

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Bases moleculares que regulan la expresión de PECAM-1/CD31: caracterización estructural y funcional de su región promotora

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nuria Almendro Motos

Director

Carmelo Bernabéu Quirante

Madrid

© Nuria Almendro Motos, 1997

**BASES MOLECULARES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE
PECAM-1/CD31. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y
FUNCIONAL DE SU REGION PROMOTORA.**

Memoria presentada por
Nuria Almendro Motos
para optar al grado de doctor en Farmacia

Universidad Complutense de Madrid

1997

Director: Dr. Carmelo Bernabéu Quirante
Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.).



CARMELO BERNABEU QUIRANTE, INVESTIGADOR CIENTIFICO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS,

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "Bases moleculares que regulan la expresión de PECAM-1/CD31. Caracterización estructural y funcional de su región promotora", ha sido realizado por Doña Nuria Almendro Motos (DNI 50833515) bajo mi dirección, y cuenta con mi aprobación para su presentación en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para optar al Título de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Madrid a veinte de Febrero de mil novecientos noventa y siete.

Fdo.: Carmelo Bernabeu Quirante



A veces sentimos que lo que hacemos es tan sólo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara esa gota.

- Madre Teresa de Calcuta -

A mis padres y hermana.
A Fernando

Han sido tantas las personas que me han apoyado y ayudado a lo largo de todos estos años, tanto en el laboratorio como fuera de él, que seguramente será difícil nombrarlas a todas sin olvidar a nadie. Si este es el caso, espero se me perdone y no se sientan excesivamente desilusionados al leer esta parte.

Agradezco en primer lugar al Dr. Carmelo Bernabéu la oportunidad que me brindó hace ya algunos años al admitirme en su grupo. Mi más sincero agradecimiento por la confianza que siempre me demostró, por su amistad, paciencia y comprensión cuando las cosas no salían como esperábamos. Agradezco sus recomendaciones incondicionales así como el tiempo que ha dedicado en corregir esta tesis. Al Dr. Angel Corbí le estoy enormemente agradecida por atender mis dudas pacientemente durante estos años, por tener siempre 5 minutos disponibles para mí así como por su constante apoyo. Debo agradecerle también el que me ofreciera su laboratorio en el Hospital de la Princesa siempre que lo necesité. Igualmente quisiera agradecer el trato de igualdad y los innumerables consejos que allí recibí por parte de Arsenio, Domi, Angel Luis, Miguel “el pelos” y en especial de Cristina a quien tanto debo agradecerle por su valiosísima ayuda en los experimentos con c-Myc que se presentan en esta tesis. Por supuesto no puedo dejar de nombrar a la primera persona que me inició y aconsejó pacientemente en mis primeros experimentos: Teresa Bellón. Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a M^a Luisa Botella por sus innumerable buenos consejos y su incondicional amistad a lo largo de todos estos años en los que siempre a estado dispuesta a echarme una mano. Quisiera agradecer a los Dres. Santiago Rodríguez de Córdoba y a Javier Rey la atención prestada cuando recurrí a ellos. Quisiera también recordar al Dr. Peter Newman quien me brindó la oportunidad de trabajar durante 3 meses en su laboratorio donde se realizaron los experimentos de 5' RACE que se describen en este trabajo, habiendo supuesto una extraordinaria experiencia no sólo en el terreno profesional sino también en el personal.

A Carmen Langa quisiera agradecerle su inestimable ayuda ya que sin su colaboración hubiera sido mucho más duro concluir el trabajo experimental en el tiempo previsto. También quisiera darle las gracias por el cariño y la amistad que siempre me ha demostrado. A todos los que forman o han formado parte del laboratorio 321: Al Dr. Patricio Aller, con quien estoy en deuda por haberme puesto en contacto con el CIB; a Elena, quien creo que por su santa paciencia para conmigo bien tiene merecido el cielo. Aihnoa, Ulla, Carlos, Pedro, Laurita *alias* “Ms Tornado”, gracias por vuestro apoyo incondicional, el cariño y la amistad que siempre me demostrasteis así como los dulces compartidos entre experimento y experimento. Al igual que para aquellos que ya no están como Concha, Paloma, Alicia, Nuria V. (a la que debo el sobrenombre de Nurial) y con quien compartí innumerables noches de sábado y domingo en el CIB. Gracias a Rosa de quien siempre he recibido una sonrisa y he escuchado palabras de ánimo y fortaleza en mis momentos más bajos. También debo agradecer la enorme paciencia y

comprensión de Marta Cebrián cuando tocaba “experimento con radiactividad”. Por supuesto, no puedo olvidar a Pablo, Juan Ignacio, M^a José, Elisa, Resu y Nacho gracias por vuestra amistad y por “sacarme de paseo” cuando lo necesité. A Resu y Nacho, por su continuo apoyo y por mostrarme que el mundo no se acaba cuando los experimentos no salen. Quisiera aprovechar y dar las gracias a todas aquellas personas que he conocido a lo largo de estos años en el CIB, y que siempre tenían una palabra amable y una sonrisa para animarme o bien la solución a ese ensayo que no acaba de salir. Aunque es imposible nombrarlos a todos, ¡mil gracias!. Por supuesto mi agradecimiento por su labor y cooperación a los servicios generales del CIB. Le agradezco al grupo de Santiago Lamas el que me proporcionaran las células BAEC utilizadas en el presente trabajo y que me permitieran utilizar el luminómetro al igual que lo hizo en su día Víctor de Lorenzo. Igualmente, debo agradecer a Maite Serra el que amablemente me haya proporcionado el electroporador pieza clave en los experimentos de transfección.

A Fernando por haber sido tan comprensivo y paciente con mis ataques de histeria y por su constante apoyo en todo momento. Por ese verano sin vacaciones y esos fines de semana en los que nunca sabía cuando iba a terminar en el CIB. Y dejo para lo último un especial gracias para mis padres quienes pacientemente me han soportado estos años (cosa que no debe haber sido nada fácil) y han sufrido esta tesis en la sombra” alentándome en todo momento a seguir luchando con tesón en los momentos difíciles. Y otro especial gracias a Eva quien día a día ha sufrido estoicamente la ocupación de nuestro espacio compartido, cada vez más lleno del ordenador, autorradiografías, “papers”.... Gracias por tu paciencia.

i.i.- ABREVIATURAS	I
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1- MIGRACIÓN LEUCOCITARIA Y ADHESIÓN	2
1.2.- MOLECULAS QUE INTERVIENEN EN LOS PROCESOS DE INFLAMACIÓN	2
1.3.- MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	4
1.3.1- Las selectinas	4
1.3.2.-Las cadherinas	5
1.3.3- Las integrinas	5
1.3.4- La superfamilia de las inmunoglobulinas	7
1.3.4.1.- ICAM	7
1.3.4.2.- VCAM	8
1.3.4.3.- L1	8
• Papel fisiológico de la unión de L1 a $\alpha_v\beta_3$	9
1.3.4.4.- PECAM-1CD31	10
1.4.- ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN PECAM-1	11
1.4.1.- Estructura de PECAM-1	11
1.4.2.- Organización genómica y formas alternativas de PECAM-1	11
1.4.3.- Distribución celular de PECAM-1	13
1.4.4.- Aspectos fisiológicos de PECAM-1	14
• PECAM-1 como molécula de adhesión	14
• Implicación de PECAM-1 en los procesos de inflamación e interacción entre células endoteliales y leucocitos	17
• Función de PECAM-1 en células vasculares	18
• PECAM-1 como transductora de señales hacia y desde el interior celular ...	19
• Angiogénesis y metástasis tumoral	23
1.5.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	
1.5.1.- Regulación por citoquinas inflamatorias	24
1.5.1.1.- Regulación de las selectinas	24
1.5.1.2.- Regulación de las integrinas	25
1.5.1.3.- Regulación de PECAM-1 y otros miembros de la IgSF	26

1.6.- ELEMENTOS DE RELEVANCIA TRANSCRIPCIONAL IDENTIFICADOS EN EL PROMOTOR DE OTRAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN. ELEMENTOS SSRE, GATA, NFκB Y ELEMENTOS DE RESPUESTA A TGF-β	30
1.7.- OBJETIVOS DE ESTA TESIS	38
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1.- ENZIMAS Y REACTIVOS	40
2.2.- MEDIOS Y TAMPONES	40
2.3.- CULTIVO CELULAR	
2.3.1.- Material de cultivo celular	41
2.3.2.- Líneas celulares	42
2.4.- ESCRUTINIO DE GENOTECAS DE ADN GENÓMICO HUMANO	43
2.5.- VECTORES UTILIZADOS. CARACTERÍSTICAS	43
2.6.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
2.6.1.- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico	45
2.6.2.- Aislamiento y purificación de ADN de fagos	45
2.6.3.- Aislamiento y purificación de ARN celular	45
2.7.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
2.7.1.- Análisis de ADN	46
2.7.2.- Análisis de ARN	46
2.8.- MARCAJE DE ADN	
2.8.1.- Fragmentos de ADN de doble cadena	47
2.8.2.- Oligonucleótidos de doble cadena	47
2.8.3.- Oligonucleótidos de cadena sencilla	47
2.9.- OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES GENÓMICAS	47
2.10.- SECUENCIACIÓN DEL ADN CLONADO	48
2.11.- OBTENCIÓN DE TRANSFECTANTES	49
2.12.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA CON LAS CONSTRUCCIONES DE PECAM-1	51
2.13.- IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EL PROMOTOR DE PECAM-1	
2.13.1.- Amplificación del extremo 5' del ADN genómico de PECAM-1 mediante la técnica de PCR (5' RACE)	52
2.13.2.- Ensayo de protección con nucleasa S1	53

2.14.- CITOMETRÍA DE FLUJO	53
2.15.- ENSAYOS DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.	
2.15.1.- Obtención de los extractos nucleares	54
2.15.2.- Anillamiento de los oligonucleótidos de cadena sencilla	54
2.15.3.- Ensayos de unión ADN-proteína	55
3.- RESULTADOS.	57
3.1.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLON GENÓMICO CONTENIENDO LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN DE PECAM-1	58
3.2.- SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LA REGIÓN 5' FLANQUEANTE DEL GEN DE PECAM-1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL PROMOTOR DE PECAM-1	60
3.3.-ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA REGIÓN 5' FLANQUEANTE DE PECAM-1: LOCALIZACIÓN DE REGIONES REGULADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN	63
3.4.- DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD TISULAR DEL PROMOTOR DE PECAM-1 ...	64
3.5.- ACTIVIDAD PROMOTORA DEL FRAGMENTO DE 0.22 Kb <i>NheI/BglIII</i>	66
3.6.- IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PKC EN LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PECAM-1	74
3.7.- IDENTIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA A ÉSTERES DE FORBOL EN EL PROMOTOR DE PECAM-1	
3.7.1.- Regulación transcripcional de PECAM-1 por ésteres de forbol	74
3.8.- IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS DE RESPUESTA A ÁCIDO RETINOICO EN EL PROMOTOR DE PECAM-1	80
3.9.- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1 POR c-Myc	
3.9.1.- Presencia de secuencias de unión bHLH (E-BOX) en la región reguladora de PECAM-1	81
3.9.2.- Efecto de la sobreexpresión de c-Myc sobre la actividad transcripcional de PECAM-1	82
3.10.- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1 POR NF- κ B.	
3.10.1.- Identificación de sitios consenso de unión para miembros de la familia Rel/ κ B en la región reguladora de PECAM-1	84
3.10.2.- Efecto de TNF- α , el más potente activador de la activación de NF κ B, sobre la expresión de PECAM-1	89
3.11.- Regulación transcripcional de PECAM-1 por TGF- β 1	90

4.- DISCUSIÓN	95
4.1.- IDENTIFICACIÓN DE DOS FOCOS PRINCIPALES DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EL PROMOTOR DE PECAM-1	96
4.2.- PRESENCIA DE UN ELEMENTO INICIADOR EN EL FOCO 3' DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL PROMOTOR DE PECAM-1	99
4.3.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA DE PECAM-1. IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS CONSENSO	100
4.4.- IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PKC EN LA REGULACIÓN DE PECAM-1 EN CÉLULAS MONOCÍTICAS	112
4.5.- c-Myc COMO MEDIADOR DE LA REPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1	114
4.6.- PAPEL DE NFκB EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1. REGULACIÓN DE PECAM-1 POR CITOQUINAS INFLAMATORIAS	115
4.7.- BASES MOLECULARES DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1 POR TGF-β1	119
5.- CONCLUSIONES	124
6.- REFERENCIAS	127
7.- ANEXO	152

i.i.- ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario al ARNm
AE	Actividad específica
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Oligonucleótido antisentido
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
bHLH-Lz	Hélice-vuelta-hélice de tipo básico con cremallera de leucinas
BSA	Albúmina sérica bovina
CMV	Citomegalovirus
cpm	Cuentas por minuto
DAG	Diacilglicerol
DEAE	Dietil-amino-etil
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dhfr	Dihidrofolato reductasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Deoxinucleótidos
DOG	1,2 dioctanoilglicerol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
EGTA	Ácido etilén glicol (aminoetil eter) tetra-acético)
EMBL	Laboratorio de Biología Molecular Europeo
FCS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
gr	gramo
H-7	1-(5-isoquinoleinsulfonil)-2-metil-piperazina
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
HEPES	Ácido sulfónico 4-(2 hidroxietil)-1-piperazina propano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN- γ	Interferón gamma
IgSF	Superfamilia de las Inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
LFA-1	Antígeno linfocitario asociado a función-1
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos

MHG	Complejo principal de histocompatibilidad
ng	Nanogramos (10^{-9} gr)
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NK	Célula asesina natural
NP-40	Nonidet P-40
μ g	Microgramo (10^{-6} gr)
OAG	1-octanoil-2-acetil glicerol
PAF	Factor activador de plaquetas
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
PDTC	Pirrolidín ditiocarbamato
PECAM-1	CD31. Molécula de adhesión celular de plaquetas y endotelio
PEG	Polietilénglicol
PF4	Factor de plaquetas 4
PIPES	Ácido sulfónico 1.4 piperazina dietano (4-(2-hidroxi-etil)-1
PKC	Piperazina propano)
PMA	Ester de forbol miristato acetato
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
RLU	Unidades relativas de luciferasa
S	Oligonucleótido sentido
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSRE	Elemento de respuesta a fuerzas hemodinámicas
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TdT	Deoxinucleotidil transferasa
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N'',N'-tetrametil-etilendiamina
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral-beta
Tm	Temperatura de anillamiento entre 2 cadenas de ADN
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- MIGRACIÓN LEUCOCITARIA Y ADHESIÓN.

La organización de las células animales en órganos diferenciados y tejidos es consecuencia tanto de interacciones entre moléculas existentes en la superficie de las células como de la interacción de éstas con la matriz extracelular (Ruoslahti *et. al.*, 1987). Para preservar al organismo de infecciones, las células del sistema inmune deben circular como células no adherentes en sangre y sistema linfoide y migrar como células adherentes a través de los tejidos. Los leucocitos son los principales responsables del sistema de defensa frente a la invasión por microorganismos (Weissman *et. al.*, 1993; Paul *et. al.*, 1993). Este sistema de defensa tiene un componente no específico como son los granulocitos y los macrófagos y un componente específico como son los linfocitos. Los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), son capaces de liberar compuestos citotóxicos a partir de sus gránulos intracelulares ante la presencia de microorganismos. Esta destrucción al azar ocurre rápidamente pero puede dañar también a tejidos del organismo. Los macrófagos son capaces de destruir los microorganismos por fagocitosis, o bien secretando compuestos citotóxicos de una forma similar a los neutrófilos. A diferencia de los granulocitos, los macrófagos pueden actuar de una forma más específica colaborando con los linfocitos. El sistema linfoide está constituido por los linfocitos B y T siendo los responsables de la respuesta inmunitaria específica frente a un antígeno. Todos estos leucocitos circulan por el organismo a través del sistema circulatorio y linfático asegurando una vigilancia continua, prerequisite para una defensa eficiente (Anderson *et. al.*, 1982). Ante un daño tisular y un proceso de inflamación los leucocitos son reclutados desde el torrente circulatorio hasta el tejido dañado, mientras que los eosinófilos se extravasan hacia los sitios donde se producen reacciones alérgicas o infestaciones con parásitos, y los neutrófilos se extravasan a los sitios de inflamación aguda o daño tisular (Butcher *et. al.*, 1991; Dunon *et. al.*, 1994). La migración de linfocitos presenta una regulación muy selectiva e incluye un complejo modelo de recirculación que implica una diferenciación y una activación. El punto clave en la actuación y supervivencia inmune es la rápida transición entre un estado adherente/no adherente de las células. Ante la presencia de un agente antigénico, los linfocitos son activados y tienen lugar una serie de interacciones adhesivas, que dirigen su migración y localización “*homing*” hacia los distintos órganos linfoides y localización de los neutrófilos en los focos de inflamación.

1.2.- MOLECULAS QUE INTERVIENEN EN LOS PROCESOS DE INFLAMACIÓN.

El reclutamiento de los leucocitos hacia las áreas de inflamación comienza con la unión de éstos al endotelio, seguido de su transmigración hasta los tejidos dañados. Aunque este hecho es conocido desde hace 150 años, únicamente en la última década, con la identificación de las moléculas de adhesión, así como de activadores y agentes quimiotácticos, se han ido desvelando los mecanismos moleculares de la adhesión leucocitaria. Al menos, tres familias principales de receptores de adhesión median estas interacciones: La Superfamilia de las

Inmunoglobulinas (IgSF), que incluyen los receptores antigénicos específicos de los linfocitos T y B, la familia de las integrinas, que juegan un papel muy importante en la regulación de la adhesión y migración, y las selectinas, elementos claves para la interacción de los linfocitos y neutrófilos con el endotelio vascular. Además, también juegan un papel muy importante factores que activan los neutrófilos y las células endoteliales, provocando como respuesta la expresión de moléculas de adhesión y/o migración quimiotáctica. Todos estos procesos se suceden programada y secuencialmente para dar lugar a lo que se conoce como la cascada de adhesión leucocito-endotelial (Pober *et. al.*, 1990; Butcher *et. al.*, 1991; von Andrian *et. al.*, 1991; Smith *et. al.*, 1993). Esta sucesión de eventos se representan en la **Figura 1.1**.

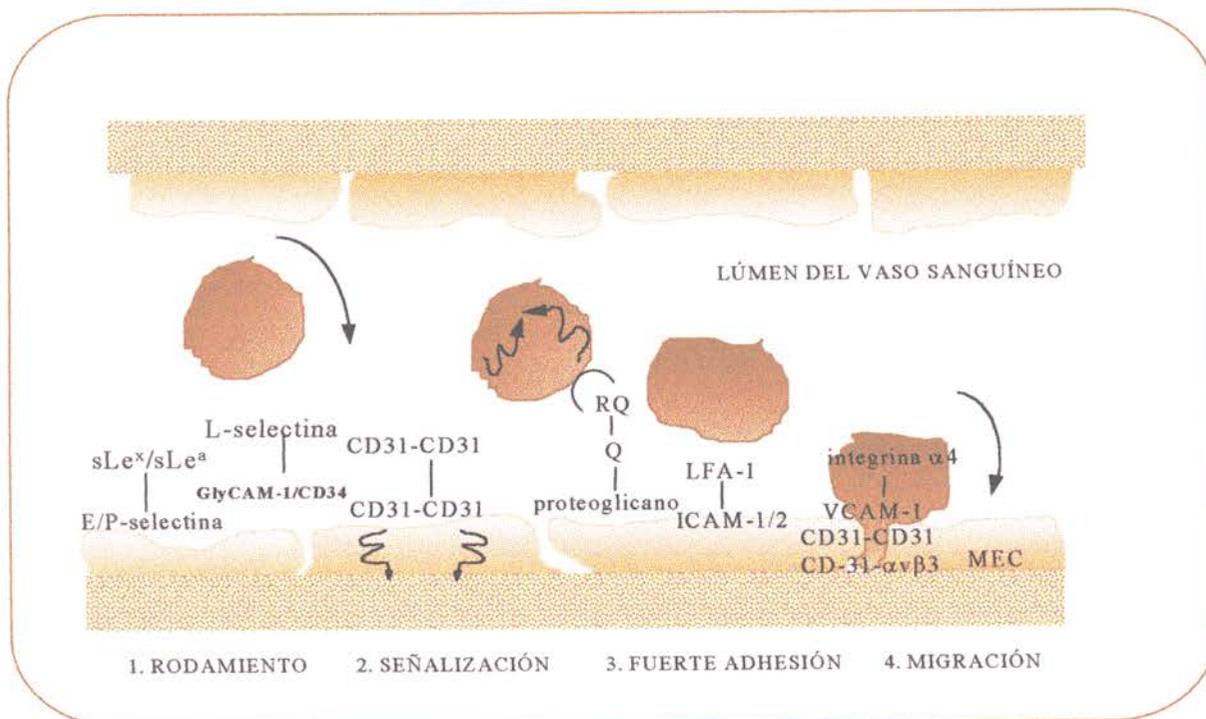


Figura 1.1.- Moléculas de adhesión, activadores de éstas y agentes quimiotácticos implicadas en la interacción del leucocito con el endotelio. En la parte inferior de la figura se resumen secuencialmente según acontecen, los 4 pasos implicados en el proceso de adhesión leucocitaria. RQ: receptor de quimioquinas. Q: quimioquina. ECM: matriz extracelular. (Imhof *et. al.*, 1995. *Advances in Immunology* 58, 345-416)

En esta cascada, el primer proceso consiste en una leve adhesión del leucocito a la pared del vaso y un rodamiento a lo largo de la superficie del endotelio a velocidades inferiores a 50µm/s. Tras un periodo variable de rodaje, muchos neutrófilos se adhieren firmemente a la superficie de la célula endotelial y se activan, cambiando su configuración desde una forma esférica a una forma aplanada. Se han observado en este punto, agregados de neutrófilos, así como algunas plaquetas adheridas. Las células adheridas entonces, migran a través de las uniones endoteliales a una región entre el endotelio y la membrana basal. Tras una pequeña pausa en esta localización, los neutrófilos finalmente migran hacia los tejidos intersticiales. Cada uno de los pasos de emigración va asociado con moléculas de adhesión específicas así como con activadores de éstas y agentes quimiotácticos.

1.3.- MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

Las interacciones célula-matriz extracelular (ECM) y célula-célula juegan un papel esencial en la diferenciación y migración celular que tienen lugar durante la embriogénesis e histiogénesis, “*homing*” de linfocitos, así como en los procesos de homeostasis, cicatrización de heridas, coagulación, reacciones inmunes e inflamatorias, y en los mecanismos de transformación y deseminación tumoral (Albelda *et. al.*, 1990; Springer *et. al.*, 1990). Dichas interacciones celulares son mediadas por un número elevado de moléculas integrales de membrana denominadas receptores de adhesión, divididos en los siguientes grandes grupos de acuerdo a sus relaciones evolutivas: Selectinas, Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF), Cadherinas y la familia de las Integrinas.

1.3.1- LAS SELECTINAS.

De los cuatro grupos de moléculas de adhesión, las selectinas representan la familia de receptores de adhesión más pequeña y más recientemente identificada. Son moléculas de adhesión de tipo I transmembranales que median adhesión transitoria de poca intensidad “*tethering*”, dependiente de calcio, así como el rodaje de los leucocitos a las células endoteliales (Barclay, *et. al.*, 1993; Pigott *et. al.*, 1993; Lasky *et. al.*, 1992). Existen distintos miembros en esta familia según su localización. La selectina que se expresa constitutivamente en neutrófilos conocida como L-Selectina/Lam-1/LECAM-1 es eliminada de la superficie celular tras su activación, inmediatamente después de que el rodamiento del neutrófilo comience (Kishimoto *et. al.*, 1989; Lasky *et. al.*, 1989; Siegelman *et. al.*, 1989; Tedder *et. al.*, 1989). Otro miembro de esta familia se encuentra almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade de las plaquetas y recibe el nombre de P-Selectina/GMP140/PADGEM (Johnston *et. al.*, 1989; Weller *et. al.*, 1992) y finalmente, la E-selectina/ELAM-1 (Weller *et. al.*, 1992; Bevilacqua *et. al.*, 1989; 1991) expresada únicamente en células endoteliales. Existen dos aspectos diferenciales de esta familia que la hacen única. En primer lugar, los 3 tipos de selectinas están implicadas únicamente en la unión del leucocito y algunas células metastáticas a las células endoteliales del lumen de la vasculatura y en segundo lugar, son proteínas que unen hidratos de carbono a diferencia de otros miembros de las moléculas de adhesión que unen proteínas. Esta familia de receptores, comparten una estructura en mosaico común que consiste en un dominio amino terminal con una lectina de tipo C, un dominio del tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), varias pequeñas repeticiones consenso similar a las proteínas reguladoras que unen complemento (SCR), un dominio transmembrana y un pequeño dominio citoplásmico (Figura 1.2). La principal diferencia entre las tres selectinas radica en el número de SCR pero la función de estas repeticiones es todavía desconocida. El dominio de lectinas, se ha implicado directamente en la unión a sus ligandos de carbohidratos y el dominio EGF parece que contribuye a la afinidad por el ligando. Las selectinas son capaces de unir ligandos conteniendo carbohidratos a sus dominios de lectina, monosacáridos y polisacáridos fosforilados,

polisacáridos sulfatados y lípidos (Bevilacqua *et. al.*, 1993). También se ha demostrado que los tetrasacáridos, sialyl Lewis x y sialyl Lewis a (sLe^x, sLe^a), o sus formas sulfatadas, pueden unirse a las tres selectinas. Entre las proteínas-ligandos más conocidas de L-selectina se encuentra GlyCAM-1, Mad-CAM-1 y CD34, siendo ésta última una sialomucina vascular expresada también en progenitores hematopoyéticos. La P-Selectina es una glicoproteína transmembrana de sialomucina en células mieloides denominada PSGL-1 (Sato *et. al.*, 1993) y E-selectina es un antígeno CLA expresado en una subpoblación de linfocitos T de memoria (Picker *et. al.*, 1990; Shimizu *et. al.*, 1991; Norton *et. al.*, 1993; Streeter *et. al.*, 1988).

1.3.2.- LAS CADHERINAS.

Constituyen una familia de receptores de adhesión que se expresan en todas las células formadoras de tejidos sólidos (Takeichi *et. al.*, 1991; Luna *et. al.*, 1992) mediante interacciones homofílicas célula-célula dependientes de calcio. Parece que juegan un papel importante en la determinación de la morfología de células y tejidos, en la segregación celular durante la morfogénesis y en la metástasis tumorigénica. Esta familia de moléculas de adhesión está constituida por 12 miembros subdivididos en cuatro subclases en función de su localización: E-cadherina (epitelial), P-cadherina (placenta), N-cadherina (neuronal) y L-CAM (pulmón) (Luna *et. al.*, 1992; Whelan *et. al.*, 1996). Cada tipo celular puede expresar varias cadherinas y el modelo de expresión es tejido específico. Recientemente se ha visto que las E-cadherinas expresadas por células epiteliales también se unen a las integrinas $\alpha_E\beta_7$ expresadas en linfocitos T implicadas en el "homing" de linfocitos (Cepek *et. al.*, 1994). Las cadherinas presentan un dominio extracelular con 3-5 repeticiones internas de aproximadamente 110 aminoácidos, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico corto. Este dominio citoplásmico está altamente conservado y se asocia con tres proteínas citoplásmicas denominadas cateninas (α , β y γ) (Takeichi *et. al.*, 1991; Luna *et. al.*, 1992; Hinck *et. al.*, 1994), las cuales median la interacción de las cadherinas con el citoesqueleto y con otros receptores transmembrana tales como el receptor de EGF (Hoschuetzky *et. al.*, 1994). En las cadherinas, la región aminoterminal de 113 aminoácidos está directamente implicada en las interacciones homofílicas, mientras que el dominio citoplasmático intracelular también es importante para la interacción ya que formas truncadas sin tallo citoplásmico son inactivas.

1.3.3- LAS INTEGRINAS.

Constituyen los principales receptores celulares que median las interacciones de naturaleza fuerte con otras células y con matriz extracelular (Corbí A.L. 1997). Como moléculas de adhesión juegan un papel crucial en respuesta inmune, inflamación, agregación plaquetaria, cicatrización de heridas, migración de los tejidos durante la embriogénesis y metástasis tumoral. Estructuralmente, las integrinas son heterodímeros compuestos de dos

glicoproteínas integrales de membrana denominadas α y β asociadas entre sí no covalentemente (**Figura 1.2**). En la actualidad se conocen 8 subunidades β y 16 subunidades α habiéndose identificado por el momento, hasta 21 heterodímeros diferentes. El dominio extracelular de cada una de las cadenas presenta una cabeza globular aminoterminal que media la asociación con la otra cadena, una región transmembrana y un tallo citoplásmico corto. La especificidad por el ligando reside en ambas cadenas (Bajt *et. al.*, 1995). La presencia de cationes divalentes juega un papel importante en la función adhesiva de las integrinas y además la naturaleza del catión influye en la afinidad y especificidad por el ligando. El tallo citoplásmico de ambas cadenas α y β interacciona con el citoesqueleto siendo esta interacción crucial para la función de la integrina (Tamatani *et. al.*, 1993; Larsen *et. al.*, 1990; McEver *et. al.*, 1992). La expresión de la cadena α está regulada transcripcionalmente por citoquinas inflamatorias (TNF- α) y esto modula la expresión de una integrina particular en la superficie de la célula (Defilippi *et. al.*, 1991; 1992). Uno de los principales mecanismos en la función de las integrinas es la transición rápida desde una forma no adhesiva o estado de baja afinidad a una forma adhesiva o estado de alta afinidad (Hynes *et. al.*, 1992). Parece ser que el incremento en la adhesividad de las integrinas es debido a cambios conformacionales causados por la activación. El control sobre la adhesividad de las integrinas proporciona un mecanismo versátil para el reclutamiento y fuerte adhesión del leucocito circulante sobre el endotelio vascular, seguido inmediatamente de una adhesión intermedia durante la migración transendotelial, y finalmente de una deadhesión durante la extravasación (Shimizu *et. al.*, 1992; Mackay *et. al.*, 1993; Springer *et. al.*, 1994).

Las integrinas de la subfamilia β_2 (CD11a/CD18 = LFA-1; CD11b/CD18 = Mac-1; y CD11c/CD18 = p150,95) se expresan exclusivamente en leucocitos y median interacciones intercelulares. Mientras CD11a/CD18 es pan-leucocitaria, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 se expresan principalmente en células mieloides, si bien la expresión de CD11c/CD18 se induce *de novo* en linfocitos B activados. CD11a/CD18 está implicada en la citotoxicidad de los granulocitos, monocitos, células T y NK, en las funciones reguladoras de linfocitos T, y en la adhesión de leucocitos a endotelio. Todas estas funciones se explican por la interacción de CD11a/CD18 con uno o más de sus tres ligandos identificados (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3) que pertenecen a la IgSF. Además de ser receptores específicos para iC3b, LPS, fibrinógeno y heparina, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 son imprescindibles para la adhesión y migración de leucocitos hacia lugares de inflamación y, consecuentemente, también participan en la metástasis de linfomas y leucemias (Roossien *et. al.*, 1989). Además, las integrinas β_2 son componentes esenciales de la citotoxicidad de linfocitos T frente a ciertos linfomas y a tumores de origen epitelial (Schmits *et. al.*, 1996; Maeurer *et. al.*, 1996).

1.3.4.- LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

La IgSF comprende un amplio número de moléculas cruciales para la respuesta inmune (Dustin *et. al.*, 1991; Barclay *et. al.*, 1993; Springer *et. al.*, 1994). Algunas de ellas, están implicadas en el reconocimiento antigénico como son los receptores para el antígeno de células B y T, moléculas del MHC y los co-receptores CD4 y CD8. Otras, en cambio, han sido identificadas como receptores de adhesión implicadas en las interacciones célula-célula. Son moléculas transmembranales con dominios de homología con la familia de las Inmunoglobulinas. Estos dominios se denominan V y C de acuerdo con la homología estructural con los dominios variable (V) y constante (C) de la familia de las Inmunoglobulinas. A su vez los dominios C se dividen en C1 y C2. Las moléculas de adhesión generalmente presentan dominios de tipo V y C2.

La IgSF comprende un enorme grupo de moléculas con múltiples dominios de homología a las Inmunoglobulinas. Cada dominio generalmente es codificado por un exón y consiste en una secuencia de 60-70 aminoácidos con un puente disulfuro. Hasta el momento se han descrito 5 miembros de esta familia implicados en la interacción leucocito-endotelio: ICAM-1 (CD56a), ICAM-2 (CD56b), ICAM-3 (CD56c), VCAM-1 (CD108) y PECAM-1 (CD31) (Simmons D. *et. al.*, 1988; Staunton *et. al.*, 1989; Horley *et. al.*, 1989; Newman *et. al.*, 1990; Osborn *et. al.*, 1989; de Fougérolles *et. al.*, 1993). De estos, cuatro de ellos (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y PECAM-1) actúan como ligandos endoteliales para los leucocitos.

1.3.4.1.- ICAM.

ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3 son moléculas estructuralmente relacionadas que unen integrinas β_2 .

ICAM-1 presenta una amplia distribución tisular y se expresa tanto en células hematopoyéticas como no hematopoyéticas. Las células endoteliales en reposo y linfocitos expresan bajos niveles. La expresión de ICAM-1 en células endoteliales, epiteliales y mesenquimales se induce a través de mediadores inflamatorios (Dustin *et. al.*, 1986; Pohlman *et. al.*, 1987; Rohlein *et. al.*, 1988; Groves *et. al.*, 1992). ICAM-1 se une a la integrina LFA-1 a través del primer dominio aminoterminal y a Mac-1 a través del tercer dominio. También se ha reportado su unión a CD43 (Rosenstein *et. al.*, 1991).

ICAM-2 presenta un patrón más restringido de expresión. Está débilmente expresado en linfocitos en reposo. En cambio, está altamente expresado en células vasculares endoteliales en reposo. La expresión de ICAM-2 se induce por mediadores inflamatorios. ICAM-2 une LFA-1 pero no Mac-1. Debido a su expresión diferencial en endotelio, ICAM-2 se considera el

principal receptor endotelial para el LFA-1 del linfocito en endotelio en reposo, mientras que ICAM-1 es el principal receptor en los sitios de inflamación.

ICAM-3 es una molécula de adhesión recientemente descubierta. Está fuertemente expresada en linfocitos en reposo, (de Fougerolles *et. al.*, 1992; 1993; 1994), monocitos, neutrófilos y algunos tumores de líneas endoteliales. Se une a LFA-1 pero no a Mac-1. ICAM-3 es una molécula señalizadora. Se cree que es una señal coestimuladora para las células T y potenciadora de la señalización inducida por CD3/TCR. A pesar de no haberse descrito en células endoteliales podría estar implicada en la interacción endotelio/linfocito así como en inhibir competitivamente la unión LFA-1/ICAM-1 (de Fougerolles *et. al.*, 1992).

1.3.4.2.- VCAM-1

Se expresa en células endoteliales activadas, macrófagos tisulares, células dendríticas, fibroblastos de médula ósea y mioblastos. Se une a integrinas $\alpha_4\beta_1$ (VLA-1) y $\alpha_4\beta_7$ (Strauch *et. al.*, 1994; Elices *et. al.*, 1990; Chan *et. al.*, 1992) y está implicada tanto en la activación de linfocitos por células presentadoras de antígeno, como en la migración de linfocitos. Multitud de tejidos son capaces de expresar isoformas de VCAM-1 que difieren en el número de sitios de unión a integrinas. En endotelio se expresan dos isoformas de VCAM-1: una isoforma con siete dominios Ig y otra con seis, siendo esta última, la forma minoritaria cuyo significado biológico y propiedades de unión no se conocen (Osborn *et. al.*, 1992) (**Figura 1.2**). Se ha aislado una forma soluble de VCAM-1 a partir de sobrenadante de células endoteliales humanas así como en sangre de pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (Pigott *et. al.*, 1992; Wellicome *et. al.*, 1993).

1.3.4.3.- L1

La molécula de adhesión L1 es una glicoproteína transmembrana de 200-240 kDa, que pertenece a la IgSF (Rathjen *et. al.*, 1984; Faissner *et. al.*, 1985; Moos *et. al.*, 1988). Inicialmente, fue caracterizada como una molécula de adhesión neuronal (Fischer *et. al.*, 1986). Más recientemente, la expresión de L1 ha sido hallada en células normales y transformadas de origen hematopoyético en ratón (Kowitz *et. al.*, 1992; 1993). Parece ser que en leucocitos, L1 juega un papel en adhesión de células endoteliales (Hubbe *et. al.*, 1993). Se expresa en monocitos, linfocitos humanos B, linfocitos T CD4⁺, así como en numerosas líneas celulares de tumores de origen hematopoyético. En el sexto dominio de homología con las Ig, L1 humana presenta una secuencia RGD y su inversa DGR. Esta secuencia RGD es responsable de la unión a $\alpha_v\beta_3$ pero no a VLA-5. L1 se ha identificado como un ligando para el receptor de fibronectina $\alpha_5\beta_1$ en ratón (Ruppert *et. al.*, 1995) y para la integrina $\alpha_v\beta_3$ en humano (Montgomery *et. al.*, 1996). Además de su función como molécula de adhesión en la superficie celular, L1 desaparece de la superficie celular (Martini *et. al.*, 1991) y es depositada

en la matriz extracelular, (Montgomery *et. al.*, 1996) sugiriendo un papel para L1 como constituyente de matriz extracelular.

