 es un marcador de endosomas encargados del reciclaje de proteínas de membrana, pero también está implicado en el transporte de la E-cadherina desde la red trans-golgi a la membrana basolateral en células epiteliales (Hickson et al., 2003, Lock and Stow, 2005). Sin embargo en el caso de EMMPRIN se observa colocalización principalmente en zonas de membrana próximas a los contactos intercelulares, por lo que la mayor parte las vesículas observadas que son positivas para Rab 11 y para EMMPRIN podrían ser vesículas de reciclaje en membrana. También se estudia la colocalización de EMMPRIN con Rab8, la cual también ha sido implicada en el transporte de E-cadherina (Yamamura et al., 2008). Esta GTPasa se localiza en la red trans-golgi, en endosomas de reciclaje, en vesículas citosólicas y en algunas protrusiones de membrana. En células epiteliales se ha demostrado que media el transporte basolateral dependiente de AP1B (Nishimura and Sasaki, 2009) aunque existe algo de controversia ya que en otros estudios se ha observado que es muy importante para el transporte apical de membrana (Sato et al., 2007). En el caso de EMMPRIN no se observa colocalización con Rab8 en HUVEC excepto en algunas vesículas localizadas en la red trans-golgi lo que podría confirmar que su transporte a la parte basolateral de la membrana no es dependiente de AP1B tampoco en estas células. Por otro lado también se estudia la colocalización de EMMPRIN con un marcador de endosomas tempranos, la proteína EEA1. Aunque en la mayoría de las situaciones los endosomas tempranos transportan proteínas de la membrana para su degradación a lisosomas a través de su maduración a endosomas tardíos, en algunos casos reciclan el material que portan directamente a la membrana plasmática (Johannes and Wunder, 2011).

Pero no parece ser el caso de EMMPRIN ya que no parece colocalizar con estas vesículas a lo largo de la formación de la monocapa.

Parece ser que la mayor correlación entre la tinción de EMMPRIN y las vesículas de tráfico celular analizadas se da con las vesículas positivas para la caveolina-1. Ambas proteínas colocalizan en lo que podría ser la ruta trans-golgi, ya que al inicio de la formación de la monocapa (1h) ambas proteínas colocalizan en la zona perinuclear además de en algunas protusiones de membrana y en un estadio más intermedio (24h) las vesículas positivas para ambas proteínas se distribuyen más homogéneamente en citoplasma y membrana. Esta colocalización correlaciona en el tiempo con la presencia de una forma menos glicosilada de EMMPRIN, lo que coincide con trabajos publicados anteriormente donde se describe que la unión de EMMPRIN con cav-1 en células tumorales se produce principalmente cuando la glicosilación de EMMPRIN es baja (Tang and Hemler, 2004). De esta manera, EMMPRIN podría viajar a la zona basolateral de la membrana desde la zona perinuclear en vesículas positivas para cav-1, probablemente caveolas, cuando su glicosilación es baja. Sin embargo parece ser que la unión de cav-1 con la forma de baja glicosilación de EMMPRIN impide una mayor glicosilación de ésta, por lo que es probable que una vez en membrana la proteína sufra un reciclaje por medio quizás de clatrina o de Rab11 se glicosile y vuelva a membrana. Puede ser que este estado de glicosilación sea un requisito para que EMMPRIN se establezca en estas zonas de membrana en relación con la capacidad de EMMPRIN para formar homodímeros, ya que estos se forman con mas afinidad cuando EMMPRIN está altamente glicosilada. Estos dímeros de EMMPRIN en la superficie celular en *cis*, favorecen su conformación para interaccionar en *trans* con EMMPRIN de otras membranas (Tang and Hemler, 2004). De esta manera el cambio en su localización en diferentes dominios de membrana, así como de su glicosilación y la agregación de dímeros de EMMPRIN podría estar favoreciendo la estabilidad de la adhesión célula-célula mediada por esta proteína. Sin embargo otras proteínas de las uniones, como la E-cadherina o la N-cadherina parecen estabilizarse mejor en membrana cuando están hipoglicosiladas (Jamal et al., 2009, Nita-Lazar et al., 2010, Guo et al., 2009) aunque por otro lado se ha descrito que los ácidos siálicos de las cadenas de glicanos de la VE-cadherina parecen ser necesarios para su función en los contactos intercelulares (Geyer et al., 1999).

En esta tesis se demuestra también que la glicosilación de EMMPRIN es necesaria para su localización en los sitios de unión entre células, ya que mutaciones en los sitios de glicosilación de esta proteína hace que se localice en la parte apical de la célula y no sea capaz de localizarse en las uniones. Es importante destacar que este comportamiento no es usual en las proteínas glicosiladas, ya que su glicosilación,

ya sea parcial o total suele ser indispensable para que se expresen en membrana. Además esta glicosilación y no su ausencia, suele ser señal de transporte apical. Las células epiteliales que expresan el mutante para la glicosilación de EMMPRIN parecen más retraídas y no son capaces de formar correctamente una monocapa en cultivo.

En anteriores trabajos se ha descrito que la proteína ortóloga de EMMPRIN en pollo, la neurotelina forma parte de las uniones endoteliales en la barrera hematoencefálica (Schlosshauer and Herzog, 1990). Sin embargo hasta ahora no se había estudiado en detalle la expresión de EMMPRIN en otros lechos vasculares. En esta tesis se muestra cómo EMMPRIN localiza en las uniones entre células endoteliales humanas y de ratón en cultivo, como en la vasculatura de diferentes órganos en ratón, existiendo una correlación entre la expresión de EMMPRIN y la complejidad de las uniones del endotelio estudiado. Así se observa más expresión de EMMPRIN en las uniones endoteliales de los vasos en cerebro, formando parte de la barrera hematoencefálica y en macrovasculatura de pulmón. Sin embargo esta expresión es menor en los vasos que conforman los glomérulos en el riñón, que se caracterizan por tener un endotelio fenestrado, que es más permeable. Además, en otros trabajos se ha descrito como EMMPRIN se expresa en los vasos del cerebro humano pero no en los vasos proliferantes de gliomas malignos (Sameshima et al., 2000). Estos datos apuntan a que los vasos que muestran una mayor permeabilidad, ya sea por necesidad funcional, como en el caso del glomérulo o por disfunción, como en el caso de los vasos tumorales, muestran una menor expresión de EMMPRIN.

Además se ha observado que EMMPRIN es importante para la correcta formación y maduración de las uniones endoteliales tanto en humano como en ratón. Se ha demostrado que en células humanas en cultivo, la deficiencia de EMMPRIN produce una alteración de la formación de los complejos de la VE-cadherina, observado mediante inmunofluorescencia y por detección de dímeros de VE-cadherina mediante electroforesis de proteínas en condiciones nativas. La formación de los dímeros de la VE-cadherina es esencial para que la unión tenga la consistencia necesaria para mantener unidas a las dos células, ya que el dímero de VE-cadherina es la mínima unidad funcional de la VE-cadherina (Gumbiner, 2005). Sin embargo existe algo de controversia sobre si la dimerización ocurre primero en *trans* y luego en *cis* o si es necesaria una dimerización previa en *cis* para constituir la interacción en *trans* (Gumbiner, 2005). En cualquier caso la disrupción de la adhesión homofílica de VE-cadherina conlleva una acumulación excesiva de líquido intersticial y está asociado con procesos patológicos como inflamación, aterogénesis y lesión pulmonar aguda

(Wallez and Huber, 2008). Muchos de los agentes que incrementan la permeabilidad vascular afectan a la organización de las AJs, lo que puede ir acompañado o no por retracción de la célula endotelial y la aparición de “huecos” entre las células (Dejana et al., 2008), pero el aumento en permeabilidad no siempre implica una alteración evidente de la morfología de las células endoteliales (Andriopoulou et al., 1999, Esser et al., 1998). En el caso de las células deficientes en EMMPRIN sólo en algunas células se observa retracción o formación de huecos y no parece existir una internalización evidente de la VE-cadherina. Sin embargo sí se produce una alteración en el patrón de tinción de esta proteína en los contactos, así como un aumento en la permeabilidad de la monocapa de HUVECs en cultivo, lo que corrobora que los contactos formados por células deficientes en EMMPRIN no se establecen correctamente. Estos defectos han sido confirmados en los ratones deficientes para EMMPRIN, en los que tanto la VE-cadherina como PECAM-1 forman un patrón punteado y discontinuo en comparación con los ratones de genotipo silvestre. El defecto observado no es exactamente igual al del cultivo, pero in vivo hay otros parámetros que afectan a la estructura y formación de las uniones, así como a su visualización.

Estos ratones también muestran un incremento en la permeabilidad vascular al azul de Evans en condiciones de inflamación y al dextrano fluorescente de alto y bajo peso molecular, tanto en condiciones basales como de inflamación y tanto en capilares y vasos pequeños como en vasos más grandes. Que en condiciones basales no se observe un aumento de la permeabilidad al azul de Evans, puede deberse a que la extracción del colorante no sea lo suficientemente efectiva como para detectar pequeñas diferencias en la cantidad de éste en el tejido, como a que la colorimetría tiene menos sensibilidad de detección que la fluorescencia. Los ratones heterocigotos para la deficiencia en EMMPRIN también muestran alteraciones vasculares y aumento en la permeabilidad en condiciones de inflamación lo que indica que es necesaria la carga completa de la proteína para su correcta función en las uniones interendoteliales. El fenotipo de permeabilidad observado mediante la visualización de dextrano extravasado en los ratones deficientes en EMMPRIN es atípico, ya que en otros modelos estudiados el incremento de permeabilidad se produce principalmente a través de capilares y post-vénulas. Además es único comparado con el de otros ratones deficientes para otras proteínas de la familia de las inmunoglobulinas presentes en las uniones endoteliales, ya que en el caso de PECAM-1 sólo muestran un aumento de la permeabilidad en condiciones de inflamación (Graesser et al., 2002) y en el caso de JAM-C por el contrario muestran un aumento de la función barrera y

una disminución de la permeabilidad tanto en condiciones basales como en inflamación (Orlova et al., 2006).

Por otro lado la VE-cadherina es el primer marcador de progenitores endoteliales, y por ello contribuye a la remodelación y maduración de la vasculatura durante la embriogénesis (Breier et al., 1996, Carmeliet, 1999). De esta manera la correcta formación de las uniones adherentes es necesaria para el ensamblaje de las uniones estrechas (Nita-Lazar et al., 2010, Taddei et al., 2008). En HUVEC silenciadas para EMMPRIN se observa una disminución de JAM A en los contactos entre éstas. Así, la alteración de las uniones estrechas en las células deficientes en EMMPRIN también podría estar contribuyendo al fenotipo de permeabilidad, aunque en los ratones deficientes para la claudina 5 perteneciente a las uniones estrechas y específica de endotelio, solo parece existir un defecto en la función barrera frente a moléculas menores a 800Da. (Nitta et al., 2003).

Como ya se ha comentado en la introducción las fuerzas ejercidas por el citoesqueleto de actina sobre la célula, tienen un papel fundamental en la formación y mantenimiento de las uniones intercelulares (Hoelzle and Svitkina, 2012). Asimismo se ha visto que un incremento o disminución en las fuerzas que el citoesqueleto de actina ejerce sobre las uniones, puede alterar el reclutamiento de la VE-cadherina a las uniones (Liu et al., 2010). En experimentos mostrados en esta tesis se produce una alteración del patrón de VE-cadherina así como una disminución en la proporción dímeros/monómeros homofílicos formados por esta proteína. En trabajos anteriores se ha descrito que EMMPRIN parece conferir resistencia a la muerte por *anoikis* a través de E-cadherina (Ma et al., 2010). De esta manera la adhesión célula-célula dependiente de EMMPRIN podría facilitar el reclutamiento y dimerización de la E-cadherina en este caso, lo que desencadena señalización de supervivencia en la célula.