- **Papel fisiológico de la unión de L1 a $\alpha_v\beta_3$**

L1 presenta similitudes tanto estructurales como funcionales con PECAM-1, otro miembro de la IgSF. Ambas moléculas tienen seis dominios de homología con la familia de las Inmunoglobulinas, presentan una organización genómica compleja con formas de procesamiento alternativo de diferentes exones (Kirschbaum *et. al.*, 1994) y pueden actuar tanto en adhesión homofílica como heterofílica (DeLisser *et. al.*, 1994; Fawcett *et. al.*, 1995; Buckley *et. al.*, 1996). Ambas moléculas, PECAM-1 (Buckley *et. al.*, 1996) y L1 (Montgomery *et. al.*, 1996) han sido identificadas como ligandos para integrinas $\alpha_v\beta_3$ en humanos. El sitio de unión para $\alpha_v\beta_3$ en PECAM-1 reside predominantemente en los dominios 1 y 2 y no existe ninguna secuencia RGD implicada en la unión (Piali *et. al.*, 1995; Buckley *et. al.*, 1996). En cambio, la unión de $\alpha_v\beta_3$ en L1 reside en la secuencia RGD localizada en el dominio seis. Las integrinas $\alpha_v\beta_3$ se expresan en multitud de tipos celulares incluyendo células endoteliales (Cheresh *et. al.*, 1987), células epidérmicas dentríticas T (Kikuchi *et. al.*, 1992), células NK (Rabinowich *et. al.*, 1995), algunos tumores humanos en células B (Salcedo *et. al.*, 1995), células LAK, (Moulder *et. al.*, 1991), y es un activador antigénico tardío para células T de ratón (Moulder *et. al.*, 1991). También es un receptor multifuncional para componentes de matriz extracelular como vitronectina, fibronectina, laminina, trambospondina, osteospondina, y colágeno desnaturalizado de tipo I, así como para componentes sanguíneos como fibrinógeno y el factor de von Willebrand. Para todos estos ligandos la secuencia RGD representa el sitio de unión correspondiente (Hynes *et. al.*, 1992). Es de destacar que la integrina $\alpha_v\beta_3$ se expresa preferencialmente en vasos sanguíneos angiogénicos de pollo y humano (Brooks *et. al.*, 1994) y es de vital importancia para la neovascularización de tumores (Brooks *et. al.*, 1994). También existen evidencias sobre la posibilidad de que $\alpha_v\beta_3$ promueva movilidad celular o migración (Leavesley *et. al.*, 1992). Montgomery *et. al.* (1996) han reportado que L1 podría inducir una migración haptotáctica en células de melanoma que puede ser bloqueada con Am específicos frente a $\alpha_v\beta_3$. Am frente a PECAM-1, otro ligando de $\alpha_v\beta_3$, son capaces de inhibir la transmigración de leucocitos a través de una monocapa de células endoteliales (Muller *et. al.*, 1993; Berman *et. al.*, 1996). Experimentos recientes han demostrado que el receptor para L1 en células endoteliales es una integrina α_v (Ebeling *et. al.*, 1996).

Es posible que las parejas de adhesión $\alpha_v\beta_3$ /PECAM-1 y $\alpha_v\beta_3$ /L1 jueguen un papel fundamental en la adhesión e iniciación de la migración de los leucocitos sobre las células endoteliales, que suponen un paso importante antes de la transmigración (Butcher *et. al.*, 1996). A este respecto Ebeling *et. al.* (1996) han observado que la mayoría de los linfocitos humanos T expresan bien L1 o bien PECAM-1 y únicamente un porcentaje muy bajo 10-20% co-expresan simultáneamente L1 y PECAM-1.

1.3.4.4.- PECAM-1/CD31.

El antígeno CD31/PECAM-1 fue identificado a mediados de los años ochenta mediante el empleo de anticuerpos que reconocían moléculas presentes en la membrana de las células endoteliales y leucocitos (Ohto *et. al.*, 1985; van Mourik *et. al.*, 1985; Goyert *et. al.*, 1986; Cabañas *et. al.*, 1989; Knapp *et. al.*, 1989). Los anticuerpos dirigidos contra esta proteína presentaban reactividad frente a neutrófilos y monocitos, y tenían la capacidad de inhibir la quimiotaxis de dichas células en ensayos donde se utilizaban sueros activados con endotoxina (Ohto *et. al.*, 1985). La especie molecular reconocida por dichos anticuerpos correspondía a una proteína de membrana con un peso molecular aproximado de 130 kDa, presente también en la membrana de plaquetas y endotelio (van Mourik *et. al.*, 1985), y en células del linaje mielóide (Goyert *et. al.*, 1986). Estudios posteriores identificaron a esta proteína como un componente del sistema de contacto célula-célula en el endotelio (Muller *et. al.*, 1989; Albelda *et. al.*, 1990). Newman *et. al.* (1990) reportaron su clonaje molecular, denominándola PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*).

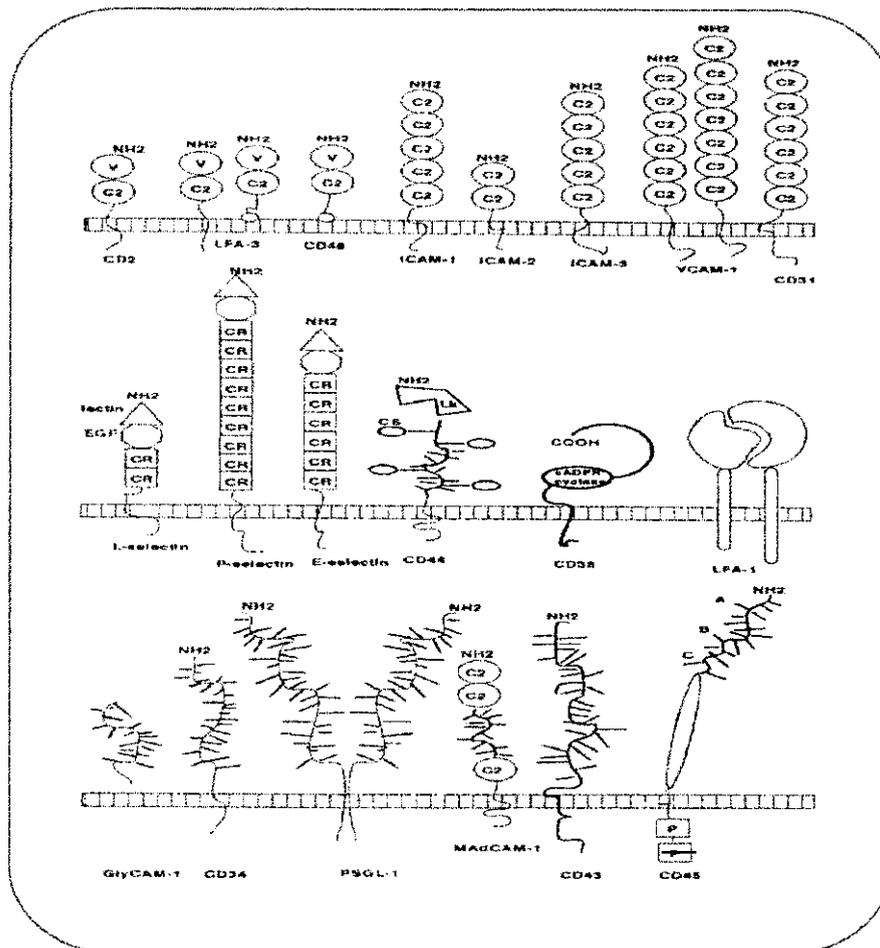


Figura 1.2.- Moléculas de adhesión implicadas en las interacciones célula-célula y en la migración linfocítica. V y C2: dominios de homología con la IgSF de tipo V y C2. CR: motivos en tándem homólogos a secuencias consenso de proteínas reguladoras de complemento. LK: Dominio de homología con el núcleo del proteoglicano de cartilago y las proteínas de unión. CS: condroitín sulfato. P: dominio tirosina fosfatasa. Los círculos representan las uniones a GPI. (Dianzani *et. al.*, 1995. *Critical reviews in immunology* 15: 167-200).

1.4.- ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN PECAM-1.

1.4.1.- Estructura de PECAM-1.

PECAM-1 es un glicoproteína transmembrana de tipo I con un peso molecular ligeramente distinto dependiendo del tipo celular, posiblemente como consecuencia del diferente patrón de glicosilación que puede presentar (Ashman *et. al.*, 1991). El clonaje del ADNc humano que codifica esta proteína demostró una alta homología con otros miembros de la IgSF (Newman *et. al.*, 1990; Simmons *et. al.*, 1990, Stockinger *et. al.*, 1990). El equivalente murino de PECAM-1 presenta una homología de secuencia con el humano de un 70-80% (Xie *et. al.*, 1993) y recientemente se ha caracterizado PECAM-1 bovino (Stewart *et. al.*, 1996) con una homología de secuencia del 70% con el humano y un 60% con el de ratón.

La forma madura de la proteína expresada en membrana, se estructura en una región extracelular grande, compuesta de 574 aminoácidos, un solo dominio transmembrana formado por 19 residuos hidrofóbicos y un dominio citoplásmico con 118 residuos (**Figura 1.3**). La región extracelular está organizada en seis dominios del tipo C2 característico de las inmunoglobulinas, y que a su vez se encuentran presentes en la familia de receptores de adhesión celular (CAM) englobada dentro de la IgSF. Una característica de la porción extracelular es que posee nueve sitios potenciales de N-glicosilación, lo que explica el hallazgo de que los azúcares constituyen el 40% aproximadamente del peso de la proteína madura. En PECAM-1 bovino se han detectado 11 posibles sitios de glicosilación. El segundo dominio C2 en el extremo N-terminal, contiene una secuencia consenso para la unión a glicosaminoglicanos (Cardin *et. al.*, 1989), cuya importancia funcional se comentará más adelante. El dominio citoplásmico contiene en su secuencia varias serinas, treoninas y tirosinas que representan sitios potencialmente fosforilables tras la activación celular (Newman *et. al.*, 1990), así como de sufrir palmitoilación e interacción con moléculas señalizadoras de citoesqueleto. Experimentos de “pulso y caza” realizados con células endoteliales y la línea promonocítica U-937 han demostrado que PECAM-1 es sintetizado por las células en forma de precursor con un peso de 110 kDa en un período entre 1-3 horas, el cual es posteriormente procesado hasta la forma madura de 130 kDa antes de aparecer en membrana. Los sitios de glicosilación y las estructuras glicosídicas asociadas al esqueleto proteico no se conocen con exactitud por el momento. En ambos tipos celulares, el tiempo de recambio de la proteína se ha estimado en 48 horas (Goldberger *et. al.*, 1994).

1.4.2.- Organización genómica y formas alternativas de PECAM-1.

El gen de PECAM-1 humano se localiza en el extremo terminal del brazo largo del cromosoma 17 (Gumina *et. al.*, 1996). En esta misma zona del cromosoma también se encuentran los genes de otras moléculas de adhesión presentes en plaquetas y endotelio, como

ICAM-2 y las glicoproteínas IIb y IIIa, lo que sugiere que esta zona podría corresponder a un sitio de localización común de moléculas de adhesión del endotelio. La caracterización del gen que codifica para PECAM-1 (Kirschbaum *et. al.*, 1994) ha desvelado que se trata del gen más grande de todas las moléculas de adhesión celular pertenecientes a la IgSF descrito hasta el momento. Está formado por una secuencia de 75 kb de ADN, y se encuentra organizado en 16 exones separados por intrones de longitud variable comprendidos entre 86 y 12000 pb (Figura 1.3).

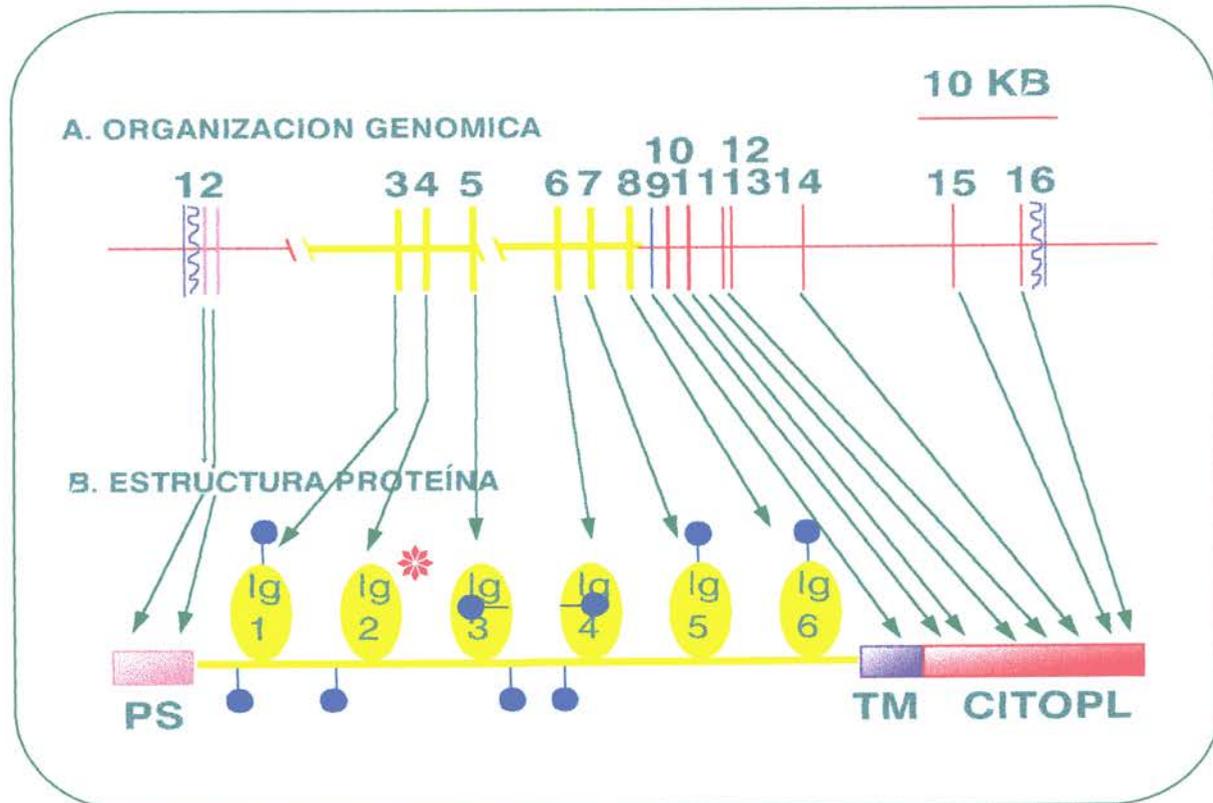


Figura 1.3.- Estructura proteica y organización genómica de PECAM-1. (A). El gen PECAM-1 está organizado en 16 exones separados por intrones de tamaño variable. (B). La proteína PECAM-1 presenta 6 dominios de homología con la IgSF de tipo C2. Los círculos azules representan sitios potenciales de N-glicosilación y la estrella roja indica la posición de la secuencia que une heparina en el dominio 2. PS: péptido señal. TM: transmembrana. Cito: tallo citoplásmico.

La región 5' no traducida y el péptido señal están codificados por los dos primeros exones. Cada uno de los seis dominios extracelulares del tipo C2 está codificado por su propio exón (exones 3-8), el dominio transmembrana está codificado por el exón 9, y una serie de seis exones pequeños (del 10 al 16), con una longitud comprendida entre 23 y 74 pb codifican el dominio citoplásmico. Esta organización difiere de la encontrada para otros miembros de su familia como ICAM-1 o VCAM-1, en los cuales un solo exón codifica para los dominios transmembrana y citoplásmico (Voraberger *et. al.*, 1991; Cybulsky *et. al.*, 1991).

Se han identificado varias formas alternativas de PECAM-1 humano y su equivalente murino. Es importante destacar, que todas las variantes aisladas difieren bien en el dominio transmembrana o en el citoplásmico. Se conocen tres variantes en humanos: 1) Una isoforma que ha perdido 63 pb correspondientes al exón 13, en el dominio citoplásmico (Kirschbaum *et al.*, 1994), 2) Una isoforma aislada de células endoteliales de la vena umbilical, que es soluble, como resultado de la pérdida del exón 9 correspondiente al dominio transmembrana (Goldberger *et al.*, 1994a); y, 3) una isoforma también aislada de endotelio umbilical que es expresada en niveles bajos y que ha perdido la secuencia correspondiente al exón 14, también en el dominio citoplásmico (DeLisser *et al.*, 1994b). En ratón, también se han encontrado formas alternativas; dos variantes han sido aisladas a partir de una librería de ADNc de tejido embrionario cardíaco las cuales presentan pérdidas de los exones 12 y 15 ó 14 y 15, correspondientes también al dominio intracelular de la proteína (Baldwin *et al.*, 1994). La existencia de estas isoformas es probablemente consecuencia de un procesamiento alternativo del ARNm, y se especula que pueda contribuir como mecanismo de regulación de las interacciones de PECAM-1 con su ligando. Existen evidencias sobre la existencia de un pseudogen de PECAM-1 que contiene un 76% de identidad con la secuencia de PECAM-1 descrita (Kirschbaum *et al.*, 1994). La región caracterizada del pseudogen descrito comprende los exones 2-4 y se caracteriza por la ausencia de marcos de lectura abiertos y de regiones intrónicas. Están descritos pseudogenes homólogos a otros genes tales como el gen del factor de von Willebrand (Mancuso *et al.*, 1989) y el gen que codifica para la cadena pesada de la Inmunoglobulina gamma (Takahashi *et al.*, 1982), aunque el papel funcional de estos pseudogenes es aún desconocido. A diferencia de los pseudogenes descritos hasta el momento, cuya localización cromosómica es adyacente a sus genes, el pseudogen homólogo a PECAM-1 está situado en un cromosoma diferente al cromosoma donde se ha localizado el gen de PECAM-1. El gen de PECAM-1 ha sido localizado recientemente en el cromosoma 17 (Gumina *et al.*, 1996), mientras que el pseudogen ha sido localizado en el cromosoma 3 (Kirschbaum *et al.*, 1994).

1.4.3.- Distribución celular de PECAM-1.

Una propiedad importante de PECAM-1 es su amplia distribución en células de origen hematopoyético así como en el endotelio. PECAM-1 está presente en la membrana de plaquetas en niveles bajos, unas 5.000 copias por célula (Ohto *et al.*, 1985; van Mourik *et al.*, 1985; Newman *et al.*, 1990; Stockinger *et al.*, 1990; Metzelaar *et al.*, 1991). Además, su presencia ha sido descrita en los gránulos α de las plaquetas, lo que podría indicar que los niveles de expresión en la membrana plasmática pudieran ser aumentados tras la activación plaquetaria (Cramer *et al.*, 1994). PECAM-1 se expresa en grandes cantidades en células endoteliales en cultivo (10^6 copias por célula), concentrándose en las zonas de contacto célula-célula (Albelda *et al.*, 1990). *In situ*, PECAM-1 se ha encontrado en el endotelio continuo de todos los vasos (Muller *et al.*, 1989) por lo que se ha utilizado como un marcador inmunohistoquímico de los vasos sanguíneos y en particular de la angiogénesis (Page *et al.*,

1992). Entre las poblaciones leucocitarias, ha sido identificado en monocitos, neutrófilos (Ohto *et. al.*, 1985; Goyert *et. al.*, 1986, Stockinger *et. al.*, 1990; Newman *et. al.*, 1994), y en el 50% de los linfocitos T, especialmente las subpoblaciones de fenotipo CD8 y CD45 RA (Stockinger *et. al.*, 1990; Ashman *et. al.*, 1991; Torimoto *et. al.*, 1992; Stockinger *et. al.*, 1992; Tanaka *et. al.*, 1992). PECAM-1 también está presente en precursores de la médula ósea y en líneas celulares de origen mieloide y megacariocítico (Ohto *et. al.*, 1985; Goyert *et. al.*, 1986; Simmons *et. al.*, 1990; Zehnder *et. al.*, 1992; Cabañas *et. al.*, 1989; Watt *et. al.*, 1993; Goldberger *et. al.*, 1994b). PECAM-1 no está presente en fibroblastos, epitelio o células musculares. Aunque la expresión de PECAM-1 está asignada principalmente a células del sistema vascular y sanguíneo, existen evidencias de que se encuentra en otros tipos celulares, habiendo sido identificada en líneas humanas, de ratón y rata derivadas de tumores sólidos (Teng *et. al.*, 1993).

1.4.4.- Aspectos fisiológicos de PECAM-1.

Aunque actualmente se conocen muchos aspectos de la funcionalidad de PECAM-1, hasta hace poco tiempo no se han tenido resultados sobre sus posibles implicaciones *in vivo*. Los estudios más recientes sugieren que PECAM-1 podría estar implicado en procesos tan importantes como los que concurren en la inflamación, adhesión, metástasis y angiogénesis.

• PECAM-1 como molécula de adhesión

La homología entre PECAM-1 y otras moléculas de adhesión celular pertenecientes a la IgSF, sugirió que la función de esta molécula también sería la de actuar como un componente del sistema de adhesión celular. Este punto fue confirmado mediante la utilización de la línea L de fibroblastos de ratón, en los que se había transfectado el ADNc que codifica la proteína. En los ensayos realizados con estos transfectantes se demostró la formación de agregados que eran sensibles a la temperatura y a la presencia de cationes bivalentes durante la realización del ensayo. Además, la presencia de Am dirigidos contra PECAM-1 eran capaces de inhibir dichas agregaciones (Albelda *et. al.*, 1991; Muller *et. al.*, 1992; DeLisser *et. al.*, 1993, 1994a). En la actualidad, se admite que esta proteína es una molécula de adhesión que puede participar en dichos procesos a través de dos tipos de interacciones: por una parte, PECAM-1 puede interaccionar consigo mismo (mecanismo de adhesión homofílica) (Albelda *et. al.*, 1991; Watt *et. al.*, 1993), y por otra parte puede también interaccionar con ligandos distintos del propio PECAM-1 (mecanismo de adhesión heterofílica) (Muller *et. al.*, 1992; DeLisser *et. al.*, 1993, Liao *et. al.*, 1995, Piali *et. al.*, 1995, Buckley *et. al.*, 1996). Esta capacidad de unión a contra-receptores distintos ha sido también descrita para otras moléculas de adhesión de esta familia, en concreto para Ng-CAM (Neuron-glia Cell Adhesion Molecule) (Grumet *et. al.*, 1988), Nr-CAM (Neuron-glia related Cell Adhesion Molecule), (Mauro *et. al.*, 1992), N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), (Murray *et. al.*, 1992; Rao *et. al.*, 1992) y L1 (Kadmon *et. al.*, 1990; Ruppert *et. al.*, 1995; Kadmon *et. al.*, 1995; Montgomery *et. al.*, 1996).

Las interacciones homofílicas entre moléculas de PECAM-1 han sido demostradas en varios sistemas experimentales. PECAM-1 se concentra en la zona de contacto entre células endoteliales adyacentes y entre células COS o fibroblastos murinos NIH/3T3, transfectados con el ADNc de PECAM-1. Además, se obtuvo un patrón similar de localización cuando se realizaron ensayos mezclando células endoteliales y transfectantes NIH/3T3. Por el contrario, la proteína no se concentra en los bordes libres o en los sitios de contacto entre células no transfectadas y transfectadas (Albelda *et. al.*, 1990, 1991). Los estudios de microscopía electrónica también han demostrado un comportamiento similar en plaquetas (Newman *et. al.*, 1992). Estudios de unión utilizando una forma recombinante soluble de la proteína también demostraron que ésta se unía a células COS transfectadas con la forma de membrana, pero no lo hacía sobre transfectantes control (Watt *et. al.*, 1993). Todos estos datos implicaban las interacciones homofílicas de PECAM-1 como las responsables de la concentración de la moléculas en las uniones intercelulares.

El mecanismo heterofílico también ha sido demostrado utilizando ensayos de agregación en poblaciones mixtas de células (Muller *et. al.*, 1992; DeLisser *et. al.*, 1993). En estos estudios se mezclaron células L transfectadas con PECAM-1 con células no transfectadas y se estimaron los agregados formados. Se pudo demostrar que las células transfectadas se unían tanto a células transfectadas como a las no transfectadas, lo que sugería que PECAM-1 en la superficie de la célula transfectada se unía a un receptor diferente presente en la superficie de las células L. Este receptor podría ser un proteoglicano del tipo condroitín o heparán sulfato que interaccionaría con PECAM-1 a través de una secuencia consenso de unión a glicosaminoglicanos presente en el segundo dominio C2 de la proteína (DeLisser *et. al.*, 1993). La secuencia que comprende el sexto dominio C2, el más próximo al transmembrana, también parece intervenir en el mecanismo de interacción heterofílica, ya que se han identificado epítomos reconocidos por los Am 4G6 y PECAM-1.2, los cuales inhiben las adhesiones mediadas por este mecanismo, que se localizan en dicho dominio (DeLisser *et. al.*, 1994a). Un dato adicional que apoya la interacción heterofílica lo constituye el que el Am LYP21 que también se une al sexto dominio, así como un péptido que mimetiza el epítomo reconocido por el anticuerpo, pueden inhibir la reacción linfocitaria en cultivos mixtos, lo que además implicaría a PECAM-1 en la activación de dichas células (DeLisser *et. al.*, 1994b). Muy recientemente ha sido descrita la interacción entre PECAM-1 y la integrina $\alpha_v\beta_3$. Esta interacción no es inhibible por la presencia de heparina, lo que implica un tercer mecanismo de interacción que no es mediado por glicosaminoglicanos (Piali *et. al.*, 1995). El sitio de unión para $\alpha_v\beta_3$ reside al menos en parte en el dominio 1 aunque el dominio 2 también contribuye en la unión (Buckley *et. al.*, 1996). El papel que juega el dominio 2 en la interacción heterofílica mediada por los glicosaminoglicanos fue descrito con anterioridad (DeLisser *et. al.*, 1993). Por tanto, los dominios 1 y 2 son importantes tanto para mediar las interacciones homofílicas como heterofílicas. Los sitios de unión a PECAM-1, tanto en las interacciones homofílicas como en la unión a $\alpha_v\beta_3$, parece que solapa en estudios realizados por mapeo de los epítomos con Am.

Por otro lado, Buckley *et. al.* (1996) han demostrado que PECAM-1 puede unir células por un mecanismo homofílico o heterofílico dependiendo de la línea celular usada. Así U-937 une PECAM-1 de una manera preferentemente heterofílica, pero también existe paralelamente, aunque en menor proporción, una adhesión homofílica. La preferencia de un tipo de adhesión frente a otro que regule la adhesión total de la célula ha sido demostrada por otras interacciones entre la IgSF y las Integrinas.

La región citoplásmica de PECAM-1 parece jugar un papel muy importante en la modulación de la interacción con su contra-receptor. Estudios iniciales con transfectantes de la proteína a los que se les había mutado la fracción intracelular demostraron que el dominio citoplásmico es necesario para la localización de PECAM-1 en las zonas de contacto célula-célula (DeLisser *et. al.*, 1994a). Además, la delección del exón 14 dentro del dominio citoplásmico, puede cambiar el mecanismo de interacción de heterofílico a homofílico, lo que sugiere que las secuencias de este exón son muy importantes en la determinación de la especificidad del ligando reconocido (DeLisser *et. al.*, 1994a). El mecanismo concreto por el cual dicho exón pueda cambiar las propiedades funcionales de PECAM-1 es desconocido; probablemente pueden estar implicados cambios en la conformación exterior de la proteína, alteraciones en la fosforilación y/o cambios en la asociación al citoesqueleto. La fosforilación de PECAM-1 en el dominio citoplásmico ha sido descrita en varios sistemas, siendo la PKC u otra quinasa dependiente de esta actividad la responsable de su activación en plaquetas (Zehnder *et. al.*, 1992, Newman *et. al.*, 1992). Este último grupo demostró que la activación de plaquetas con trombina o con PMA daba como resultado la rápida fosforilación de PECAM-1 en residuos de serina, su asociación con el citoesqueleto y su redistribución dentro de la membrana. En células promonocíticas U-937 Lastres *et. al.* (1994), analizando las vías de señalización intracelular, demostraron que TGF- β 1 induce la actividad PKC, así como una fosforilación de PECAM-1 y una asociación a los componentes del citoesqueleto. Además, propusieron un modelo de mecanismo autocrino para la liberación de la forma biológicamente activa de TGF- β 1, permitiendo la activación de PECAM-1. El mecanismo propuesto por estos autores se muestra en la **Figura 1.6**. Los resultados expuestos proporcionaron la evidencia que TGF- β 1 regula la función de PECAM-1 incrementando la expresión y activando la adhesión de células monocíticas mediada por PECAM-1. Estos dos mecanismos parecen ser necesarios para la adhesión porque la inhibición independiente tanto de la expresión como de la activación de PECAM-1 condujo a la inhibición de la agregación celular. Lastres *et. al.* (1994) han descrito que el factor de crecimiento TGF- β 1 es capaz de inducir tanto la fosforilación de PECAM-1 como su asociación a citoesqueleto. La fosforilación de PECAM-1 en residuos de tirosina también ha sido descrita en neutrófilos no activados (Skubitz *et. al.*, 1994).

- **Implicación de PECAM-1 en los procesos de inflamación e interacción entre células endoteliales y leucocitos**

El reclutamiento de los leucocitos hacia los sitios de inflamación se produce como consecuencia de una cascada de eventos en los cuales las moléculas de adhesión celular, las citoquinas y sustancias quimiotácticas funcionan de un forma altamente regulada para dirigir los leucocitos desde el lumen, a través de la barrera endotelial, hasta donde se produce el estímulo inflamatorio (Albelda *et. al.*, 1994). Recientemente, se ha demostrado que PECAM-1 está implicado en dicho proceso utilizando dos modelos diferentes de activación de neutrófilos; se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra PECAM-1 bloquean la acumulación de neutrófilos en los sitios de inflamación tras la inducción de peritonitis aguda (Bogen *et. al.*, 1994), o la inducción de la respuesta inflamatoria, como respuesta a la inflamación en ratones inmunodeficientes y en ratas (Vaporician *et. al.*, 1993). Aunque el papel preciso que juega PECAM-1 en el reclutamiento de leucocitos *in vivo* no está claro, los estudios *in vitro* han implicado a esta molécula en ambos lados de la interacción, es decir, tanto en el endotelio como en los leucocitos. Las evidencias en el sentido de la contribución de PECAM-1 presente en el endotelio han sido aportadas por Muller *et. al.* (1993), quien demostró que tanto anticuerpos anti-PECAM-1, como una forma soluble recombinante de la proteína, bloqueaban la migración de los leucocitos a través del endotelio sin afectar la adhesión de dichas células. Por otro lado, también hay razones para suponer que PECAM-1, presente en la membrana leucocitaria, pueda estar implicada en este proceso, ya que anticuerpos dirigidos contra la proteína aumentan la capacidad de adhesión celular mediada por integrinas (Torimoto *et. al.*, 1992; Berman *et. al.*, 1992; Piali *et. al.*, 1993). Recientemente, se ha descubierto que la transmigración endotelial y la migración intersticial están mediadas por diferentes dominios de la molécula de PECAM-1 (Liao F. *et. al.*, 1995). Mientras que la interacción homofílica de la región amino terminal del PECAM-1 leucocitario con PECAM-1 endotelial está implicada en la migración transendotelial *per se*, la interacción heterofílica entre la región próxima a la membrana de PECAM-1 del leucocito con el proteoglicano heparán sulfato (como puede ser perlecano) en la lámina basal del endotelio, y posiblemente más profundamente en los tejidos intersticiales, está implicada en la transmigración de los leucocitos a través de la matriz extracelular. En la **Figura 1.4** se muestra un diagrama esquemático de la molécula PECAM-1 con los epítomos reconocidos por los Am, así como la función para estos dominios. Si la interacción de PECAM-1 con un proteoglicano sirve para promover la adhesión directamente, activando las integrinas leucocitarias (Berman *et. al.*, 1995; Tanaka *et. al.*, 1992; Piali, *et. al.*, 1993), o si esta interacción provoca una estimulación de la secreción monocítica de proteasas que degradan la matriz está siendo investigado.

Hasta el momento, es la primera vez que una molécula implicada en la adhesión del leucocito al endotelio utiliza distintos dominios en dos mecanismos diferentes de interacción (homofílico y heterofílico) para mediar dos funciones separadas y secuenciales: la migración transendotelial y la migración a través de la matriz extracelular. Es de destacar que otras

moléculas de adhesión, como son Ng-CAM, (Grumet *et. al.*, 1992), y N-CAM también presentan ambas funciones de interacción homofílica y heterofílica. N-CAM se une a sí misma a través de su dominio 3 (Rao *et. al.*, 1992) y a heparina, a través del dominio 2 (Reyes *et. al.*, 1990). Los dominios responsables de las interacciones de unión de Ng-CAM consigo misma (Grumet *et. al.*, 1992) o con ligandos heterofílicos como laminina (Grumet *et. al.*, 1993) y proteoglicanos condroitín sulfato (Friedlander *et. al.*, 1995; Milev *et. al.*, 1995) todavía no han sido identificados.

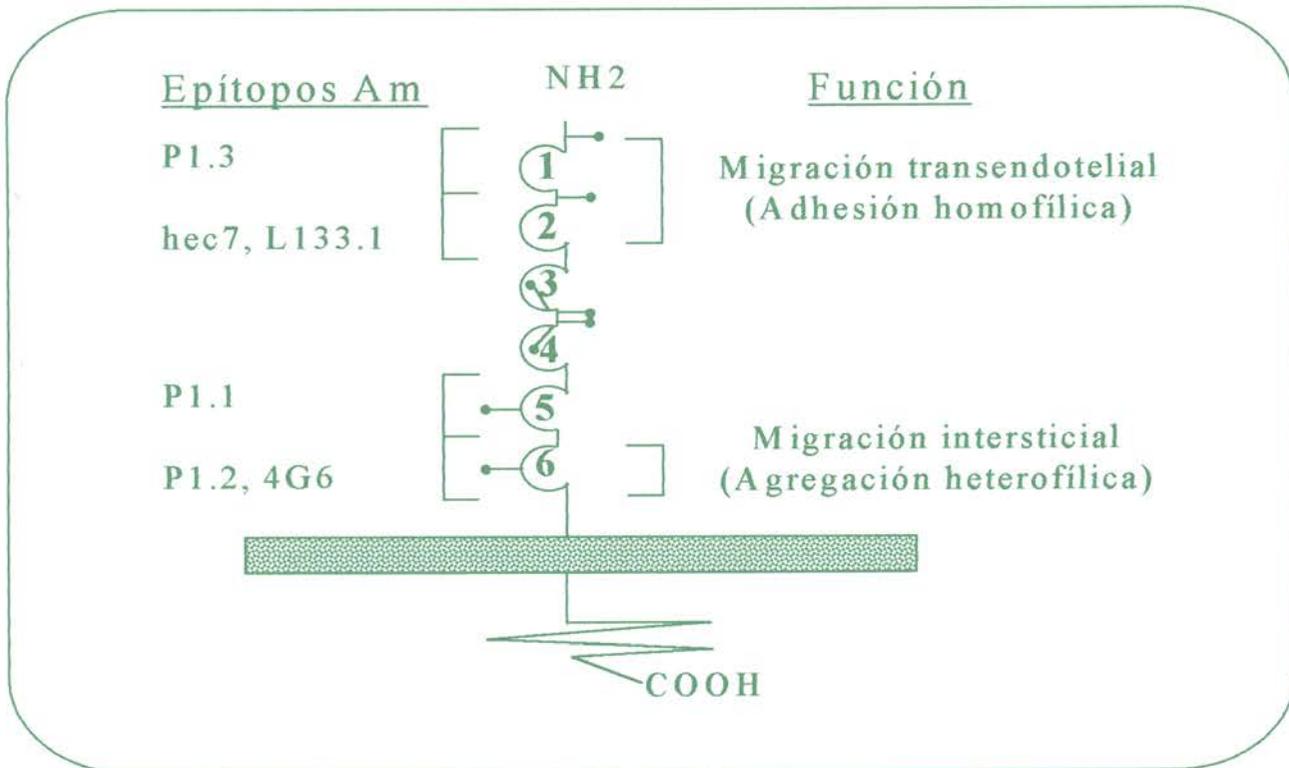


Figura 1.4.- Diagrama esquemático de la estructura de los dominios de Inmunoglobulinas de PECAM-1 identificando los posibles dominios responsables de la transmigración endotelial y la migración intersticial. En la parte izquierda de la figura se muestran los epítomos que reconocen los Am utilizados por los autores. (Liao *et. al.*, 1995. *J. Exp. Med* 182: 1337-1343).

• Función de PECAM-1 en células vasculares

Hasta ahora hemos descrito evidencias que sugieren que PECAM-1 es un elemento clave en la extravasación de los leucocitos durante los procesos inflamatorios. Muller *et. al.* (1993) fueron los primeros en demostrar que monocitos o neutrófilos pretratados con anticuerpos específicos frente a PECAM-1 inhibían su emigración a través de la monocapa en experimentos de migración transendotelial *in vitro*. El bloqueo de las uniones intercelulares de PECAM-1 también inhibía la transmigración leucocitaria, indicando que las moléculas de PECAM-1, tanto del endotelio como del leucocito, contribuían al proceso de transmigración. El requerimiento de PECAM-1 en el reclutamiento de los leucocitos dio el mismo resultado *in vivo*, ya que anticuerpos frente a PECAM-1 bloquearon la acumulación de neutrófilos en la

cavidad peritoneal, el compartimento alveolar, y en injertos de piel en humanos en tres modelos diferentes de inflamación en ratas (Vaporciyan *et. al.*, 1993). La utilización de un Am frente a PECAM-1 de ratón también ha reducido eficientemente la emigración de los leucocitos hacia la cavidad peritoneal en un modelo de ratón con peritonitis aguda (Bogen *et. al.*, 1994). Recientemente, se han realizado estudios experimentales con PECAM-1 de una relevancia potencial en cuanto a una posible futura aplicación en enfermedades humanas. Dos grupos de investigación diferentes han demostrado que anticuerpos frente a PECAM-1 reducen el tamaño de infarto de miocardio en ratas (Gumina *et. al.*, 1997) y reducen considerablemente el daño provocado durante un proceso de isquemia-reperusión en gatos (Murohara *et. al.*, 1996). Las funciones mediadas por PECAM-1 en otras células sanguíneas o de origen vascular han sido menos estudiadas. Ohto *et. al.* (1985) han demostrado que ciertos Am frente a PECAM-1 son capaces de inhibir quimiotaxis en neutrófilos y monocitos. Se ha reportado que células NIH/3T3 trasfectadas con PECAM-1 reducen considerablemente su migración celular (Schimmenti *et. al.*, 1992), probablemente debido a su habilidad para estabilizar los contactos intercelulares. PECAM-1 también se ha implicado en el desarrollo de una respuesta aloimmune por el linfocito T. Zehnder *et. al.* (1992) reportaron que Am dirigidos frente al dominio 6 de PECAM-1 inhibía la activación del linfocito T, mientras que recientemente Behar *et. al.* (1996) han descrito un polimorfismo en la Leu98Val de PECAM-1 de forma que cuando los genotipos del donante y del receptor no son idénticos, el riesgo de rechazo agudo del órgano transplantado se incrementa. A pesar de que PECAM-1 debe su nombre a su identificación inicial en la superficie de las plaquetas, en la práctica, muy poco se conoce acerca del papel que PECAM-1 juega en la función plaquetaria. Recientes estudios sugieren que podría servir como un receptor agonista que modulara la función de las integrinas β_3 .

- **PECAM-1 como transductora de señales hacia y desde el interior celular**

Las primeras evidencias experimentales que implicaron a PECAM-1 como transductora de señal provienen de experimentos realizados por Tanaka *et. al.* (1992) que demostraron que la dimerización de PECAM-1 inducida con anticuerpos sobre la superficie de la célula T provocaba un incremento de la adhesión a sustratos de integrinas como eran VCAM-1 (vía $\alpha_4\beta_1$) y fibronectina (vía $\alpha_5\beta_1$). Fragmentos monovalentes $F(ab')_2$ o anticuerpos PECAM-1 sobre la superficie celular eran los responsables de la regulación positiva observada en la función de la integrina β_1 . Paralelamente, ensayos de entrecruzamiento de PECAM-1 en células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$ (Leavesley *et. al.*, 1994) indujeron la modulación de la afinidad de las integrinas β_1 . Además, la función de las integrinas leucocitarias β_2 parece ser modulada por la dimerización de PECAM-1 en células killer activadas con linfoquinas (Albelda *et. al.*, 1990), en monocitos y neutrófilos (Berman *et. al.*, 1995) y en células NK (Berman *et. al.*, 1996). Recientemente, se ha implicado a las integrinas β_3 en la transducción de las señales plaquetarias mediadas por PECAM-1. En este caso fragmentos $(Fab')_2$ específicos frente al dominio 6 de PECAM-1 transforman el complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ desde un estado de reposo a

un estado conformacionalmente activado y un aumento de la adhesión plaquetaria y de la agregación (Newman *et. al.*, 1996). DeLisser *et. al.* (1994) han demostrado que fibroblastos de ratón transfectados con isoformas de PECAM-1 que carecen de parte del dominio citoplásmico son incapaces de asociarse con fibroblastos sin transfectar, estando de acuerdo con la hipótesis de considerar a PECAM-1 como una mediadora de la transducción de señales para lo cual requiere el dominio citoplásmico para transmitir señales desde el dominio extracelular hacia el citosol. Si tomamos todos estos datos en conjunto, es como si la dimerización de PECAM-1 fuera capaz de transmitir señales hacia el interior de la célula, un proceso que imitaría las interacciones homofílicas de PECAM-1 entre el leucocito y las células endoteliales durante la migración transendotelial. Este papel dual propuesto para PECAM-1 serviría tanto como receptor agonista así como un receptor de adhesión en células vasculares. No obstante, quedaría por conocer cual podría ser el mecanismo por el cual PECAM-1 actúa como transductor de señales dando lugar por un lado a la activación de integrinas, y por otro lado induciendo una interacción heterofílica.

Al igual que otras proteínas receptoras tirosín-quinasa (como los receptores de PDGF, FGF, VEGF, NGF, y M-CSF), el dominio extracelular de PECAM-1 está constituido por dominios de homología con las inmunoglobulinas. Pero el dominio citoplásmico de PECAM-1, no contiene un dominio con actividad catalítica quinasa siendo por tanto incapaz de activarse por autofosforilación una vez que un ligando (por ejemplo PECAM-1) se une a él. Estudios previos, han demostrado que PECAM-1 es fosforilado en tirosina, tanto en plaquetas humanas (Modderman *et. al.*, 1994), como en células endoteliales en cultivo (Lu *et. al.*, 1996). Jackson *et. al.* (1996) han demostrado recientemente que cuando PECAM-1 se fosforila, la Tyr663 del dominio citoplásmico se convierte en el sitio de acoplamiento para una proteína tirosín-fosfatasa (SHP-2) a través de su dominio (SH2) o de homología a SRC. SHP-2 es una proteína tirosín-fosfatasa de expresión ubicua que contiene dos dominios SH2 en el extremo amino terminal de la proteína, seguido por un dominio catalítico de fosfatasa, y una región carboxílica terminal que puede autofosforilarse (Freeman *et. al.*, 1992; Ahmad *et. al.*, 1993; Feng *et. al.*, 1993; Vogel *et. al.*, 1993). SHP-2 anteriormente se había asociado con varios receptores tirosinas quinasa autofosforilables, incluyendo el PDGF y el receptor EGF (Feng *et. al.*, 1993; Vogel *et. al.*, 1993; Kuhne *et. al.*, 1993; Lechleider *et. al.*, 1993). Se desconoce por el momento, el mecanismo por el que la asociación de SHP-2 con el dominio citoplásmico de PECAM-1 se convierte en una señal transductora hacia las células vasculares. En otros tipos celulares, SHP-2 se ha implicado como molécula de señalización multifuncional actuando tanto como una fosfatasa para activar las quinasa de la familia Src, como un mediador de la activación p21^{ras} debido a su capacidad de unirse al complejo Grb2/Sos (Stone *et. al.*, 1994; Feng *et. al.*, 1994; Streuli *et. al.*, 1996).

Además de su papel como activador de integrinas por su acción transductora de señales (de fuera hacia dentro) de la célula, PECAM-1 parece ser capaz de responder a las interacciones de las integrinas tanto con la matriz extracelular, como con los receptores de la

superficie celular. Recientemente, Lu *et. al.*, (1996) han demostrado que la función de integrinas en cultivos de células endoteliales trae consigo la defosforilación de PECAM-1, mientras que Jackson *et. al.*, (1996) han demostrado que las interacciones mediadas por las integrinas dan lugar a un incremento de la fosforilación en tirosina de PECAM-1 cuando se agregan las plaquetas humanas. Posiblemente, exista un balance entre la actividad quinasa y fosfatasa que controle el estado de fosforilación no sólo de PECAM-1 sino de otros receptores celulares, aunque las diferencias observadas en el estado de fosforilación de PECAM-1 en estos dos tipos celulares en respuesta a la actuación de las integrinas no se conoce aún. En la **Figura 1.5** se muestra un diagrama esquemático sobre el posible papel de PECAM-1 como transductor de señal en células sanguíneas y de la vasculatura.

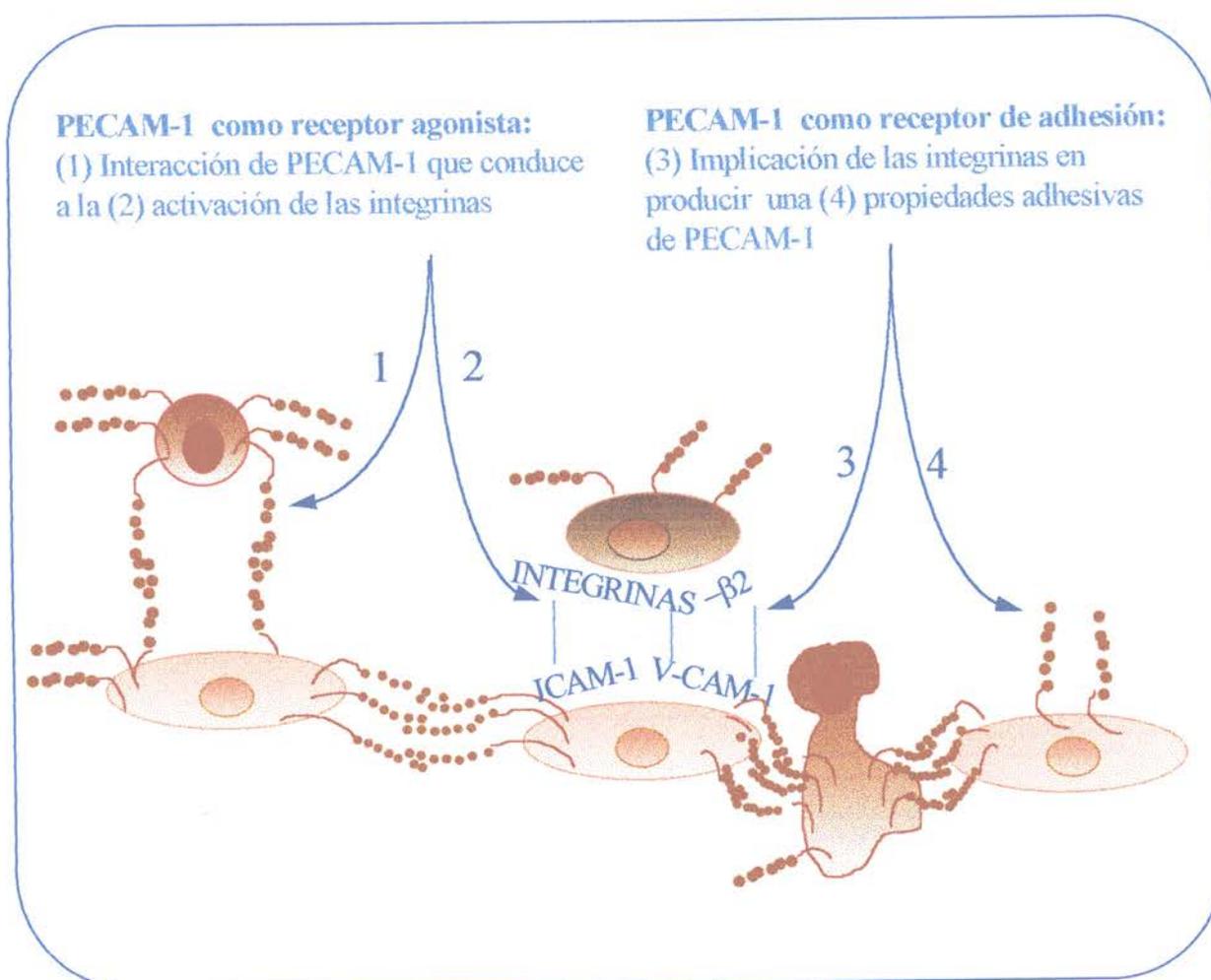


Figura 1.5.- Dualidad en el papel funcional de PECAM-1 en las interacciones leucocito/endoteliales. Se representan dos funciones receptoras de PECAM-1 que no se excluyen mutuamente. En la parte izquierda de la figura, se representa la interacción homofílica de las moléculas de PECAM-1 entre leucocitos en circulación y la monocapa de células endoteliales (1). Este hecho inicia los acontecimientos de transducción de señal intracelular que dan como resultado la regulación positiva de la afinidad de las integrinas leucocitarias, facilitando consecuentemente interacciones con los contra-receptores de las células endoteliales (2). Las interacciones celulares mediadas por las integrinas leucocitarias (3), a su vez, vía amplificadora de transducción de señales citosólica, dan como resultado la fosforilación de PECAM-1 y la unión de moléculas adicionales señalizadoras, algunas de las cuales modulan la afinidad de PECAM-1 y posibilitan la migración transendotelial. (P.J. Newman (1997). *J. Clin. Inv.* 99, 3-8).

Las propiedades adhesivas de PECAM-1 también pueden ser reguladas en presencia de TGF- β por un mecanismo de dentro-fuera (Figura 1.6). Así en monocitos, TGF- β 1 dispara la agregación homotípica mediada por PECAM-1 e induce la fosforilación del dominio citoplásmico de PECAM-1 y su asociación con el citoesqueleto (Lastres *et. al.*, 1994). Esto está de acuerdo con el hecho de que deleciones del dominio citoplásmico afectan las interacciones homofílicas y heterofílicas (DeLisser *et. al.*, 1994a).

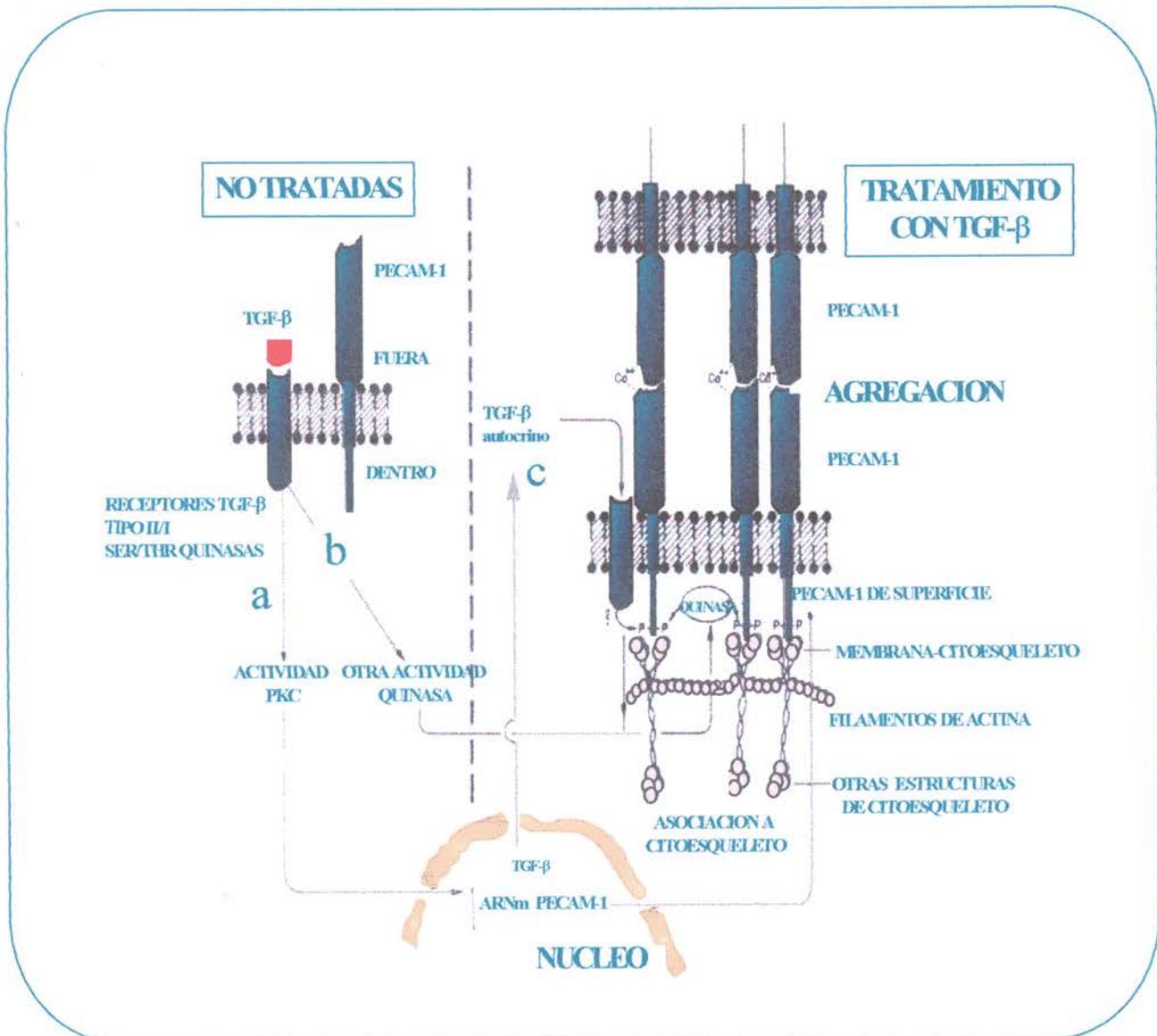


Figura 1.6.- Regulación funcional de PECAM-1 por TGF- β 1. a) TGF- β 1 se une a los receptores señalizadores en la membrana de la célula, lo que conduce a la activación de alguna isoforma citosólica de la PKC, el aumento de esta actividad quinasa es responsable del aumento de la tasa de transcripción y expresión en membrana de PECAM-1. b) TGF- β 1 activa otra quinasa, de naturaleza desconocida hasta el momento, la cual fosforila a PECAM-1, promoviendo en este estado su asociación al citoesqueleto. Una vez ocurridos estos eventos, PECAM-1 adquiere una conformación activa desde el punto de vista de la adhesión, uniéndose a su receptor en otra células. En la figura hemos representado un modelo de unión homofílico. c) El TGF- β añadido exógenamente induce la síntesis de forma autocrina de más TGF- β 1, lo que permite una amplificación de los procesos a y b. (Lastres *et. al.*, 1994, *Journal of Immunology*, 153: 4206-4218).

- **Angiogénesis y metástasis tumoral**

La angiogénesis o neovascularización depende de las interacciones adhesivas entre células de la vasculatura endotelial (McCormick, *et. al.*, 1992; Bischoff, *et. al.*, 1995). Las moléculas de adhesión endotelial facilitan el paso de leucocitos hacia los tejidos inflamados. Este hecho promueve la neovascularización constituyendo un proceso central en la progresión de la artritis reumatoide, crecimiento tumoral y la cicatrización de heridas. Curiosamente, se han descrito formas solubles de moléculas de adhesión como son la E-selectina y VCAM-1 que promueven angiogénesis (Koch *et. al.*, 1995). Recientemente, se ha identificado en plasma, una forma soluble de PECAM-1, cuya función todavía no se conoce. Varias líneas de investigación han sugerido la implicación de PECAM-1 en los procesos de angiogénesis. Así, Albelda *et. al.* (1990), demostraron que las células endoteliales crecidas en presencia de anticuerpos anti-PECAM-1 no podían formar normalmente los contactos célula-célula, y dicha inhibición podía ser revertida tras retirar dichos anticuerpos. Por otro lado, la adición de estos anticuerpos a monocapas de células endoteliales en cultivo no tenía ningún efecto. Estos resultados sugieren que PECAM-1 es importante para la iniciación de los contactos célula-célula pero no para su mantenimiento (Fawcett *et. al.*, 1995). Estudios recientes sobre la expresión de PECAM-1 durante el desarrollo morfogénico murino están de acuerdo con los hallazgos en la angiogénesis humana (Baldwin *et. al.*, 1994). El establecimiento del sistema cardiovascular, uno de los eventos más críticos en el desarrollo del embrión de vertebrados, depende de la interacción de las células endoteliales con las células adyacentes y con la matriz extracelular. PECAM-1 es una de las primeras moléculas de adhesión endotelial que aparece durante el desarrollo embrionario. De este trabajo se deduce además, que PECAM-1 es uno de los marcadores más tempranos de la diferenciación del endocardio y que su expresión podría estar regulada durante el desarrollo cardiovascular. Por otro lado, se ha demostrado un incremento de la expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ en el endotelio vascular angiogénico (Brooks *et. al.*, 1994). El bloqueo de $\alpha_v\beta_3$ con antagonistas interrumpe la formación de nuevos vasos sanguíneos y conduce a las células endoteliales hacia apoptosis (Brooks *et. al.*, 1994).

De forma similar a los leucocitos, las células malignas metastáticas son transportadas por la sangre a los tejidos más distales (Stoolman *et. al.*, 1992). La elevada expresión de $\alpha_v\beta_3$ sobre melanomas se relaciona directamente con el incremento de la malignidad de tumores (Albelda *et. al.*, 1990; Marshall *et. al.*, 1991; Felding-Habermann *et. al.*, 1992; Gehlsen *et. al.*, 1992). Todas las células metastáticas deben adherirse al endotelio vascular antes de alcanzar la matriz subendotelial que contienen los ligandos para $\alpha_v\beta_3$ (Weiss *et. al.*, 1989). Es posible que PECAM-1 juegue un papel importante en la adhesión al endotelio de las células tumorales como paso importante en el proceso de metástasis.

1.5.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

1.5.1.- Regulación por citoquinas inflamatorias.

El mantenimiento de los leucocitos en circulación en condiciones normales y su adhesión al endotelio, así como la subsiguiente emigración desde el sistema circulatorio hasta los sitios de inflamación, es un fenómeno que está cuidadosamente regulado. Parte de este control reside en la regulación existente de las moléculas de adhesión de la superficie de leucocitos y células endoteliales. La importancia de las moléculas de adhesión y su regulación se demuestra en enfermedades tales como la aterogénesis, en la que el endotelio muestra una adhesividad anormal (Endemann *et. al.*, 1987; Territo *et. al.*, 1989) y en la deficiencia de la adhesión leucocitaria (LAD) donde la falta de expresión de moléculas de adhesión sobre los neutrófilos provoca una respuesta inmune disminuída (Anderson *et. al.*, 1987).

Las células endoteliales expresan moléculas de adhesión que pertenecen a la clase de las selectinas y de la IgSF capaces de interactuar con los linfocitos. La mayoría de estos receptores se encuentran normalmente ausentes de la superficie endotelial, y aparecen paralelamente con la respuesta inmune e inflamatoria.

1.5.1.1.- Regulación de las Selectinas.

Dentro de la familia de las selectinas, la P-selectina y E-selectina son receptores que median la adhesión de neutrófilos al endotelio (Springer *et. al.*, 1990; Zimmerman *et. al.*, 1992; McEver *et. al.*, 1992; Lasky *et. al.*, 1992). La presencia de las tres selectinas en la superficie celular está regulada por varios mecanismos. La L-selectina se expresa constitutivamente en la superficie de leucocitos, pero es rápidamente eliminada de la superficie de neutrófilos en cuestión de minutos tras una activación con factores quimitácticos o con ésteres de forbol (Kisimoto *et. al.*, 1989b). Previamente a la rápida desaparición de la L-selectina, la activación de linfocitos y neutrófilos conduce a un incremento de la unión de la L-selectina a un polifosfomanano (Spertini *et. al.*, 1991). Esta adhesión es inducida en neutrófilos y linfocitos por estímulos específicos de las células que explicarían cómo la extravasación de los dos tipos de leucocitos puede regularse diferencialmente. La E-selectina es, en cambio, regulada transcripcionalmente en células HUVEC (Bevilacqua *et. al.*, 1989) detectándose un nivel máximo a las 3 o 4 h de activación con IL-1 o TNF- α . Los niveles basales se recuperan de nuevo transcurridas 16-24 h, al contrario que otras moléculas de adhesión inducibles por citoquinas tales como ICAM-1 y VCAM-1, de las que se detectan niveles estables en membrana durante más de 48 h tras la inducción.

La expresión de la P-selectina es regulada por dos mecanismos completamente diferentes y con distintas cinéticas. En un primer mecanismo, la P-selectina almacenada intracelularmente puede ser rápidamente transportada desde los gránulos de almacenamiento hasta la superficie celular en minutos tras una estimulación con agentes proinflamatorios tales como histamina y trombina o por ésteres de forbol (Geng *et. al.*, 1990). Esta regulación de la P-selectina se ha encontrado en plaquetas y células endoteliales y siendo la expresión de la P-selectina es transitoria. Además, existe un segundo mecanismo de regulación estudiado en células de endotelioma de ratón donde se ha encontrado una regulación transcripcional de la P-selectina similar a la de la E-selectina (Weller *et. al.*, 1992; Sanders *et. al.*, 1992). En varias líneas de endotelioma de ratón, la síntesis de la P-selectina y E-selectina se induce por TNF- α con un nivel máximo de expresión del ARNm a las 2 h, y detectándose la proteína a las 3-4 h. Ambos mecanismos de regulación pueden tener lugar en la misma célula y funcionar independientemente (Hahne *et. al.*, 1993).

1.5.1.2.- Regulación de las Integrinas.

Estudios experimentales con células endoteliales *in vitro* han mostrado, que éstas se adhieren a componentes purificados de la membrana basal y la matriz intersticial tales como laminina, colágeno IV, fibronectina, vitronectina y trombospondina. Esta adhesión es mediada por receptores de membranas celulares pertenecientes a la familia de las integrinas. En algunos tipos celulares, las integrinas no se unen a sus ligandos, a menos que las células estén activadas. Este sería el caso de la glicoproteína GP_{IIb-IIIa} plaquetaria (Philips *et. al.*, 1991), que tras una estimulación con trombina, colágeno o ADP se convierte en el receptor de al menos cuatro glicoproteínas solubles: fibrinógeno, factor de von Willebrand, fibronectina y vitronectina. En este caso la adhesión es de carácter permanente. La molécula LFA-1 sobre los linfocitos T es un ejemplo de requerimiento de activación antes de que sea funcionalmente activa (Dusting *et. al.*, 1989; Van Kooyk *et. al.*, 1989). En este caso se trataría de una activación de tipo transitorio. Estos mecanismos de adhesión dependientes de activación han sido descritos también para el receptor de fibronectina ($\alpha_4\beta_1$) y $\alpha_5\beta_1$ en células T (Shimizu *et. al.*, 1990a, b) y para Mac-1 y LFA-1 en neutrófilos (Lo *et. al.*, 1989a, b). El mecanismo molecular de activación de las integrinas parece ser debido a cambios conformacionales en el sitio de unión al ligando pasando de una forma inactiva a una forma activa (Sims *et. al.*, 1991; Kouns *et. al.*, 1992). Es posible que intervenga una señalización por interacción del dominio citoplásmico de la integrina con las proteínas del citoesqueleto. En linfocitos tratados con PMA, la talina, pero no la vinculina o la α -actina, se codistribuye en la célula con las integrinas (Burn *et. al.*, 1988), pero no se sabe si la redistribución se debe a una fosforilación de la talina o de otros componentes del citoesqueleto. Ciertos lípidos son también capaces de regular la actividad de las integrinas como es el caso de los disialogangliósidos que en células de melanoma aumentan la activación del receptor de vitronectina ($\alpha_5\beta_3$) (Cheresh *et. al.*, 1987) o un lípido llamado IMF-1 (*integrin modulating factor-1*) que modula la activación de integrinas (Hermanowski-Vosatka *et. al.*, 1992). Existen mecanismos de activación de las integrinas

independientes de PMA como son tratamientos con cationes divalentes como Mn^{2+} (Hautanen *et. al.*, 1991), anticuerpos frente a algunas subunidades de las integrinas (Frelinger *et. al.*, 1991; van de Wiel-Van Kemenade *et. al.*, 1992; Arroyo *et. al.*, 1992) o con ligandos peptídicos (Du *et. al.*, 1991). Se cree que la actividad inducida por estos agentes debe imitar los cambios conformacionales que tiene lugar cuando las células se tratan con PMA. No obstante, se debe tener en cuenta que el efecto estimulante de la adhesión inducida por algunos anticuerpos no depende sólo de cambios conformacionales, sino que se requieren tanto energía metabólica como un citoesqueleto intacto.

La regulación de las integrinas por citoquinas inflamatorias provoca una reducción de la adhesión de la célula endotelial a laminina y vitronectina, componentes de la matriz subendotelial. La integrina $\alpha_v\beta_3$, que es un receptor para vitronectina, fibronectina y factor de von Willebrand, está regulada por citoquinas, siendo regulada negativamente por el tratamiento combinado de TNF- α e IFN γ (Defilippi *et. al.*, 1991b). Esta regulación negativa de $\alpha_v\beta_3$ en la superficie celular conduce a una bajada de la adhesión a vitronectina. IL-1 β por el contrario, no altera la expresión de la integrina en la superficie de la célula endotelial. La regulación negativa del receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) no implica una regulación transcripcional; sino que ocurre a nivel traduccional. De hecho, el descenso de la síntesis de la subunidad β_3 no va acompañada de alteración en el correspondiente ARNm (Defilippi *et. al.*, 1991).

1.5.1.3.- Regulación de PECAM-1 y otros miembros de la IgSF.

La inducción de moléculas de adhesión puede deberse a distintos mecanismos. La inducción de ICAM-1 por trombina, es debida a la secreción de un reservorio celular presintetizado al igual que ocurría con la P-selectina (Sugama *et. al.*, 1992). Este proceso no requiere síntesis de ARN o proteína y es muy rápido (minutos) y puede imitar la estimulación mediada por PMA, sugiriendo la implicación de la proteína quinasa C (PKC) (Zimmerman *et. al.*, 1992). La inducción de este receptor de adhesión por citoquinas inflamatorias requiere mecanismos regulados transcripcionalmente. Se ha descrito que TNF- α activa su transcripción vía tanto AP1 como NF κ B, mientras que IFN- γ actúa a través de factores de transcripción que se unen a regiones del ADN que son elementos de respuesta a IFN- γ (Israel *et. al.*, 1989; Jaattela *et. al.*, 1991). El análisis de la región regulatoria de ICAM-1 ha revelado la presencia de elementos de respuesta a TNF- α que son responsables de la inducción de la transcripción de ICAM-1 (Voraberger *et. al.*, 1991). TNF- α e IFN- γ actúan sinérgicamente para incrementar la transcripción de MHC (Jaattela *et. al.*, 1991), sugiriendo que las dos citoquinas activan dos factores diferentes de transcripción, pudiendo actuar de forma independiente sobre diferentes sitios de unión al ADN.

El análisis de las cinéticas de regulación de los receptores de adhesión muestran que existen tres mecanismos: uno muy rápido (en minutos), otro intermedio (2-8 h), y un tercer

mecanismo tardío (48-72 h). Los receptores de membrana de las células que están en circulación entrarían en las dos primeras categorías de regulación, en cambio, la regulación de las integrinas entrarían en el mecanismo de regulación tardío. La regulación de las integrinas puede jugar un papel importante en la reducción de la adhesión de las células endoteliales a la membrana basal permitiendo la transmigración de las células sanguíneas e incrementando la permeabilidad de la pared vascular. A este respecto hay que mencionar que TNF- α inhibe la síntesis de colágeno (Jaattela *et. al.*, 1991) e induce la secreción de uroquinasa y colagenasa (Van Hinsbergh *et. al.*, 1990). Todos estos procesos pueden contribuir a la pérdida de adhesividad de las células a la matriz. Es posible que la disminución de la adhesión a la membrana basal inducida por TNF- α sea un primer paso en la transición de un comportamiento estacionario a uno móvil.

Estudios previos sobre otra molécula de adhesión que pertenece a esta superfamilia como es PECAM-1 mostraron que su expresión varía durante el proceso de diferenciación mielomonocítica (Goyert *et. al.*, 1986; Ohto *et. al.*, 1985; Cabañas *et. al.*, 1989; Goldberger *et. al.*, 1994). La expresión de PECAM-1 en superficie está aumentada en monocitos en cultivo *in vitro* y en líneas celulares monocíticas cuando se diferencian con ésteres de forbol a líneas macrofágicas. Por tanto, el tratamiento de células monocíticas U-937 y HL-60 con PMA o vitamina D3 no sólo incrementa la expresión en superficie sino que también aumentan los transcritos específicos de PECAM-1 (Bellón 1992., Tesis doctoral).

Una de las principales características de las uniones endoteliales es su organización dinámica. Las células endoteliales necesitan estar constantemente cambiando la arquitectura de sus uniones para permitir el paso de los constituyentes plasmáticos (Dejana *et. al.*, 1995). Rival *et. al.* (1996) han estudiado el efecto ejercido por la asociación de dos citoquinas inflamatorias TNF- α e IFN- γ sobre la organización de PECAM-1. Estudios anteriores habían demostrado que estas citoquinas actúan sinérgicamente modulando diversas propiedades funcionales de las células endoteliales (Stolpen *et. al.*, 1988; Mantovani *et. al.*, 1992; Marfaing-Koka *et. al.*, 1995) tales como la activación de la óxido-nítrico sintetasa (Rosenkranz *et. al.*, 1993), la expresión del receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) (Defilippi *et. al.*, 1991) o la permeabilidad del endotelio *in vitro* (Brett *et. al.*, 1989; Beynon *et. al.*, 1993) e *in vivo* (Yi *et. al.*, 1992). Además, el tratamiento combinado de ambas citoquinas provoca la elongación y solapamiento de las células endoteliales así como el reordenamiento de los microfilamentos de actina (Stolpen *et. al.*, 1986), sugiriendo que podría modificarse la arquitectura de las uniones intercelulares así como la desaparición de PECAM-1 de las uniones intercelulares. Este efecto está relacionado con dos fenómenos: por un lado la internalización y degradación de las moléculas de PECAM-1 preexistentes y la inhibición de la síntesis de PECAM-1. Además se produce una redistribución de PECAM-1 en la superficie de la célula (Romer *et. al.*, 1996; Rival *et. al.*, 1996). Otros autores han reportado que la síntesis de PECAM-1 puede estar regulada en leucocitos (Stockinger *et. al.*, 1990) y linfocitos T (Zehnder *et. al.*, 1992). Romer

et. al., (1996) han reportado que la administración de IFN- γ o TNF- α alteraba la localización de PECAM-1 en las uniones intercelulares del endotelio, y este efecto no parecía ir acompañado por una inhibición de la expresión de PECAM-1 en membrana. Rival *et. al.* (1996) han confirmado estas observaciones, pero a diferencia de los anteriores, no ven una reducción de los niveles de PECAM-1 cuando las células se tratan sólo con TNF- α , ni observan cambios en la distribución intercelular de PECAM-1. Stewart *et. al.* (1996) han observado que el tratamiento con IFN γ y/o TNF- α provocaba una disminución de los niveles de ARNm asociado a una marcada desestabilización del ARNm sin que se produzcan cambios en la transcripción del gen. Esta disminución del ARNm se asocia con una disminución de la cantidad total celular de PECAM-1 en la superficie de las células endoteliales. Posiblemente, la discrepancia en los resultados obtenidos por estos tres grupos de trabajo citados sea debida a una diferencia en las concentraciones de citoquinas utilizadas y en los tiempos de tratamiento, así como el número de pases de las células endoteliales que modifican la sensibilidad de éstas a citoquinas inflamatorias. Para explicar estas aparentes contradicciones, se han propuesto distintos estados de respuesta de las células endoteliales a las citoquinas. De esta manera, altas concentraciones de TNF- α o IFN- γ inducen una redistribución parcial de PECAM-1 fuera de las uniones intercelulares sin cambiar el nivel de proteína (Romer *et. al.*, 1996). Cuando las dos citoquinas se administran conjuntamente, el efecto es más marcado, no se localiza PECAM-1 en las uniones intercelulares, y se inhibe su síntesis. Se ha encontrado que las dos citoquinas actúan sinérgicamente en otras respuestas funcionales de las células endoteliales (Pober *et. al.*, 1990; Mantovani *et. al.*, 1992).

El tratamiento sencillo o doble con TNF- α e IFN- γ provoca un aumento de la expresión de ICAM-1 que va acompañado de un aumento de la adhesión de PMN a las células endoteliales. En cambio, el tratamiento doble provoca una disminución de la transmigración de los PMN en comparación con el tratamiento sencillo, sugiriendo que PECAM-1 es requerida para esta función y por tanto ICAM-1 no es suficiente para la transmigración de los PMN si PECAM-1 no se expresa correctamente (Muller *et. al.*, 1993; Rival *et. al.*, 1996). La pérdida de PECAM-1 de las uniones intercelulares podría servir como un mecanismo de retroalimentación para la infiltración de los PMN inducidos por citoquinas inflamatorias hacia los lugares de la inflamación. De esta manera, en los estadios tempranos de la inflamación, las citoquinas estimularían la localización de PMN y la emigración de las distintas moléculas de adhesión expresadas en las células endoteliales y citoquinas quimiotácticas (Pober *et. al.*, 1990, Carlos *et. al.*, 1994; Duperray *et. al.*, 1994). Sin embargo, en los últimos estadios de la inflamación, las citoquinas inflamatorias reducen la infiltración de los PMN y el daño tisular asociado al mismo, disminuyendo la expresión de PECAM-1 en la superficie de la célula. La reducción de la síntesis y expresión en la superficie celular de PECAM-1 puede afectar a otras funciones vasculares. Así, se ha encontrado que TNF- α e IFN γ aumentan la permeabilidad de las células endoteliales (Brett *et. al.*, 1989; Yi *et. al.*, 1992). Sin embargo, mientras que este efecto requiere un mecanismo de corta duración (2-3 h), el producir una alteración detectable de la distribución de PECAM-1 requiere entre 6-24 h. Ambas citoquinas producen además un

alargamiento y un solapamiento de las células endoteliales que no parece depender de PECAM-1, ya que similares cambios se han podido inducir por las citoquinas administradas de forma individualizada que no provocaban ningún efecto en la expresión de PECAM-1.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con células promonocíticas U-937 (Lastres *et. al.*, 1994) han demostrado que TGF- β 1 induce una agregación homotípica entre células monocíticas que es mediada por PECAM-1. TGF- β 1, por tanto, regula la función de PECAM-1 aumentando su expresión y activando sus propiedades adhesivas. Esta citoquina aumenta tanto la expresión de PECAM-1 en la superficie de las células, como los niveles del ARNm y parece ser que este proceso implica la vía de señalización de PKC, así como la fosforilación de PECAM-1 y su asociación a citoesqueleto. Otras moléculas que pertenecen a la IgSF también están reguladas por esta citoquina. Así, la expresión del antígeno carcinoembrionario (CEA) al igual que PECAM-1 está inducido por TGF- β 1 a través de una vía transductora de señales asociada con PKC (Chakrabarty *et. al.*, 1992). La expresión de N-CAM también está estimulada por TGF- β 1 (Roubin *et. al.*, 1990) mientras que la expresión de ICAM-1 está regulada negativamente por TGF- β 1 (Lastres *et. al.*, 1994).

TABLA 1.1.- Receptores de adhesión y su regulación en las células endoteliales.