Las células deficientes para EMMPRIN, ya sea en cultivo o ex vivo, muestran un patrón alterado del citoesqueleto de actina, observándose una disminución de F-actina en las uniones y un aumento de actina polimerizada en el interior celular mostrando lo que correlaciona con un estadio más inmaduro de las uniones intercelulares. Esto correlaciona con trabajos anteriores en los que se ha descrito que la interferencia de EMMPRIN en células tumorales produce un aumento en las fibras de estrés aunque sin incrementar por ello las adhesiones focales, y una disminución en la formación de filopodia (Zhu et al., 2012). De hecho aunque EMMPRIN ha sido estudiada en el contexto de las integrinas no existen evidencias de que forme parte de las adhesiones focales (Berditchevski et al., 1997) con lo que su posible papel en la

regulación de la formación de las fibras de estrés no parece estar relacionado con adhesión a la matriz. Además, la disminución de la formación de filopodia en ausencia de EMMPRIN concuerda con que EMMPRIN tenga un papel en la formación y nacimiento de los contactos entre células endoteliales, ya que parece ser que la formación de filopodia en el establecimiento de los contactos es necesaria para que éstos se estabilicen y maduren (Hoelzle and Svitkina, 2012).

En los videos presentados se puede observar cómo al formarse las uniones las fibras de actina van cambiando de una posición perpendicular a la membrana cuando las células comienzan a contactar a una posición paralela cuando aumenta la superficie de adhesión entre las dos células. Sin embargo, en ausencia de EMMPRIN la mayor parte de las fibras permanecen perpendiculares a la superficie de contacto lo que podría indicar que éstas uniones son aún inmaduras y más móviles e inestables.

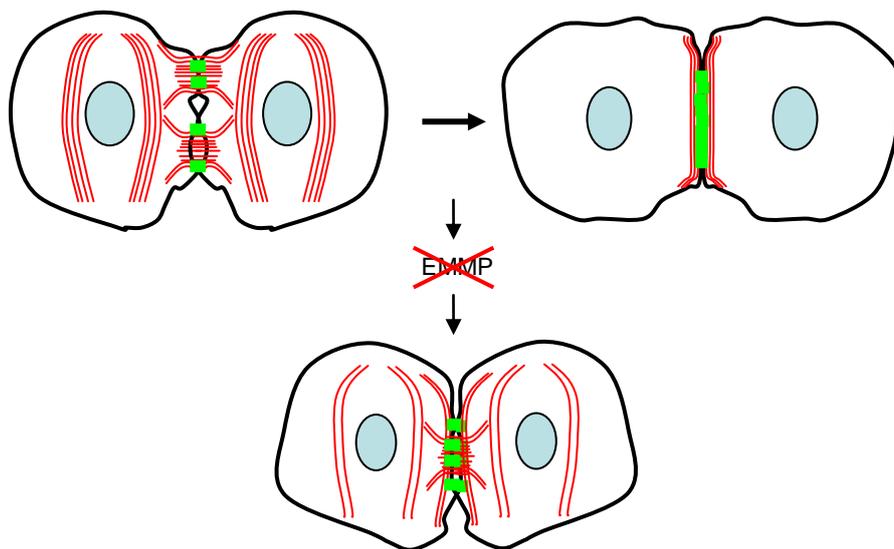


Figura 44: Patrón de actina en la formación de las uniones endoteliales. En un principio las fibras de actina se colocan en dirección perpendicular a la unión entre dos células y según madura ésta las fibras de actina se colocan paralelas a lo largo de la unión. En ausencia de EMMPRIN esta transición se altera y parte de las fibras de actina permanecen perpendiculares al eje de la unión.

Se ha descrito que en células en cultivo pueden existir un tipo de contactos en los que la actina se coloca de manera perpendicular al eje de la unión entre las dos células conectándolas y que suelen ir acompañados de un cambio en el patrón de tinción de la VE-cadherina similar al observado en las células deficientes en EMMPRIN. Estos tipos de unión aumentan en porcentaje en el cultivo cuando éste es sometido a algún estímulo inflamatorio, como $TNF\alpha$ (Millan et al., 2010), por lo que podrían ser un tipo de contactos más dinámicos e inmaduros, al igual que ocurre en ausencia de EMMPRIN.

Por otro lado tanto en HUVEC silenciadas para EMMPRIN, como en MLEC y en aorta de ratones deficientes, se observa un aumento en la fosforilación de la MLC en el interior celular y una disminución en las uniones. MLC se fosforila en los residuos Ser19 y en Thr18, lo que resulta en un cambio en la estructura terciaria de MLC favoreciendo el movimiento contráctil que ésta ejerce contra la actina (Garcia et al., 1995, Verin et al., 1998). El cambio en la distribución de la pMLC en las células deficientes en EMMPRIN estaría indicando por lo tanto una mayor tensión ejercida por el citoesqueleto de actina dentro de la célula y menor en las estructuras de actina que soportan las uniones. El aumento en fosforilación de la MLC en el interior celular ya ha sido implicado anteriormente en hiper-permeabilidad en endotelio bajo diferentes estímulos como son la histamina y la trombina, principalmente bajo la acción de la quinasa ROCK (Amano et al., 2010) que puede fosforilar a MLC directamente o a través de la inhibición de su fosfatasa MLCP (Amano et al., 2010, Amano et al., 1996, Kimura et al., 1996). De esta manera, la inhibición de la función contráctil de la maquinaria de actina-miosina mediante el inhibidor de ROCK, Y27632 y el inhibidor de la unión de miosina II a la actina, blebistatina, producen una recuperación del fenotipo normal de VE-cadherina en las uniones entre células deficientes para EMMPRIN, así como de la permeabilidad en las células tratadas con Y27632. Esto parece indicar que ambos efectos estarían siendo producidos por el desequilibrio producido en las diferentes tensiones ejercidas sobre las uniones. Se sabe que la quinasa ROCK suele actuar bajo la acción de la GTPasa Rho cuando ésta está activa (Amano et al., 2010). Sin embargo en las células deficientes en EMMPRIN no se observa un aumento en la actividad de la GTPasa Rho, activadora de ROCK, con lo que esta no parece ser la vía de señalización desencadenada en ausencia de EMMPRIN. Pero ROCK también puede unirse a otras GTPasas encargadas de modular su función inhibiéndola como son Rnd3/RhoE, Gem o Rad (Ward et al., 2002, Riento et al., 2003, Komander et al., 2008). Por otro lado PDK1 puede unirse directamente con a ROCK en competición con RhoE, lo que produce la liberación de esta última y la activación de ROCK (Pinner and Sahai, 2008). ROCK también puede ser activada por procesamiento de la parte reguladora de su extremo C-terminal por proteasas como la caspasa 3 o la granzima B (Coleman et al., 2001, Sebbagh et al., 2001, Sebbagh et al., 2005). Con esto se puede concluir que aunque no se observen cambios en la actividad de Rho, no se puede descartar que no los haya en la actividad de ROCK, como parecen indicar los datos presentados.

Por otro lado, puede ser que en las células deficientes en EMMPRIN la MLC se esté fosforilando de manera independiente de la vía de Rho/ROCK, como puede ser a través de la quinasa PKC (Garcia et al., 1995). Al inhibir la acción de ROCK lo que

estaríamos produciendo es un aumento en la actividad fosfatasa de MLCP y defosforilando MLC, produciendo así la relajación del citoesqueleto (Garcia et al., 1995, Kim et al., 2012) en las células deficientes en EMMPRIN. Así por ejemplo, el inhibidor de fosfatasa en serina y treonina (residuos donde es fosforilada la MLC), calyculin A genera una respuesta similar a la causada por la trombina (Garcia et al., 1995, Shasby et al., 1997) y la reducción de la fosforilación de MLC reduce la hiperpermeabilidad generada por estos agonistas (Amano et al., 2010).

Es importante destacar también que EMMPRIN es capaz de inhibir la activación de Pak-1, efector de la GTPasa Rac en una línea celular linfocítica (Ruiz et al., 2008). La activación de Pak y su reclutamiento a las zonas de unión entre células endoteliales bajo condiciones de flujo provoca un aumento en la permeabilidad de la monocapa formada por estas células (Orr et al., 2007). De esta manera la ausencia de EMMPRIN podría estar provocando un aumento en la activación de Pak-1 produciendo así el consecuente aumento en permeabilidad. Así mismo, la inactivación de cofilina dependiente de Rac/PAK/LIMK resulta en un incremento neto de la dinámica de polimerización de actina (Garcia et al., 2001).

Del mismo modo que la polimerización del citoesqueleto de actina y la tensión que ejerce sobre la membrana son importantes para el reclutamiento y estabilización de los complejos de unión, estos complejos son necesarios para el reclutamiento de proteínas que se unen a actina e inducen su polimerización. Así, un cambio en la cantidad de complejos en las uniones, así como en la composición proteica de éstos, podría llevar a una disminución en la actina polimerizada en los sitios de unión y un desequilibrio en las fuerzas de tensión. En la bibliografía existente sobre la adhesión célula-célula, se ha revisado extensamente el papel de las cadherinas y de las proteínas intracelulares unidas a ellas, como las cateninas, en la formación y mantenimiento del citoesqueleto de actina. Pero sin embargo estos estudios están siendo revisados y están apareciendo nuevos modelos que pretenden explicar la interrelación entre los complejos de adhesión célula-célula y el citoesqueleto de actina (Yamada et al., 2005).

En la presente tesis se describe un nuevo complejo en las uniones entre células endoteliales formado por EMMPRIN, γ -catenina y actina, que las comunica con el citoesqueleto de actina. Aunque clásicamente se había descrito γ -catenina como un componente de uniones ya maduras (Schnittler et al., 1997), en esta tesis se observa cómo EMMPRIN, γ -catenina y actina colocalizan en el endotelio en las uniones tempranas, cuando las membranas de dos células adyacentes empiezan a tomar contacto. El complejo así formado podría estar favoreciendo el anclaje de actina a los

contactos intercelulares propiciando así la generación del equilibrio necesario de las tensiones para que las uniones queden establecidas. A favor de esta hipótesis, se sabe que γ -catenina es capaz de unirse a α -catenina y a vinculina, las cuales poseen la doble función de unirse al citoesqueleto de actina y de favorecer el reclutamiento de nucleadores de actina como pueden ser Arp2/3, (Drees et al., 2005, Kobiela et al., 2004) formin-1 (Kobiela et al., 2004) o en el caso de la vinculina, favorecer directamente la polimerización de actina (Wen et al., 2009). Además se ha descrito el papel tanto de γ -catenina como de vinculina como proteínas estabilizadoras de las uniones intercelulares (Palovuori and Eskelinen, 2000, Walker et al., 2008, Watabe-Uchida et al., 1998, Jamal et al., 2009)

Por otro lado se ha descrito en células epiteliales que tanto γ -catenina como β -catenina son capaces de unirse a la proteína fascina reclutándola a las uniones adherentes de manera independiente de E-cadherina (Tao et al., 1996); además la expresión de EMMPRIN correlaciona con el patrón de expresión de fascina sobre-expresándose ambas en diferentes tipos de tumores (Jung et al., 2011, Tsai et al., 2007a, Tsai et al., 2007b). La proteína fascina, se une a los filamentos de actina para formar paquetes paralelos (Brill-Karniely et al., 2009, Courson and Rock, 2010) y se localiza en los filopodia formados en las primeras etapas de la formación de las uniones endoteliales (Hoelzle and Svitkina, 2012). Recientemente se ha comprobado que fascina es capaz de promover la formación de filopodia, aunque de manera independiente de su actividad empaquetadora de actina (Zanet et al., 2012). De esta manera EMMPRIN/ γ -catenina y fascina podrían estar coordinando tanto la formación de filopodia en las zonas de contacto en las etapas más tempranas de su formación, como de paquetes de actina según los contactos van madurando.