MOLÉCULA	MODULADOR	REGULACIÓN	LIGANDO	CONSECUENCIA FUNCIONAL
P-selectina	Trombina, histamina	positiva ^a	glicoproteínas sialil-Lewis ^x	Adhesión de PMN
E-selectina	TNF- α , IL-1 β , IL-4	positiva ^a negativa ^b	glicoproteínas sialil-Lewis ^x	Adhesión de PMN
ICAM-1	TNF- α , IL-1 β , IFN γ , Trombina IL-4	positiva ^b positiva ^a negativa ^b	LFA-1/Mac1	Adhesión de PMN, monocitos, linfocitos y células tumorales
VCAM-1	TNF- α , IL-1 β , IL-4	positiva ^b	integrina $\alpha_4\beta_1$	Adhesión de linfocitos y células tumorales
MHC clase I	IFN α , β , γ , TNF α ,	positiva ^b	receptor de célula T, CD8	Presentador de antígeno
MHC clase II	IFN γ	positiva ^b	receptor de célula T, CD4	Presentador de antígeno
PAF	IL-1 β , TNF- α , trombina, histamina, leucotrieno C4	positiva ^a	receptor PAF	Adhesión de PMN
integrina $\alpha_1\beta_1$	TNF- α	positiva ^a	laminina (P-1) colágenos	?
integrina $\alpha_6\beta_1$	TNF- α , IL-1 β	negativa ^b	laminina (E-8)	Disminuye la adhesión a laminina
integrina $\alpha_v\beta_3$	TNF- α + INF- γ	negativa ^b	vitronectina, fibrinógeno, factor de von Willebrand	Disminuye la adhesión a vitronectina

^a La regulación es transitoria y la expresión del receptor vuelve a los niveles basales en presencia del modulador.

^b La regulación persiste en tanto en cuanto el modulador esté presente.

1.6.- ELEMENTOS DE RELEVANCIA TRANSCRIPCIONAL IDENTIFICADOS EN EL PROMOTOR DE OTRAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN. ELEMENTOS SSRE, GATA, NFκB y ELEMENTOS DE RESPUESTA A TGF-β1.

PECAM-1 se expresa en alta proporción (10^6 moléculas/célula) en células endoteliales, por lo que es de interés conocer los mecanismos de regulación de otras moléculas de adhesión presentes en endotelio. Toda alteración en el balance de los mecanismos que regulan la función endotelial es la responsable de la generación de patologías vasculares. En una aproximación del conocimiento de cómo las células endoteliales pueden coordinar la respuesta transcripcional, diversos grupos han investigado los mecanismos que controlan la expresión génica de las moléculas de adhesión identificando las secuencias en el ADN que son elementos de respuesta a diversos agentes que están asociados con desórdenes vasculares.

El factor nuclear de transcripción κB (NFκB), es un miembro pleiotrópico de la familia Rel de proteínas activadoras de la transcripción implicadas en la respuesta inmune e inflamatoria (Grilli *et. al.*, 1993). Esta familia de factores de transcripción está constituida por las subunidades p50 (NFκB1) y p52 (NFκB2), generados ambos por un procesamiento proteolítico a partir de sus moléculas precursoras p105 y p100, respectivamente. Otros miembros de esta familia son p65 (RelA), c-Rel, y RelB, que contienen potentes dominios de transactivación. Todos, pertenecen a la familia Rel de proteínas activadoras de la transcripción, la cual incluye el oncogen *v-rel*, el protooncogen *c-rel* y los factores reguladores dif y dorsal de *Drosophila*. En células en reposo, NFκB se localiza en el citosol en forma inactiva y asociada con los miembros de una familia de proteínas inhibidoras conocidas como IκB. Se han identificado varias proteínas IκB: IκB-α, IκB-β, IκB-γ, bcl-3, p100, y p105 (Beg *et. al.*, 1993; Thompson *et. al.*, 1995). Todas las formas IκB identificadas contienen múltiples copias de una secuencia proteica conocida como repeticiones anquirina. En la célula, NFκB en condiciones basales, está secuestrado en el citoplasma al menos mediante dos mecanismos (**Figura 1.7**). En el primero de ellos, IκB se une a la subunidad p65 de NFκB mediante las repeticiones anquirina presentes en el inhibidor. La unión de IκB bloquea la región donde se halla la señal de localización nuclear de NFκB impidiendo su translocación al núcleo. En el segundo mecanismo, el componente p65 de NFκB se une al precursor de p50 (p105) o de p52 (p100). Esta unión funciona igualmente como inhibidora enmascarando la señal de localización nuclear (Thanos *et. al.*, 1995).

NFκB puede ser activado por numerosos y diversos agentes tales como mediadores inflamatorios, virus y fuerzas físicas de estrés que son relevantes para la función endotelial (Grilli *et. al.*, 1993; Beg *et. al.*, 1993; Thanos *et. al.*, 1995). Entre estos agentes se incluyen citoquinas inflamatorias como IL-1β, TNF-α, lipopolisacáridos, homólogos virales, poli(I-C), así como estrés oxidativo y fuerzas mecánicas de estrés (Collins *et. al.*, 1993; Resnick *et. al.*,

1995). Este sistema regulador, puede ser inhibido por agentes antioxidantes (Offerman *et. al.*, 1994) e inhibidores de proteasoma (Read *et. al.*, 1995). Una vez se produce la activación de la

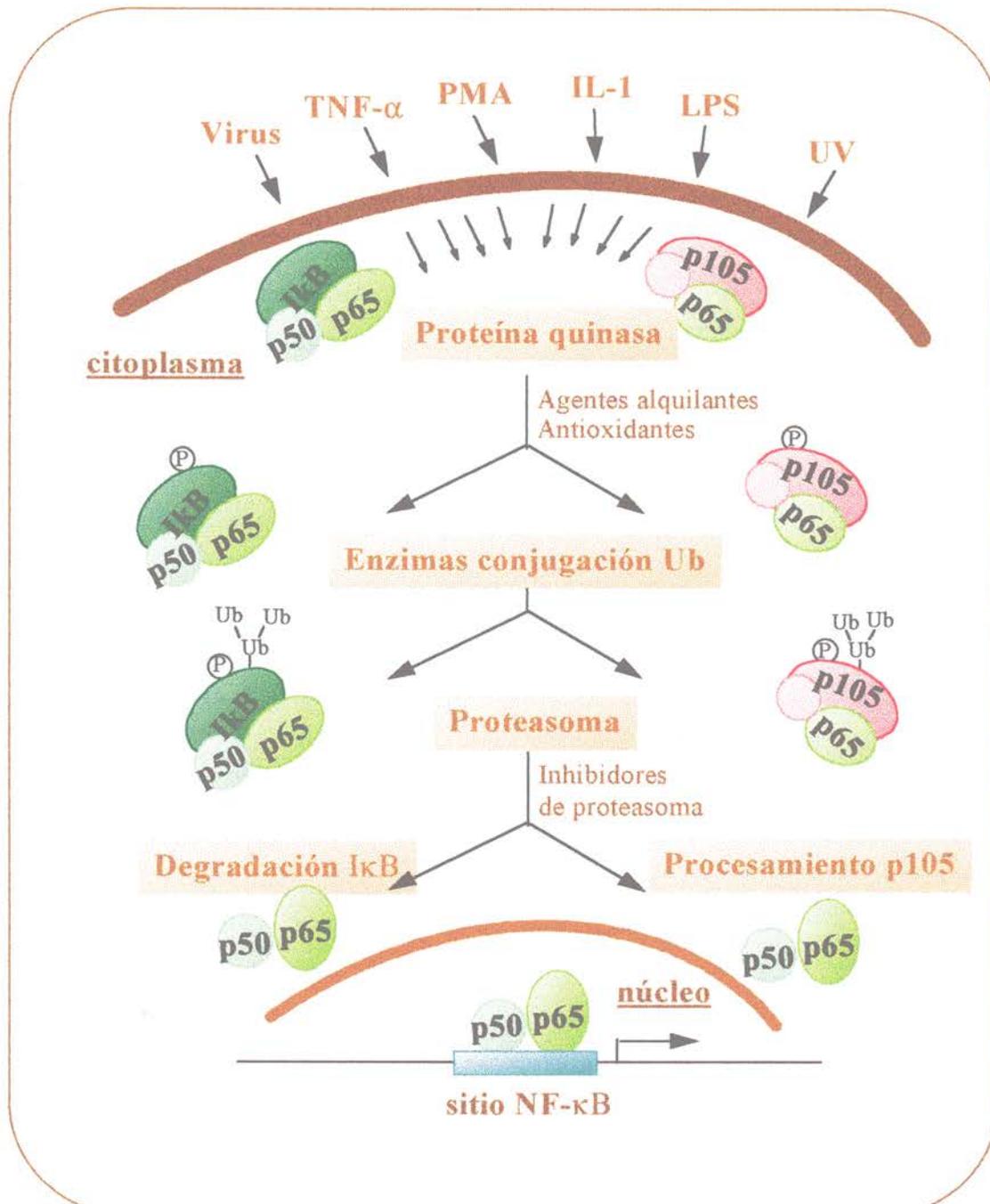


Figura 1.7.- Hipotética vía de activación de NFκB. Una de las muchas señales extracelulares que inducen la actividad NFκB, conducen a la activación de una o más vías de transducción de señal, que a su vez, conducen a la actuación de una proteína quinasa que fosforila IκB y p105. Esta fosforilación puede ser bloqueada por antioxidantes y agentes alquilantes. IκB fosforilada y p105 son reconocidos por un sistema conjugado de enzimas responsables de la adición de ubiquitina que facilita la degradación y procesamiento para producir la forma activa de NFκB, que se transloca al núcleo. Tanto la degradación como el procesamiento son bloqueados por inhibidores del proteasoma. La forma heterodimérica de NFκB entra y se acumula en el núcleo activando la expresión de numerosos genes relevantes en la patofisiología endotelial, incluyendo el gen para el inhibidor de NFκB: IκB. Una expresión incrementada de IκB reduce los niveles citoplásmicos del inhibidor y la célula endotelial vuelve a la quiescencia. (Figura tomada de Thanos *et. al.*, 1995, *Cell* 80: 529-532).

célula, I κ B- α es fosforilada y degradada. La degradación de I κ B- α y el procesamiento de la subunidad p105 hasta la forma activa p50 implican la actuación de un proteosoma proteolítico (Palombella *et. al.*, 1994; Traenckner *et. al.*, 1994). Esta acción enzimática permite la translocación y acumulación del dímero activo p50/p65 en el núcleo, el reconocimiento y unión a elementos del ADN y su participación en los mecanismos de activación transcripcional. NF κ B e I κ B- α actúan mediante un mecanismo autoregulatorio. NF κ B media la activación del gen I κ B- α , abasteciendo al citoplasma de un reservorio de su propio inhibidor (Brown *et. al.*, 1993; Sun *et. al.*, 1993; Scott *et. al.*, 1993; de Martin *et. al.*, 1993). A su vez, el reestablecimiento de la expresión de I κ B- α inhibe la activación de NF κ B disminuyendo así la expresión de genes κ B-dependientes. Este sistema NF κ B/I κ B- α juega un papel fundamental en la regulación de la actividad endotelial en los sitios de inflamación. Por tanto, cualquier alteración en este sistema regulador, se correlaciona con el establecimiento de una patología vascular.

El mecanismo regulador de la expresión de las moléculas de adhesión inducido por citoquinas, se ha estudiado en el promotor de los genes de E-selectina, VCAM-1 y ICAM-1. La E-selectina juega un papel imprescindible en el tráfico leucocitario, tanto en respuestas inflamatorias agudas como crónicas, siendo su expresión tanto específica de tejido como inducible. E-selectina normalmente no se detecta en endotelio en condiciones basales, pero es fuerte y rápidamente inducida por citoquinas inflamatorias y lipopolisacáridos. El gen de la E-selectina comprende aproximadamente 13Kb de ADN, y contiene 14 exones (Collins *et. al.*, 1991). Los elementos implicados en la activación de E-selectina por citoquinas, se han localizado dentro de los 160 pb por encima del comienzo del inicio de la transcripción (Rock *et. al.*, 1994) (**Figura 1.8**). Esta región actúa como un amplificador de la transcripción inducible por citoquinas tanto en células endoteliales como no endoteliales. La expresión específica de tejido de la E-selectina, se ha asociado con una hipometilación de su promotor en respuesta a citoquinas (Smith *et. al.*, 1993). En el promotor de esta molécula de adhesión, se han definido cuatro dominios PD que regulan positivamente el promotor de E-selectina (Whitley *et. al.*, 1994): un elemento consenso κ B, definido como PDI y un sitio ATF junto con un HMG definido como PDII. Posteriormente, se identificaron otros elementos PDIII y PDIV que corresponden a dos sitios de reconocimiento para NF κ B integrado por dos heterodímeros p50/p65. Para la inducción de la transcripción es necesario que los múltiples elementos NF κ B descritos y un elemento CRE/ATF interaccionen cooperativamente. Esta interacción cooperativa proteína-proteína se ha descrito también en otros genes inducibles por citoquinas.

VCAM-1 une monocitos en circulación y linfocitos que expresan las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ (Elices *et. al.*, 1990). Puede participar en el reclutamiento de estas células inflamatorias desde el torrente sanguíneo a los sitios de daño tisular. La expresión de VCAM-1 se encuentra asociado con una gran variedad de procesos inflamatorios como son las lesiones ateroscleróticas (Cybulsky *et. al.*, 1991). Las células endoteliales en condiciones basales, no

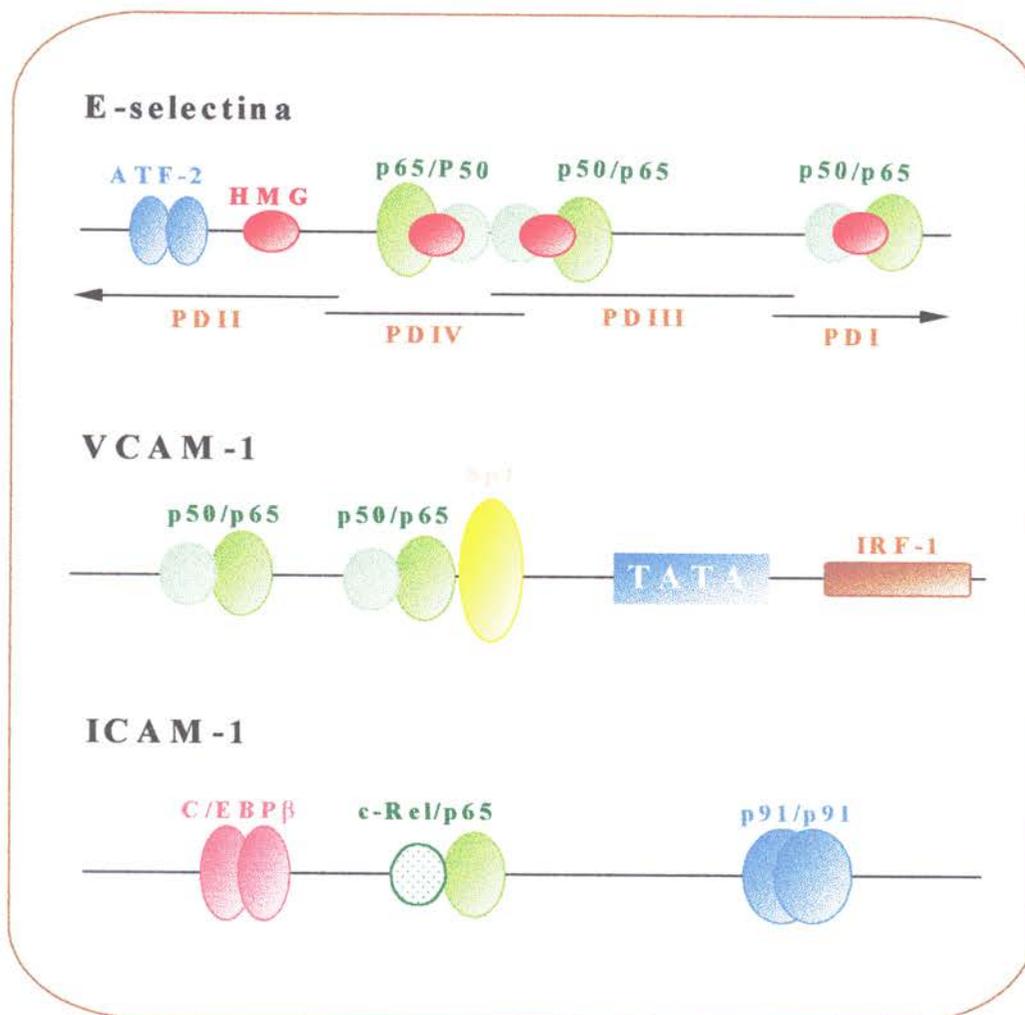


Figura 1.8.- Comparación de la organización estructural de los promotores de las moléculas de adhesión: E-selectina, VCAM-1 y ICAM-1. E-selectina. Los factores de transcripción que se unen a las regiones de respuesta a citoquinas en E-selectina son: NFκB, ATF-2. HMG-I(Y) se une a una región dentro del fragmento PDII, así como a regiones ricas AT en sitios κB contenidos en PDI, PDIII, y PDIV. VCAM-1. Elementos de respuesta implicados en la regulación de la expresión de VCAM-1 por citoquinas. Existen dos elementos NFκB así como un IRF-1. NFκB interacciona con Sp1 para activar la expresión de VCAM-1. ICAM-1. Organización de los elementos implicados en la inducción de la expresión de ICAM-1 por citoquinas. Los elementos de respuesta a TNF-α lo constituyen sitios NFκB y C/EBP. El elemento de respuesta a IFN-γ lo constituye un sitio de unión para p91. (Collins et al., 1995, FASEB J. 9, 899-909).

expresan VCAM-1, aunque la exposición a citoquinas inflamatorias como IL-1β y TNF-α o liposacáridos provocan un aumento rápido de la expresión de VCAM-1. El gen humano que codifica VCAM-1 comprende 25 Kb de ADN y contiene 9 exones cada uno de los cuales codifican para un dominio funcional de la proteína. La organización de los elementos reguladores requeridos para la inducción de la expresión de VCAM-1 por citoquinas han sido parcialmente definidos (**Figura 1.8**). Estudios de mutagénesis, han mostrado que los dos sitios de unión en tándem para NF-κB localizados en las posiciones -73 y -58, son necesarios para la activación transcripcional de VCAM-1 mediada por citoquinas. La mutación de cualquiera de estos elementos anula la respuesta a citoquinas, sugiriendo una interacción cooperativa entre los dímeros NF-κB unidos en tándem a elementos κB en el promotor VCAM-1. Las especies de NF-κB que se unen al promotor humano de VCAM-1 en células endoteliales activadas con

TNF- α son heterodímeros p50/p65 (Neish *et. al.*, 1995). Existe una secuencia consenso en el promotor de VCAM-1 que es un sitio de reconocimiento para la familia de factores reguladores de interferón. Este elemento es funcional en otros promotores de genes inducibles, tales como IFN- γ , la forma inducible de la sintetasa del óxido nítrico y el complejo de histocompatibilidad de clase I que unen al factor IFR-1. En VCAM-1, IFR-1 coopera con NF- κ B mediando la inducción de VCAM-1 por citoquinas.

El análisis tanto de los promotores de VCAM-1 como de E-selectina, han demostrado la existencia de pequeñas regiones responsables de la respuesta a citoquinas con múltiples elementos NF- κ B que deben interactuar cooperativamente para inducir la transcripción. Además de estas dos moléculas de adhesión, se han identificado dos elementos κ B funcionales que se encuentran muy próximos entre sí en otros genes como MAdCAM-1 (Takeuchi *et. al.*, 1995), el promotor de MHC (Mansky *et. al.*, 1994) y el promotor de I κ B- α (Cheng *et. al.*, 1994).

En el promotor VCAM-1, se han identificado 2 elementos GATA distanciados entre sí 10 pb y dispuestos en orientación transcripcionalmente opuesta. El análisis de otros promotores ha identificado una distribución similar de los elementos GATA. El promotor de la γ -globina contiene 2 sitios funcionales GATA separados entre sí 10 pb. El promotor GATA-1 contiene 2 elementos funcionales que reconocen GATA y que al igual que el gen VCAM-1 se encuentran en orientación opuesta para la transcripción (Tsai *et. al.*, 1991). Estos elementos GATA en el promotor de VCAM-1 son reguladores positivos importantes de la transcripción pero no son los responsables del patrón de expresión restringida de VCAM-1. A este respecto, se han identificado por encima de los elementos GATA unos elementos negativos que pudieran intervenir en la especificidad de tejido. Se ha especulado que estos elementos negativos pudieran, junto con los factores de transcripción GATA, ser los causantes de la especificidad de linaje tal y como se ha descrito para el factor 4 de plaquetas (PF4).

ICAM-1 es el receptor para varias integrinas leucocitarias β_2 (LFA-1 y Mac-1). La adhesión de ICAM-1 a estas integrinas leucocitarias juega un papel muy importante en una gran variedad de interacciones celulares, incluidas el tráfico leucocitario y la iniciación de respuestas inmunitarias antígeno-específicas. ICAM-1 se expresa constitutivamente en endotelio, pero durante las respuestas inflamatorias los niveles proteicos se incrementan. El gen ICAM-1 contiene 7 exones cada uno de los cuales codifica para un dominio de las inmunoglobulinas. Los elementos reguladores implicados en la expresión de ICAM-1 se han localizado a 190 y 90 pb, respectivamente por encima del inicio de la transcripción (**Figura 1.8**). Análisis de mutagénesis sobre estos elementos así como ensayos de retardo en gel, han demostrado que los elementos de respuesta a TNF- α consisten en sitios de unión para NF- κ B y C/EBP β . Mutaciones dentro de estos sitios no afectaron a los niveles basales de ICAM-1. Las formas heterodiméricas de NF- κ B p50/p65, así como c-Rel/p65 y el homodímero p65, se

unen a los elementos κ B de ICAM-1 (Hou *et. al.*, 1994; Jahnke *et. al.*, 1994; Parry *et. al.*, 1994). Curiosamente, en el promotor del gen IL-8 también se ha encontrado esta distribución de los elementos NF- κ B y C/EBP β (Stein *et. al.*, 1993). Además, se han encontrado asociaciones directas proteína-proteína entre NF- κ B y C/EBP β , sugiriendo que estas proteínas pudieran unirse cooperativamente al elemento de respuesta de TNF- α del promotor de ICAM-1. TNF- α e IFN- γ actúan sinérgicamente aumentando la expresión de ICAM-1 en células endoteliales (Poher *et. al.*, 1990). La inducción transcripcional mediada por IFN- γ se ha mapeado a 72 pb por encima del inicio de la transcripción de ICAM-1. Experimentos de retardo en gel con extractos de células de hepatoma han demostrado que el elemento de respuesta a IFN- γ actúa como un único elemento regulador que se une selectivamente a la actividad inducible por IFN- γ compuesto al menos en parte por p91. En ICAM-1 los elementos de respuesta a TNF- α e IFN- γ se unen a distintas proteínas reguladoras de la transcripción. La co-estimulación de ICAM-1 con las dos citoquinas presentan un efecto sinérgico, aunque las bases moleculares por las que se produce este efecto se desconocen.

La expresión de los tres genes que codifican para las moléculas de adhesión leucocitaria VCAM-1, ICAM-1 y ELAM-1 inducidas por citoquinas inflamatorias implica una interacción sinérgica entre NF- κ B y un número limitado de factores de transcripción. La sorprendente similitud entre los elementos de regulación inducibles entre los promotores de E-selectina e IFN- β , sugieren que la expresión génica implica la formación de un complejo mecánicamente similar al complejo estereoespecífico de IFN- β donde la orientación de la hélice de ADN y de PDI y PDII en E-selectina, es más importante que la distancia entre estos elementos para la respuesta a citoquinas (Meacock *et. al.*, 1994). Esta dependencia estequiométrica o espacial sugiere que los factores de transcripción necesitan unirse en la misma cara de la hélice del ADN para una interacción óptima. Por otra parte, el plegamiento del ADN inducido por estos factores de transcripción también juega un papel importante en la expresión génica, tal y como se ha sugerido en la región amplificadora del gen de IFN- β . La interacción directa entre las proteínas unidas a los sitios del ADN separados entre sí requiere una distancia mínima de 130 pb para que sea posible la formación de una horquilla en el ADN tanto del gen de E-selectina como en IFN- β . Esto sugiere que la interacción entre los elementos funcionales del promotor de E-selectina necesita también de un plegamiento o torcimiento en la región promotora de ambos genes. Las proteínas que pertenecen a HMG son proteínas tipo histonas no cromosómicas que incrementan la afinidad de unión entre NF- κ B y ATF-2 y favorecen el plegamiento del ADN de forma que facilitan la formación de un gran complejo imprescindible para la activación transcripcional del promotor de IFN- γ y de la E-selectina.

La asociación proteína-proteína es un mecanismo importante por el cual los factores de transcripción cooperan sinérgicamente. NF- κ B puede cooperar con un número diferente de proteínas activadoras de la transcripción incluyendo Sp1, *Ets*, ATF-2/c-Jun y NFIL-6. Así tenemos que NF κ B interacciona con ATF-2 en el gen de IFN- β (Du *et. al.*, 1993), con ATF- α ,

c-Jun (Kaszubska *et. al.*, 1993) en el promotor de E-selectina, con TF-IID (Kerr *et. al.*, 1993), y con HMG-I(Y) (Du *et. al.*, 1993). Además, se han demostrado asociaciones directas entre proteínas ATF-2 y HMG-I(Y) (Du *et. al.*, 1994) o entre NF- κ B y Sp1 (Perkins *et. al.*, 1993) en la región amplificadora del gen del HIV. Se ha identificado, asimismo, una interacción entre NF- κ B e IFN-1 (Neish *et. al.*, 1995) en VCAM-1, pudiendo ser relevante para la inducción de la expresión de VCAM-1 inducido por citoquinas. De la misma manera, la asociación NF- κ B y C/EBP β (Neish *et. al.*, 1992), puede ser importante para la inducción de la expresión de ICAM-1. Se ha propuesto que estas interacciones estabilizan el complejo activador de la transcripción inducido por citoquinas y proporcionan una única superficie entre la región activadora del promotor y los factores o coactivadores en la maquinaria transcripcional.

Las fuerzas hemodinámicas en general y más específicamente el estrés provocado por los fluidos hemodinámicos, se han implicado como modificadores de la estructura celular y de la función *in vivo* (Frangos *et. al.*, 1985; Pohl *et. al.*, 1986; Rubanyi *et. al.*, 1986; Yoshizumi *et. al.*, 1989; Furchgott *et. al.*, 1989). Fuerzas mecánicas aplicadas a células del endotelio vascular pueden regular la expresión de los genes endoteliales a nivel transcripcional. En células HUVEC, ICAM-1 está regulada positivamente por *shear stress*. El gen de esta molécula de adhesión presenta una secuencia consenso SSRE en su región promotora. Por el contrario, en otras dos moléculas endoteliales como E-selectina y VCAM-1 no existe una regulación positiva por SSRE (Davies *et. al.*, 1986; Diamond *et. al.*, 1990). E-selectina y VCAM-1, a pesar de no contar con el elemento de respuesta SSRE, ambas contienen numerosos sitios de respuesta a NF κ B responsables de la inducción de la transcripción por citoquinas inflamatorias. El estímulo por SSRE es suficiente para activar NF κ B translocándose al núcleo. Collins *et. al.* (1995) han estudiado el papel transactivador de NF κ B interaccionando funcionalmente con el elemento SSRE de PDGF-B en células endoteliales expuestas a fuerzas de estrés (Khachigian *et. al.*, 1995). Es interesante conocer si la unión de los componentes de NF κ B a SSRE es suficiente para activar la expresión de un gen endógeno en respuesta a SSRE o implica la participación de factores de transcripción adicionales. Existen casos experimentalmente demostrados en el que la presencia de SSRE en un gen no es necesariamente una indicación de su funcionalidad en la actividad transcripcional inducida por fuerzas hemodinámicas. Un ejemplo lo constituye el gen MCP-1 (Shyy *et. al.*, 1994) que a pesar de contar con 2 secuencias consenso SSRE en su promotor la inducibilidad por fuerzas mecánicas de estrés es dependiente de un sitio de respuesta a TPA perteneciente a la familia de los factores de transcripción AP-1. Otro ejemplo lo constituye un gen endotelial como es PDGF-A que a pesar de carecer en su promotor de un elemento SSRE, es inducible por SSRE sugiriendo la implicación de otros elementos reguladores positivos en la respuesta a SSRE. *Shear stress* parece también regular negativamente la expresión de ciertos genes endoteliales como son Endotelina-1 y VCAM-1.

TGF- β es un potente regulador de la adhesión celular. Modula negativamente los niveles de la adhesión de neutrófilos y linfocitos sobre endotelio activado con TNF- α o IL-1, al menos en parte, por inhibición de la expresión de la superficie celular de E-selectina. Esta inhibición es específica del tratamiento con TGF- β 1, ya que no afecta a la expresión de otras moléculas de adhesión como son ICAM-1 y VCAM-1. La inhibición de la E-selectina por TGF- β 1 afecta tanto a la expresión basal, como a la inducida por TNF- α . Paralelamente, se ha visto una disminución similar de la expresión de mensajero cuando las células HUVEC fueron pretratadas con TGF- β 1 durante 24 h. Esta disminución en los niveles de ARNm observados en presencia de TGF- β 1 es debida a una inhibición de la transcripción génica de E-selectina. La actividad transcripcional de genes tales como *c-myc* (Takehara *et. al.*, 1987) y transina/stromelina (Matrisian *et. al.*, 1986; Kerr *et. al.*, 1988; Machida *et. al.*, 1988) son inhibidos de un modo similar por TGF- β 1. Basándose en la homología de secuencia de los promotores de estos genes, Kerr *et. al.* (1990) han propuesto un posible elemento inhibidor TGF- β 1 (TIE) con la siguiente secuencia consenso GNNTTGGTGA. Está reportado que en el promotor del gen de la transina/stromelina el sitio TIE une un complejo constituido por el complejo inducible de TGF- β y una proteína nuclear inducible. La secuencia del promotor de E-selectina (Whelan *et. al.*, 1991) contiene cuatro posibles sitios de unión al TIE en una región 200 pb por encima del inicio de transcripción. Curiosamente, tres de ellos solapan con sitios de unión para otros factores de transcripción nucleares que son esenciales para la transcripción del gen tanto basal como inducida por citoquinas. Uno de estos motivos solapa con una caja CAAT, otra con un sitio de reconocimiento para NF- κ B, que está situado entre NF- κ B y NF-ELAM-2, y el tercero solapa con el sitio para unión de NF-ELAM-1. Aunque el sitio de reconocimiento para NF- κ B es esencial para la inducción de la expresión de E-selectina mediada por citoquinas, Hooft van Huijsduijnen *et. al.* (1992) han reportado que no es suficiente para mediar el efecto completo de la inducción de la citoquina y requiere de la cooperación de NF-ELAM-1 y NF-ELAM-2 para una actividad transcripcional completa. Continúa sin determinarse si el factor(es) nuclear inducido por TGF- β es capaz de unirse a sitios NF- κ B, NF-ELAM-1 y o NF-ELAM-2 y competir en la unión del factor.

La inducción de la expresión de moléculas de adhesión por agentes preinflamatorios está descrita como una vía de obtener una respuesta inmune. Pero el mantenimiento del estado no adhesivo del endotelio no es un proceso pasivo debido únicamente a la no expresión de moléculas de adhesión celular. El nivel de la adhesividad de la célula endotelial viene determinado por un balance entre moléculas que ejercen una regulación positiva (TNF- α y IL-1) y otras que ejercen una regulación negativa (TGF- β 1, en el caso de E-selectina). Recientemente, se han realizado experimentos de ruptura del gen de TGF- β 1 y de recombinación homóloga en ratones transgénicos que resulta en un síndrome de debilitamiento con una respuesta inflamatoria multifocal y necrosis tisular en animales de 20 días, aunque no se han detectado anomalías grandes de desarrollo en el nacimiento (Shull *et. al.*, 1992).

1.7.- OBJETIVOS DE ESTA TESIS.

PECAM-1/(CD31), es una glicoproteína de membrana presente en endotelio, plaquetas, monocitos, macrófagos, granulocitos y plaquetas. Dentro del linaje mieloide, la expresión de PECAM-1 se incrementa durante la diferenciación macrofágica y mediante el tratamiento con TGF- β 1 de células monocíticas de una forma dependiente de PKC. PECAM-1 es un importante mediador de la interacción entre células mieloides y endotelio, estando implicado en la migración transendotelial. En el presente trabajo, nos propusimos estudiar las bases moleculares que regulan la expresión de PECAM-1 que pudieran explicar los estudios funcionales realizados en esta molécula de adhesión.

Los principales objetivos de esta tesis han sido:

- 1.- Caracterización estructural y funcional de la región promotora del gen que codifica para la glicoproteína integral de membrana PECAM-1.
- 2.- Caracterización de las secuencias implicadas en la especificidad de tejido de la expresión de PECAM-1.
- 3.- Caracterización e identificación de los sitios de iniciación de la transcripción en el promotor de PECAM-1.
- 4.- Localización de las secuencias consenso así como de los factores de transcripción implicados en la expresión basal y regulada de PECAM-1.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- ENZIMAS Y REACTIVOS.

Los enzimas de restricción empleados fueron de Boehringer Mannheim (Alemania) y Fermentas (MBI). La proteinasa K y la lisozima se obtuvieron de la firma Boehringer Mannheim (Alemania). Otros enzimas empleados en la manipulación del ADN fueron: fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. Coli*, ADN polimerasa del bacteriófago T4, ADN ligasa T4, polinucleótido quinasa T4, fosfatasa alcalina, ARNasa (Boehringer Mannheim, Alemania), Taq polimerasa, transcriptasa reversa (Promega, Madison, USA), T7 ADN Polimerasa (Pharmacia Biotech. Uppsala, Suecia), transcriptasa reversa M-MLV (Moloney murine leukemia virus) (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA). Todos estos enzimas se han utilizado siguiendo protocolos estándar previamente descritos (Sambrook *et. al.*, 1989).

Los antibióticos utilizados, Ampicilina y Puromicina se obtuvieron de la firma comercial Sigma España.

Los precursores radiactivos utilizados para el marcaje, tanto de fragmentos de ADN de doble cadena, como de los oligonucleótidos utilizados, fueron [α -³⁵S] dATP (AE, 1000 Ci/mmol) y [γ -³²P] dATP de (AE, 1000 Ci/mmol), de Amersham Ibérica (Madrid, Spain) y [α -³²P] dCTP (AE, 3000 Ci, mmol), de New England-Itisa (Madrid, Spain).

Entre los reactivos utilizados: El Tris fue de Merck (Merck, Darmstadt, Alemania), así como todas las sales inorgánicas, el EDTA, SDS, EGTA, cloruro de cesio. El Hepes fue de Flow (Flow laboratories, EEUU). El TEMED fue de Biorad (Hércules, CA, USA). MOPS, inhibidores de proteasas (aprotinina, pepstatina, leupeptina, PMSF), inhibidores de quinasas (H-7 y estaurosporina), PMA, esperma de salmón, PDTC y AR fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, EEUU). El Ficoll (tipo 400) fue de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia). El factor transformante de crecimiento, recombinante humano TGF- β 1 fue de R&D (R&D Systems, Abingdon, Inglaterra). El TNF- α recombinante humano derivado de *E. Coli* (fue donado generosamente por el Dr. Eduardo Páez).

2.2.- MEDIOS Y TAMPONES.

En este trabajo se utilizarán nombres genéricos de medios y tampones siguiendo la nomenclatura de Sambrook *et. al.* (1989) que con el fin de simplificar el texto se resumen en esta sección.

- **Medio LB** para crecimiento bacteriano. Composición por litro: 10 gr bactotripton, 5 gr extracto de levadura y 10 gr de NaCl. Fue autoclavado antes de su uso.

- **Tampón Fosfato Salino (PBS):** Composición por litro: 136 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄ pH 7.4.

- **TE pH 8.0 :** 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA.

- **TAE 1x:** 40 mM Tris-Base, 20 mM Ácido Acético glacial, 1mM EDTA pH 8.0.

- **HEBS 2x:** 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂PO₄·2H₂O, 12 mM dextrosa, 40 mM Hepes pH 7.05.

- **NET 20x** (hibridación de oligonucleótidos): 3 M NaCl, 300 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.20 mM EDTA.

- **Tampón MOPS 10x :** 400 mM MOPS, 100 mM acetato sódico, 20 mM EDTA, 0.15% dietilpircarbonato (DEPC) pH 7.0.

- **Tampón de carga de muestra de ARN:** 50% glicerol, 1 mM EDTA, 0.4% azul de bromofenol, 0.15% DEPC. Esta solución se mezcló en la proporción 1:10 con la muestra disuelta en MOPS 1x, 50% formamida, 6.3% formaldehído, 0.15% DEPC en un volumen final de 30 µl.

- **Tampón SSC 20x :** 3M NaCl, 0.3 M citrato sódico pH 7.0.

- **Solución Denhardt's 50x :** 1% Ficoll 400, 1% polivinilpirrolidona, 1% de albúmina de suero bovino (BSA).

- **Tampón de carga (6x) para muestras de ADN:** 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol y 15% de Ficoll en agua.

- **Tampón de carga (6x) para muestras de geles de retardo:** 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol en agua.

- **Tampón SM** (para fagos). Composición por litro: 2% gelatina, 1M Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgSO₄.

2.3.- CULTIVO CELULAR.

23.1.- Material de cultivo celular.

En la realización del presente trabajo, todo el material de cultivo empleado, tanto para el mantenimiento de células como para los ensayos descritos, fue plástico Costar (Costar, Cambridge, EEUU). Las placas de cultivo de 60 mm fueron de Nunc (Dinamarca).