En ausencia de EMMPRIN se observa una disminución en la expresión de γ -catenina en las uniones intercelulares tanto en uniones en formación, como en uniones ya establecidas. Ya que el incremento en la actividad de MLCK produce aperturas intracelulares en la monocapa, un aumento en la contractilidad de la célula y pérdida de β -catenina periférica (Tinsley et al., 2000), el aumento de la pMLC en el interior celular observado en las células deficientes en EMMPRIN podría estar favoreciendo también una disminución en el reclutamiento de γ -catenina a las uniones. Sin embargo, los niveles de γ -catenina no se recuperan completamente al relajar el citoesqueleto con los inhibidores Y27632 y blebbistatina, lo que parece indicar que la disminución en la expresión de γ -catenina en las uniones podría ser la causa más que

la consecuencia del incremento de la maquinaria de acto-miosina en el interior celular en ausencia de EMMPRIN. Este incremento podría venir dado por diferentes mecanismos que se describen a continuación.

Primero, la disminución del reclutamiento de γ -catenin en las uniones en ausencia de EMMPRIN puede alterar la señalización a través de GTPasas ya que se ha descrito que la deficiencia de γ -catenina en queratinocitos produce un aumento de la actividad de RhoA y Rac1 (Todorovic et al., 2010) y en *Xenopus*, cuando se silencia γ -catenina, disminuye la actina cortical y la actividad de la GTPasa Cdc42 (Kofron et al., 2002). En este último estudio se demuestra, además que el defecto observado en la actina cortical en ausencia de γ -catenina, no puede ser compensado por α - o β -catenina, lo que sugiere un papel único de la γ -catenina en la organización del citoesqueleto de actina a nivel de membrana, al menos en *Xenopus*. Sin embargo, según los datos presentados, en las células deficientes en EMMPRIN no se observa un aumento en la actividad de la GTPasa Rho, pero podrían estar siendo afectadas otros miembros de esta familia de proteínas.

Segundo, la ausencia del complejo formado por EMMPRIN/ γ -catenina/actina podría estar promoviendo la deslocalización de proteínas polimerizadoras y organizadoras del citoesqueleto de actina, como vinculina y fascina de las uniones al interior celular. Así por ejemplo, se sabe que en ausencia de su anclaje a los sitios de unión fascina se acumula en el citoplasma y en fibras de estrés (Tao et al., 1996), lo que puede estar favoreciendo la disminución del empaquetamiento de la actina en las uniones y el aumento en el interior celular, produciendo así el desequilibrio observado en la maquinaria contráctil de la célula.

Tercero, la ausencia de los puntos de adhesión generados por el complejo EMMPRIN/ γ -catenina/actina y de las proteínas reclutadas por éste, impide el establecimiento de un anillo cortical de actina formado adecuadamente en las células deficientes en EMMPRIN. Esto produciría una disminución en la tensión cortical (centrifuga), provocando que la principal tensión ejercida sobre la célula sea en el interior celular (centrípeta). Este desequilibrio en las diferentes tensiones ejercidas sobre las uniones podría estar provocando un aumento en la polimerización de actina en el interior celular, ya que muchos de los polimerizadores de actina responden al aumento de la tensión y es ahí donde reside la mayor fuerza resultante del desequilibrio. Ese aumento en la polimerización de actina en el interior celular estaría promoviendo la actividad de la miosina en esos sitios (Tojkander et al., 2011) resultando en un aumento de la pMLC en el interior celular.

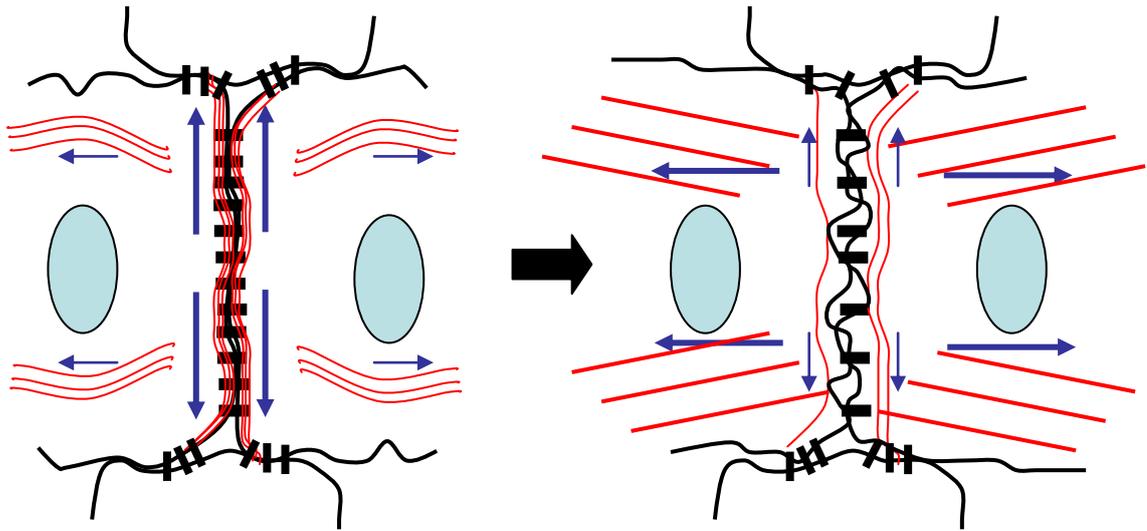


Figura 45. Esquema de las diferentes tensiones ejercidas por el citoesqueleto de actina sobre las uniones intercelulares. En presencia de EMMPRIN se conforma un anillo cortical de actina que soporta mecánicamente los complejos de adhesión entre las células y contrarresta la tensión ejercida desde el interior celular. En ausencia de EMMPRIN el anillo cortical de actina no se forma adecuadamente y el soporte mecánico de las uniones ejerce una menor tensión favoreciendo el aumento de la tensión del citoesqueleto en el interior celular.

6. CONCLUSIONES

- I. La expresión de la proteína transmembrana EMMPRIN así como su estado de glicosilación se regulan a lo largo del establecimiento de las monocapas formadas por células endoteliales en cultivo.
- II. EMMPRIN se recluta de manera temprana a las protrusiones de membrana formadas entre células endoteliales que empiezan a contactar y en ausencia de VE-cadherina en algunas de ellas. En células ya confluentes la expresión de EMMPRIN se restringe principalmente a los contactos formados entre estas células, donde colocaliza principalmente con la proteína de membrana PECAM-1.
- III. La localización subcelular de EMMPRIN es dependiente de su estado de glicosilación y de su reclutamiento a diferentes tipos de vesículas de la maquinaria de tráfico celular; su enriquecimiento es mayor en vesículas ricas en caveolina-1 en el inicio de la formación de los contactos célula-célula endotelial y en vesículas positivas para clatrina y Rab11 en contactos cuando éstos son más maduros.
- IV. La glicosilación de EMMPRIN es un requisito para su reclutamiento a los contactos célula-célula.
- V. La expresión de EMMPRIN es necesaria para la formación de tubos tridimensionales de células endoteliales en cultivo.
- VI. La ausencia de EMMPRIN altera la integridad vascular en ratón. La expresión de EMMPRIN es necesaria para la estabilización de los contactos entre células endoteliales y la función de barrera tanto *in vitro* como *in vivo*.
- VII. La desestabilización de los contactos y la alteración de la función de barrera en células deficientes en EMMPRIN son debidas a un incremento en la cantidad de fibras de actina con actividad contráctil en el interior celular y a una disminución de la F-actina y pMLC en las uniones.
- VIII. EMMPRIN interacciona a nivel de membrana con γ -catenina y α -actina.
- IX. El complejo formado por EMMPRIN, γ -catenina y actina es necesario para la correcta organización y dinámica del citoesqueleto de actina que sustenta las estructuras de adhesión entre células endoteliales.

7.BIBLIOGRAFÍA

- AGRAWAL, S. M., SILVA, C., TOURTELLOTTE, W. W. & YONG, V. W. 2011. EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*, 31, 669-77.
- ALLINGHAM, J. S., KLENCHIN, V. A. & RAYMENT, I. 2006. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2119-34.
- AMANO, M., ITO, M., KIMURA, K., FUKATA, Y., CHIHARA, K., NAKANO, T., MATSUURA, Y. & KAIBUCHI, K. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, 271, 20246-9.
- AMANO, M., NAKAYAMA, M. & KAIBUCHI, K. 2010. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67, 545-54.
- ANDRIOPOULOU, P., NAVARRO, P., ZANETTI, A., LAMPUGNANI, M. G. & DEJANA, E. 1999. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2286-97.
- ANFOSSO, F., BARDIN, N., VIVIER, E., SABATIER, F., SAMPOL, J. & DIGNAT-GEORGE, F. 2001. Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 276, 1564-9.
- ARORA, K., GWINN, W. M., BOWER, M. A., WATSON, A., OKWUMABUA, I., MACDONALD, H. R., BUKRINSKY, M. I. & CONSTANT, S. L. 2005. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol*, 175, 517-22.
- ARROYO, A. G., SANCHEZ-MATEOS, P., CAMPANERO, M. R., MARTIN-PADURA, I., DEJANA, E. & SANCHEZ-MADRID, F. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit. *J Cell Biol*, 117, 659-70.
- BARTH, K., BLASCHE, R. & KASPER, M. 2006. Lack of evidence for caveolin-1 and CD147 interaction before and after bleomycin-induced lung injury. *Histochem Cell Biol*, 126, 563-73.
- BAUMER, S., KELLER, L., HOLTMANN, A., FUNKE, R., AUGUST, B., GAMP, A., WOLBURG, H., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., DEUTSCH, U. & VESTWEBER, D. 2006. Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood*, 107, 4754-62.
- BAZZONI, G. & DEJANA, E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 84, 869-901.

- BAZZONI, G., MARTINEZ-ESTRADA, O. M., MUELLER, F., NELBOECK, P., SCHMID, G., BARTFAI, T., DEJANA, E. & BROCKHAUS, M. 2000. Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*, 275, 30970-6.
- BELTON, R. J., JR., CHEN, L., MESQUITA, F. S. & NOWAK, R. A. 2008. Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand. *J Biol Chem*, 283, 17805-14.
- BEN-ZE'EV, A. & GEIGER, B. 1998. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 629-39.
- BERDITCHEVSKI, F., CHANG, S., BODOROVA, J. & HEMLER, M. E. 1997. Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem*, 272, 29174-80.
- BERSHADSKY, A. 2004. Magic touch: how does cell-cell adhesion trigger actin assembly? *Trends Cell Biol*, 14, 589-93.
- BETSUYAKU, T., KADOMATSU, K., GRIFFIN, G. L., MURAMATSU, T. & SENIOR, R. M. 2003. Increased basigin in bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28, 600-6.
- BISWAS, C. 1982. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 109, 1026-34.
- BISWAS, C. 1984. Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells. *Cancer Lett*, 24, 201-7.
- BISWAS, C., ZHANG, Y., DECASTRO, R., GUO, H., NAKAMURA, T., KATAOKA, H. & NABESHIMA, K. 1995. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*, 55, 434-9.
- BOGATCHEVA, N. V. & VERIN, A. D. 2008. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvasc Res*, 76, 202-7.
- BOGATCHEVA, N. V., VERIN, A. D., WANG, P., BIRUKOVA, A. A., BIRUKOV, K. G., MIRZOPOYAZOVA, T., ADYSHEV, D. M., CHIANG, E. T., CROW, M. T. & GARCIA, J. G. 2003. Phorbol esters increase MLC phosphorylation and actin remodeling in bovine lung endothelium without increased contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285, L415-26.
- BOGGON, T. J., MURRAY, J., CHAPPUIS-FLAMENT, S., WONG, E., GUMBINER, B. M. & SHAPIRO, L. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*, 296, 1308-13.
- BOS, J. L. 2005. Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 123-8.

- BOUGATEF, F., QUEMENER, C., KELLOUCHE, S., NAIMI, B., PODGORNIK, M. P., MILLOT, G., GABISON, E. E., CALVO, F., DOSQUET, C., LEBBE, C., MENASHI, S. & MOURAH, S. 2009. EMMPRIN promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2 α -mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2. *Blood*, 114, 5547-56.
- BOULOS, S., MELONI, B. P., ARTHUR, P. G., MAJDA, B., BOJARSKI, C. & KNUCKEY, N. W. 2007. Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury. *Neurobiol Dis*, 25, 54-64.
- BOURDEAU, A., DUMONT, D. J. & LETARTE, M. 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*, 104, 1343-51.
- BRAGA, V. M. 2002. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 546-56.
- BRAUNDMEIER, A. G., FAZLEABAS, A. T., LESSEY, B. A., GUO, H., TOOLE, B. P. & NOWAK, R. A. 2006. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates metalloproteinases in human uterine endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 2358-65.
- BREIER, G., BREVIARIO, F., CAVEDA, L., BERTHIER, R., SCHNURCH, H., GOTSCH, U., VESTWEBER, D., RISAU, W. & DEJANA, E. 1996. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, 87, 630-41.
- BRILL-KARNIELY, Y., IDESES, Y., BERNHEIM-GROSWASSER, A. & BEN-SHAUL, A. 2009. From branched networks of actin filaments to bundles. *Chemphyschem*, 10, 2818-27.
- CARMELIET, P. 1999. Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature*, 401, 657-8.
- CASTORINO, J. J., DEBORDE, S., DEORA, A., SCHREINER, R., GALLAGHER-COLOMBO, S. M., RODRIGUEZ-BOULAN, E. & PHILP, N. J. 2011. Basolateral sorting signals regulating tissue-specific polarity of heteromeric monocarboxylate transporters in epithelia. *Traffic*, 12, 483-98.
- CAUDROY, S., POLETTE, M., NAWROCKI-RABY, B., CAO, J., TOOLE, B. P., ZUCKER, S. & BIREMBAUT, P. 2002. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis*, 19, 697-702.
- COLEMAN, M. L., SAHAI, E. A., YEO, M., BOSCH, M., DEWAR, A. & OLSON, M. F. 2001. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, 3, 339-45.
- COURSON, D. S. & ROCK, R. S. 2010. Actin cross-link assembly and disassembly mechanics for alpha-Actinin and fascin. *J Biol Chem*, 285, 26350-7.

- CROSNIER, C., BUSTAMANTE, L. Y., BARTHOLDSON, S. J., BEI, A. K., THERON, M., UCHIKAWA, M., MBOUP, S., NDIR, O., KWIATKOWSKI, D. P., DURAISINGH, M. T., RAYNER, J. C. & WRIGHT, G. J. 2011. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 480, 534-7.
- CURTIN, K. D., MEINERTZHAGEN, I. A. & WYMAN, R. J. 2005. Basigin (EMMPRIN/CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture. *J Cell Sci*, 118, 2649-60.
- CHAVEZ, A., SMITH, M. & MEHTA, D. 2011. New insights into the regulation of vascular permeability. *Int Rev Cell Mol Biol*, 290, 205-48.
- CHEN, S., KADOMATSU, K., KONDO, M., TOYAMA, Y., TOSHIMORI, K., UENO, S., MIYAKE, Y. & MURAMATSU, T. 2004. Effects of flanking genes on the phenotypes of mice deficient in basigin/CD147. *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 147-53.
- CHEN, Y., ZHANG, H., GOU, X., HORIKAWA, Y., XING, J. & CHEN, Z. 2009. Upregulation of HAb18G/CD147 in activated human umbilical vein endothelial cells enhances the angiogenesis. *Cancer Lett*, 278, 113-21.
- CHKLOVSKAIA, E., NISSEN, C., LANDMANN, L., RAHNER, C., PFISTER, O. & WODNAR-FILIPOWICZ, A. 2001. Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A. *Blood*, 97, 1027-34.
- CHO, J. Y., FOX, D. A., HOREJSI, V., SAGAWA, K., SKUBITZ, K. M., KATZ, D. R. & CHAIN, B. 2001. The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood*, 98, 374-82.
- CHOI, E. Y., KIM, D., HONG, B. K., KWON, H. M., SONG, Y. G., BYUN, K. H., PARK, H. Y., WHANG, K. C. & KIM, H. S. 2002. Upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and gelatinases in human atherosclerosis infected with *Chlamydia pneumoniae*: the potential role of *Chlamydia pneumoniae* infection in the progression of atherosclerosis. *Exp Mol Med*, 34, 391-400.
- CHU, Y. S., THOMAS, W. A., EDER, O., PINCET, F., PEREZ, E., THIERY, J. P. & DUFOUR, S. 2004. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol*, 167, 1183-94.
- DAI, J. Y., DOU, K. F., WANG, C. H., ZHAO, P., LAU, W. B., TAO, L., WU, Y. M., TANG, J., JIANG, J. L. & CHEN, Z. N. 2009. The interaction of HAb18G/CD147

- with integrin alpha6beta1 and its implications for the invasion potential of human hepatoma cells. *BMC Cancer*, 9, 337.
- DAI, L., BRATOEVA, M., TOOLE, B. P., QIN, Z. & PARSONS, C. 2011. KSHV activation of VEGF secretion and invasion for endothelial cells is mediated through viral upregulation of emmprin-induced signal transduction. *Int J Cancer*.
- DAMSKER, J. M., BUKRINSKY, M. I. & CONSTANT, S. L. 2007. Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A. *J Leukoc Biol*, 82, 613-8.
- DAVIDSON, B., GIVANT-HORWITZ, V., LAZAROVICI, P., RISBERG, B., NESLAND, J. M., TROPE, C. G., SCHAEFER, E. & REICH, R. 2003. Matrix metalloproteinases (MMP), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases (MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 20, 621-31.
- DEBORDE, S., PERRET, E., GRAVOTTA, D., DEORA, A., SALVAREZZA, S., SCHREINER, R. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature*, 452, 719-23.
- DECASTRO, R., ZHANG, Y., GUO, H., KATAOKA, H., GORDON, M. K., TOOLE, B. & BISWAS, G. 1996. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol*, 106, 1260-5.
- DEJANA, E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 261-70.
- DEJANA, E., ORSENIGO, F. & LAMPUGNANI, M. G. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, 121, 2115-22.
- DEJANA, E., TOURNIER-LASSERVE, E. & WEINSTEIN, B. M. 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*, 16, 209-21.
- DEORA, A. A., GRAVOTTA, D., KREITZER, G., HU, J., BOK, D. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2004. The basolateral targeting signal of CD147 (EMMPRIN) consists of a single leucine and is not recognized by retinal pigment epithelium. *Mol Biol Cell*, 15, 4148-65.
- DEORA, A. A., PHILP, N., HU, J., BOK, D. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2005. Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16245-50.

- DREES, F., POKUTTA, S., YAMADA, S., NELSON, W. J. & WEIS, W. I. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123, 903-15.
- DU, Z. M., HU, C. F., SHAO, Q., HUANG, M. Y., KOU, C. W., ZHU, X. F., ZENG, Y. X. & SHAO, J. Y. 2009. Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients. *Int J Cancer*, 125, 1832-41.
- DUDEK, S. M. & GARCIA, J. G. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, 91, 1487-500.
- DUDEK, S. M., JACOBSON, J. R., CHIANG, E. T., BIRUKOV, K. G., WANG, P., ZHAN, X. & GARCIA, J. G. 2004. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase. *J Biol Chem*, 279, 24692-700.
- DUNCAN, G. S., ANDREW, D. P., TAKIMOTO, H., KAUFMAN, S. A., YOSHIDA, H., SPELLBERG, J., DE LA POMPA, J. L., ELIA, A., WAKEHAM, A., KARAN-TAMIR, B., MULLER, W. A., SENALDI, G., ZUKOWSKI, M. M. & MAK, T. W. 1999. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol*, 162, 3022-30.
- ESSER, S., LAMPUGNANI, M. G., CORADA, M., DEJANA, E. & RISAU, W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13), 1853-65.
- FAN, Q. W., YUASA, S., KUNO, N., SENDA, T., KOBAYASHI, M., MURAMATSU, T. & KADOMATSU, K. 1998. Expression of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in the mouse central nervous system. *Neurosci Res*, 30, 53-63.
- FANNING, A. S., JAMESON, B. J., JESAITIS, L. A. & ANDERSON, J. M. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 273, 29745-53.
- FENCZIK, C. A., ZENT, R., DELLOS, M., CALDERWOOD, D. A., SATRIANO, J., KELLY, C. & GINSBERG, M. H. 2001. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem*, 276, 8746-52.
- FODA, H. D., ROLLO, E. E., DREWS, M., CONNER, C., APPELT, K., SHALINSKY, D. R. & ZUCKER, S. 2001. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340). *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25, 717-24.

- FOLSCH, H., OHNO, H., BONIFACINO, J. S. & MELLMAN, I. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell*, 99, 189-98.
- FOSSUM, S., MALLETT, S. & BARCLAY, A. N. 1991. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol*, 21, 671-9.
- FRANK, M. & KEMLER, R. 2002. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 557-62.
- FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S. & TSUKITA, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123, 1777-88.
- GABISON, E. E., HOANG-XUAN, T., MAUVIEL, A. & MENASHI, S. 2005. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie*, 87, 361-8.
- GALLAGHER, S. M., CASTORINO, J. J., WANG, D. & PHILP, N. J. 2007. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Res*, 67, 4182-9.
- GAN, Y., MCGRAW, T. E. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2002. The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol*, 4, 605-9.
- GARCIA, J. G., DAVIS, H. W. & PATTERSON, C. E. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*, 163, 510-22.
- GARCIA, J. G., LIU, F., VERIN, A. D., BIRUKOVA, A., DECHERT, M. A., GERTHOFFER, W. T., BAMBERG, J. R. & ENGLISH, D. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*, 108, 689-701.
- GAVARD, J. & GUTKIND, J. S. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, 8, 1223-34.
- GAVARD, J. & GUTKIND, J. S. 2008. Protein kinase C-related kinase and ROCK are required for thrombin-induced endothelial cell permeability downstream from Galpha12/13 and Galpha11/q. *J Biol Chem*, 283, 29888-96.
- GAVARD, J., PATEL, V. & GUTKIND, J. S. 2008. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell*, 14, 25-36.