Los medios de cultivo fueron RPMI 1640 y DMEM (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, EEUU) suplementados con 10% de suero fetal bovino (FCS; Flow), previamente inactivado a 56 °C durante 30 minutos, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 25 µg/ml. de gentamicina como antibióticos (todos ellos de Gibco). En lo sucesivo, dicha composición se expresará como medio completo. Como soluciones de lavado celular se utilizó Hank's (Gibco, BRL) y PBS. En aquellos ensayos en los que fue necesario despegar las células adherentes, se utilizó Tripsina 0.25%, 1 mM EDTA en PBS (Gibco, BRL). Las células

fueron mantenidas rutinariamente en cultivo con crecimiento exponencial en un incubador Heraeus (Heraeus, Osterode, Alemania), en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Todas las manipulaciones que requerían ambiente estéril se realizaron en una cabina de flujo laminar vertical Gelaire BSBU (Gelaire, Italia). Las células fueron colectadas mediante centrifugación con una centrífuga de mesa GRP de Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, EEUU) a 600 x g durante 5 minutos.

2.3.2.- Líneas celulares.

Las células humanas utilizadas fueron líneas ya establecidas, células de sangre periférica, o células endoteliales obtenidas mediante cultivos primarios. Las líneas celulares humanas utilizadas han sido U-937, promonocítica; HL60, mielomonocítica; Jurkat, leucémica T; K562, eritroleucémica; y HEL, eritromegacarioblástica. Todas fueron cultivadas en medio RPMI completo (Gibco; BRL) en crecimiento exponencial. La línea celular Kmyc B, una sublínea K562 transfectada establemente con el gen *c-myc* bajo la dirección del promotor inducible por zinc de la metalotioneína I de ratón y su correspondiente control negativo de la transfección, KMMT, transfectada únicamente con el vector vacío sin *c-myc*, se crecieron en RPMI completo y suplementado con 100 µM de SO₄Zn (Delgado *et. al.*, 1995). La línea celular HeLa de carcinoma de cérvix y la línea celular de pulmón de visón Mv1Lu fueron crecidas en DMEM completo en crecimiento exponencial. Las células endoteliales BAEC, fueron obtenidas mediante cultivos primarios a partir de aorta bovina, mediante la perfusión con colagenasa (Boehringer) según el método descrito por Muller *et. al.* (1986). Tras la incubación durante 20 minutos a 37 °C con dicha actividad enzimática, las células fueron recogidas mediante lavado de la arteria con Hank's y una vez colectadas fueron cultivadas en DMEM completo en un frasco de cultivo recubierto con gelatina. Estas células fueron utilizadas cuando se encontraban entre el quinto y noveno pase. La línea de fibroblastos de ratón NCTC-929 (L-929) se mantuvo en cultivo empleando medio DMEM (Gibco, BRL) completo hasta confluencia, realizando pases mediante dilución del cultivo en la proporción 1:5. Cuando fue necesario, las células fueron recogidas mediante tratamiento con Tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37 °C, 5% CO₂. La reacción de tripsinización se detuvo mediante adición de DMEM completo, las células fueron lavadas con Hank's y resuspendidas a las concentraciones adecuadas.

La activación de la actividad proteína quinasa C (PKC) en U-937 se llevó a cabo en presencia de 10 ng/ml PMA, 100 µg/ml DOG o 100 µg/ml OAG durante 48h. Los experimentos con inhibidores de la actividad quinasa PKC, se llevaron a cabo en células U-937 creciendo exponencialmente (5x10⁵ células/ml) con H-7 (50-200 µM) o estaurosporina (100 nM) durante 30 minutos antes del tratamiento con PMA o con los DAG mencionados, DOG y OAG, agonistas fisiológicos de PKC.

2.4.- ESCRUTINIO DE GENOTECAS DE ADN GENÓMICO HUMANO.

Para el escrutinio de una genoteca de placenta humana en el fago λ EMBL3 se usaron métodos previamente descritos (Benton *et. al.*, 1977), empleándose en cada caso alrededor de 600.000 fagos recombinantes en un total de 20 filtros de nitrocelulosa de 150 mm de diámetro. De cada uno de los filtros se obtuvieron réplicas por duplicado, a lo largo de un total de tres procesos de selección. Como sonda para el escrutinio, se utilizó un oligonucleótido antisentido de cadena sencilla PE # 2 (5'- GTTGAGAAACCCGCCCTGTGAAAAGC- 3') que corresponde a la región 5' no traducida del ADNc de PECAM-1 (Albelda *et. al.*, 1991). Los filtros, fueron procesados mediante hibridación en solución acuosa como se describe en el apartado 2.7.1 de análisis de ADN. El ADN de los fagos seleccionados se purificó y los fragmentos de interés se insertaron en el vector pBS (Tabla 2.1) empleando métodos previamente descritos (Sambrook *et. al.*, 1989). Los mapas de restricción de los fagos y plásmidos posteriormente obtenidos se efectuaron con métodos ya descritos (Sambrook *et. al.*, 1989).

2.5.- VECTORES UTILIZADOS. CARACTERÍSTICAS.

Para la realización de las construcciones génicas, amplificación por PCR y secuenciación, se utilizaron los plásmidos que se indican a continuación:

TABLA 2.1.- Vectores para las construcciones génicas, amplificación por PCR y secuenciación.

NOMBRE	TAMAÑO	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
pCR TM II	3.9 Kb	Amp ^R , Kan ^R , Lac Z gene	Invitrogen
pUC 19	2.7 Kb	Amp ^R , promotores SP6 y T7, Lac Z gene	Clontech
pBS	3.0 Kb	Amp ^R , promotores T3 y T7 Lac Z gene	Invitrogen

Plásmidos empleados en la obtención de construcciones génicas, amplificación por PCR y secuenciación. Aparece detallado su tamaño, así como las características referentes a la resistencia a antibióticos, promotores y la casa comercial que los distribuye. Lac Z gene: gen que codifica para β -galactosidasa. Amp^R: resistencia a ampicilina. Kan^R: resistencia a kanamicina.

Para los experimentos de transfección del ADN genómico de PECAM-1 en células de mamíferos, se emplearon los vectores de expresión que se detallan en la **Tabla 2.2.**

TABLA 2.2.- Vectores de expresión y selección.

NOMBRE	TAMAÑO	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
pXP2	5.2 Kb	Amp ^R , cDNA del gen de luciferasa precedido del sitio de clonaje para el promotor genómico objeto de estudio.	Nordeen <i>et al.</i> , 1988
pGL2P-Luc	5.5 Kb	Amp ^R , ADNc del gen de luciferasa precedido por el promotor temprano de SV40.	Promega
pCMV-βGal	7.2 Kb	Amp ^R , ADNc del gen de β-galactosidasa precedido por el amplificador y promotor temprano de Citomegalovirus (CMV).	Clontech
pSEAP control	6.2 Kb	Amp ^R , ADNc del gen de fosfatasa alcalina precedido por el amplificador y promotor temprano del SV40.	Clontech
pBS pac Ap	4.2 Kb	Amp ^R , Pur ^R . Plásmido de selección en la transfección estable de U-937.	de la Luna <i>et al.</i> , 1988
pCX-USF	5.5 Kb	Amp ^R , ADN del gen de USF1 precedido por el promotor de CMV.	Dr. Robert Roeder
pCMV-Myc	6.2 Kb	Amp ^R , ADN del gen de c-Myc precedido por el promotor del CMV en pcDNA I.	Dr. Linheng Li
pRc/CMV-p65	5.5 Kb	Amp ^R , ADN del gen de la subunidad p65 de NFκB precedido por el promotor del CMV.	Le Bail <i>et al.</i> , 1993
pKBF-Luc	6.5 Kb	Amp ^R . Contiene un trímero de elementos de reconocimiento para NFκB del gen H-2K ^b por encima del promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple precedido por el promotor del CMV.	Yano <i>et al.</i> , 1987
p3TP-LUX	6 Kb	Amp ^R , ADN del gen de luciferasa precedido por el promotor de SV40. Contiene 3 elementos en tándem de respuesta a TPA y una porción del promotor del inhibidor del activador de plasminógeno (PA-1).	Wrana <i>et al.</i> , 1992

Plásmidos empleados para la expresión de los genes correspondientes en células eucariotas, tanto mediante transfección transitoria como estable. Aparece detallado el tamaño, así como las características referentes a la resistencia a antibióticos, promotores y la casa comercial que los distribuye. Pur^R: resistencia a puromicina. Amp^R: resistencia a ampicilina.

2.6.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

2.6.1.- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.

Para preparaciones a pequeña escala, el ADN plasmídico fue obtenido por el método de lisis alcalina (Birnboim *et. al.*, 1979; Ish-Horowitz *et. al.*, 1981) y purificado mediante fenolización y posterior precipitación con acetato sódico pH 5.2. Las preparaciones a gran escala se efectuaron mediante lisis alcalina y posterior purificación con PEG (Sambrook *et. al.*, 1989). El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Las digestiones del ADN plasmídico y su análisis mediante electroforesis en geles de agarosa se efectuaron siguiendo métodos estándar (Sambrook *et. al.*, 1989). Los geles se observaron a la luz ultravioleta en un transiluminador de onda larga a 365 nm. Los fragmentos de ADN se purificaron a partir de agarosa de bajo punto de fusión mediante fenolización y precipitación. Para el clonaje de los fragmentos de ADN en los vectores que aparecen en las **Tablas 2.1 y 2.2**, se emplearon métodos descritos (Sambrook *et. al.*, 1989).

2.6.2.- Aislamiento y purificación de ADN de fagos.

La preparación de ADN a pequeña escala a partir de fagos, se realizó de acuerdo a un protocolo previamente descrito (Yamamoto *et. al.*, 1970) con ciertas modificaciones: Sobre un cultivo de 35 ml de bacterias de *E. coli* NM539 se inoculó una placa completa de fago. Después de 5-6 h de crecimiento en agitación, tan pronto se observó el inicio de la lisis bacteriana, se añadieron 10 ml de cloroformo, agitándose la mezcla durante 10 minutos más a 37 °C. Posteriormente, se incubó el cultivo con 1 µg/ml de DNasa I y ribonucleasa durante 30 minutos a 37 °C y se añadió NaCl hasta alcanzar una concentración final de 1 M. Después de 1 h a 4 °C, se eliminó el precipitado por centrifugación y los fagos fueron precipitados del sobrenadante con PEG 8.000 al 10% y resuspendidos en SM. El ADN obtenido se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y posterior precipitación.

2.6.3.- Aislamiento y purificación de ARN celular.

El aislamiento a pequeña escala de ARN celular se efectuó mediante lisis celular con isotiocianato de guanidina y posterior purificación con fenol-cloroformo (Chomczynski *et. al.*, 1987); para la obtención de ARN a gran escala, la purificación se realizó por ultracentrifugación en colchón de cloruro de cesio (Chirwin *et. al.*, 1979). La integridad del ADN y del ARN obtenido se comprobó sometiendo 1-2 µg de los mismos a electroforesis en gel de agarosa en tampón TAE 1x o TBE 1x respectivamente, suplementado con bromuro de etidio 0.5 µg/ml.

2.7.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

2.7.1.- Análisis de ADN.

El análisis de ADN mediante la técnica de “Southern-blot” se efectuó siguiendo protocolos ya establecidos (Southern *et. al.*, 1975), empleando 2-5 µg de ADN clonado. El ADN se fijó a las membranas mediante incubación en horno a -80 °C (Sambrook *et. al.*, 1989) o por radiación ultravioleta (Reed *et. al.*, 1985). Las hibridaciones con la sonda radiactiva se efectuaron en solución acuosa. La prehibridación se realizó a 65 °C en agitación en 6x SSC, 5x Denhardt's, 0.5% SDS, 10 mM EDTA y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, durante 2-14 horas. Las hibridaciones se realizaron durante 14 horas a 65 °C en la misma mezcla descrita para la prehibridación, pero conteniendo 10⁶ cpm/ml de sonda marcada radiactivamente. Los filtros de nitrocelulosa se sometieron a un primer lavado en 2x SSC/0.5% SDS durante 20-30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente un segundo lavado en 0.3-0.5x SSC/0.5% SDS durante 30 minutos a 37 °C y 10-20 minutos a 65 °C. Finalmente, los filtros se expusieron a -80 °C durante 2-48 h con pantalla intensificadora.

En el caso de oligonucleótidos de cadena sencilla las condiciones de hibridación fueron similares a las empleadas para sondas de ADN de doble cadena. La composición de la solución de prehibridación fue: 6x NET, 10x Denhardt's, 0.1% SDS. La solución de hibridación fue idéntica a la de prehibridación, conteniendo además 10⁶ cpm/ml. La hibridación se llevó a cabo a Tm-5 °C siendo la Tm la temperatura de anillamiento del oligonucleótido empleado como sonda. Los lavados se realizaron primero con 6x SSC/0.2% SDS a temperatura ambiente, un segundo lavado a la temperatura de hibridación del oligonucleótido (Tm-5 °C), y un tercer lavado a la Tm del oligonucleótido durante 2-3 minutos.

2.7.2.- Análisis de ARN.

10 µg de ARN fueron desnaturalizados y fraccionados en geles de agarosa al 1.1% en presencia de formaldehído. Una vez realizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, EEUU) mediante capilaridad toda la noche. Una vez transferido el ARN, fue fijado a la membrana por tratamiento térmico a -80 °C durante 2 h. Las membranas fueron pretratadas con una solución de prehibridación conteniendo 5x SSC, 2.5x Denhardt's, 50 mM NaH₂PO₄. Tras el pretratamiento, las membranas fueron hibridadas en la misma solución añadiendo un exceso de sonda marcada. La hibridación tuvo lugar toda la noche a 42 °C en agitación. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC/0.1% SDS y un último lavado de 30 minutos a 52 °C con 0.1x SSC/0.1% SDS. Todos estos procesos se realizaron en un horno de hibridación (Techne, Inglaterra). Como sonda se utilizó un fragmento de 0.7 Kb *Xho I* correspondiente del ADNc de PECAM-1 (Albelda *et. al.*, 1991).

2.8.- MARCAJE DE ADN.

2.8.1.- Fragmentos de ADN de doble cadena.

Los ADNs de doble cadena utilizados como sondas fueron marcados radiactivamente con 30 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ siguiendo el método conocido como “*Primer extension*” previamente descrito por Feinberg *et. al.* (1983). Se utilizó un “*Kit*” comercial para marcaje radiactivo “*Multiprime DNA labelling System*” (Amersham). En cada reacción de marcaje fueron utilizados 25-30 ng de ADN previamente desnaturalizados por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. Tras la reacción de marcaje, el precursor radiactivo no incorporado fue separado de la sonda marcada mediante cromatografía en columna de Sephadex G-50 (Boehringer Mannheim). La actividad específica de las sondas empleadas en el presente trabajo osciló alrededor de 10^9 cpm/ μg de DNA.

2.8.2.- Oligonucleótidos de doble cadena.

El marcaje de oligonucleótidos de doble cadena para los ensayos de retardo en gel, se realizó mediante la reacción de “*filling-in*” (Sambrook *et. al.*, 1989) empleando 10 μl de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, fragmento Klenow de la polimerasa I y 40 ng de ADN del oligonucleótido anillado. El precursor radiactivo no incorporado se separó previa fenolización, por precipitación con NaCl. La actividad específica de las sondas empleadas en el presente trabajo fue de $0.8\text{-}1.2 \times 10^9$ cpm/ μg de ADN.

2.8.3.- Oligonucleótidos de cadena sencilla.

Los oligonucleótidos de cadena sencilla se marcaron en sus extremos 5' empleando 100 ng de oligonucleótido, 50 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ y T4 polinucleótido quinasa de acuerdo a condiciones previamente descritas (Sambrook *et. al.*, 1989) obteniendo actividades específicas de $2\text{-}4 \times 10^8$ cpm/ μg .

2.9.- OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES GENÓMICAS.

Tras el escrutinio de la genoteca de placenta, se obtuvieron clones positivos, de los cuales fue seleccionado el clon positivo PECAM-1 #4121, el cual se sometió a digestiones dobles y sencillas con distintas combinaciones de enzimas de restricción. Uno de los fragmentos, de 5.2 Kb *HindIII/HindIII*, dio una hibridación positiva. Este fragmento se clonó en el plásmido pBS (Tabla 2.1) previamente digerido con *HindIII*. Para el clonaje del fragmento de 5.2 Kb *HindIII/HindIII*, se hicieron romos los extremos mediante tratamiento de los mismos con Klenow y se clonó en pXP2 previamente digerido con *SmaI* y defosforilado. De esta manera, se obtuvo la construcción pCD31-5.0-LUC. A partir de esta construcción, se

obtuvo pCD31-4.0-LUC mediante digestión con *PstI-HindIII*, haciendo romos los extremos y, religando el vector pXP2. Las construcciones pCD31-1.42-LUC y pCD31-0.66-LUC se obtuvieron haciendo romos los fragmentos genómicos 1.42 Kb *SmaI/PstI* y 0.66 Kb *NheI/PstI* obtenidos por digestión e insertándolos en el vector pXP2 previamente digerido con *SmaI* y defosforilado. La construcción pCD31-1.42-LUC se digirió con *BglII* dando lugar a un fragmento genómico de 0.44 Kb y al vector conteniendo un fragmento de 0.98 Kb. El fragmento de 0.44 Kb liberado de la anterior digestión se subclonó en pXP2 previamente digerido éste con *BamHI/BglII* y defosforilado obteniéndose de este modo la construcción pCD31-0.44-LUC. El vector conteniendo el fragmento genómico de 0.98 Kb se sometió a tratamiento con Klenow para hacer romos los extremos y se religó dando lugar a la construcción de pCD31-0.98-LUC. A partir de la construcción de pCD31-0.66-LUC se obtuvo la construcción pCD31-0.25-LUC mediante doble digestión con *NotI/BamHI* y religación. La construcción pCD31-0.98-LUC se obtuvo digiriendo pCD31-1.42-LUC con *NheI/BglII* y religando. Finalmente la construcción pCD31-0.22-LUC se obtuvo a partir del fragmento genómico *NheI/BglII* de 0.22 Kb, cuyos extremos se hicieron romos e insertando dicho fragmento en el vector pXP2 previamente digerido con *SmaI* y defosforilado. Todas las construcciones obtenidas fueron secuenciadas para comprobar su orientación.

2.10.- SECUENCIACIÓN DE ADN CLONADO.

La secuenciación de fragmentos clonados de ADN genómico se efectuó siguiendo el protocolo de Sanger (Sanger *et. al.*, 1977), utilizando “*T7/ Sequencing Kit*” de Pharmacia Biotech, (Uppsala, Suecia). Las muestras, fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes (Sambrook *et. al.*, 1989), empleándose los oligonucleótidos “*PUC/M13 Reverse*” y “*PUC/M13 Forward*” (Messing *et. al.*, 1983) o bien los oligonucleótidos internos específicos de PECAM-1, cuya secuencia se detalla en la **Tabla 2.3**.

TABLA 2.3.- Oligonucleótidos internos utilizados en la secuenciación del promotor de PECAM-1.

PECAM-1 PE#3:	5´- CATCCTGAGAGTGAAGACTGCAGGCACAGTTAGTTC -3´
PECAM-1 PE#4:	5´- TGAAAAGCAGAAATTGCTCT -3´
PECAM-1 PE#5:	5´- AGAGAGACCGGCTGTGGCGC -3
PECAM-1 #7-AS:	5´- CTGTGGCGCTGGTCAGGTAATG -3´
PECAM-1 #8-AS:	5´- CACTGTGAGGGGATTCCTCCCTGCC -3´
PECAM-1 #8-S:	5´- GGCAGGGAGGAATCCCCTCACAGTG -3´
PECAM-1 #9-AS:	5´- CTGCTCTCCCAGGACATCCAGAAAG -3´
PECAM-1 #10-AS:	5´- GCTGCTGGGGCAGGCTGAGCTT -3´
PECAM-1 #11-AS:	5´- CGTTATTCCTACTCC -3´

2.11.- OBTENCIÓN DE TRANSFECTANTES.

En la realización del presente trabajo, se han generado tanto células transfectadas establemente como células transfectadas de modo transitorio. Las células transfectadas establemente fueron la línea celular U-937; las células transfectadas transitoriamente fueron BAEC, HEL, HeLa, Jurkat, K562, Mv1Lu, NCTC-929 y U-937. Para realizar estas transfecciones se han utilizado distintos vectores de expresión cuyas características se resumen en la **Tabla 2.2**.

Las transfecciones transitorias de las células U-937, HEL y K562, se llevaron a cabo mediante electroporación. Para ello se utilizó un electroporador “*Gene Pulser*” de Biorad (Hércules, CA, USA). Entre $2-3 \times 10^7$ células fueron electroporadas, utilizándose 40 μg del vector de expresión pXP2 conteniendo el DNA apropiado de PECAM-1 y 10 μg del control interno pCMV- βGal (β -galactosidasa en el caso de HEL y K562) y pSEAP (Fosfatasa alcalina en el caso de U-937). Para la electroporación, las células resuspendidas en 400 μl de RPMI (U-937 y HEL) o HEBS 2x (en el caso de K562), se mezclaron con el ADN (resuspendido en 100 μl) en cubetas de 4 mm y utilizando las siguientes condiciones experimentales: 250 volt, 960 μF de capacitancia, siendo la duración del pulso 30 milisegundos aproximadamente. Las cubetas con el medio y las células fueron incubadas en hielo antes y después del pulso durante 15 minutos. A continuación las células se resuspendieron en 10-20 ml de RPMI completo en frascos de 75 cm^2 . En el caso de las células U-937, éstas fueron previamente lavadas con RPMI antes de añadir el medio completo. Pasadas 14 h, las células transfectadas fueron lisadas en 50 μl de tampón de lisis 1x “*Reporter buffer lysis 5x*” (Promega) y a partir de los extractos celulares obtenidos se analizaron independientemente la actividad luciferasa, la actividad β -galactosidasa, y la cantidad de proteína, según procedimientos descritos en el apartado 2.12. Para el tratamiento de los transfectantes transitorios de U-937 con ésteres de forbol, estos se añadieron después del lavado y resuspensión de las células recién transfectadas.

Para la obtención de transfectantes estables de U-937, se siguió el mismo procedimiento descrito que para la transfección transitoria pero con algunas modificaciones. Los plásmidos se linearizaron previamente, siendo la cantidad de ADN utilizada de 80 μg para $25-30 \times 10^6$ células con una proporción de plásmido reportero/pBS pac Ap de 5:1. Tras el proceso de transfección, las células fueron seleccionadas con 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puomicina. A continuación se ensayó la actividad luciferasa del transfectante estable obtenido con la construcción completa del promotor de PECAM-1 pCD31-1.42-LUC en el conjunto de clones supervivientes U937#1.6.2. En la realización del presente trabajo se ha utilizado, en todo momento, una población policlonal de transfectantes.

Para el tratamiento con agentes activadores o inductores de diferenciación, los transfectantes estables de células U-937 se plaquearon el día anterior a una concentración de

2.5×10^5 células/ml. La concentración de PMA utilizada fue 40 ng/ml en las células U-937. El antioxidante PDTC se usó a 30 μ M, añadiéndose 1 h antes del PMA en los casos en los que ambos se emplearon juntos. El AR se utilizó a una concentración final de 1mM; el TGF- β 1 a 10 ng/ml y, el TNF- α a una concentración final de 50 ng/ml.

Las líneas celulares HeLa, NCTC-929 (L-929) y BAEC fueron transfectadas utilizando Lipofectina (Gibco, BRL). Se utilizaron las condiciones estándar proporcionadas por el fabricante. El día anterior a la transfección se plaquearon $0.4-0.6 \times 10^5$ células en placas de 60 mm (Nunc, Dinamarca). A continuación, 15 μ g del ADN reportero objeto de estudio, 7.5 μ g del control interno (pCMV- β Gal) resuspendidos en 100 μ l de DMEM sin suero, y 10 μ g de Lipofectina, se mezclaron y mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió a las células (200 μ l totales), completando hasta un volumen final de 3 ml con medio DMEM sin suero que se incubó durante aproximadamente 24 h. Posteriormente, las células se incubaron durante otro período de 24 h, se lisaron en 50 μ l de tampón de lisis 1x (*Reporter buffer lysis 5x*) de Promega, y a partir de los extractos celulares obtenidos, se analizaron, independientemente, la actividad luciferasa, la actividad β -galactosidasa y la proteína según procedimientos descritos en el apartado 2.12. Las células BAEC se transfectaron siguiendo el método descrito del fosfato cálcico (Chen *et. al.*, 1988). El día anterior a la transfección, se plaquearon 4×10^5 células/ml en placas de cultivo de 60 mm. Las transfecciones se realizaron con 15 μ g de ADN reportero y 7.5 μ g de pCMV- β Gal. La valoración de las actividades de luciferasa, β -galactosidasa así como la cantidad de proteína se realizó a las 48 h postransfección.

Las sublíneas celulares Kmyc B y KMMT se transfectaron transitoriamente por electroporación usando las mismas condiciones que para la línea parental K562. La cantidad de ADN en cada transfección se normalizó utilizando un plásmido que contuviera el promotor CMV como portador de ADN. Las eficiencias de la transfección se normalizaron con fines comparativos entre las líneas celulares y las distintas construcciones por cotransfección con el plásmido de expresión pCMV- β Gal.

La transfección transitoria de células Mv1Lu se realizó igualmente con Lipofectina siguiendo las condiciones estándar proporcionadas por el fabricante y utilizando 10 μ g de ADN total. Como en los casos anteriores, la eficiencia de la transfección se normalizó por cotransfección con pCMV- β Gal. Como control positivo de respuesta a TGF- β se utilizó el vector de expresión p3TP-Lux (**Tabla 2.2**) inducible por TGF- β (Wrana *et. al.*, 1992). Cada punto transfectado se dividió en dos: una mitad utilizada como control del tratamiento y la otra mitad se trató con 5ng/ml de TGF- β 1. Las células se colectaron a las 48 h postransfección.

La transfecciones transitorias en células Jurkat, K562 y HeLa realizadas con la construcción de PECAM-1 pCD31-0.66-LUC y el vector de expresión para la subunidad p65

de NFκB pRc/CMV-p65 se llevaron a cabo utilizando Lipofectina y siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. La normalización de la eficiencia de la transfección en cada punto, se realizó por cotransfección con pCMV-βGal.

2.12.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA CON LAS CONSTRUCCIONES DE PECAM-1.

Los ensayos de la actividad luciferasa se realizaron a las 14, 24 ó 48 horas después de la transfección, empleando métodos descritos (Brasier *et. al.*, 1989; Wood *et. al.*, 1991), y utilizando “Luciferase Assay System Kit” (Promega). Para los ensayos de actividad luciferasa se emplearon las construcciones obtenidas del promotor de PECAM-1 clonadas en el vector de expresión pXP2. Como control positivo de la transfección se utilizó el vector pGL2-Luc que contiene el promotor temprano del SV40. Se asumió que el promotor de SV40 en pGL2-Luc, era capaz de dirigir niveles similares de transcripción del gen de la luciferasa en todas las líneas celulares. Las determinaciones de la actividad luciferasa, se realizaron en un luminómetro BioOrbit 1250 LKB con un tiempo de medida de 25 segundos. La normalización de las eficiencias de la transfección con fines comparativos entre las distintas construcciones y líneas celulares, se realizon con pCMV-βGal. Los ensayos de determinación de la actividad β-galactosidasa se efectuaron de acuerdo a métodos previamente descritos (Sambrook *et. al.*, 1989). Las actividades enzimáticas se refirieron a la cantidad de proteína en el extracto correspondiente. La proteína fue ensayada mediante el método de Bradford (Bradford *et. al.*, 1976) usando el reactivo coloreado comercial “Biorad protein assay” de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El valor de unidades relativas de luciferasa (RLU) se obtuvo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{RLU}_{\text{p-X-LUC}} = \frac{\text{Actividad luciferasa p-X-LUC}}{\text{Actividad pCMV-}\beta\text{Gal}}$$

donde p-X-LUC representa todos aquellos plásmidos ensayados que llevan el gen marcador de la luciferasa.

Con fines comparativos, la inducción de la actividad promotora por agentes diferenciadores (PMA) o citoquinas (TGF-β1) se definió según la siguiente relación:

$$\text{INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL} = \frac{\text{RLU en células tratadas}}{\text{RLU en células sin tratar}}$$

2.13.- IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EL PROMOTOR DE PECAM-1.

2.13.1.- Amplificación del extremo 5' del ADN genómico de PECAM-1 mediante la técnica de "PCR".

Para llevar a cabo los ensayos, se utilizó el "5' Amplifinder RACE Kit" (Clontech, Palo Alto, CA). La síntesis del ADNc, se llevó a cabo utilizando 10 µg de ARN total obtenido de células U-937 tratadas con PMA (10 ng/ml durante 48 h) que fue retrotranscrito a 44 °C durante 30 minutos utilizando como transcriptasa reversa M-Mlv (Clontech) y el oligonucleótido antisentido específico de PECAM-1 PE #3 correspondiente a la región 5' de PECAM-1 de la secuencia del ADNc descrita (Albelda *et. al.*, 1991). El ARN residual se hidrolizó con hidróxido sódico, y el ADNc sintetizado, se purificó mediante un soporte de bolitas (GENOBIND particles, Clontech). El oligonucleótido de cadena sencilla (oligonucleótido de anclaje) de 35 pb proporcionado en el "Kit", se ligó al extremo 5' del ADNc sintetizado utilizando T4 RNA ligasa. A continuación, se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido interno al oligonucleótido de anclaje (oligonucleótido de anclaje 2) y los oligos específicos antisentido de PECAM-1 PE#4 y PE#5. Las reacciones de amplificación tuvieron lugar en un volumen final de 100 µl con una concentración 5 µM de cada oligonucleótido. El programa de amplificación consistió en 30 ciclos con 45 s a 95 °C para la desnaturalización, 45 s a 56 °C para el anillamiento y finalmente, 1 s a 72 °C para la extensión. Al finalizar los 30 ciclos, tuvo lugar una extensión final durante 10 min a 72 °C. (Clackson *et. al.*, 1991). Estas amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador automático Perkin Elmer modelo "Gene PCR System 9600". Los productos de PCR obtenidos se analizaron y separaron mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión al 2% y el clonaje de estos productos se realizó utilizando un vector conteniendo extremos 3' protuberantes en deoxitimidina según procedimiento descrito (Marchuk *et. al.*, 1991), proporcionado por Invitrogen "TA cloning PCR", California, USA. Los plásmidos resultantes, se transformaron con bacterias DH5 α' competentes (Chung *et. al.*, 1988) y plaquearon en LB suplementado con ampicilina y X-Gal según métodos descritos (Sambrook *et. al.*, 1989). Se seleccionaron 24 colonias y el ADN purificado de las mismas, se sometió a secuenciación según el apartado 3.11 descrito anteriormente.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados es la descrita a continuación:

PECAM-1 PE#3 5' - CATCCTGAGAGTGAAGACTGAGGCACAGTTAGTTCTGCCTTC -3
 PECAM-1 PE#4 5' - TGAAAAGCAGAAATTGCTCT -3
 PECAM-1 PE#5 5' - AGAGAGACCGGCTGTGGCGC -3

2.13.2.- Ensayo de protección con nucleasa S1.

Se llevó a cabo utilizando un "Kit" comercial "S1 AssayTM" (Ambion, Inc). El oligonucleótido PE #6 (5'- GTCTCTGCTTTTCCAGTCCTCCCCTTCCCCCATCAAAGAG GGCTTTTGCCACACAGCATAAGT-3') fue marcado en su extremo 5' con [γ -³²P] dATP y T4 polinucleótido quinasa. 25 μ g de ARN total procedente de U-937 tratadas con PMA (10 ng/ml durante 48 h) ó ARN de levadura como control negativo, y aproximadamente 5×10^5 cpm del oligonucleótido marcado se hibridaron a 42 °C durante 18 h en tampón de hibridación (80% formamida desionizada, 100 mM citrato sódico pH 6.4, 300 mM acetato sódico pH 6.4, 1 mM EDTA). Posteriormente, la muestra se sometió a un proceso de digestión con nucleasa S1 (250 U/ml) durante 30 minutos a 37 °C y a una precipitación con etanol. Los fragmentos protegidos se analizaron en un gel de poliácridamida en condiciones desnaturalizantes al 8%. Como marcador de tamaños de ADN se utilizó ADN del fago ϕ X174 digerido con *HinfI* marcado radiactivamente en el extremo terminal 5' con [γ -³²P] dATP. Las bandas específicas radiomarcadas, fueron detectadas con un Phosphorimager 410A y el paquete informático ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EEUU).

2.14.- CITOMETRÍA DE FLUJO.

El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo a 4 °C, mediante incubación de 100 μ l de suspensión celular en PBS (concentración aproximada de 5×10^6 células/ml) con el correspondiente anticuerpo (100 μ l de una dilución 1/500 de fluido ascítico HC1/6), durante 30 minutos. Tras un lavado con 1 ml de PBS, las células se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Sobre el sedimento celular se añadieron directamente 50 μ l de una dilución 1/30 de fragmentos F(ab)₂ de conejo anti-ratón marcados con isotiocianato de fluoresceína (Dakopats, Noruega). Tras una nueva incubación durante 30 minutos, las células fueron lavadas como antes, centrifugadas y resuspendidas en 250 μ l de PBS. Dichas muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo modelo EPICS CS o EPICS XL (Coulter Científica, Móstoles, España), usando amplificación logarítmica para detectar fluorescencia. Para determinar el blanco se hizo el marcaje en ausencia del primer anticuerpo.

Los anticuerpos utilizados en el presente trabajo han sido: **HC1/6** (anti-CD31) (Cabañas *et. al.*, 1989) y **TP1/8** (anti-CD69) (Cebrián *et. al.*, 1988) donado generosamente por el Dr. Francisco Sánchez Madrid.

2.15.- ENSAYOS DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.

Los ensayos de cambio de movilidad electroforética de oligonucleótidos de doble cadena se efectuaron de acuerdo a métodos ya descritos (Chodosh *et. al.*, 1986).

2.15.1- Obtención de los extractos nucleares.

Los extractos nucleares en pequeña escala se obtuvieron de acuerdo a un método previamente descrito (Schreibert *et. al.*, 1989). Se recolectaron $1-2 \times 10^7$ células mediante centrifugación a 1.000 r.p.m a 4 °C durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1 ml de tampón TBS (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en un tampón de homogeneización hipotónico (Hepes 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM) suplementado justo en el momento de su utilización con una concentración final de 5 µg/ml leupeptina, 2.5 mM DTT y 1.2 mM PMSF. Una vez resuspendidas las células, se mantuvieron en hielo 15 minutos, añadiéndose al cabo de este tiempo NP-40 a una concentración final de 0.6%. La fracción nuclear se obtuvo mediante centrifugación a 1.200 r.p.m. a 4 °C durante 1 minuto, eliminándose el sobrenadante. Al precipitado nuclear, se le añadió el tampón de extracción (Hepes 20 mM pH 7.9, glicerol 25%, NaCl 0.4 M, EDTA 1mM, EGTA 1 mM), suplementado igual que en el caso del tampón de homogeneización, agitándose a continuación durante 15 minutos a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 1.200 r.p.m. a 4 °C durante 5 minutos. Los extractos nucleares (sobrenadante) se alicuotaron y almacenaron a -70 °C hasta su utilización. La cuantificación de proteína en el extracto se realizó según se describe en el apartado 2.12.

2.15.2.- Anillamiento de los oligonucleótidos de cadena sencilla.

Para la obtención de oligonucleótidos de doble cadena, 30 µg de cada uno de los oligonucleótidos de cadena sencilla (complementarios entre sí) se hibridaron mediante calentamiento durante 5 minutos a 85 °C en 75 µl de una solución conteniendo 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM espermidina, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT. A continuación, se dejó enfriar la mezcla hasta 40 °C pasando la muestra posteriormente a un baño de hielo.

2.15.3.- Ensayos de unión.

Los ensayos de unión se realizaron incubando 10 µg de proteína nuclear, 4 µg de poli-(dI-dC) y 5 ng de oligonucleótido marcado radiactivamente en un volumen final de 20 µl durante 20 minutos a 4 °C.

Los ensayos de unión para SP1 y EGR-1, se efectuaron en presencia de un tampón de reacción conteniendo 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 0.5 mM DTT, 0.05% (w/v) NP40, 12% glicerol, 1 mg/ml BSA y 20 mM Hepes pH 7.5 en hielo durante 20 minutos. Los ensayos de unión en el caso de NFκB, se hicieron en tampón con la siguiente composición: 10mM Hepes PH 7.8, 10 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 170 mM NaCl, 10% glicerol, 10 µg BSA durante 20 minutos a 4 °C.

Para experimentos de competición, se incubó un exceso de 50-100 veces de oligonucleótido no marcado (según se indique) durante 20 minutos a 4 °C antes de añadir el oligonucleótido marcado radiactivamente. Del mismo modo, anticuerpos frente a SP1 (proporcionados generosamente por el Dr. S. Jackson, Cambridge, UK) o EGR-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), p50, p65 o c-Rel (proporcionados generosamente por el Dr. Eduardo Muñoz, Córdoba, Spain), fueron incubados con los extractos nucleares durante 15 minutos a 4 °C antes de añadir la sonda marcada a la mezcla de reacción.

Para preparar la oligo-sonda que contiene una secuencia de reconocimiento para el factor de transcripción NF-κB, se utilizaron los oligonucleótidos:

NFκB-PECAM-1:	5´ -	GGCAGGGAGGAATCCCCTCACAGT	-3´
	3´ -	GTCCCTCCTTAGGGGAGTGTCAGG	-5´
NFκB-CD11c	5´ -	GATCGAGGGGACTTTCCTAGC	-3´
	3´ -	AGCTCCCCTGAAAGGGATCGGG	-5´

La secuencia de NFκB-PECAM-1 corresponde a los nucleótidos +102 a +129 de la secuencia genómica del promotor de PECAM-1. La secuencia de NFκB-CD11c corresponde al sitio consenso para el factor de transcripción NFκB del promotor de CD11c.

Las secuencias de los oligonucleótidos relacionados con el sitio consenso SP1/EGR-1 y AP-2 unas vez anillados se detallan a continuación. Los nucleótidos que aparecen en negrita representan la localización de la mutación.