- GERHARDT, H., GOLDING, M., FRUTTIGER, M., RUHRBERG, C., LUNDKVIST, A., ABRAMSSON, A., JELTSCH, M., MITCHELL, C., ALITALO, K., SHIMA, D. & BETSHOLTZ, C. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 161, 1163-77.
- GEYER, H., GEYER, R., ODENTHAL-SCHNITTLER, M. & SCHNITTLER, H. J. 1999. Characterization of human vascular endothelial cadherin glycans. *Glycobiology*, 9, 915-25.
- GONZALEZ, A. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2009. Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett*, 583, 3784-95.
- GRAESSER, D., SOLOWIEJ, A., BRUCKNER, M., OSTERWEIL, E., JUEDES, A., DAVIS, S., RUDDLE, N. H., ENGELHARDT, B. & MADRI, J. A. 2002. Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest*, 109, 383-92.
- GUMBINER, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 622-34.
- GUO, H. B., JOHNSON, H., RANDOLPH, M. & PIERCE, M. 2009. Regulation of homotypic cell-cell adhesion by branched N-glycosylation of N-cadherin extracellular EC2 and EC3 domains. *J Biol Chem*, 284, 34986-97.
- GWINN, W. M., DAMSKER, J. M., FALAHATI, R., OKWUMABUA, I., KELLY-WELCH, A., KEEGAN, A. D., VANPOUILLE, C., LEE, J. J., DENT, L. A., LEITENBERG, D., BUKRINSKY, M. I. & CONSTANT, S. L. 2006. Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J Immunol*, 177, 4870-9.
- HANDSLEY, M. M. & EDWARDS, D. R. 2005. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, 115, 849-60.
- HANNA, S. M., KIRK, P., HOLT, O. J., PUKLAVEC, M. J., BROWN, M. H. & BARCLAY, A. N. 2003. A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically. *BMC Biochem*, 4, 17.
- HASANEEN, N. A., ZUCKER, S., CAO, J., CHIARELLI, C., PANETTIERI, R. A. & FODA, H. D. 2005. Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells: role of EMMPRIN and MMPs. *FASEB J*, 19, 1507-9.
- HATHERLEY, D., GRAHAM, S. C., TURNER, J., HARLOS, K., STUART, D. I. & BARCLAY, A. N. 2008. Paired receptor specificity explained by structures of

- signal regulatory proteins alone and complexed with CD47. *Mol Cell*, 31, 266-77.
- HATSELL, S. & COWIN, P. 2001. Deconstructing desmoplakin. *Nat Cell Biol*, 3, E270-2.
- HERREN, B., LEVKAU, B., RAINES, E. W. & ROSS, R. 1998. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell*, 9, 1589-601.
- HERRENKNECHT, K., OZAWA, M., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F., LENTER, M. & KEMLER, R. 1991. The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9156-60.
- HICKSON, G. R., MATHESON, J., RIGGS, B., MAIER, V. H., FIELDING, A. B., PREKERIS, R., SULLIVAN, W., BARR, F. A. & GOULD, G. W. 2003. Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout. *Mol Biol Cell*, 14, 2908-20.
- HOELZLE, M. K. & SVITKINA, T. 2012. The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 23, 310-23.
- HORI, K., KATAYAMA, N., KACHI, S., KONDO, M., KADOMATSU, K., USUKURA, J., MURAMATSU, T., MORI, S. & MIYAKE, Y. 2000. Retinal dysfunction in basigin deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 3128-33.
- HUBER, A. H. & WEIS, W. I. 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*, 105, 391-402.
- HUDRY-CLERGEON, H., STENGEL, D., NINIO, E. & VILGRAIN, I. 2005. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J*, 19, 512-20.
- HUVENEERS, S., OLDENBURG, J., SPANJAARD, E., VAN DER KROGT, G., GRIGORIEV, I., AKHMANOVA, A., REHMANN, H. & DE ROOIJ, J. 2012. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J Cell Biol*, 196, 641-52.
- IACONO, K. T., BROWN, A. L., GREENE, M. I. & SAOUAF, S. J. 2007. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*, 83, 283-95.
- IGAKURA, T., KADOMATSU, K., KANAME, T., MURAMATSU, H., FAN, Q. W., MIYAUCHI, T., TOYAMA, Y., KUNO, N., YUASA, S., TAKAHASHI, M., SENDA,

- T., TAGUCHI, O., YAMAMURA, K., ARIMURA, K. & MURAMATSU, T. 1998. A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol*, 194, 152-65.
- IGAKURA, T., KADOMATSU, K., TAGUCHI, O., MURAMATSU, H., KANAME, T., MIYAUCHI, T., YAMAMURA, K., ARIMURA, K. & MURAMATSU, T. 1996. Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 224, 33-6.
- ILAN, N., CHEUNG, L., PINTER, E. & MADRI, J. A. 2000. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*, 275, 21435-43.
- IVANOV, D., PHILIPPOVA, M., ANTROPOVA, J., GUBAEVA, F., ILJINSKAYA, O., TARARAK, E., BOCHKOV, V., ERNE, P., RESINK, T. & TKACHUK, V. 2001. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol*, 115, 231-42.
- JACOBSON, J. R. & GARCIA, J. G. 2007. Novel therapies for microvascular permeability in sepsis. *Curr Drug Targets*, 8, 509-14.
- JAMAL, B. T., NITA-LAZAR, M., GAO, Z., AMIN, B., WALKER, J. & KUKURUZINSKA, M. A. 2009. N-glycosylation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct beta-catenin- and gamma-catenin-containing AJs. *Cell Health Cytoskeleton*, 2009, 67-80.
- JANSSEN, M. E., KIM, E., LIU, H., FUJIMOTO, L. M., BOBKOV, A., VOLKMANN, N. & HANEIN, D. 2006. Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Mol Cell*, 21, 271-81.
- JIA, J., WANG, C., SHI, Z., ZHAO, J., JIA, Y., ZHAO-HUI, Z., LI, X., CHEN, Z. & ZHU, P. 2009. Inhibitory effect of CD147/HAb18 monoclonal antibody on cartilage erosion and synovitis in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 48, 721-6.
- JIA, L., ZHOU, H., WANG, S., CAO, J., WEI, W. & ZHANG, J. 2006. Deglycosylation of CD147 down-regulates Matrix Metalloproteinase-11 expression and the adhesive capability of murine hepatocarcinoma cell HcaF in vitro. *IUBMB Life*, 58, 209-16.
- JOHANNES, L. & WUNDER, C. 2011. Retrograde transport: two (or more) roads diverged in an endosomal tree? *Traffic*, 12, 956-62.

- JORGENSEN, K. A., KOEFOED-NIELSEN, P. B. & KARAMPERIS, N. 2003. Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand J Immunol*, 57, 93-8.
- JUNG, E. J., LEE, J. H., MIN, B. W., KIM, Y. S. & CHOI, J. S. 2011. Clinicopathologic significance of fascin, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and ezrin expressions in colorectal adenocarcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*, 54, 32-6.
- KANEKURA, T., CHEN, X. & KANZAKI, T. 2002. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer*, 99, 520-8.
- KANEKURA, T., MIYAUCHI, T., TASHIRO, M. & MURAMATSU, T. 1991. Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct Funct*, 16, 23-30.
- KASINRERK, W., FIEBIGER, E., STEFANOVA, I., BAUMRUKER, T., KNAPP, W. & STOCKINGER, H. 1992. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol*, 149, 847-54.
- KASINRERK, W., TOKRASINWIT, N. & PHUNPAE, P. 1999. CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunology*, 96, 184-92.
- KATO, N., YUZAWA, Y., KOSUGI, T., HOB0, A., SATO, W., MIWA, Y., SAKAMOTO, K., MATSUO, S. & KADOMATSU, K. 2009. The E-selectin ligand basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1565-76.
- KIM, K. M., CSORTOS, C., CZIKORA, I., FULTON, D., UMAPATHY, N. S., OLAH, G. & VERIN, A. D. 2012. Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium. *J Cell Physiol*, 227, 1701-8.
- KIMURA, K., ITO, M., AMANO, M., CHIHARA, K., FUKATA, Y., NAKAFUKU, M., YAMAMORI, B., FENG, J., NAKANO, T., OKAWA, K., IWAMATSU, A. & KAIBUCHI, K. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273, 245-8.
- KIRK, P., WILSON, M. C., HEDDLE, C., BROWN, M. H., BARCLAY, A. N. & HALESTRAP, A. P. 2000. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J*, 19, 3896-904.

- KNUDSEN, K. A., SOLER, A. P., JOHNSON, K. R. & WHEELLOCK, M. J. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol*, 130, 67-77.
- KOBIELAK, A. & FUCHS, E. 2004. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 614-25.
- KOBIELAK, A., PASOLLI, H. A. & FUCHS, E. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol*, 6, 21-30.
- KOCH, C., STAFFLER, G., HUTTINGER, R., HILGERT, I., PRAGER, E., CERNY, J., STEINLEIN, P., MAJDIC, O., HOREJSI, V. & STOCKINGER, H. 1999. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int Immunol*, 11, 777-86.
- KOFRON, M., HEASMAN, J., LANG, S. A. & WYLIE, C. C. 2002. Plakoglobin is required for maintenance of the cortical actin skeleton in early *Xenopus* embryos and for cdc42-mediated wound healing. *J Cell Biol*, 158, 695-708.
- KOMANDER, D., GARG, R., WAN, P. T., RIDLEY, A. J. & BARFORD, D. 2008. Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure. *EMBO J*, 27, 3175-85.
- KOOISTRA, M. R., DUBE, N. & BOS, J. L. 2007. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci*, 120, 17-22.
- KOUKLIS, P., KONSTANTOULAKI, M. & MALIK, A. B. 2003. VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *J Biol Chem*, 278, 16230-6.
- KOVAR, D. R. 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 11-7.
- KRAUSE, M., DENT, E. W., BEAR, J. E., LOUREIRO, J. J. & GERTLER, F. B. 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 541-64.
- LAMBERT, M., CHOQUET, D. & MEGE, R. M. 2002. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, 157, 469-79.
- LAMPUGNANI, M. G. & DEJANA, E. 2007. Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis. *Thromb Res*, 120 Suppl 2, S1-6.

- LAMPUGNANI, M. G., ORSENIGO, F., GAGLIANI, M. C., TACCHETTI, C. & DEJANA, E. 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol*, 174, 593-604.
- LAMPUGNANI, M. G., RESNATI, M., DEJANA, E. & MARCHISIO, P. C. 1991. The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity. *J Cell Biol*, 112, 479-90.
- LAMPUGNANI, M. G., RESNATI, M., RAITERI, M., PIGOTT, R., PISACANE, A., HOUEN, G., RUCO, L. P. & DEJANA, E. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 118, 1511-22.
- LARJAVA, H., PELTONEN, J., AKIYAMA, S. K., YAMADA, S. S., GRALNICK, H. R., UITTO, J. & YAMADA, K. M. 1990. Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *J Cell Biol*, 110, 803-15.
- LEE, J. S. & GOTLIEB, A. I. 2002. Microtubule-actin interactions may regulate endothelial integrity and repair. *Cardiovasc Pathol*, 11, 135-40.
- LEE, J. S. & GOTLIEB, A. I. 2003. Understanding the role of the cytoskeleton in the complex regulation of the endothelial repair. *Histol Histopathol*, 18, 879-87.
- LEE, M. J., THANGADA, S., CLAFFEY, K. P., ANCELLIN, N., LIU, C. H., KLUK, M., VOLPI, M., SHA'AFI, R. I. & HLA, T. 1999. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*, 99, 301-12.
- LI, R., HUANG, L., GUO, H. & TOOLE, B. P. 2001. Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J Cell Physiol*, 186, 371-9.
- LILIEN, J. & BALSAMO, J. 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 459-65.
- LIM, M., MARTINEZ, T., JABLONS, D., CAMERON, R., GUO, H., TOOLE, B., LI, J. D. & BASBAUM, C. 1998. Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Lett*, 441, 88-92.
- LIM, M. J., CHIANG, E. T., HECHTMAN, H. B. & SHEPRO, D. 2001. Inflammation-induced subcellular redistribution of VE-cadherin, actin, and gamma-catenin in cultured human lung microvessel endothelial cells. *Microvasc Res*, 62, 366-82.
- LIU, Z., TAN, J. L., COHEN, D. M., YANG, M. T., SNIADOCKI, N. J., RUIZ, S. A., NELSON, C. M. & CHEN, C. S. 2010. Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 9944-9.

- LOCK, J. G. & STOW, J. L. 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell*, 16, 1744-55.
- LUO, J., TEPLYAKOV, A., OBMOLOVA, G., MALIA, T., WU, S. J., BEIL, E., BAKER, A., SWENCKI-UNDERWOOD, B., ZHAO, Y., SPRENKLE, J., DIXON, K., SWEET, R. & GILLILAND, G. L. 2009. Structure of the EMMPRIN N-terminal domain 1: dimerization via beta-strand swapping. *Proteins*, 77, 1009-14.
- LUPLERTLOP, N., MISSE, D., BRAY, D., DELEUZE, V., GONZALEZ, J. P., LEARDKAMOLKARN, V., YSSEL, H. & VEAS, F. 2006. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep*, 7, 1176-81.
- MA, X. K., WANG, L., LI, Y., YANG, X. M., ZHAO, P., TANG, H., ZHU, P., LI, L. & CHEN, Z. N. 2010. HAb18G/CD147 cell-cell contacts confer resistance of a HEK293 subpopulation to anoikis in an E-cadherin-dependent manner. *BMC Cell Biol*, 11, 27.
- MAMDOUH, Z., CHEN, X., PIERINI, L. M., MAXFIELD, F. R. & MULLER, W. A. 2003. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*, 421, 748-53.
- MATTILA, P. K. & LAPPALAINEN, P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 446-54.
- MCALLISTER, K. A., GROGG, K. M., JOHNSON, D. W., GALLIONE, C. J., BALDWIN, M. A., JACKSON, C. E., HELMBOLD, E. A., MARKEL, D. S., MCKINNON, W. C., MURRELL, J. & ET AL. 1994. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*, 8, 345-51.
- MEGE, R. M., GAVARD, J. & LAMBERT, M. 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 541-8.
- MEHTA, D. & MALIK, A. B. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 86, 279-367.
- MILLAN, J., CAIN, R. J., REGLERO-REAL, N., BIGARELLA, C., MARCOS-RAMIRO, B., FERNANDEZ-MARTIN, L., CORREAS, I. & RIDLEY, A. J. 2010. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol*, 8, 11.
- MILLIMAGGI, D., MARI, M., D'ASCENZO, S., CAROSA, E., JANNINI, E. A., ZUCKER, S., CARTA, G., PAVAN, A. & DOLO, V. 2007. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia*, 9, 349-57.

- MIRAVET, S., PIEDRA, J., MIRO, F., ITARTE, E., GARCIA DE HERREROS, A. & DUNACH, M. 2002. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *J Biol Chem*, 277, 1884-91.
- MIYAMOTO, Y. J., MITCHELL, J. S. & MCINTYRE, B. W. 2003. Physical association and functional interaction between beta1 integrin and CD98 on human T lymphocytes. *Mol Immunol*, 39, 739-51.
- MIYAUCHI, T., JIMMA, F., IGAKURA, T., YU, S., OZAWA, M. & MURAMATSU, T. 1995. Structure of the mouse basigin gene, a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Biochem*, 118, 717-24.
- MIYAUCHI, T., KANEKURA, T., YAMAOKA, A., OZAWA, M., MIYAZAWA, S. & MURAMATSU, T. 1990. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem*, 107, 316-23.
- MIYAUCHI, T., MASUZAWA, Y. & MURAMATSU, T. 1991. The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. *J Biochem*, 110, 770-4.
- MORITA, K., MIYACHI, Y. & FURUSE, M. 2011. Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol*, 21, 12-7.
- MOY, A. B., BLACKWELL, K., WANG, N., HAXHINASTO, K., KASISKE, M. K., BODMER, J., REYES, G. & ENGLISH, A. 2004. Phorbol ester-mediated pulmonary artery endothelial barrier dysfunction through regulation of actin cytoskeletal mechanics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, L153-67.
- MURAKAMI, M., NGUYEN, L. T., ZHUANG, Z. W., MOODIE, K. L., CARMELIET, P., STAN, R. V. & SIMONS, M. 2008. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest*, 118, 3355-66.
- MURAMATSU, T. & MIYAUCHI, T. 2003. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol*, 18, 981-7.
- MURAOKA, K., NABESHIMA, K., MURAYAMA, T., BISWAS, C. & KOONO, M. 1993. Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *Int J Cancer*, 55, 19-26.
- NABESHIMA, K., IWASAKI, H., KOGA, K., HOJO, H., SUZUMIYA, J. & KIKUCHI, M. 2006a. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and

- multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int*, 56, 359-67.
- NABESHIMA, K., IWASAKI, H., NISHIO, J., KOGA, K., SHISHIME, M. & KIKUCHI, M. 2006b. Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors: emmprin and membrane-type (MT)1-MMP expressions are associated with malignant potential. *Anticancer Res*, 26, 1359-67.
- NARUHASHI, K., KADOMATSU, K., IGAKURA, T., FAN, Q. W., KUNO, N., MURAMATSU, H., MIYAUCHI, T., HASEGAWA, T., ITOH, A., MURAMATSU, T. & NABESHIMA, T. 1997. Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 733-7.
- NASDALA, I., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., WOLBURG, H., KUHN, A., EBNET, K., BRACHTENDORF, G., SAMULOWITZ, U., KUSTER, B., ENGELHARDT, B., VESTWEBER, D. & BUTZ, S. 2002. A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem*, 277, 16294-303.
- NAVARRO, P., RUCO, L. & DEJANA, E. 1998. Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol*, 140, 1475-84.
- NAWROTH, R., POELL, G., RANFT, A., KLOEP, S., SAMULOWITZ, U., FACHINGER, G., GOLDING, M., SHIMA, D. T., DEUTSCH, U. & VESTWEBER, D. 2002. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J*, 21, 4885-95.
- NEHME, C. L., FAYOS, B. E. & BARTLES, J. R. 1995. Distribution of the integral plasma membrane glycoprotein CE9 (MRC OX-47) among rat tissues and its induction by diverse stimuli of metabolic activation. *Biochem J*, 310 (Pt 2), 693-8.
- NEWMAN, P. J. 1997. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*, 100, S25-9.
- NIESET, J. E., REDFIELD, A. R., JIN, F., KNUDSEN, K. A., JOHNSON, K. R. & WHEELLOCK, M. J. 1997. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci*, 110 (Pt 8), 1013-22.
- NIESSEN, C. M. & GOTTARDI, C. J. 2008. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 562-71.
- NISHIMURA, N. & SASAKI, T. 2009. Rab family small G proteins in regulation of epithelial apical junctions. *Front Biosci*, 14, 2115-29.

- NITA-LAZAR, M., REBUSTINI, I., WALKER, J. & KUKURUZINSKA, M. A. 2010. Hypoglycosylated E-cadherin promotes the assembly of tight junctions through the recruitment of PP2A to adherens junctions. *Exp Cell Res*, 316, 1871-84.
- NITTA, T., HATA, M., GOTOH, S., SEO, Y., SASAKI, H., HASHIMOTO, N., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161, 653-60.
- NOGUCHI, Y., SATO, T., HIRATA, M., HARA, T., OHAMA, K. & ITO, A. 2003. Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 6063-72.
- NOTTEBAUM, A. F., CAGNA, G., WINDERLICH, M., GAMP, A. C., LINNEPE, R., POLASCHEGG, C., FILIPPOVA, K., LYCK, R., ENGELHARDT, B., KAMENYEVA, O., BIXEL, M. G., BUTZ, S. & VESTWEBER, D. 2008. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med*, 205, 2929-45.
- OBLANDER, S. A., ZHOU, Z., GALVEZ, B. G., STARCHER, B., SHANNON, J. M., DURBEEJ, M., ARROYO, A. G., TRYGGVASON, K. & APTE, S. S. 2005. Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev Biol*, 277, 255-69.
- OCHRIETOR, J. D., MOROZ, T. P., CLAMP, M. F., TIMMERS, A. M., MURAMATSU, T. & LINSER, P. J. 2002. Inactivation of the Basigin gene impairs normal retinal development and maturation. *Vision Res*, 42, 447-53.
- OCHRIETOR, J. D., MOROZ, T. P., VAN EKERIS, L., CLAMP, M. F., JEFFERSON, S. C., DECARVALHO, A. C., FADOOL, J. M., WISTOW, G., MURAMATSU, T. & LINSER, P. J. 2003. Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 4086-96.
- ORLOVA, V. V., ECONOMOPOULOU, M., LUPU, F., SANTOSO, S. & CHAVAKIS, T. 2006. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *J Exp Med*, 203, 2703-14.
- ORR, A. W., STOCKTON, R., SIMMERS, M. B., SANDERS, J. M., SAREMBOCK, I. J., BLACKMAN, B. R. & SCHWARTZ, M. A. 2007. Matrix-specific p21-activated kinase activation regulates vascular permeability in atherogenesis. *J Cell Biol*, 176, 719-27.
- PAKULA, R., MELCHIOR, A., DENYS, A., VANPOUILLE, C., MAZURIER, J. & ALLAIN, F. 2007. Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-

- induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology*, 17, 492-503.
- PALOVUORI, R. & ESKELINEN, S. 2000. Role of vinculin in the maintenance of cell-cell contacts in kidney epithelial MDBK cells. *Eur J Cell Biol*, 79, 961-74.
- PATEL, S. D., CHEN, C. P., BAHNA, F., HONIG, B. & SHAPIRO, L. 2003. Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol*, 13, 690-8.
- PATTERSON, C. E. & LUM, H. 2001. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium*, 8, 75-105.
- PFEFFER, S. 2003. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell*, 112, 507-17.
- PHILP, N. J., OCHRIETOR, J. D., RUDOY, C., MURAMATSU, T. & LINSER, P. J. 2003. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1305-11.
- PHILLIPS, P. G., LUM, H., MALIK, A. B. & TSAN, M. F. 1989. Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin. *Am J Physiol*, 257, C562-7.
- PIALI, L., HAMMEL, P., UHEREK, C., BACHMANN, F., GISLER, R. H., DUNON, D. & IMHOF, B. A. 1995. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol*, 130, 451-60.
- PINNER, S. & SAHAI, E. 2008. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol*, 10, 127-37.
- PISTOL, G., MATACHE, C., CALUGARU, A., STAVARU, C., TANASEANU, S., IONESCU, R., DUMITRACHE, S. & STEFANESCU, M. 2007. Roles of CD147 on T lymphocytes activation and MMP-9 secretion in systemic lupus erythematosus. *J Cell Mol Med*, 11, 339-48.
- POLETTE, M., GILLES, C., MARCHAND, V., LORENZATO, M., TOOLE, B., TOURNIER, J. M., ZUCKER, S. & BIREMBAUT, P. 1997. Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *J Histochem Cytochem*, 45, 703-9.
- PRASAIN, N. & STEVENS, T. 2009. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res*, 77, 53-63.
- PUSHKARSKY, T., YURCHENKO, V., LABORICO, A. & BUKRINSKY, M. 2007. CD147 stimulates HIV-1 infection in a signal-independent fashion. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 495-9.