Sp1/EGR1-PECAM-1	5'- GCATTCCAAGCTCAGCCTGCCCCAGCA 3'- TAAGGTTTCGAGTCGGACGGGGTCGTGG	-3' -5'
Sp1/EGR1-DC11c	5'- GCGTACTCTGCCCCGCCCCCTCTGACTC 3'- CCGCATGAGACGGGCGGGGAGACTGAGC	-3' -5'
Sp1/EGR1-CD11c-mut	5'- GCGTACTCTGCC GAATT CCTCTGACTC 3'- GCATGAGACGG CTTA AGGAGACTGAGC	-3' -5'
AP2-CD11a	5'- CTCCTGAACCCCTGCGGTTTCACAACCTCCTG 3'- GGAGGGACTTGGGGACGCCAAAGTGTTGAGGACC	-3' -5'
AP2-CD11a-mut	5'- CTCCTGAACCC GAATTC TTTCACAACCTCCTG 3'- GGAGGGACTTGGG CTTAAG AAAGTGTTGAGGACC	-3' -5'

La secuencia de Sp1/EGR-1-PECAM-1 corresponde a los nucleótidos -109 a -76 de la secuencia genómica del promotor de PECAM-1. La secuencia de Sp1/EGR1-CD11c corresponde a los nucleótidos -81 a -55 del promotor CD11c y contienen la secuencia consenso para los factores de transcripción Sp1 y EGR-1 (Klemsz *et. al.*, 1990). La secuencia de AP-2-CD11a corresponde a los nucleótidos -110 a -80 del promotor de CD11a y contiene un sitio consenso para el factor de transcripción AP-2 (Klemsz *et. al.*, 1990).

3.- RESULTADOS

3.1.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLON GENÓMICO CONTENIENDO LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN DE PECAM-1.

Para aislar la región reguladora 5' flanqueante del gen PECAM-1, se llevó a cabo el escrutinio de una genoteca de placenta en el fago λ EMBL3 utilizando como sonda un fragmento *Xho I* de 692 pb que contenía el extremo 5' del ADNc de PECAM-1 (Simmons *et. al.*, 1990; Stockinger *et. al.*, 1990; Albelda *et. al.*, 1991). Una vez efectuados cuatro pases de selección, se obtuvieron cuatro clones que se sometieron a digestiones con los enzimas de restricción *Sall*, *Sau3A* y *BamHI* los cuales, liberaban los brazos del fago y el inserto genómico. Finalmente, se escogió el clon 4.1.2.1 que contenía el mayor inserto (14 Kb). La caracterización de este clon se llevó a cabo mediante digestiones con enzimas de restricción, bien de forma aislada, o efectuando digestiones dobles de forma combinada. En la **Figura 3.1** se muestra el mapa de restricción obtenido del clon genómico 4.1.2.1 de PECAM-1 siguiendo el procedimiento de las digestiones descrito anteriormente.

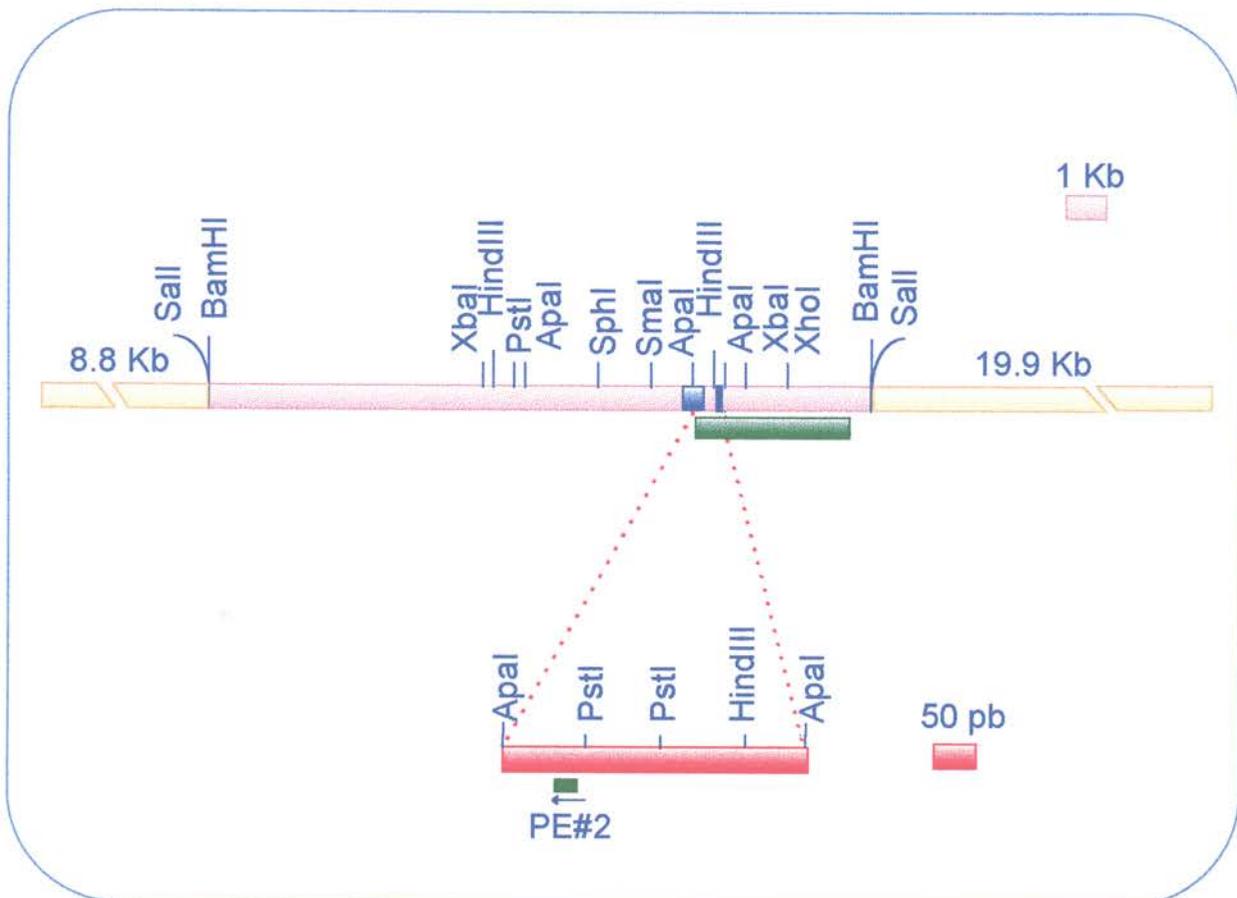


Fig. 3.1.- Mapa de restricción del clon genómico 4.1.2.1 conteniendo la región 5' flanqueante del gen PECAM-1 en el fago λ EMBL3. Los brazos del fago se representan con barras amarillas y el inserto genómico de PECAM-1 de 14 Kb se representa con una barra rosa. La localización del fragmento de cDNA de 692 pb *XhoI* utilizado en el escrutinio de la genoteca se representa con una barra verde. En la figura también se indica la posición relativa de los exones I y II (recuadros en azul). Como se muestra, la digestión con *HindIII/Sall* dio lugar a 3 fragmentos *Sall/HindIII* (4.2 Kb), *HindIII/HindIII* (5.3 Kb) y *HindIII/Sall* (3.75 Kb). El oligonucleótido antisentido PE#2, utilizado para identificar por *southern blot* cual de estos fragmentos contenía la región más 5' flanqueante de PECAM-1, se representa también en la parte inferior de la figura (barra roja).

El estudio de este mapa preliminar, nos reveló que de las 14 Kb de inserto genómico, los exones 1 y 2 que codifican para la región 5' no traducida de PECAM-1 y contenidos en 3.7 Kb se localizaban en la región 3'. Como lo que nos interesaba era la región reguladora de la transcripción del gen, las siguientes hibridaciones las realizamos con un oligonucleótido antisentido PE#2 comprendido entre los nucleótidos 17-42 de la región 5' flanqueante no traducida del ADNc publicado. Concretamente la digestión doble del clon 4.1.2.1 con *HindIII/SalI*, dio lugar a tres fragmentos de 3.75, 4.2 y 5.3 Kb. De estos, el fragmento *HindIII/HindIII* de 5.3 Kb que hibridó con el oligonucleótido PE#2 se subclonó en el plásmido pBS para realizar un mapeo más fino del mismo y llevar a cabo su secuenciación. En la **Figura 3.2** se muestra un mapa de restricción parcial del fragmento de 5.3 Kb *HindIII/HindIII* que contiene parte del primer exón. El fragmento *SmaI/PstI* de 1.42 Kb se subclonó en el vector de expresión pXP2. El mapa de restricción y la estrategia de secuenciación del ADN genómico de una de las cadenas del fragmento *SmaI/HindIII* de 1.55 Kb se esquematiza en la **Figura 3.3**.

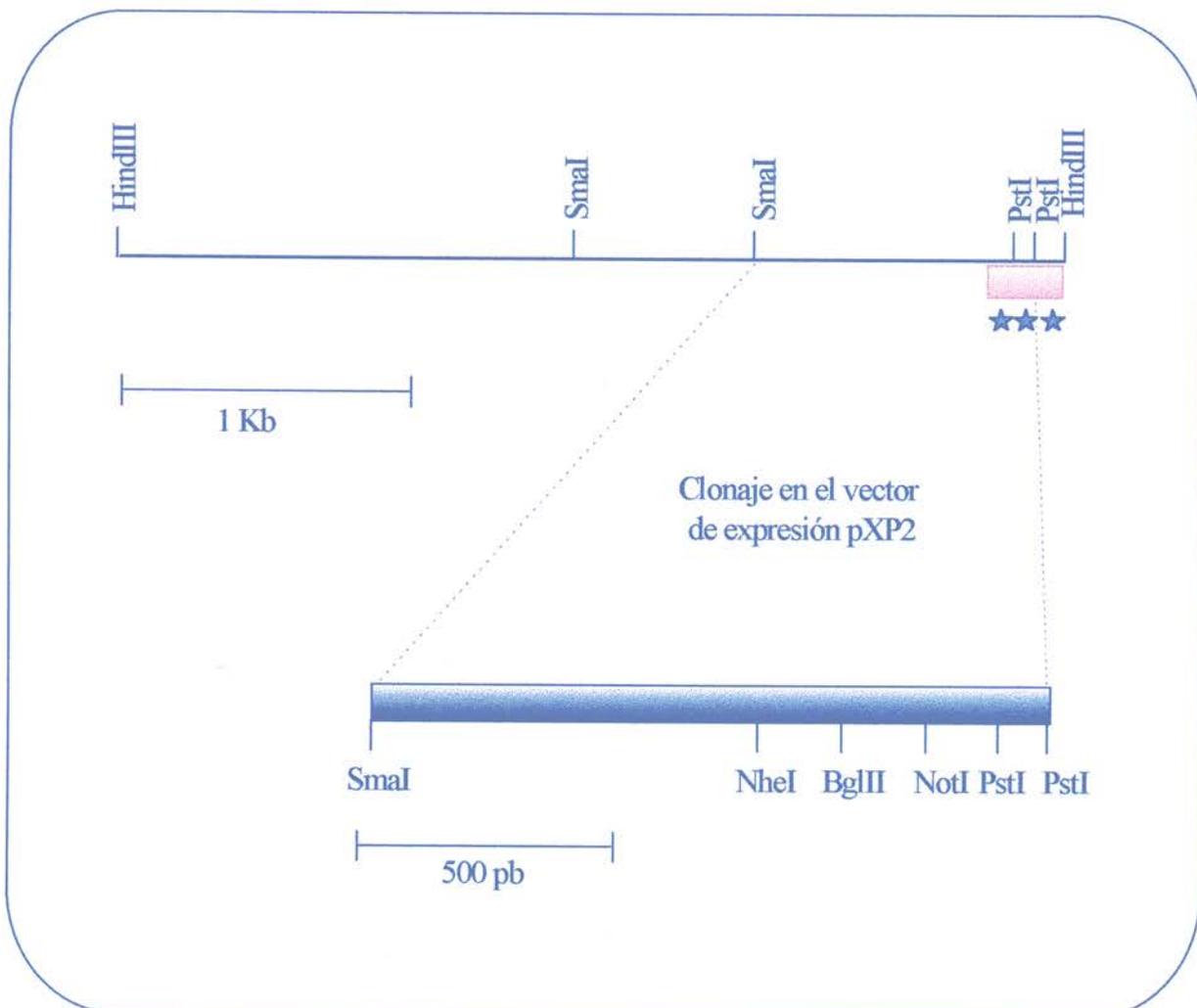


Figura 3.2. Mapa de restricción detallado del fragmento genómico de 5.3Kb *HindIII/HindIII* que contiene la región promotora de PECAM-1 así como el primer exón (caja rosa). El fragmento *SmaI/PstI* se subclonó en el vector de expresión pXP2 delante del gen de luciferasa para la realización de ensayos de actividad promotora. La sonda utilizada se representa con una línea de estrellas azules.

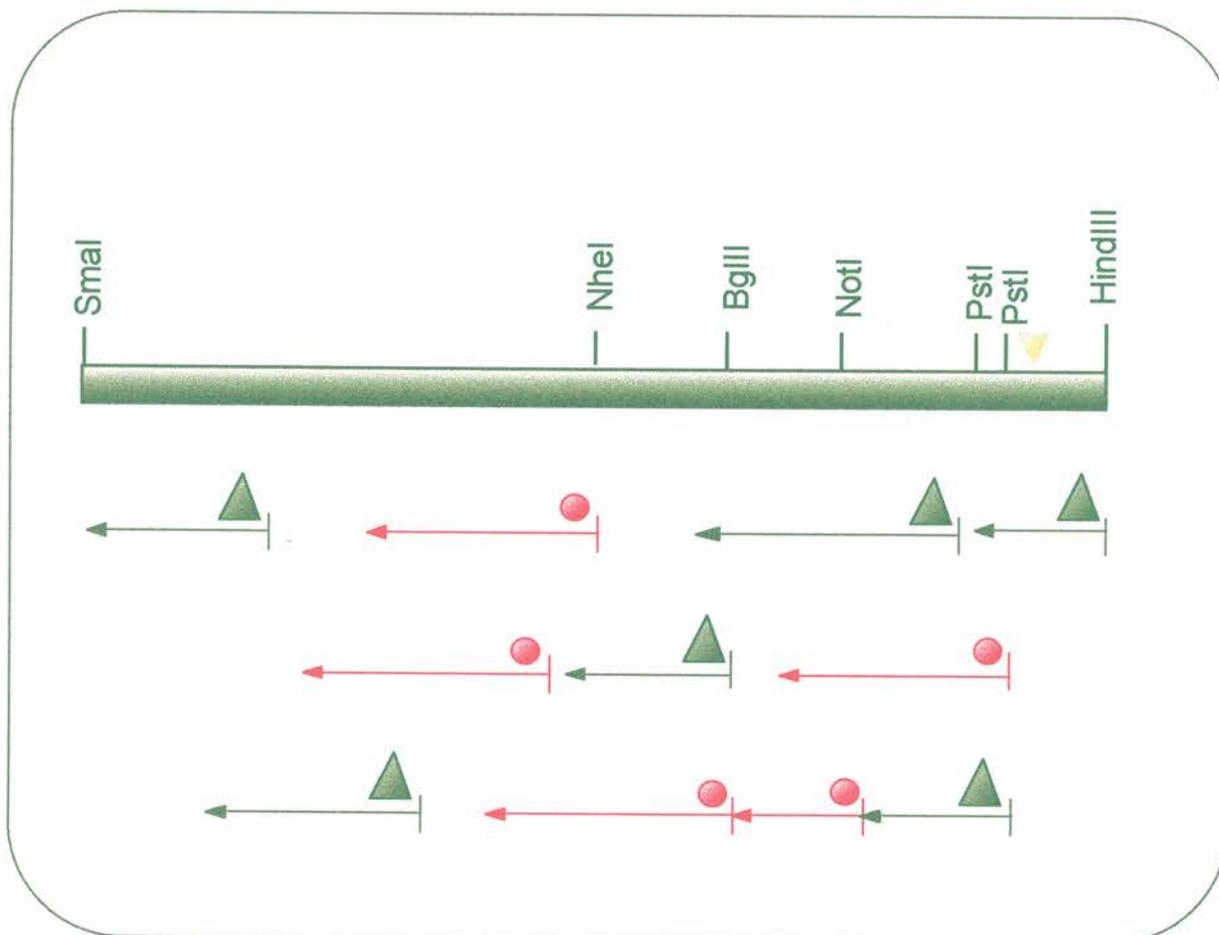


Figura 3.3.- Representación esquemática de la estrategia de secuenciación de una de las cadenas del fragmento genómico de 1.55 Kb *SmaI/HindIII*. El marco de lectura abierto se representa con un triángulo invertido amarillo. Las flechas representan la dirección y longitud de la secuencia que fue obtenida bien con nucleótidos específicos (triángulos verdes) o a partir de delecciones seriadas (círculos rojos) en el vector de expresión pXP2.

3.2.- SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LA REGIÓN 5' FLANQUEANTE DEL GEN PECAM-1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL PROMOTOR DE PECAM-1.

La **Figura 3.4** muestra la secuencia genómica de los primeros 1.242 pb por encima del inicio de transcripción descrito previamente en células endoteliales (Kirschbaum *et. al.*, 1994). El análisis de la secuencia del fragmento de 1.55 Kb *SmaI/HindIII* de la **Figura 3.4**, reveló la presencia de 48 nucleótidos del primer intrón, 268 nucleótidos del primer exón y 498 nucleótidos de la región 5' de PECAM-1 descritos previamente (Kirschbaum *et. al.*, 1994). Además, en el presente trabajo describimos, por primera vez, una secuencia de 744 nucleótidos que corresponde a la región reguladora 5' del gen PECAM-1.

La región 5' flanqueante del gen PECAM-1 carece de una secuencia consenso para una caja TATA o CAAT, y contiene diversos posibles elementos reguladores *en cis*. Se han encontrado posibles secuencias reguladoras de la transcripción *en cis* cuya posición se indica

▼ **SmaI**
 -942 CCCGGGTTCA AGCGATTCTC CTGCCTCAGC CTCTGGGTA GCTGGGATTA TAGGCGTGTG
 -882 CCACCGTGCC TGGCTAATTT TTGTATTTTT ATTGGAGACA GGGTTTCACC ATGTTGGCCA
 -822 GGCTGGTCTG AAACCTCTGA CCTCAGGCAA TCCTCCTACC TCAGCCTCTC AAAGTGTCTGG
 LyF-1
 -762 GATTACCGGC ATGAGCCACG ACTCCCGGCC CCAAAGGTCA ATCTTAAAGC TACAAGGTAT
 -702 CTTTTAAAAG GAGTAGGAAT AACGTATTTT GAGGCTTAAA GGAGTAGGAA TAGTGTATTT
 -642 TTAGATTTGA AGCCATCTTC TAAAGGGTAC GATATTTGGT TAACAATGCA CTCCTTATCG
 GATA C/EBP GATA(R)
 -582 CCATGGAAGA AGTTAATTCT ATTCTTTTTT TTTTTTTTTT GAGATGGAGT CTCACTCTGT
 -522 TGCCCAGGCT GGAGTACAAT GGTGTGATCT CAGTCACTG CAACCTCTGC CTCCTGGGTT
 AluI
 -462 CAAGCAATTC TCCTGCCTCA GCCTCCTGAG TAGCAGGGAT TACAAGGGTT CTCCACCATG
 NFkB
 -402 CCTGTCTAAT TTTTGTATTT TTTTTTTT TAGAGGTGGA GTTTCACCAT GTTGGTCAGG
 AR
 -342 CTGGTCTCAA ACCCCTAAC TCATGATCC CCCGCTTGG CCTCCCAAAG TGCTGGGATT
 SSRE HEPT SPI/AP-2 AP-2 LyF-1
 -282 ACAGGCGTGA GCCACCATGC CCAGCCGTTA ATTCTATTCT TACTGCTTAC TCCCTTATTT
 CCACC
 -222 TGTAATGTTCT TCTTCTATCT TACATCTTTT GCTTTTGCTA TTGCTTAAGC TAGCCTACGC
 GRE GATA-3 YYI C/EBP NheI
 -162 CAAGGGTGCT CTTTGCCCC TACTTCCTCT GCTATTCTCG CCTCAGTTCC GCTGCATTCC
 ets
 Sp1/EGR1 AP-2 SSRE AR
 -102 AAGCTCAGCC TGCCCCAGCA GCAGGTCTCT TTGACAAACC TGCAATTTTG GGGAAAAGTC
 caja GC
 -42 AGCCCCAAGA AAGCAGGGG GCCCAGACTT ATGCTGTGTG GCAAAGCCC TCTTTGATCG
 ets
 +19 GGGAAAGGGA GACTTGAAA AGCAGAGAGA TCTTTCTGGA TGTCTGGGA GAGCAAGCCT
 BglIII APRE NFkB (R)
 +79 TTGGTGGTG GGTGGAGGCT GGAGGCAGG AGGAATCCCC TCACAGTGCC ATGAGAAGGG
 ets NFkB AR
 +139 CCCCCAAACC CAGGCGAGAC AGAGGGAGGG TCAAGAACGC CAAGGCAAAAT GTCAATTGTG
 OCT E-Box AR E-Box
 +199 CTTGTTTTT TCCCTAAAGA AACTAAACAA AGCGGCCGCG TTCGGTGGCC CTCAGGAAG
 HMG NotI caja GC +253 ets
 +259 GCCGGTCATT TCCTGAGGAG ATATCAGGCC AGCCAGGCC CCATTGTTCC CGGTTTCCAG
 ets GATA caja GC +301
 +319 CCATGGCTGC CATTACCTGA CCAGCGCCAC AGCCAGTCTC TCTGCAGGCG CCGGGAGAAG
 SSRE
 +379 TGACCAGAGC AATTTCTGCT TTCACAGCG CGGGTTTCTC AACGGTGA CTGTGGGCAGT
 AR Sp1
 +439 GCCTTCTGCT GAGCGAGTCA TGGCCCAGG GCAGAACTAA CTGTGCCTGC AGTCTTCACT
 PstI
 +499 GTCAGGATGC AGCCGAGGTG GGCCCAAGGG GCCACGATGT GGCTTGGAGT CCTGCTGACC
 M Q P R W A Q G A T M W L G V L L T
 +559 CTTCTGCTCT gtgagtgttt actctgtttc cacatcactt taactccatg agcatcgaag
 L L L HindIII

Figura 3.4.- Secuencia nucleotídica de la región 5' flanqueante y parte del primer exón del gen de PECAM-1. La numeración, en el margen izquierdo, está referida al sitio de inicio de la transcripción (+1) del foco de transcripción en 5' determinado por análisis de 5' RACE. Las flechas de color verde indican los sitios de inicio de la transcripción encontrados en el presente trabajo en células U-937 (posiciones -7, -6, +1, desde +9 hasta +18, y +53) o por otros autores en células endoteliales (+301) (Kirschbaum *et. al.*, 1994). La localización del oligonucleótido PE#2 utilizado en el escrutinio de la genoteca aparece subrayado con línea verde a trazos. La localización de los sitios consenso de las enzimas de restricción utilizadas para obtener las delecciones de PECAM-1 aparecen representadas mediante puntas de flechas invertidas en color rojo. Las secuencias consenso para la unión de factores de transcripción encontradas aparecen destacadas en recuadros en color azul con el nombre correspondiente del factor de transcripción. Entre estos sitios cabe destacar tanto factores de transcripción ubicuos como específicos de tejido así como factores de transcripción dependientes de diferenciación. Se destaca la existencia de sitios Sp1, EGR-1, LyF-1, AP-2, *ets*, YY1, GATA-1, GATA-2, GATA-3, CCACC, NFκB, heptámero (HEPT), octámero imperfecto (OCT), E-Box, HMG, elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), elementos de respuesta a AR, elementos de respuesta a *Shear Stress* (SSRE). Los dos sitios LyF-1 están flanqueados en la región más 3' por una secuencia de 13 nucleótidos (subrayado azul). La secuencia Alu, localizada entre las posiciones -571 y -242 está representada con una caja rosa. Esta secuencia nucleotídica ha sido sometida a la base de datos EMBL/GenBank con el número de acceso X96848. La secuencia de aminoácidos derivada del primer exón, se muestra utilizando un código simple de letras y subrayando cada uno de los tripletes que codifican para cada aminoácido.

entre paréntesis tales como AP-2 (-88, -297, -308), Sp1 (+407, -84, -308), YY1(-193), dos cajas E-Box adjacencias (+184 y +191), cuatro cajas HMG (*High Mobility Group*) en tándem (+200, +214, +218 y +223) y dos sitios C/EBP (-598 y -172), tres elementos de respuesta al estrés (*shear stress element*) SSRE (+353, -74 y -335), un sitio de reconocimiento para glucocorticoides GRE (-213) y en la posición +63 un elemento de respuesta para procesos en fase aguda (*acute responsive element*) APRE.

Además de los citados, se encontraron otros motivos de reconocimiento asociados con el proceso de diferenciación hematopoyética. Concretamente cuatro sitios consenso para la familia *ets* de factores de transcripción (Klemsz *et. al.*, 1990) localizados en las posiciones: +273, +252, +108 y +18. Cuatro sitios GATA en las posiciones +275, -203, -583 y -608, los cuales se ha descrito que pueden dirigir la expresión génica durante la diferenciación eritroide/megacariocítica y de líneas de mastocitos (Orkin *et. al.*, 1992); un sitio consenso para un factor de transcripción de la familia de los “dedos de zinc” EGR-1 (Nguyen *et. al.*, 1993) localizado en la posición -86, tres sitios consenso para el factor de transcripción NFκB en las posiciones +110, +76 y -409 (los dos últimos dispuestos orientación reversa); y 5 motivos de reconocimiento para la respuesta a ácido retinoico (de Thé *et. al.*, 1990) en las posiciones +401, +188, +119, -66 y -356.

Igualmente, hemos identificado tres posibles secuencias relacionadas con el linaje linfocítico: octámero imperfecto (+181), heptámero (-317) y Lyf-1 (-770 y -294). Curiosamente, los dos sitios LyF-1 flanquean la región 3' con una secuencia idéntica de 13 nucleótidos, sugiriendo un papel funcional para ambos fragmentos. Entre los nucleótidos -571 y -242 se extiende una secuencia ubicua Alu que contiene algunas de las secuencias descritas anteriormente como elementos SSRE, heptámero, NFκB, LyF-1, Sp1 y AP-2. Tal como cabría esperar, esta secuencia Alu está flanqueada tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' por regiones que contienen pequeñas repeticiones de 15 nucleótidos.

3.3.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA REGIÓN 5' FLANQUEANTE DE PECAM-1: LOCALIZACIÓN DE REGIONES REGULADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN.

Para determinar la existencia de regiones relevantes en la regulación de la expresión del gen PECAM-1, se analizó la capacidad de la región 5' flanqueante para promover la transcripción. Para ello, se generaron una serie de deleciones seriadas tanto en el extremo 5' como en el extremo 3'. Para generar estas deleciones se aprovechó la existencia de sitios de corte con enzimas de restricción en el fragmento *SmaI/PstI* de 1.42 Kb. Los fragmentos genómicos obtenidos se clonaron delante del gen de luciferasa en el plásmido de expresión pXP2. Las construcciones generadas, se muestran en la **Figura 3.5** donde la construcción de 1.42 Kb aparece situada en posición central. Por encima de la misma se representan las deleciones obtenidas en dirección 3' y en la parte inferior aparecen las deleciones realizadas en dirección 5'.

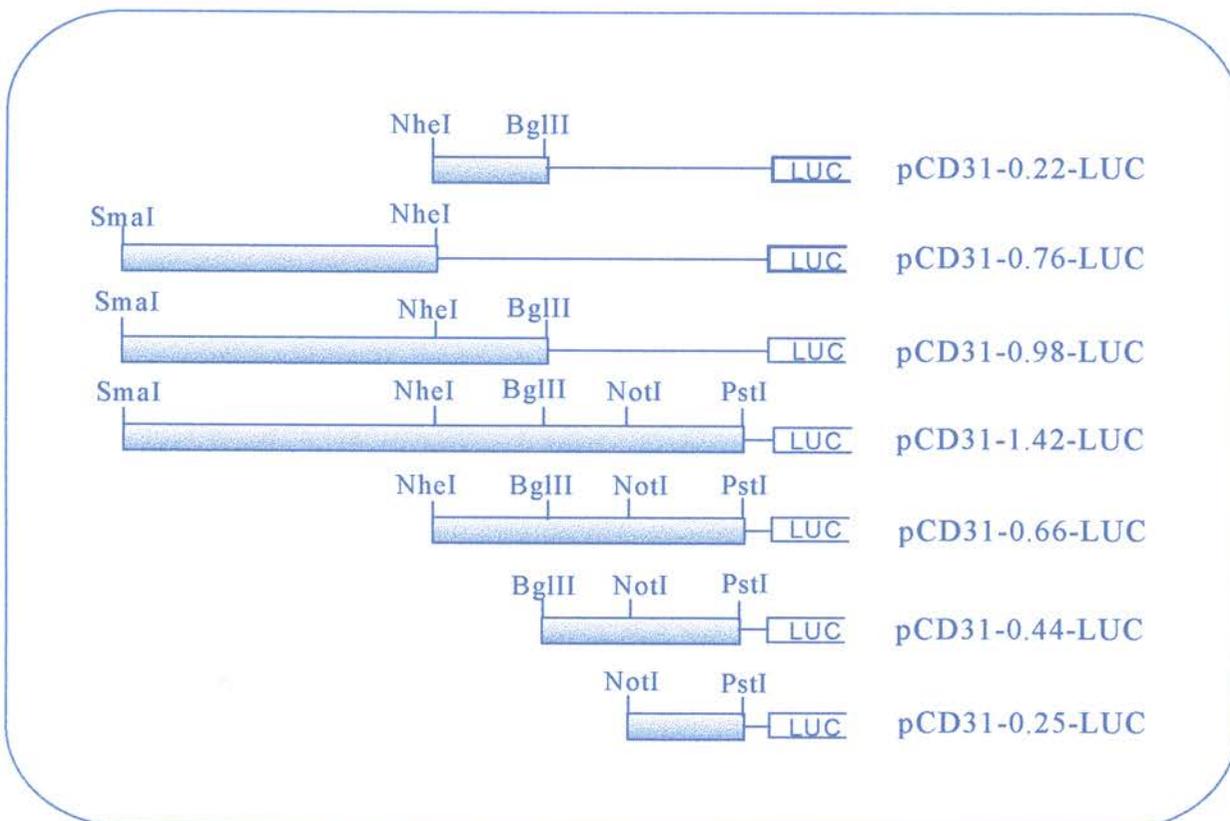


Figura 3.5.- Esquema de las construcciones de PECAM-1 en el vector de expresión pXP2-LUC. Los fragmentos genómicos obtenidos por digestión con enzimas de restricción (cajas rellenas de color azul) se insertaron en el vector reportero pXP2 precediendo al gen de luciferasa (cajas LUC). En la figura aparecen indicadas las posiciones de referencia de los sitios de restricción utilizados para la obtención de las deleciones. Así mismo, en el margen derecho de la figura se muestra la nomenclatura utilizada para designar a cada construcción generada.

La actividad promotora de todas estas construcciones genómicas se ensayó mediante transfecciones transitorias según se describen en el apartado 2.12 de “Materiales y Métodos” para cada línea celular: U-937 (línea promonocítica humana, CD31⁺), HEL (línea eritro-

megacarioblástica, CD31⁺), K562 (línea eritroleucémica humana, CD31⁺), HeLa (Carcinoma de cérvix humano, CD31⁻) y NCTC-929 (fibroblastos de ratón, CD31⁻).

En estos ensayos, incluimos como control positivo el plásmido pGL2P-Luc en el que el promotor de SV40 controló la expresión del gen de luciferasa. La capacidad de cada una de estas construcciones para promover la transcripción se determinó valorando la actividad luciferasa de los extractos citoplásmicos obtenidos a partir de las células transfectadas. Para cada ensayo los valores de actividad luciferasa se corrigieron en función de la eficacia de transfección para cada construcción utilizando los valores de actividad β -galactosidasa obtenida por la co-transfección del plásmido CMV- β Gal tal y como se explica en el apartado 2.12. El resultado numérico de las transfecciones se refirió respecto al vector pGL2P-Luc, utilizado como control positivo de la transfección, conteniendo el promotor del SV40 y considerándose arbitrariamente este valor como 100 en todas las líneas celulares utilizadas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.6** donde se pueden observar las transfecciones transitorias efectuadas con las construcciones que contienen las deleciones en 5' de la región reguladora de PECAM-1.

La mayor actividad transcripcional la presentó con diferencia la línea celular K562, seguida por una importante actividad en células HEL y U-937, cuyos valores relativos de actividad luciferasa (RLU) fueron entre 6 y 4 veces inferiores respectivamente a los obtenidos con K562. Por el contrario, la actividad promotora de las distintas construcciones de PECAM-1 en líneas celulares que no expresaban PECAM-1 como son HeLa y NCTC-929 fueron insignificantes. Concretamente, la actividad luciferasa respecto a HeLa y NCTC-929, fue entre 11-575 veces en K562, entre 4-77 veces en HEL y entre 2-57 veces en U-937. El vector de expresión pXP2 vacío, utilizado como control negativo, presentó una actividad luciferasa que estaba dentro del nivel de fondo. Estos datos muestran una clara correlación entre la capacidad de promover la transcripción y la expresión de PECAM-1 en cada una de las líneas celulares descritas (**Figura 3.7**).

3.4.- DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD TISULAR DEL PROMOTOR DE PECAM-1.

Para determinar la secuencia promotora mínima capaz de inducir actividad promotora específica de tejido, se comparó la actividad promotora de una serie de deleciones en 5' del promotor de PECAM-1 entre líneas celulares que expresaban PECAM-1 y aquellas que no lo expresaban. La construcción pCD31-1.42-LUC y su derivada pCD31-0.44-LUC en células K562 que expresaban PECAM-1 en su superficie, mostraron actividades medias similares a las obtenidas con la construcción del promotor del SV40.

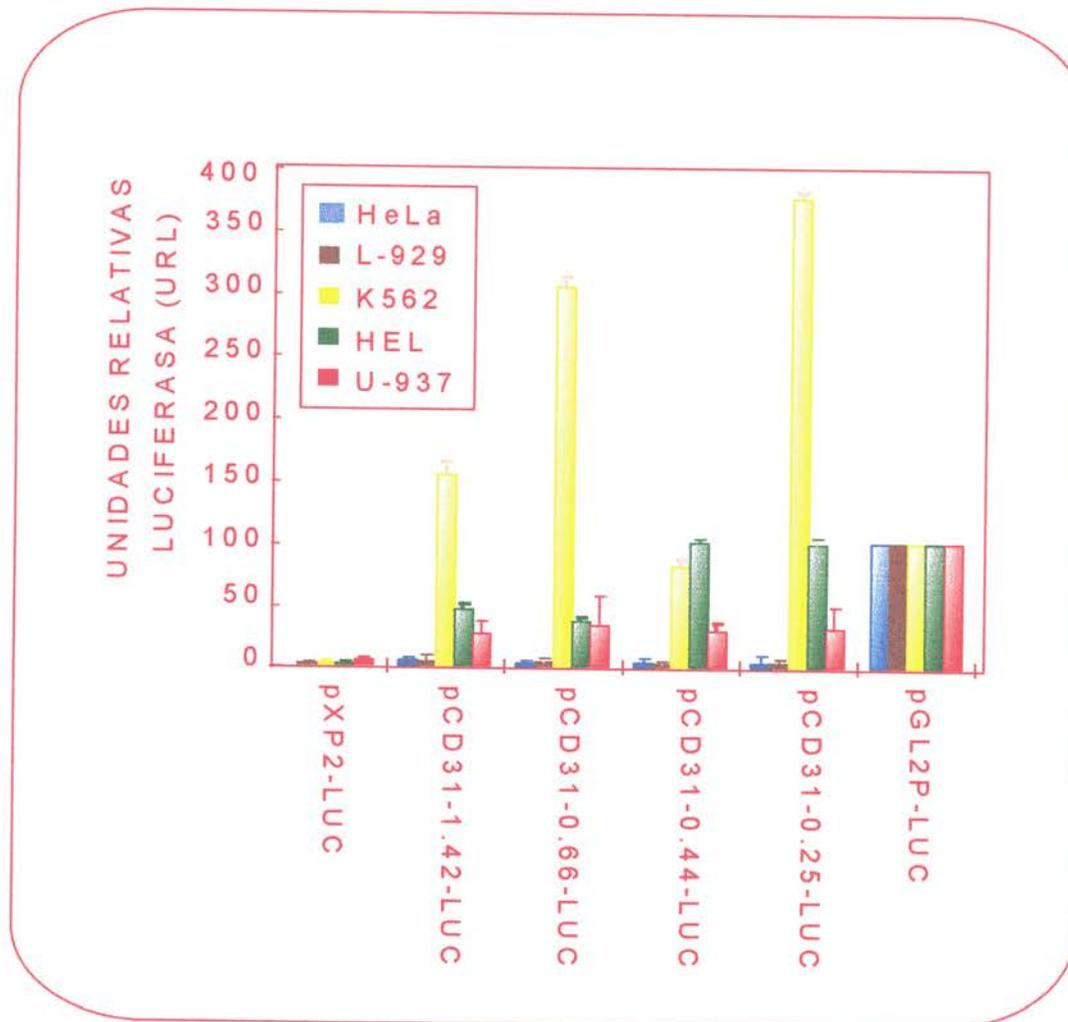


Figura 3.6.- Análisis de la actividad promotora desarrollada por las deleciones en dirección 5' de PECAM-1 mediante transfección transitoria de las líneas celulares indicadas. La actividad promotora se expresa respecto a la actividad luciferasa producida por pGL2P-LUC al que arbitrariamente se ha asignado el valor 100 después de normalizar la eficiencia de la transfección por cotransfección con pCMV- β Gal (K562, HeL, HeLa, L-929) y pSEAP (U-937). Los datos representados corresponden a la media de 5 experimentos distintos cada uno de los cuales se ha realizado con preparaciones de ADN distintas.