- PUSHKARSKY, T., YURCHENKO, V., VANPOUILLE, C., BRICHACEK, B., VAISMAN, I., HATAKEYAMA, S., NAKAYAMA, K. I., SHERRY, B. & BUKRINSKY, M. I. 2005. Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60. *J Biol Chem*, 280, 27866-71.
- PUSHKARSKY, T., ZYBARTH, G., DUBROVSKY, L., YURCHENKO, V., TANG, H., GUO, H., TOOLE, B., SHERRY, B. & BUKRINSKY, M. 2001. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6360-5.
- REED, B. H., WILK, R., SCHOCK, F. & LIPSHITZ, H. D. 2004. Integrin-dependent apposition of *Drosophila* extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis. *Curr Biol*, 14, 372-80.
- RENNO, T., WILSON, A., DUNKEL, C., COSTE, I., MAISNIER-PATIN, K., BENOIT DE COIGNAC, A., AUBRY, J. P., LEES, R. K., BONNEFOY, J. Y., MACDONALD, H. R. & GAUCHAT, J. F. 2002. A role for CD147 in thymic development. *J Immunol*, 168, 4946-50.
- REVENU, C., ATHMAN, R., ROBINE, S. & LOUVARD, D. 2004. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 635-46.
- RIDLEY, A. J. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*, 16, 522-9.
- RIENTO, K., GUASCH, R. M., GARG, R., JIN, B. & RIDLEY, A. J. 2003. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*, 23, 4219-29.
- RISAU, W., HALLMANN, R. & ALBRECHT, U. 1986. Differentiation-dependent expression of proteins in brain endothelium during development of the blood-brain barrier. *Dev Biol*, 117, 537-45.
- RUBIN, L. L. 1992. Endothelial cells: adhesion and tight junctions. *Curr Opin Cell Biol*, 4, 830-3.
- RUIZ, S., CASTRO-CASTRO, A. & BUSTELO, X. R. 2008. CD147 inhibits the nuclear factor of activated T-cells by impairing Vav1 and Rac1 downstream signaling. *J Biol Chem*, 283, 5554-66.
- SAHAI, E. & MARSHALL, C. J. 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol*, 4, 408-15.
- SAMESHIMA, T., NABESHIMA, K., TOOLE, B. P., YOKOGAMI, K., OKADA, Y., GOYA, T., KOONO, M. & WAKISAKA, S. 2000. Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int J Cancer*, 88, 21-7.
- SATO, T., MUSHIAKE, S., KATO, Y., SATO, K., SATO, M., TAKEDA, N., OZONO, K., MIKI, K., KUBO, Y., TSUJI, A., HARADA, R. & HARADA, A. 2007. The Rab8

- GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature*, 448, 366-9.
- SCOTT, J. A., SHEWAN, A. M., DEN ELZEN, N. R., LOUREIRO, J. J., GERTLER, F. B. & YAP, A. S. 2006. Ena/VASP proteins can regulate distinct modes of actin organization at cadherin-adhesive contacts. *Mol Biol Cell*, 17, 1085-95.
- SCHEIFFELE, P., VERKADE, P., FRA, A. M., VIRTA, H., SIMONS, K. & IKONEN, E. 1998. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol*, 140, 795-806.
- SCHLEGEL, J., REDZIC, J. S., PORTER, C. C., YURCHENKO, V., BUKRINSKY, M., LABEIKOVSKY, W., ARMSTRONG, G. S., ZHANG, F., ISERN, N. G., DEGREGORI, J., HODGES, R. & EISENMESSER, E. Z. 2009. Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A. *J Mol Biol*, 391, 518-35.
- SCHLOSSHAUER, B. & HERZOG, K. H. 1990. Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons. *J Cell Biol*, 110, 1261-74.
- SCHMELZ, M. & FRANKE, W. W. 1993. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur J Cell Biol*, 61, 274-89.
- SCHMELZ, M., MOLL, R., KUHN, C. & FRANKE, W. W. 1994. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels. *Differentiation*, 57, 97-117.
- SCHMIDT, R., BULTMANN, A., FISCHER, S., GILLITZER, A., CULLEN, P., WALCH, A., JOST, P., UNGERER, M., TOLLEY, N. D., LINDEMANN, S., GAWAZ, M., SCHOMIG, A. & MAY, A. E. 2008. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes. *Circ Res*, 102, 302-9.
- SCHNITTLER, H. J., PUSCHEL, B. & DRENCKHAHN, D. 1997. Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress. *Am J Physiol*, 273, H2396-405.
- SCHREINER, A., RUONALA, M., JAKOB, V., SUTHAUS, J., BOLES, E., WOUTERS, F. & STARZINSKI-POWITZ, A. 2007. Junction protein shrew-1 influences cell invasion and interacts with invasion-promoting protein CD147. *Mol Biol Cell*, 18, 1272-81.
- SCHULZ, C., VON BRUHL, M. L., BAROCKE, V., CULLEN, P., MAYER, K., OKROJEK, R., STEINHART, A., AHMAD, Z., KREMMER, E., NIESWANDT, B.,

- FRAMPTON, J., MASSBERG, S. & SCHMIDT, R. 2011. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J Thromb Haemost*, 9, 1007-19.
- SEBBAGH, M., HAMELIN, J., BERTOGLIO, J., SOLARY, E. & BREARD, J. 2005. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med*, 201, 465-71.
- SEBBAGH, M., RENVOIZE, C., HAMELIN, J., RICHE, N., BERTOGLIO, J. & BREARD, J. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, 3, 346-52.
- SEIZER, P., BORST, O., LANGER, H. F., BULTMANN, A., MUNCH, G., HEROUY, Y., STELLOS, K., KRAMER, B., BIGALKE, B., BUCHELE, B., BACHEM, M. G., VESTWEBER, D., SIMMET, T., GAWAZ, M. & MAY, A. E. 2009. EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thromb Haemost*, 101, 682-6.
- SENGER, D. R. & DAVIS, G. E. 2011. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, a005090.
- SEULBERGER, H., LOTTSPREICH, F. & RISAU, W. 1990. The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *EMBO J*, 9, 2151-8.
- SHACKEL, N. A., MCGUINNESS, P. H., ABBOTT, C. A., GORRELL, M. D. & MCCAUGHAN, G. W. 2002. Insights into the pathobiology of hepatitis C virus-associated cirrhosis: analysis of intrahepatic differential gene expression. *Am J Pathol*, 160, 641-54.
- SHASBY, D. M., SHASBY, S. S., SULLIVAN, J. M. & PEACH, M. J. 1982. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ Res*, 51, 657-61.
- SHASBY, D. M., STEVENS, T., RIES, D., MOY, A. B., KAMATH, J. M., KAMATH, A. M. & SHASBY, S. S. 1997. Thrombin inhibits myosin light chain dephosphorylation in endothelial cells. *Am J Physiol*, 272, L311-9.
- SHEIBANI, N., SORENSON, C. M. & FRAZIER, W. A. 2000. Differential modulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by platelet endothelial cell adhesion molecule-1 isoforms through activation of extracellular regulated kinases. *Mol Biol Cell*, 11, 2793-802.
- SHEWAN, A. M., MADDUGODA, M., KRAEMER, A., STEHBENS, S. J., VERMA, S., KOVACS, E. M. & YAP, A. S. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*, 16, 4531-42.

- SHIKATA, Y., BIRUKOV, K. G., BIRUKOVA, A. A., VERIN, A. & GARCIA, J. G. 2003. Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate- and thrombin-induced focal adhesion remodeling: role of Src and GIT. *FASEB J*, 17, 2240-9.
- SHIRAISHI, S., YOKOO, H., KOBAYASHI, H., YANAGITA, T., UEZONO, Y., MINAMI, S., TAKASAKI, M. & WADA, A. 2000. Post-translational reduction of cell surface expression of insulin receptors by cyclosporin A, FK506 and rapamycin in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett*, 293, 211-5.
- SIMIONESCU, M. 2001. Cellular components of the air-blood barrier. *J Cell Mol Med*, 5, 320-1.
- SIMIONESCU, M., SIMIONESCU, N. & PALADE, G. E. 1975. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol*, 67, 863-85.
- SIWIK, D. A., KUSTER, G. M., BRAHMBHATT, J. V., ZAIDI, Z., MALIK, J., OOI, H. & GHORAYEB, G. 2008. EMMPRIN mediates beta-adrenergic receptor-stimulated matrix metalloproteinase activity in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 44, 210-7.
- SPINALE, F. G., COKER, M. L., HEUNG, L. J., BOND, B. R., GUNASINGHE, H. R., ETOH, T., GOLDBERG, A. T., ZELLNER, J. L. & CRUMBLEY, A. J. 2000. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*, 102, 1944-9.
- STEVENSON, B. R., SILICIANO, J. D., MOOSEKER, M. S. & GOODENOUGH, D. A. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103, 755-66.
- STONEHOUSE, T. J., WOODHEAD, V. E., HERRIDGE, P. S., ASHRAFIAN, H., GEORGE, M., CHAIN, B. M. & KATZ, D. R. 1999. Molecular characterization of U937-dependent T-cell co-stimulation. *Immunology*, 96, 35-47.
- SUN, J. & HEMLER, M. E. 2001. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*, 61, 2276-81.
- TADDEI, A., GIAMPIETRO, C., CONTI, A., ORSENIGO, F., BREVIARIO, F., PIRAZZOLI, V., POTENTE, M., DALY, C., DIMMELER, S. & DEJANA, E. 2008. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol*, 10, 923-34.

- TAI, A. W., CHUANG, J. Z., BODE, C., WOLFRUM, U. & SUNG, C. H. 1999. Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell*, 97, 877-87.
- TAKAHASHI, T., TAKAHASHI, K., MERNAUGH, R., DROZDOFF, V., SIPE, C., SCHOECKLMANN, H., ROBERT, B., ABRAHAMSON, D. R. & DANIEL, T. O. 1999. Endothelial localization of receptor tyrosine phosphatase, ECRT/DEP-1, in developing and mature renal vasculature. *J Am Soc Nephrol*, 10, 2135-45.
- TAKAI, Y., IKEDA, W., OGITA, H. & RIKITAKE, Y. 2008. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 309-42.
- TAKAI, Y., SASAKI, T. & MATOZAKI, T. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81, 153-208.
- TANG, J., WU, Y. M., ZHAO, P., YANG, X. M., JIANG, J. L. & CHEN, Z. N. 2008. Overexpression of HAb18G/CD147 promotes invasion and metastasis via alpha3beta1 integrin mediated FAK-paxillin and FAK-PI3K-Ca²⁺ pathways. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2933-42.
- TANG, W., CHANG, S. B. & HEMLER, M. E. 2004a. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell*, 15, 4043-50.
- TANG, W. & HEMLER, M. E. 2004. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem*, 279, 11112-8.
- TANG, Y., KESAVAN, P., NAKADA, M. T. & YAN, L. 2004b. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Mol Cancer Res*, 2, 73-80.
- TANG, Y., NAKADA, M. T., KESAVAN, P., MCCABE, F., MILLAR, H., RAFFERTY, P., BUGELSKI, P. & YAN, L. 2005. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res*, 65, 3193-9.
- TANG, Y., NAKADA, M. T., RAFFERTY, P., LARAIO, J., MCCABE, F. L., MILLAR, H., CUNNINGHAM, M., SNYDER, L. A., BUGELSKI, P. & YAN, L. 2006. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Cancer Res*, 4, 371-7.
- TAO, Y. S., EDWARDS, R. A., TUBB, B., WANG, S., BRYAN, J. & MCCREA, P. D. 1996. beta-Catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a noncadherin complex. *J Cell Biol*, 134, 1271-81.

- TAYLOR, P. M., WOODFIELD, R. J., HODGKIN, M. N., PETTITT, T. R., MARTIN, A., KERR, D. J. & WAKELAM, M. J. 2002. Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. *Oncogene*, 21, 5765-72.
- TELO, P., BREVIARIO, F., HUBER, P., PANZERI, C. & DEJANA, E. 1998. Identification of a novel cadherin (vascular endothelial cadherin-2) located at intercellular junctions in endothelial cells. *J Biol Chem*, 273, 17565-72.
- THOMPSON, R. D., NOBLE, K. E., LARBI, K. Y., DEWAR, A., DUNCAN, G. S., MAK, T. W. & NOURSHARGH, S. 2001. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *Blood*, 97, 1854-60.
- TINSLEY, J. H., DE LANEROLLE, P., WILSON, E., MA, W. & YUAN, S. Y. 2000. Myosin light chain kinase transference induces myosin light chain activation and endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C1285-9.
- TODOROVIC, V., DESAI, B. V., PATTERSON, M. J., AMARGO, E. V., DUBASH, A. D., YIN, T., JONES, J. C. & GREEN, K. J. 2010. Plakoglobin regulates cell motility through Rho- and fibronectin-dependent Src signaling. *J Cell Sci*, 123, 3576-86.
- TOJKANDER, S., GATEVA, G., SCHEVZOV, G., HOTULAINEN, P., NAUMANEN, P., MARTIN, C., GUNNING, P. W. & LAPPALAINEN, P. 2011. A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers. *Curr Biol*, 21, 539-50.
- TSAI, W. C., CHAO, Y. C., SHEU, L. F., LIN, Y. F., NIEH, S., CHEN, A., YU, C. P. & JIN, J. S. 2007a. EMMPRIN and fascin overexpression associated with clinicopathologic parameters of pancreatobiliary adenocarcinoma in Chinese people. *APMIS*, 115, 929-38.
- TSAI, W. C., SHEU, L. F., NIEH, S., YU, C. P., SUN, G. H., LIN, Y. F., CHEN, A. & JIN, J. S. 2007b. Association of EMMPRIN and fascin expression in renal cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *World J Urol*, 25, 73-80.
- TSURUDOME, M. & ITO, Y. 2000. Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells. *Crit Rev Immunol*, 20, 167-96.
- TZIMA, E., IRANI-TEHRANI, M., KIOSSES, W. B., DEJANA, E., SCHULTZ, D. A., ENGELHARDT, B., CAO, G., DELISSER, H. & SCHWARTZ, M. A. 2005. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437, 426-31.

- VASIOUKHIN, V., BAUER, C., YIN, M. & FUCHS, E. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, 100, 209-19.
- VENKATESAN, B., VALENTE, A. J., PRABHU, S. D., SHANMUGAM, P., DELAFONTAINE, P. & CHANDRASEKAR, B. 2010. EMMPRIN activates multiple transcription factors in cardiomyocytes, and induces interleukin-18 expression via Rac1-dependent PI3K/Akt/IKK/NF-kappaB andMKK7/JNK/AP-1 signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 655-63.
- VERIN, A. D., GILBERT-MCCLAIN, L. I., PATTERSON, C. E. & GARCIA, J. G. 1998. Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19, 767-76.
- VESTWEBER, D., WINDERLICH, M., CAGNA, G. & NOTTEBAUM, A. F. 2009. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol*, 19, 8-15.
- VICENTE-MANZANARES, M., MA, X., ADELSTEIN, R. S. & HORWITZ, A. R. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 778-90.
- VLEMINCKX, K. & KEMLER, R. 1999. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, 21, 211-20.
- WALDOW, T., WITT, W., BUZIN, A., ULMER, A. & MATSCHKE, K. 2009. Prevention of ischemia/reperfusion-induced accumulation of matrix metalloproteinases in rat lung by preconditioning with nitric oxide. *J Surg Res*, 152, 198-208.
- WALKER, J. L., MENKO, A. S., KHALIL, S., REBUSTINI, I., HOFFMAN, M. P., KREIDBERG, J. A. & KUKURUZINSKA, M. A. 2008. Diverse roles of E-cadherin in the morphogenesis of the submandibular gland: insights into the formation of acinar and ductal structures. *Dev Dyn*, 237, 3128-41.
- WALLEZ, Y. & HUBER, P. 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 794-809.
- WARD, Y., YAP, S. F., RAVICHANDRAN, V., MATSUMURA, F., ITO, M., SPINELLI, B. & KELLY, K. 2002. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol*, 157, 291-302.
- WATABE-UCHIDA, M., UCHIDA, N., IMAMURA, Y., NAGAFUCHI, A., FUJIMOTO, K., UEMURA, T., VERMEULEN, S., VAN ROY, F., ADAMSON, E. D. & TAKEICHI, M. 1998. alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol*, 142, 847-57.

- WEHRLE-HALLER, B. & IMHOF, B. A. 2001. Stem cell factor presentation to c-Kit. Identification of a basolateral targeting domain. *J Biol Chem*, 276, 12667-74.
- WEN, K. K., RUBENSTEIN, P. A. & DEMALI, K. A. 2009. Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure. *J Biol Chem*, 284, 30463-73.
- WENNERBERG, K., ROSSMAN, K. L. & DER, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 118, 843-6.
- WILSON, M. C., MEREDITH, D. & HALESTRAP, A. P. 2002. Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex in situ. *J Biol Chem*, 277, 3666-72.
- WOJCIAK-STOTHARD, B. & RIDLEY, A. J. 2002. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 39, 187-99.
- WOODHEAD, V. E., STONEHOUSE, T. J., BINKS, M. H., SPEIDEL, K., FOX, D. A., GAYA, A., HARDIE, D., HENNIKER, A. J., HOREJSI, V., SAGAWA, K., SKUBITZ, K. M., TASKOV, H., TODD, R. F., 3RD, VAN AGTHOVEN, A., KATZ, D. R. & CHAIN, B. M. 2000. Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *Int Immunol*, 12, 1051-61.
- WU, Y., JIN, X., HARRISON, O., SHAPIRO, L., HONIG, B. H. & BEN-SHAUL, A. 2010. Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 17592-7.
- XIAO, K., GARNER, J., BUCKLEY, K. M., VINCENT, P. A., CHIASSON, C. M., DEJANA, E., FAUNDEZ, V. & KOWALCZYK, A. P. 2005. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell*, 16, 5141-51.
- XIAO, L. J., CHANG, H., DING, N. Z., NI, H., KADOMATSU, K. & YANG, Z. M. 2002. Basigin expression and hormonal regulation in mouse uterus during the peri-implantation period. *Mol Reprod Dev*, 63, 47-54.
- XU, D. & HEMLER, M. E. 2005. Metabolic activation-related CD147-CD98 complex. *Mol Cell Proteomics*, 4, 1061-71.
- YAMADA, S., POKUTTA, S., DREES, F., WEIS, W. I. & NELSON, W. J. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, 123, 889-901.
- YAMAMURA, R., NISHIMURA, N., NAKATSUJI, H., ARASE, S. & SASAKI, T. 2008. The interaction of JRAB/MICAL-L2 with Rab8 and Rab13 coordinates the assembly of tight junctions and adherens junctions. *Mol Biol Cell*, 19, 971-83.
- YANEZ-MO, M., ALFRANCA, A., CABANAS, C., MARAZUELA, M., TEJEDOR, R., URSA, M. A., ASHMAN, L. K., DE LANDAZURI, M. O. & SANCHEZ-MADRID,

- F. 1998. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol*, 141, 791-804.
- YANG, Y., LU, N., ZHOU, J., CHEN, Z. N. & ZHU, P. 2008. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 47, 1299-310.
- YOON, Y. W., KWON, H. M., HWANG, K. C., CHOI, E. Y., HONG, B. K., KIM, D., KIM, H. S., CHO, S. H., SONG, K. S. & SANGIORGI, G. 2005. Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRIN; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*, 180, 37-44.
- YU, X. L., HU, T., DU, J. M., DING, J. P., YANG, X. M., ZHANG, J., YANG, B., SHEN, X., ZHANG, Z., ZHONG, W. D., WEN, N., JIANG, H., ZHU, P. & CHEN, Z. N. 2008. Crystal structure of HAb18G/CD147: implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion. *J Biol Chem*, 283, 18056-65.
- YURCHENKO, V., CONSTANT, S., EISENMESSER, E. & BUKRINSKY, M. 2010. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol*, 160, 305-17.
- YURCHENKO, V., O'CONNOR, M., DAI, W. W., GUO, H., TOOLE, B., SHERRY, B. & BUKRINSKY, M. 2001. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 786-8.
- YURCHENKO, V., PUSHKARSKY, T., LI, J. H., DAI, W. W., SHERRY, B. & BUKRINSKY, M. 2005. Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain. *J Biol Chem*, 280, 17013-9.
- YURCHENKO, V., ZYBARTH, G., O'CONNOR, M., DAI, W. W., FRANCHIN, G., HAO, T., GUO, H., HUNG, H. C., TOOLE, B., GALLAY, P., SHERRY, B. & BUKRINSKY, M. 2002. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem*, 277, 22959-65.
- ZANET, J., JAYO, A., PLAZA, S., MILLARD, T., PARSONS, M. & STRAMER, B. 2012. Fascin promotes filopodia formation independent of its role in actin bundling. *J Cell Biol*, 197, 477-86.
- ZERIAL, M. & MCBRIDE, H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 107-17.

- ZHANG, X., CHEN, Z., HUANG, H., GORDON, J. R. & XIANG, J. 2002. DNA microarray analysis of the gene expression profiles of naive versus activated tumor-specific T cells. *Life Sci*, 71, 3005-17.
- ZHU, H., ZHAO, J., ZHU, B., COLLAZO, J., GAL, J., SHI, P., LIU, L., STROM, A. L., LU, X., MCCANN, R. O., TOBOREK, M. & KYPRIANOU, N. 2012. EMMPRIN regulates cytoskeleton reorganization and cell adhesion in prostate cancer. *Prostate*, 72, 72-81.