Las construcciones pCD31-0.66-LUC y pCD31-0.25-LUC mostraron respectivamente una actividad entre 2 y 2.5 veces mayor que la actividad del fragmento de 1.42 Kb. Si tenemos en cuenta que el fragmento de 0.25 Kb *NotI/PstI* comprende los nucleótidos desde +232 hasta +488, la actividad promotora de la construcción pCD31-0.25-LUC sugiere que el fragmento mínimo requerido para dirigir la transcripción de PECAM-1 desde el sitio de iniciación descrito en la posición +301 (Kirschbaum *et. al.*, 1994) está localizado en los 69 nucleótidos más 5' flanqueantes de dicha construcción. Esta región cuenta con la secuencia consenso iniciadora ATTTC₁₋₃₀GCCA, similar a la secuencia de reconocimiento para la RNA polimerasa II encontrada en otros promotores que carecen de caja TATA (Means *et. al.*, 1990; Smale *et. al.*, 1989), así como por elementos descritos como amplificadores potenciales del proceso de transcripción, como son los miembros de la familia *ets*, GATA y *shear stress*.

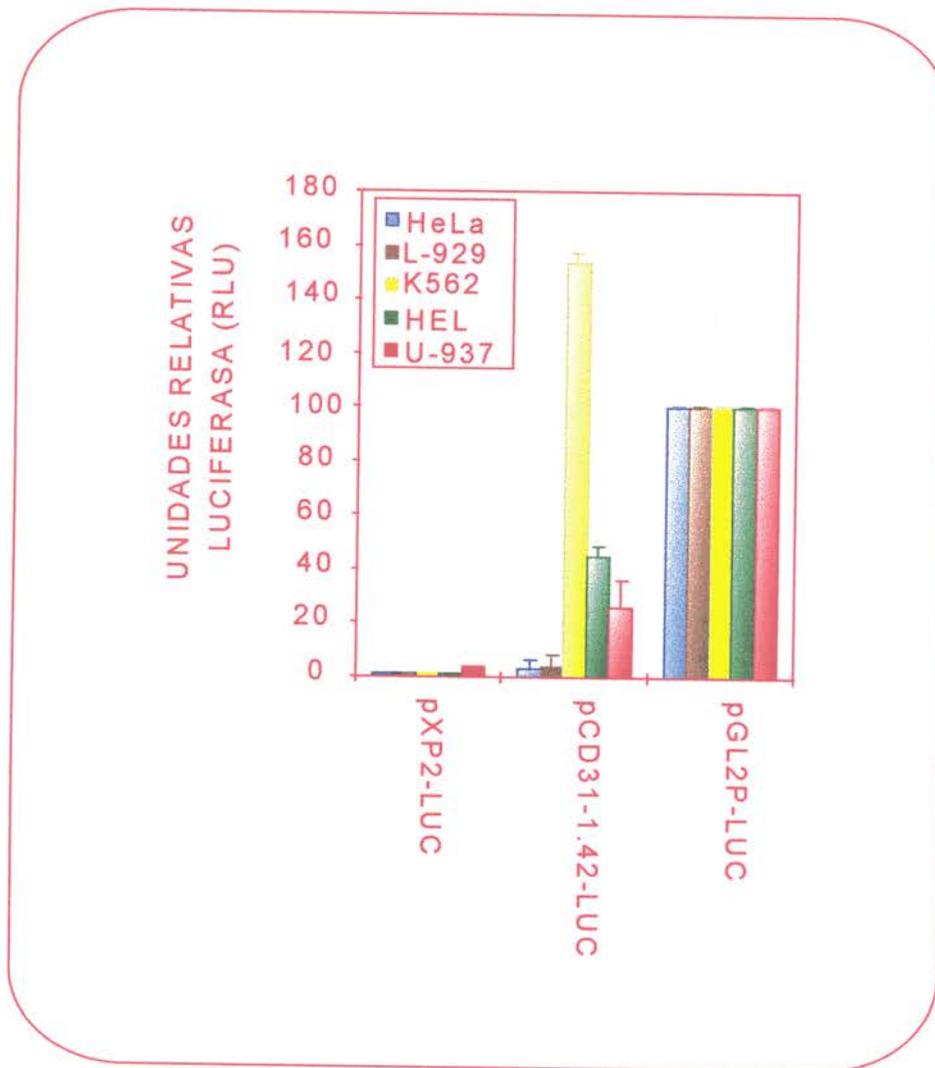


Figura 3.7.- Especificidad de tejido en la actividad transcripcional del promotor de PECAM-1. En la figura se muestra la actividad promotora desarrollada por la construcción pCD31-1.42-LUC en experimentos de transfección transitoria en líneas hematopoyéticas PECAM-1⁺ U-937 (promonocítica), K562 (eritroleucémica) y HEL (eritromegacarioblástica) y en líneas no hematopoyéticas PECAM-1⁻: HeLa (carcinoma de cérvix humano) y L-929 (fibroblastos). La actividad luciferasa se determinó a las 14 h postransfección. La corrección de los valores obtenidos en función de la eficiencia de la transfección se realizaron por cotransfección con pCMV-βGal (K562, HEL, HELA, L-929) ó pSEAP (U-937). Los datos representados, constituyen la media de 4 experimentos distintos con distintas preparaciones de ADN.

3.5.-ACTIVIDAD PROMOTORA DEL FRAGMENTO DE 0.22 Kb *NheI/BglII*.

Para caracterizar otras regiones 5' flanqueantes requeridas para la actividad promotora de PECAM-1, se analizaron las construcciones pCD31-0.98-LUC, pCD31-0.22-LUC y pCD31-0.76-LUC generadas por deleciones en el sentido 3'. Estas construcciones, tienen la particularidad de carecer de los sitios de iniciación de la transcripción descritos hasta el momento. Sorprendentemente, la actividad de la construcción pCD31-0.98-LUC resultó ser 8 veces superior a la actividad presentada por el control de la transcripción (promotor SV40) y 1.5 veces mayor que la actividad de la construcción pCD31-0.25-LUC en la línea celular K562 (Figura 3.8).

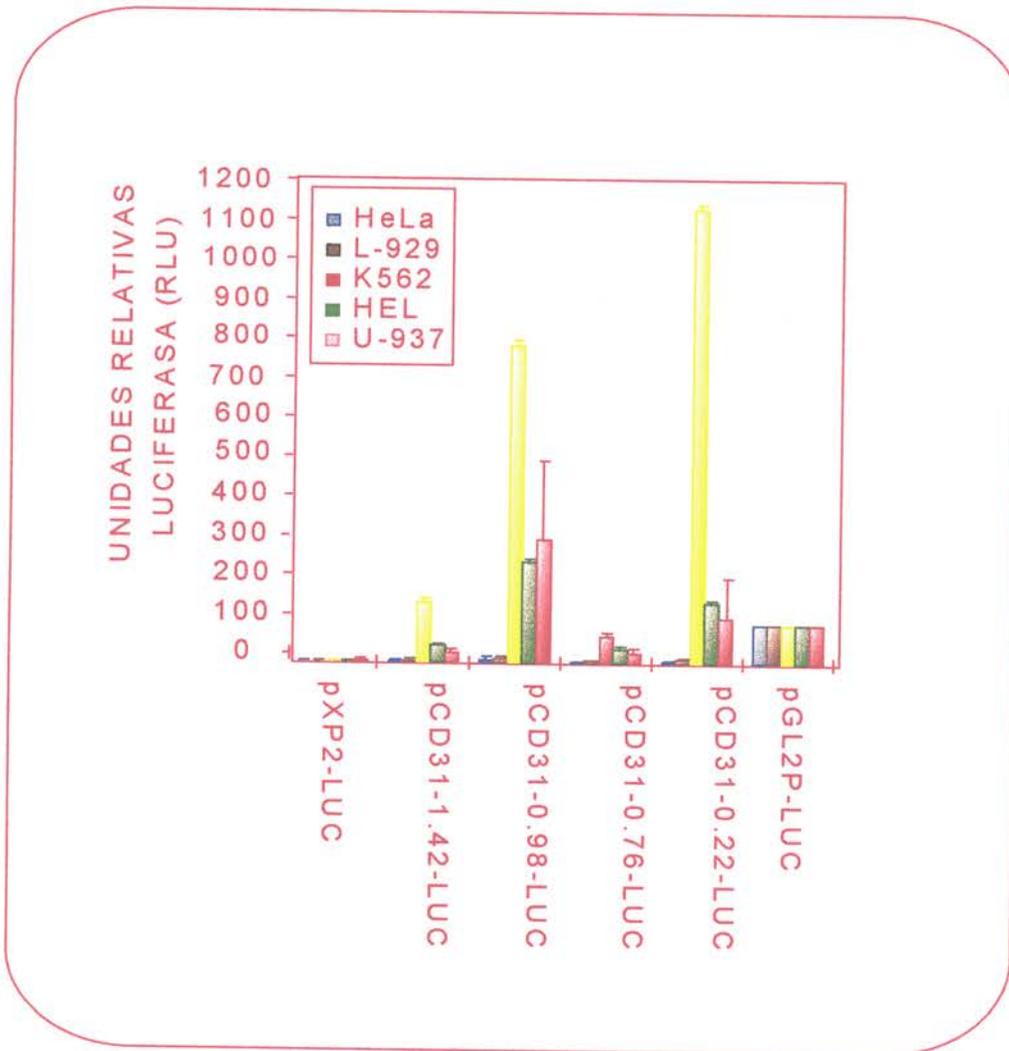


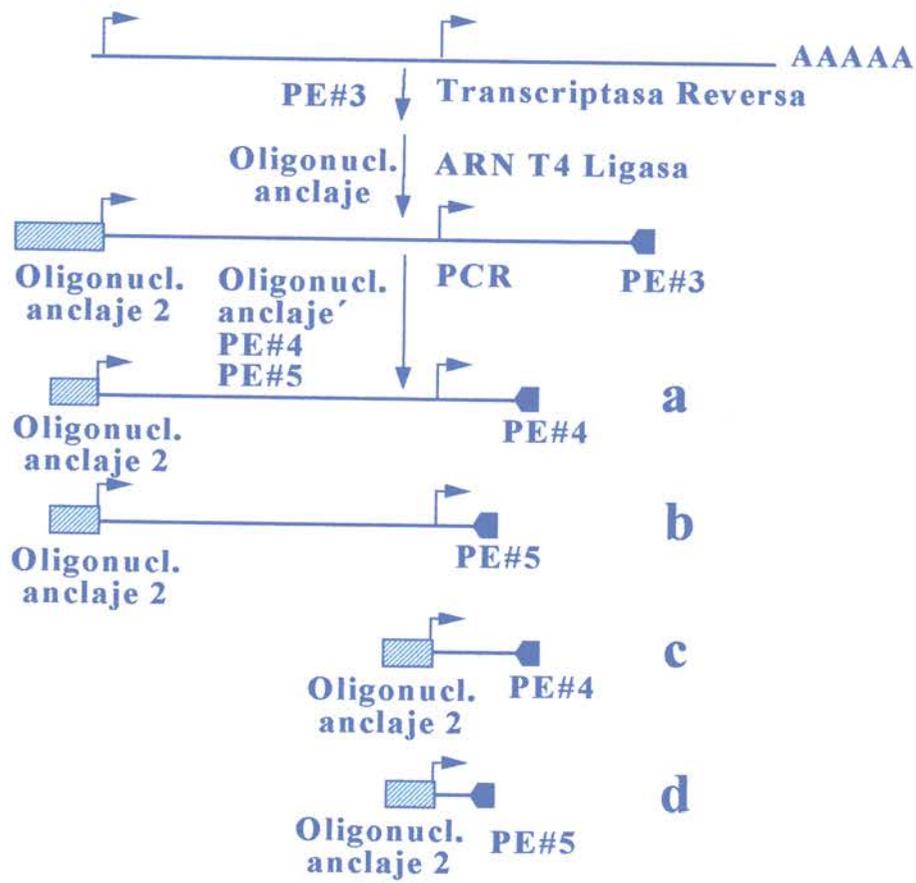
Figura 3.8.- Caracterización funcional de las construcciones obtenidas por deleciones en el extremo 3' del promotor de PECAM-1. Como referencia, aparece la actividad transcripcional de la construcción completa del promotor PECAM-1. Las transfecciones transitorias se han realizado sobre las líneas celulares PECAM-1⁺ y PECAM-1⁻ indicadas. La actividad promotora se expresa respecto a la actividad luciferasa producida por pGL2P-LUC, al que arbitrariamente se le asigna el valor 100. La corrección de los valores obtenidos se realizó por cotransfección con pCMV-βGal (K562, Hel, HeLa, L-929) y PSEAP (U-937). Los datos representados corresponden a la media de 5 experimentos distintos con distintas preparaciones de ADN.

En el caso de las líneas U-937 y HEL la actividad presentada por la construcción pCD31-0.98-LUC fue 3 veces superior a la que desarrolló el promotor de SV40 y 1.5 veces mayor que la construcción de 0.25 Kb. La actividad luciferasa se mostró claramente disminuída con la construcción que contenía el fragmento *SmaI/NheI*, carente del fragmento *NheI/BglIII*, sugiriendo que esta última región era la responsable de la actividad promotora encontrada en la construcción pCD31-0.98-LUC. De hecho, la construcción pCD31-0.22-LUC que contenía el fragmento *NheI/BglIII*, mostró una extraordinaria actividad promotora en las tres líneas hematopoyéticas estudiadas, especialmente en K562 que resultó ser 12 veces la actividad del promotor de SV40. Estos datos sugirieron la presencia de un posible sitio de iniciación de la transcripción dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII*. Pero no se identificó ninguna secuencia consenso descrita como iniciadora de la transcripción. La secuenciación de este

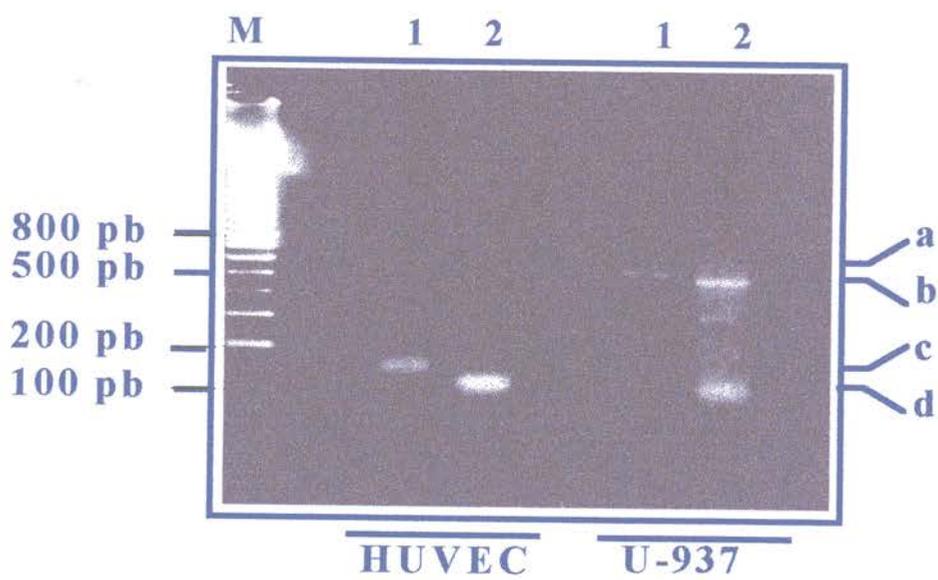
fragmento de 0.22Kb *NheI/BglIII*, identificó un sitio potencial de unión para la familia de factores de transcripción *ets*, asociada a veces con los procesos de inicio de la transcripción génica (Wasylyk *et. al.*, 1993). Igualmente, se identificaron secuencias consenso AP-2, Sp1 y EGR-1, así como secuencias de reconocimiento para elementos de respuesta a ácido retinoico y *shear stress*.

Para localizar la existencia de algún sitio de iniciación funcional de la transcripción dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII*, se realizaron experimentos de amplificación de la región 5' flanqueante del gen de PECAM-1 mediante la técnica conocida como "5' RACE". El procedimiento seguido se muestra en la **Figura 3.9A**. El ARN total obtenido de células U-937 tratadas durante 48 h con PMA (10 ng/ml) fue hibridado con el oligonucleótido antisentido PE#3, utilizado como cebador para el enzima transcriptasa reversa en presencia de deoxinucleótidos. Una vez que el ARN total celular, fue retrotranscrito a ADNc, se ligó un oligo de anclaje al extremo terminal 5' del ADNc sintetizado utilizando una ARN ligasa. La amplificación mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región flanqueante 5' del gen PECAM-1 se realizó utilizando los oligonucleótidos PE#4 y PE#5 internos a la secuencia del ADNc sintetizado, así como un oligonucleótido interno al oligonucleótido de anclaje citado (oligonucleótido de anclaje 2), tal y como se describe en la **Figura 3.9A**. Una vez completados los 30 ciclos de amplificación por PCR, los productos obtenidos se sometieron a análisis mediante técnicas electroforéticas en gel de agarosa. Como se puede apreciar en las **Figuras 3.9A y 3.9B** se obtuvieron dos tamaños distintos de bandas cuando la amplificación se realizó en células U-937; unas de aproximadamente 400 pb (bandas a y b) y otras de 100 pb (bandas c y d). En cambio, la amplificación en células endoteliales HUVEC, sólo generó un tamaño de banda de aproximadamente 100 pb. El tamaño de los pares de bandas específicas c/d y a/b resultaron ser compatibles con los sitios de iniciación dentro de los fragmentos 0.44 Kb *BglIII/PstI* y 0.22 Kb *NheI/BglIII*, respectivamente. Por tanto, mediante la técnica 5' RACE efectuada en células U-937 hemos encontrado sitios de inicio de la transcripción por encima de los descritos hasta el momento que se localizan en los fragmentos de 0.22 Kb *NheI/BglIII* y 0.44 Kb *BglIII/PstI*, mientras que en células endoteliales, los productos de PCR obtenidos correspondían únicamente al inicio de transcripción localizado dentro del fragmento de 0.44 Kb *BglIII/PstI*. Estos resultados apoyan la existencia de actividad transcripcional obtenida con la construcción p-CD31-0.22-LUC de 0.22 Kb en experimentos de transfección transitoria efectuados en U-937. Cada una de estas bandas obtenidas en el 5' RACE fue aislada y purificada a partir de un gel de agarosa y clonada en el vector pCRII de extremos 3' protuberantes en timidina. En la **Figura 3.9C** se muestran las secuencias nucleotídicas obtenidas al analizar las bandas de 400 pb y 100 pb. La secuencia de las bandas de 400 pb demostró un inicio de transcripción en adenosina dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII* que recibió la numeración $n+1$, sugiriendo que la región de 173 nucleótidos hacia el extremo más 5', era la responsable de la actividad transcripcional específica en líneas mieloides de la construcción pCD31-0.22-LUC. Además, la secuenciación de la banda más pequeña, de

A



B



C

CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAGTGAATTCTGTGAAAAGCCCTCTTTG
OLIGONUCLEÓTIDO DE ANCLAJE 2
 ATGGGGGAAGGGGAGGACTGGAAAAGCAGAGAGATCTTTCTGGATGTCC
 TGGGAGAGCAGCCCTTTGGGTGGTGGGTGGAGGCTGGAGGCAGGGAGGA
 ATCCCCTCACAGTGCCATGAGAAGGGCCCCCAAACCCAGGCGAGACAGA
 GGGAGGGTCAAGAACGCCAAGGCAAATGTCACTTGTGCCTTGT'TTTTTC
 CCTAAAGAACTAAACAAAGCGGCCGCGTTCGGTGGCCCCTCAGGAAGG
 CCGGTCATTTCTGAGGAGATATCAGGCCAGCCCAGGCCCCATTGTTCC
 CGGTTTCCAGCCATGGCTGCCATTACCTGACCAGCGCCACAGCCGGTCT
 CTCTGCAGGCGCCGGGAGAAGTGACCAGAGCAATTTCTGCTTTTCA
OLIGONUCL. INTERNO PE#4

CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAGTGAATTCTGTGAGGAAGGCCGGTCA
OLIGONUCLEÓTIDO DE ANCLAJE 2
 TTTCTGAGGAGATATCAGGCCAGCCCAGGCCCCATTGTTCCCGGTTTC
 CAGCCATGGCTGCCATTACCTGACCAGCGCCACAGCCGGTCTCTCT
OLIGONUCL. INTERNO PE#5

Figura 3.9.- Análisis por 5' RACE del sitio de inicio de la transcripción del gen PECAM-1. A. Esquema de las reacciones de amplificación por PCR. El ADNc se sintetizó utilizando como cebador el oligonucleótido PE#3 en presencia de la transcriptasa reversa. Posteriormente, la primera reacción de PCR tuvo lugar utilizando además del oligonucleótido PE#3, el oligonucleótido de anclaje ligado a la región 5' del ADNc sintetizado. Las siguientes amplificaciones, se llevaron a cabo con el oligonucleótido interno al de anclaje (oligonucleótido de anclaje 2) en presencia de los oligonucleótidos bien encontrados. B. Análisis de los productos obtenidos por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. Las flechas representan los sitios de inicio de transcripción encontrados. C. Análisis de la secuencia nucleotídica de los productos obtenidos por PCR. Los productos obtenidos por PCR se aislaron del gel de agarosa, se clonaron en el plásmido pCRII y se secuenciaron. Las secuencias subrayadas representan la secuencia del oligonucleótido interno al de anclaje así como PE#4 y PE#5 utilizados en la reacción de amplificación por PCR.

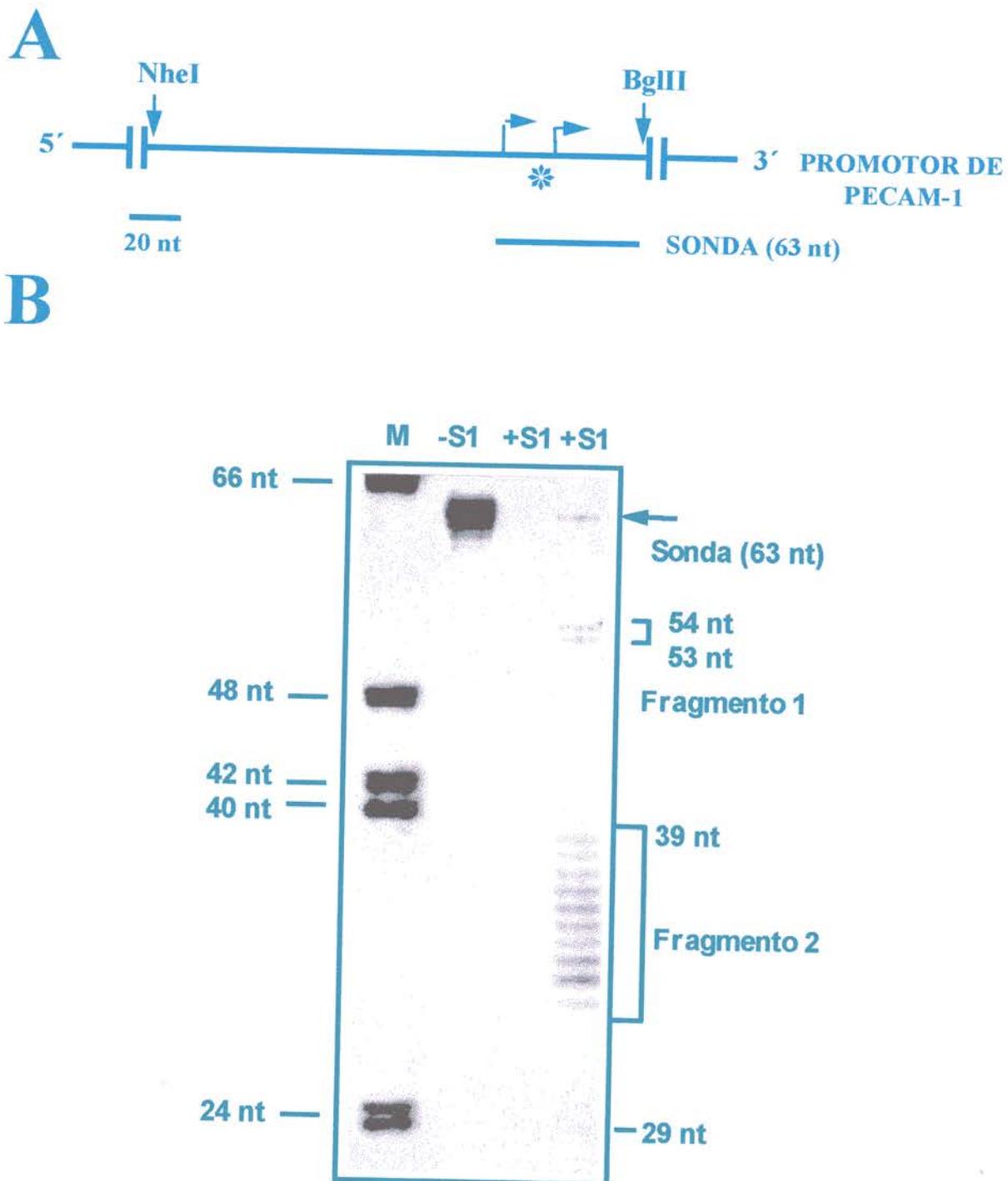


Figura 3.10.- Identificación del inicio de transcripción del gen PECAM-1 mediante análisis por protección de nucleasa S1. A. Representación esquemática del procedimiento. El sitio más 5' de inicio de la transcripción identificado mediante 5' RACE se representa mediante un asterisco. Los sitios localizados mediante nucleasa S1 se representan mediante cajas que corresponden a los fragmentos de protección 1 y 2 y que albergan varios sitios de inicio de la transcripción. B. Protección por nucleasa S1. El oligonucleótido antisentido -16/+46 utilizado como sonda fue anillado al ARN total de U-937 tratadas con PMA o ARN total de levadura. Los híbridos ADN-ARN se incubaron en presencia (+S1) o en ausencia (-S1) de nucleasa S1. Los fragmentos protegidos se analizaron en un gel de poliácridamida al 8% en condiciones desnaturalizantes. En la calle correspondiente al ARN de las células U-937 aparecieron dos fragmentos de protección: uno en los nucleótidos +53/+54 (fragmento 1) y otro en los nucleótidos +29/+39 (fragmento 2). En presencia del ARN de levadura la presencia de S1 provocó la digestión completa del ARN. Como marcador de peso molecular (M) se utilizó el ADN del fago ϕ X174 digerido con *HinfI* y marcado radiactivamente.

construcción pCD31-0.22-LUC. Además, la secuenciación de la banda más pequeña, de aproximadamente 100 pb, obtenida con la amplificación por PCR en las células U-937 tratadas con PMA, mostró un sitio de inicio de la transcripción en la posición +253 localizada a 48 nucleótidos en dirección 5' respecto al inicio de transcripción descrito en células endoteliales (Kirschbaum *et. al.*, 1994).

Para confirmar la existencia del sitio de iniciación de la transcripción encontrado dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII*, se llevaron a cabo ensayos de protección con nucleasa S1. El esquema del fragmento de ADN estudiado, así como la localización del oligonucleótido empleado y el resultado obtenido, se muestra en la **Figura 3.10**. Para llevar a cabo estos ensayos, se diseñó un oligonucleótido antisentido de 63 pb de la región 3' del fragmento genómico de 0.22 Kb *NheI/BglIII*, cuya secuencia se detalla en el apartado 2.13.2 apartado de "Materiales y Métodos". El extremo 5' de este oligonucleótido se marcó con [γ - 32 P] dATP e hibridó con ARN total de células U-937 tratadas durante 48 h con PMA (10 ng/ml). Posteriormente, se digirió con nucleasa S1. Como se muestra en la **Figura 3.10B**, se observaron dos agrupaciones diferentes de bandas protegidas denominadas "Fragmento 1" y "Fragmento 2", que sugerían la existencia de múltiples sitios de iniciación de la transcripción detectados dentro de una región de 25 pb. Es interesante resaltar, que el inicio de la transcripción determinado por la técnica de 5' RACE y que recibe la numeración de +1 (**Figura 3.9**), mapea precisamente en la región intermedia entre el fragmento 1 y el 2. Los resultados obtenidos en los experimentos de 5' RACE y nucleasa S1, considerados en conjunto, demuestran la existencia de múltiples sitios para el inicio de la transcripción en el fragmento genómico de PECAM-1 *NheI/BglIII* de 0.22 Kb. A su vez, esta afirmación está avalada por la potente actividad transcripcional obtenida con la construcción de 0.22 Kb pCD31-0.22-LUC. Otro dato que confirma esta teoría, es la existencia de dos transcritos de 3.4 y 3.7 Kb de PECAM-1 cuando se realiza un análisis por *Northern blot*. Esta diferencia de unos 300 pb es aproximadamente la diferencia existente entre los dos sitios principales de inicio de la transcripción.

Posteriormente, analizamos si la construcción de PECAM-1 que contenía el fragmento de 0.22 Kb de *NheI/BglIII* presentaba distinto comportamiento en células de distinta procedencia, esto es, en líneas celulares de linaje mielóide representado por la línea celular U-937 y endotelio representado por el cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina (BAEC). Para ello, se llevaron a cabo transfecciones transitorias en ambos tipos celulares y se compararon los resultados. Como se muestra en la **Figura 3.11**, en células endoteliales la mayor actividad transcripcional se detectó en las construcciones pCD31-0.44-LUC y pCD31-0.25-LUC cuyas RLU fueron de 1.6 veces y 6.8 veces con respecto a la construcción pCD31-0.22-LUC respectivamente. De forma inversa, en células monocíticas el fragmento de

NheI/BglIII de 0.22 Kb mostró una actividad transcripcional 4 veces superior a las construcciones que contenían los fragmentos de 0.44 Kb *BglIII/PstI* y 0.25 *NotI/PstI*.

Estos datos apoyan una vez más, la existencia de dos focos de múltiples sitios de inicio de la transcripción distanciados entre sí unos 300 pb. Parece ser, por tanto, que la actividad transcripcional contenida dentro del fragmento de 0.25 Kb *BglIII/PstI* se manifiesta fundamentalmente en células endoteliales, mientras que la actividad promotora del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII*, parece ser más específica del linaje mieloide. Según estos resultados, no parece que cada foco de sitios de inicio de la transcripción sea exclusivo de un tipo de linaje, ya que los sitios de iniciación en ambas localizaciones son capaces de promover en mayor o menor medida la iniciación de la transcripción en los dos tipos celulares estudiados.

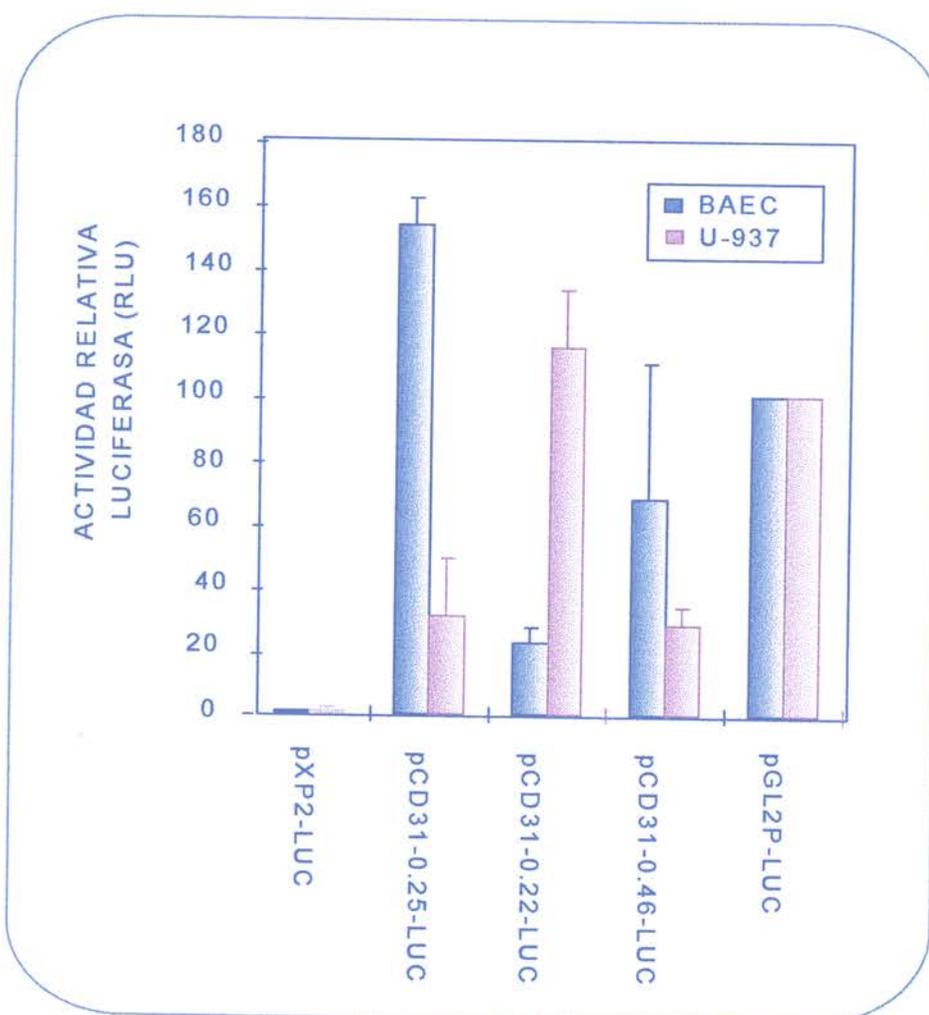


Figura 3.11.- Diferencias en la actividad promotora entre los fragmentos genómicos *NheI/BglIII* de 0.22 Kb y *NheI/PstI* de 0.44Kb dependiendo del linaje celular. Se llevaron a cabo transfecciones transitorias en células endoteliales de aorta bovina (BAEC) con las construcciones genómicas que se detallan y se determinó la actividad luciferasa transcurridas 48h desde la transfección. Las correcciones en la eficiencia de la transfección se efectuaron por cotransfección con pCMV- β Gal. Los resultados obtenidos representan la media de más de 3 experimentos realizados por separado y con preparaciones de ADN distintas. Con fines comparativos, se muestra la media de las actividades obtenidas con la línea hematopoyética de origen mieloide U-937.

3.6.- IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PKC EN LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PECAM-1.

Está descrito que la expresión del antígeno de membrana PECAM-1 está inducida durante el proceso de diferenciación de líneas monocíticas U-937 y HL-60 hacia linaje macrofágico (Cabañas *et. al.*, 1989; Goldberger *et. al.*, 1994). Igualmente, está ampliamente documentado que los ésteres de forbol activan la proteína quinasa C (PKC). Por tanto quisimos estudiar si esta actividad enzimática estaba directamente implicada en el control de la expresión de esta proteína. Se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo en células U-937 tratadas previamente durante 48 h con PMA (10 ng/ml), y como puede verse en la **Figura 3.12A**, la adición de inhibidores descritos para PKC como son H-7 o estaurosporina disminuía la expresión de la proteína de superficie PECAM-1. Además, los compuestos DOG y OAG, dos diacilglicérols sintéticos que se comportan igual que el activador fisiológico de PKC, también fueron capaces de inducir la expresión de PECAM-1 en la misma proporción que el PMA. Igualmente, OAG en presencia de un inhibidor de PKC como es H-7 disminuyó la expresión de la proteína de superficie PECAM-1 en igual proporción que la estaurosporina o H-7 lo hicieron con el pretratamiento de PMA. Este efecto inhibitorio resultó ser dependiente de la dosis como se aprecia en la **Figura 3.12B** hasta una concentración de 250 μ M de H-7 en la que PECAM-1 mostró una inhibición similar a la que presentó CD69 en presencia de H-7. Para este experimento se utilizó como control la expresión de CD69, cuya actividad es dependiente de PKC (Cebrián *et. al.*, 1989). Por otra parte, el análisis del ARNm mediante *Northern Blot* de los transcritos específicos de PECAM-1 de 3.7 Kb y 3.4 Kb mostró un incremento de forma constante durante la diferenciación de células U-937 inducidas con PMA, alcanzando un máximo entre las 24-48 h de tratamiento (**Figura 3.12C**).

3.7.- IDENTIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA A ÉSTERES DE FORBOL EN EL PROMOTOR DE PECAM-1.

3.7.1.- Regulación transcripcional de PECAM-1 por ésteres de forbol.

Los datos expuestos anteriormente, sugieren la implicación de la actividad PKC en la regulación transcripcional de PECAM-1. De hecho, experimentos de *run-on* realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, indicaron que la tasa transcripcional del gen de PECAM-1 en células U-937 se inducía entre 2 y 6 veces a las 24 h y 48 h respectivamente después del tratamiento con los ésteres de forbol (Bellón, Tesis doctoral, 1993). Para tratar de confirmar la regulación transcripcional de PECAM-1 por los ésteres de forbol, utilizamos el transfectante estable conteniendo el promotor de 1.42 Kb de PECAM-1 en células U-937.

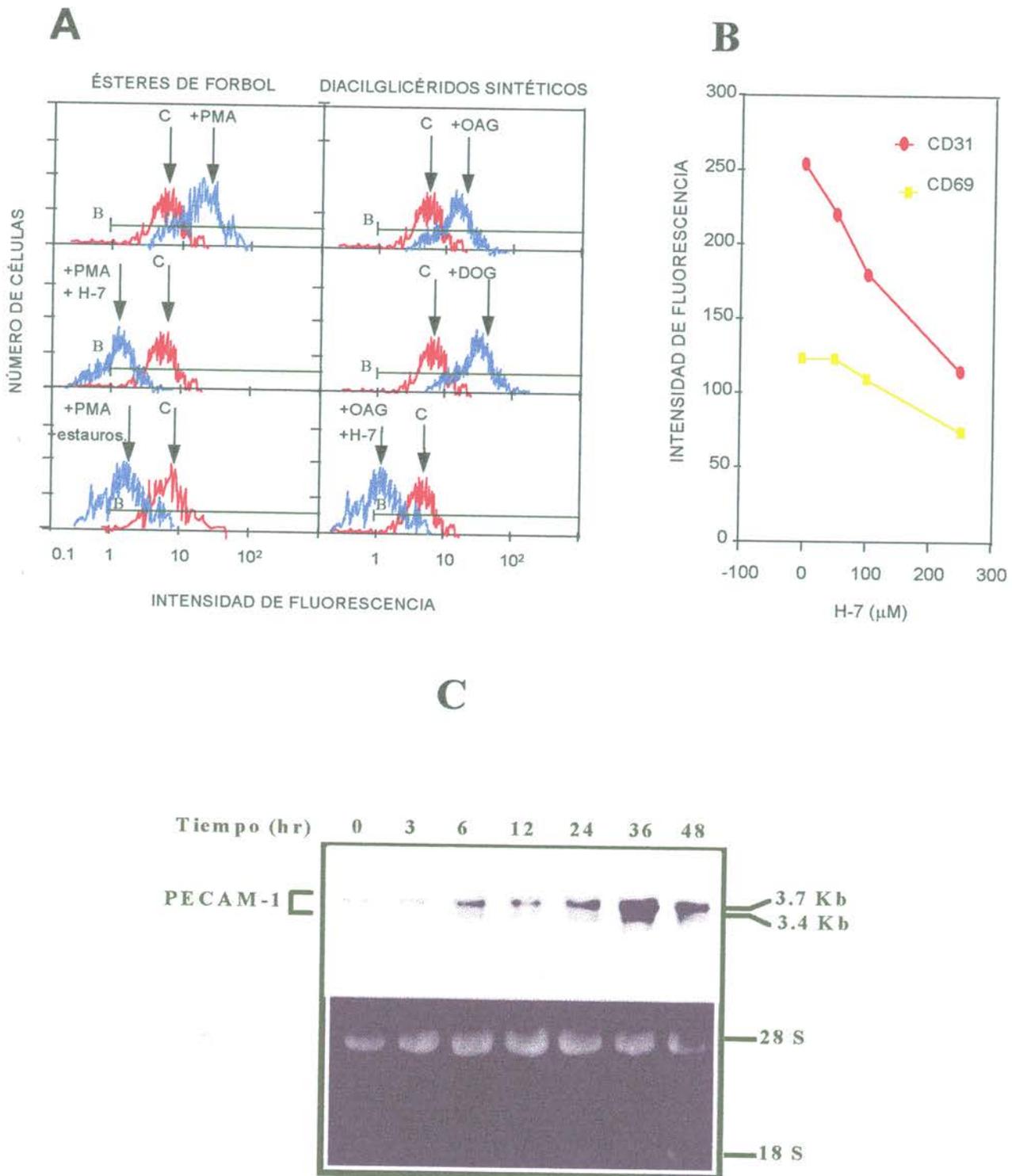


Figura 3.12.- Implicación de la actividad PKC en la expresión de PECAM-1. A. Análisis por citometría de flujo de la expresión de PECAM-1 con distintos tratamientos. El tratamiento de células U-937 con activadores de PKC como son el PMA, OAG y DOG provocan un aumento de la expresión de PECAM-1 en relación a las células control (U). Esta regulación positiva de la expresión de PECAM-1 es eliminada en presencia de inhibidores específicos para PKC como son H-7 y estaurosporina. Las células fueron teñidas con un Am anti-PECAM-1 (HC1/6) y el análisis fue realizado mediante citometría de flujo. B. Efecto del incremento de la concentración de H-7 (inhibidor de PKC) sobre la expresión de PECAM-1. Las células U-937 se trataron con PMA en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de PKC H-7. Las células se marcaron con anticuerpo anti-PECAM-1 (HC1/6) o anti-CD69 (TP1/8) y se analizó la intensidad de fluorescencia. C. Se llevaron a cabo tratamientos de células U-937 con PMA durante los tiempos especificados y se analizaron por *Northern blot* los niveles de mensajero. La cantidad de ARN utilizada fue de 10 µg/calle. La hibridación se realizó con el fragmento de ADNc de PECAM-1 *XhoI* de 692 pb. Las bandas específicas se detectaron por autoradiografía.

Como se aprecia en la **Figura 3.13A**, el aumento de la expresión de PECAM-1 en la superficie del transfectante estable tras el tratamiento con el éster de forbol, es idéntica a lo reportado en la línea parental, presentando una máxima inducción de la expresión en membrana de 2.5 veces respecto a los niveles de expresión de las células control sin tratar. Los datos sobre la actividad promotora después del tratamiento del transfectante con PMA se resumen en la **Figura 3.13B**. Se pudo comprobar que el PMA es capaz de regular transcripcionalmente PECAM-1, encontrándose que a las 24 horas de tratamiento existe una inducción de 2.5 veces respecto a la actividad transcripcional basal. A continuación, se intentó localizar el fragmento genómico mínimo de PECAM-1 implicado en el incremento transcripcional inducido por PMA. Para ello, se llevaron a cabo transfecciones transitorias con las distintas construcciones del promotor de PECAM-1 en células U-937, las cuales, inmediatamente después de la transfección fueron estimuladas con PMA.

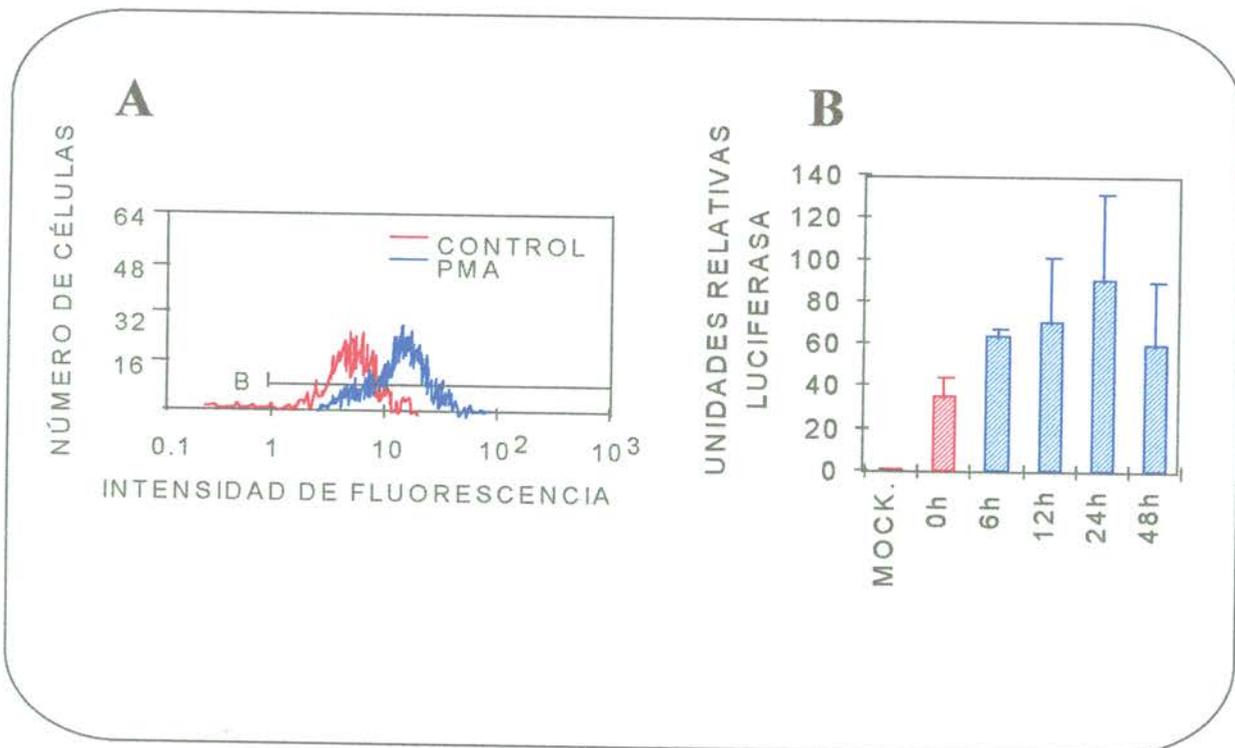


Figura 3.13.- Regulación transcripcional de PECAM-1 por los ésteres de forbol. A. Efecto de PMA (40ng/ml) sobre la expresión en membrana de PECAM-1 en el transfectante estable de U-937 en los tiempos descritos. Las células se marcaron con anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 (HCl/6) y se analizaron por citometría de flujo. B. Efecto ejercido por el tratamiento con PMA sobre la actividad transcripcional de PECAM-1 en el transfectante estable U-937. A tiempo 0, la actividad transcripcional del transfectante estable corresponde a la constitutiva de PECAM-1. Mock representa el control negativo de la transfección. Los datos mostrados representan la media de 5 ensayos aislados con sus desviaciones estándar correspondientes.

En la **Figura 3.14** se muestra un experimento representativo de una media de 4 experimentos con todas las construcciones del promotor de PECAM-1 realizados con distintas preparaciones de ADN. La única construcción cuya actividad transcripcional no se indujo por el PMA fue pCD31-0.25-LUC. En este fragmento de 0.25 Kb curiosamente, no se detectó

ninguna secuencia descrita como inductora de la actividad transcripcional mediada por los ésteres de forbol. Todas las demás, se indujeron en mayor o menor medida. La inducción por PMA de los niveles de actividad promotora obtenidos con las construcciones pCD31-0.25-LUC, pCD31-0.44-LUC, pCD31-0.76-LUC y pCD31-1.42-LUC fueron más bien bajos (entre 1 y 2.5 veces), mientras que los valores de actividad luciferasa de pCD31-0.98-LUC y pCD31-0.22-LUC se vieron claramente aumentadas en presencia del éster de forbol, mostrando valores de inducción de la actividad promotora que oscilaron entre 4 y 6 veces respecto al vector vacío. Teniendo en cuenta que el fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII* estaba contenido dentro de la construcción pCD31-0.98-LUC, estos resultados sugerían que la región principal de respuesta a PMA estaba localizada dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII*. Es interesante resaltar que este fragmento muestra la máxima actividad transcripcional en células de linaje mieloide.

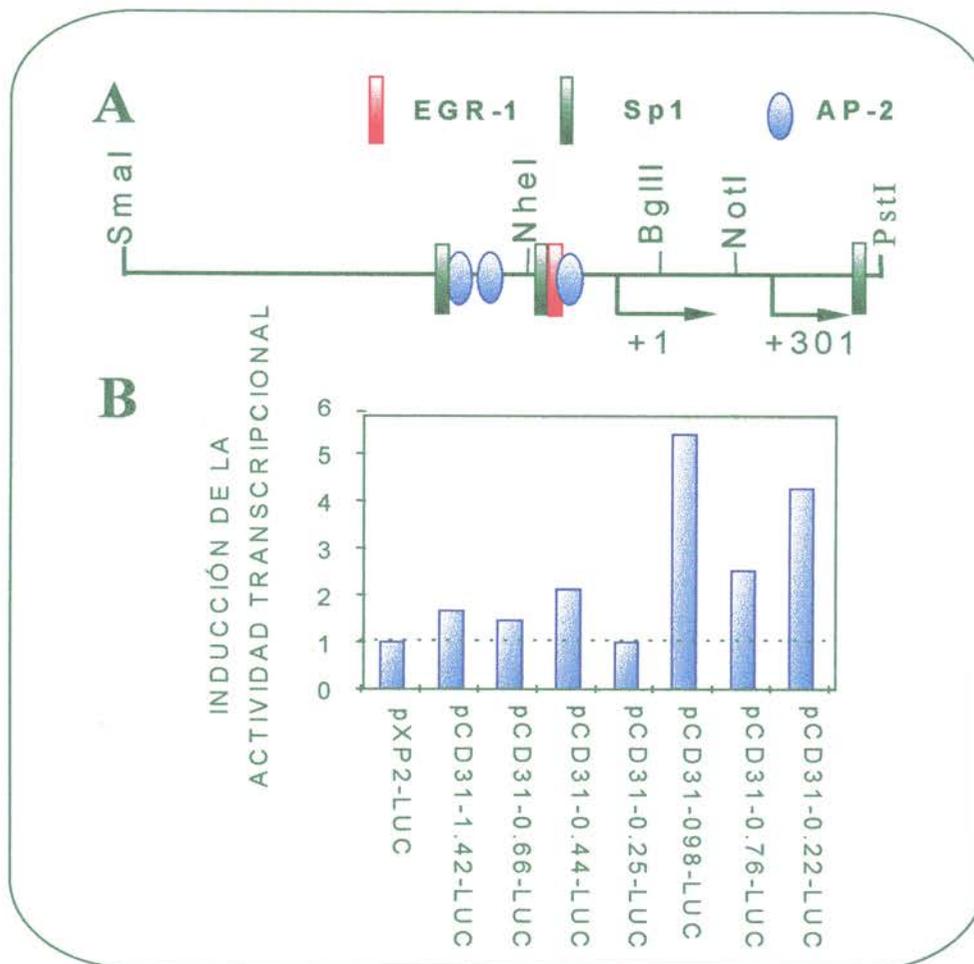


Figura 3.14.- Identificación de las regiones implicadas en la regulación transcripcional de PECAM-1 por PMA. A. Experimentos de transfección transitoria de las construcciones conteniendo distintas delecciones del promotor de PECAM-1 en células U-937 inducidas con PMA (40ng/ml) durante 14 h inmediatamente después de la transfección. El efecto sobre la actividad transcripcional de PECAM-1 ejercido por el tratamiento con PMA se refirió al vector de expresión vacío pXP2-LUC al que se le dio el valor arbitrario de 1. La única construcción que no mostró regulación transcripcional por el éster de forbol fue pCD31-0.25-LUC. Las diferencias en la eficiencia de la transfección se corrigieron mediante cotransfección con pSEAP. La máxima regulación transcripcional por PMA se manifestó en el fragmento *NheI/BglIII* de 0.22Kb. En la figura se muestra un experimento representativo de un total de 4 ensayos realizados con distintas preparaciones de ADN.

El análisis de la secuencia de ADN de este fragmento reveló la existencia de sitios consenso de unión de factores de transcripción implicados en la respuesta a ésteres de forbol. Estos sitios potenciales de unión de factores de transcripción se representan en la **Figura 3.14A**, donde se observan los sitios EGR-1, Sp1 y AP-2, previamente descritos como elementos de respuesta a ésteres de forbol (Cao *et. al.*, 1993; Williams *et. al.*, 1993).

A continuación, se analizó si el PMA era capaz de inducir una interacción entre estos factores con los sitios consenso de la secuencia de PECAM-1. Con este propósito, se realizaron experimentos de retardo en gel utilizando como sonda el oligonucleótido bicatenario Sp1/EGR1-PECAM-1 que se extiende desde los nucleótidos -109 hasta -76 de la secuencia genómica de PECAM-1 (**Figura 3.14A**). Los experimentos de retardo en gel se muestran en la **Figura 3.15** donde se resumen los resultados obtenidos en un primer estudio de tipo cinético que se realizó con extractos nucleares de células U-937 o K562 tratadas con PMA. Se observó una inducción temprana (1 h de tratamiento) de un complejo ADN-proteína que desaparecía después de 24 h de tratamiento. La formación de este complejo retardado ADN-proteína sugería una interacción entre la secuencia nucleotídica y una proteína presente en el extracto nuclear de ambas líneas celulares. La formación de este complejo resultó ser específica como se muestra en la **Figura 3.15A** ya que se inhibía eficazmente en presencia de un exceso de 50 veces de oligonucleótido sin marcar. En la **Figura 3.15B** se muestra cómo el complejo formado se compite con un oligonucleótido consenso para Sp1/EGR-1, pero no se observó alteración alguna del complejo al añadir un exceso de oligonucleótido mutado Sp1/EGR-1, ni tampoco se compitió con un oligonucleótido consenso para unir AP-2.

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que el sitio identificado como AP-2 no interviene en la inducción de la actividad promotora de PECAM-1 por los ésteres de forbol, sino que esta inducción es debida a Sp1/EGR-1. En todos los experimentos realizados, el complejo formado, aparecía siempre como un doblete sugiriendo que se encontraban involucradas al menos dos proteínas distintas presentes en el extracto de ambas líneas celulares. Para comprobar si Sp1/EGR-1 participaban en el complejo ADN-proteína, se llevó a cabo el experimento de la **Figura 3.15C**, donde se muestran competiciones del complejo formado con anticuerpos dirigidos frente a EGR-1 y frente a Sp1. En este caso se realizó un ensayo de retardo en gel utilizando extractos celulares de U-937 tratadas con PMA y como sonda marcada radiactivamente se utilizó el oligonucleótido bicatenario Sp1/EGR-1 de PECAM-1. Al añadir en la mezcla de reacción un anticuerpo frente a EGR-1, se observó la desaparición de la banda inferior del doblete respecto al control donde se añadía suero preinmune. Además, al competir el complejo con anticuerpo específico frente a Sp1 la banda que desapareció fue la superior. Estos resultados, indican que la banda superior contiene Sp1 mientras que la inferior, contiene EGR-1.

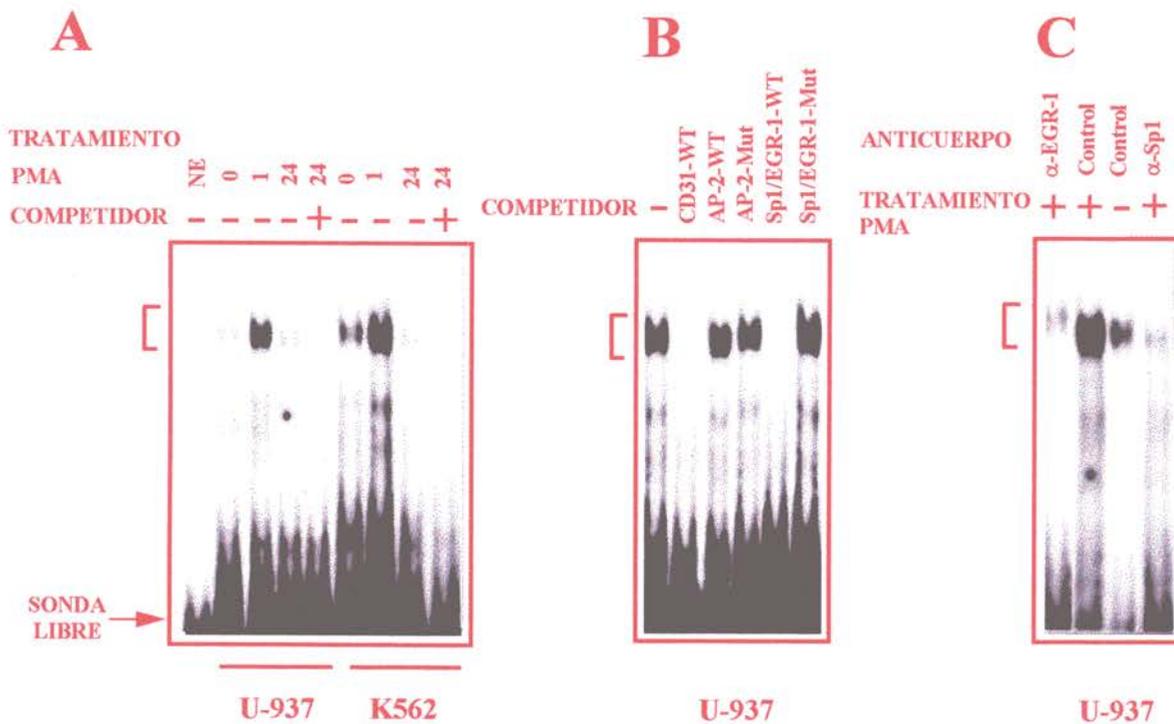


Figura 3.15.- Identificación de los elementos de respuesta a PMA (Sp1/EGR-1) dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII*. Los extractos nucleares obtenidos a partir de U-937 o K562 fueron incubados con el oligonucleótido CD31-WT(-109/-76) en ausencia o en presencia de oligonucleótidos competidores o anticuerpos específicos tal y como se detalla en la figura. Las incubaciones se realizaron durante 20' a 4 °C y los complejos fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 5%. La presencia de complejos específicos se representa mediante corchetes. A. Estudio cinético de la formación del complejo ADN-proteína en células U-937 y K562. Los extractos nucleares obtenidos a partir de células activadas con PMA en los tiempos indicados fueron incubados con la sonda radiactiva tanto en ausencia como en presencia de un exceso de 100 veces la sonda no marcada. (EN, sin extracto). B. Los extractos nucleares obtenidos de células U-937 activadas durante 1 h con PMA se incubaron con la sonda marcada en presencia y en ausencia de un exceso de 100 veces los oligonucleótidos competidores: CD31-WT, Sp1/EGR-1-mut, AP-2-wt, y AP-2-mut. C. Los extractos nucleares obtenidos a partir de células U-937 bien sin tratar o tratadas durante 1 h con PMA se incubaron con la sonda marcada tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos específicos frente a Sp1 o EGR-1; Como control negativo, se utilizó suero preimmune (PS). Los complejos que contienen Sp1 y EGR-1 aparecen indicados mediante flechas.

Estos ensayos estructurales tomados en conjunto, demuestran la interacción de EGR-1 y Sp1 con elementos de la secuencia de PECAM-1 identificados como consenso para estos factores de transcripción. Estas secuencias de reconocimiento se han localizado dentro del fragmento *NheI/BglIII* de 0.22 Kb, identificado como el fragmento de PECAM-1 que dirige una actividad transcripcional importante dentro del linaje mieloide. Estos datos, por tanto, sugieren que la inducción de EGR-1/Sp1 contribuye al aumento de la actividad transcripcional observada en el promotor de PECAM-1 cuando las células son estimuladas con ésteres de forbol.

3.8.- IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS DE RESPUESTA A ÁCIDO RETINOICO EN EL PROMOTOR DE PECAM-1.

El estudio de la secuencia de 1.55 Kb del fragmento genómico 5' flanqueante de PECAM-1 ha identificado 5 secuencias consenso de respuesta a ácido retinoico T(G/C)AC(C/A) (Agura *et. al.*, 1992), localizadas en las posiciones -361/-356, -71/-66, +119/+124, +68/+192 y +401/+406. El tratamiento con AR de las líneas celulares HL-60 y U-937 no afecta la expresión de PECAM-1 en su superficie, a pesar de que se produce un proceso de diferenciación detectado por reducción del NBT e inducción de la actividad esterasa específica (Goldberger *et. al.*, 1994). Hay que tener en cuenta que este proceso de diferenciación inducido por AR no es idéntico en términos funcionales al inducido por los ésteres de forbol lo que podría explicar las diferencias respecto a la expresión de PECAM-1.

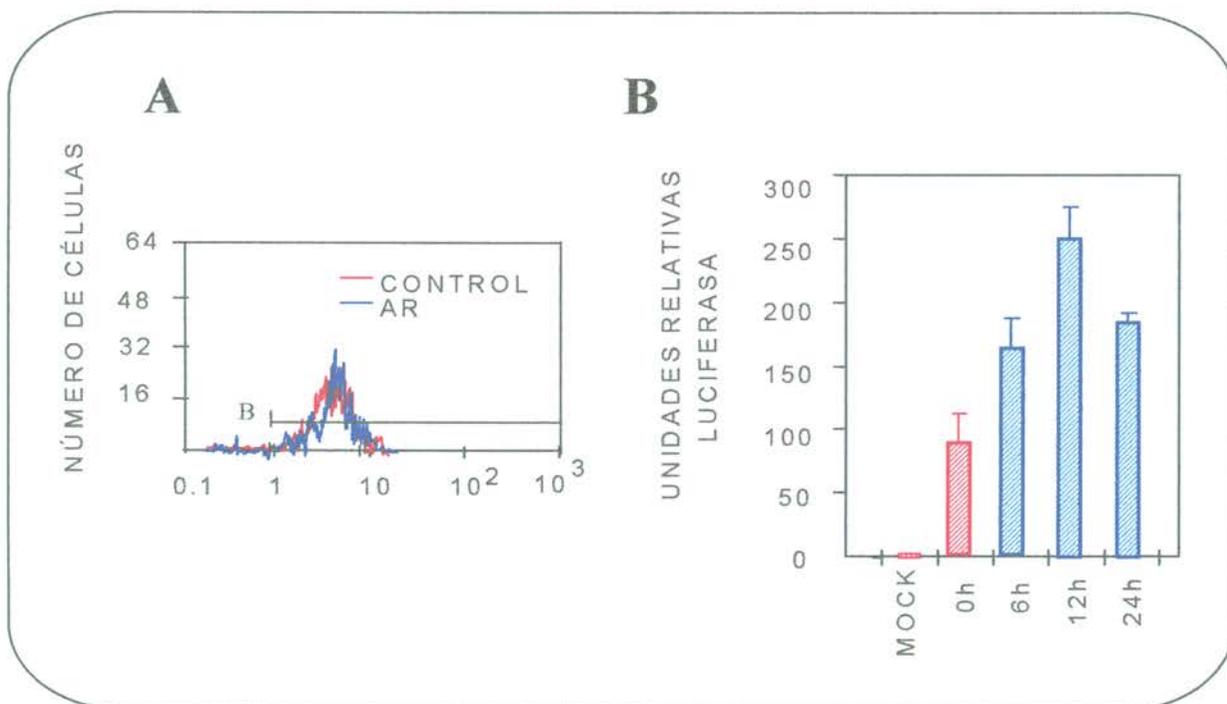


Figura 3.16.- Tratamiento del transfectante estable de U-937 con la construcción del promotor de PECAM-1 pCD31-1.42-LUC con AR. A. Análisis por citometría de flujo de la expresión de PECAM-1 en membrana del transfectante estable sin inducir (línea roja) o inducido con AR durante 24 h (línea azul). El eje de coordenadas muestra el porcentaje de células positivas. El control negativo del ensayo está señalado con la barra (B). B. Efecto que ejerce el tratamiento del transfectante estable de U-937 con AR 1 μ M a los tiempos indicados en la figura. Mock representa el control negativo de la transfección, es decir, el transfectante estable del vector vacío pXP2.

Para analizar cual era el efecto del AR sobre la expresión de PECAM-1, utilizamos como modelo de estudio los transfectantes estables de U-937 con la construcción pCD31-1.42-LUC del promotor PECAM-1. En la **Figura 3.16** se muestra cómo el tratamiento con AR no alteraba la expresión de PECAM-1, lo que estaba de acuerdo con los resultados de Goldberger *et. al.* (1994). Por el contrario, vimos un cambio en la actividad transcripcional del gen PECAM-1 induciéndose ésta 2 veces a las 6 horas de tratamiento y llegando a un máximo

de inducción de la actividad transcripcional hasta de 6.5 veces respecto a la actividad transcripcional basal a las de 24 horas de tratamiento. Por tanto, el AR es un agente diferenciador que regula positivamente la transcripción de PECAM-1, aún cuando aparentemente no afecta a su expresión en membrana. Futuros estudios nos permitirán determinar si el mantenimiento del nivel de expresión de PECAM-1 en membrana se debe a cambios en los niveles de mensajero de PECAM-1 o son resultado de una regulación postransduccional de PECAM-1.

3.9.- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1 POR c-MYC.

3.9.1.- Presencia de secuencias de unión bHLH (E-BOX) en la región reguladora de PECAM-1.

Las proteínas que interaccionan generalmente con ADN designadas como bHLH *basic Helix Loop Helix* son factores de transcripción que reconocen específicamente secuencias E-box (CANNTG) a través de su región básica y son capaces de formar homo-heterodímeros a través del dominio HLH (Murre *et. al.*, 1994). Estos factores de transcripción juegan un papel muy importante en la progresión del ciclo celular y proliferación. Una subclase de las proteínas bHLH son las bHLH-Lz que además, cuentan con un dominio de cremalleras de leucina e incluye factores de transcripción tales como la familia Myc (Myc, Max, Mad, Mxi), TFE 3, TF-EB, E-box, así como los USF (*Upstream Stimulation Factor*) (Murre *et. al.*, 1994). En general, el proceso de diferenciación celular requiere una bajada en la regulación génica de c-Myc, el cual está implicado en el control del ciclo celular (Larsson *et. al.*, 1988). Durante la diferenciación mielóide, existe una disminución tanto de los niveles de mensajero como de la expresión de *c-myc* mientras que los oncogenes *c-fos* y *c-jun* están aumentados. Por otra parte, la expresión de PECAM-1, también está sometida a una regulación dependiente de la diferenciación (Cabañas *et. al.*, 1989; Goldberger *et. al.*, 1994). Además, en el presente trabajo se ha demostrado que el tratamiento de diferenciación de monocito a macrófago induce la activación transcripcional de PECAM-1 entre 2-3 veces. Estos datos sugieren que el aumento de la expresión de PECAM-1, necesita de la disminución de la expresión de c-Myc. En favor de esta hipótesis está el hecho de que el tratamiento con TGF- β 1 de células U-937 inhibe la proliferación, y por tanto los niveles de c-Myc, y esta disminución va acompañada de un aumento de la expresión de PECAM-1 (Lastres *et. al.*, 1994). Todas estas evidencias en su conjunto nos indujeron a estudiar si c-Myc tenía alguna influencia directa sobre la actividad transcripcional de PECAM-1. La búsqueda de sitios potenciales de unión de c-Myc dentro de la región reguladora de PECAM-1 localizó dos cajas E-box en las posiciones: +184/+188 (CAAATG) y +191/+196 (CACTTG) (Solomon *et. al.*, 1993) esquematizadas en la **Figura 3.17A**.

3.9.2.- Efecto de la sobreexpresión de c-Myc sobre la actividad transcripcional de PECAM-1.

Puesto que la expresión de c-Myc se correlaciona inversamente con la expresión de PECAM-1, decidimos ensayar el efecto que tenía la sobreexpresión de c-Myc sobre la actividad promotora de PECAM-1. En la **Figura 3.17B** se muestran experimentos de cotransfección de la construcción genómica de PECAM-1 pCD31-0.66-LUC y el vector de expresión de c-Myc (pCMV-cMyc) en el que la expresión de c-Myc está dirigida por el promotor del citomegalovirus. Estos experimentos revelaron que la expresión de c-Myc reducía la actividad promotora de PECAM-1 un 40%. Este mismo fenómeno se ha observado con el promotor de las integrinas leucocitarias CD11a en la línea linfocítica T Jurkat, y en menor grado en la línea de hepatoma HepG2, así como en CD11c utilizando la línea celular HepG2 (Rodríguez *et. al.*, 1997).

Para tratar de esclarecer el papel inhibitorio que juega c-Myc en los sistemas celulares, donde la expresión de c-Myc podría estar alterada, se evaluó la actividad del promotor PECAM-1 en células Kmyc B, línea celular K562 que está transfectada establemente con el gen *c-myc* bajo el control del promotor del gen de la metalotioneína I de ratón y donde la expresión de c-Myc puede ser inducida considerablemente con el tratamiento de zinc (Delgado *et. al.*, 1995). Como se muestra en la **Figura 3.17 C** la inducción mediada por el sulfato de zinc sobre las células transfectadas establemente con el gen *c-myc* provocó una reducción de la actividad del promotor PECAM-1 de un 25% mientras que el tratamiento con sulfato de zinc de las células control KMMT no influyó en la actividad promotora de PECAM-1.

Tanto USF como c-Myc pertenecen a la clase de factores de transcripción bHLH-Lz capaces de reconocer secuencias E-Box, aunque USF es capaz de unirse a los iniciadores de la transcripción y c-Myc reprime la actividad transcripcional promovida por USF dependiente de iniciador (Roy *et. al.*, 1991; Du *et. al.*, 1993; Li *et. al.*, 1994). La expresión de c-Myc se correlaciona inversamente con la expresión de PECAM-1 en líneas mieloides (Lastres *et. al.*, 1994) donde la proliferación está disminuída como en el caso de tratamientos con TGF- β 1 o PMA. Curiosamente, la regulación negativa de c-Myc y activación de la expresión de *c-fos* y *c-jun* afecta positivamente a la transcripción del gen de PECAM-1. En conjunto, estos resultados demostraban que el factor de transcripción c-Myc regula negativamente la actividad promotora de PECAM-1.

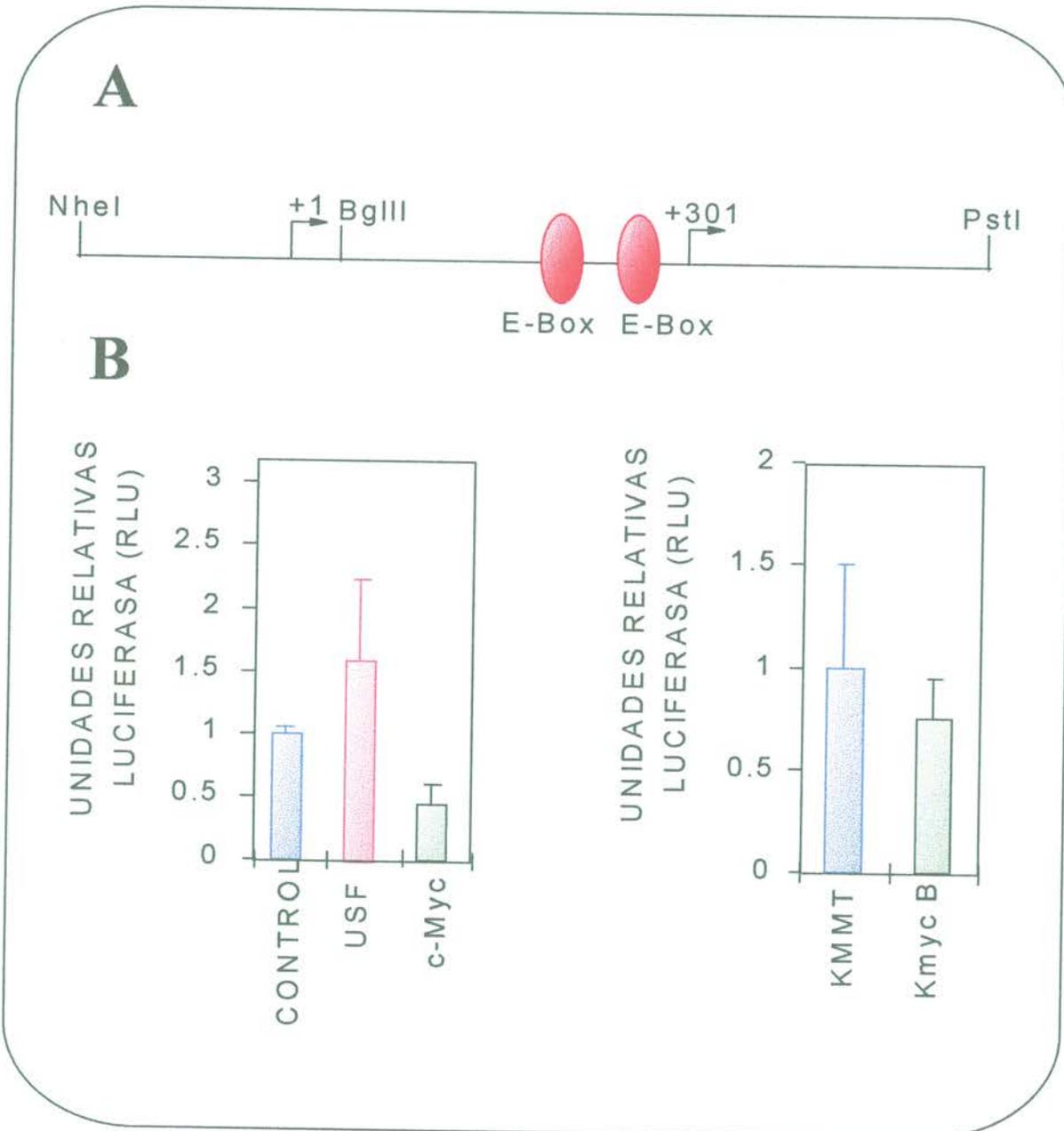


Figura 3.17.- Identificación de los elementos de reconocimiento para los factores de transcripción E-Box dentro del fragmento de 0.66 Kb *NheI/BglIII*. En el panel A de la figura, se representa el fragmento de 0.66 Kb pCD31-0.66-LUC, en el que los dos focos de transcripción se representan mediante flechas. Las 2 cajas E-box halladas, aparecen como dos óvalos rojos. B. Transactivación del promotor de PECAM-1 por USF y represión de la actividad promotora de PECAM-1 por c-Myc. Se transfectaron células HeLa con la construcción pCD31-0.66-LUC del promotor de PECAM-1 en presencia del vector de expresión pCX-USF (conteniendo el ADNc de USF en el vector pCX) o del vector de expresión pCMV-Myc (conteniendo el cDNA de *c-myc* con el pCDNA I). El efecto ejercido en ambos casos sobre la actividad transcripcional de PECAM-1 se refirió a la actividad obtenida con la construcción de PECAM-1 cotransfectado con el vector vacío pCDNA I al que arbitrariamente se le dio el valor de 1. En todos los casos, se mantuvo constante la cantidad total de ADN mediante la adición de vector vacío como portador de ADN. Los resultados que se muestran corresponden a una media de 3 experimentos independientes. Las barras de error que aparecen en la figura corresponden a las desviaciones estándar halladas. C. Análisis de la represión transcripcional ejercida por c-Myc en el sistema celular Kmyc B. Kmyc B constituye un sistema celular de K562 transfectadas establemente con el gen *c-myc* bajo el control del promotor inducible por zinc de la metalotioneína I de ratón. Estas células se transfectaron transitoriamente con la construcción del promotor de PECAM-1 pCD31-0.66-LUC. Al cabo de 2 h post-transfección, la mitad de las células fueron tratadas con 100 μ M SO_4Zn para inducir la expresión del gen *c-myc* y la actividad luciferasa se determinó pasadas 24 h. La inducción de la actividad promotora obtenida representa la actividad de la construcción en presencia de zinc respecto a la actividad de la construcción en ausencia de zinc. El resultado obtenido representa la media, con sus desviaciones estándar, de al menos 4 experimentos distintos con distintas preparaciones de ADN.

3.10.- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1 POR NF- κ B.

3.10.1.- Identificación de sitios consenso de unión para miembros de la familia Rel/ κ B en la región reguladora de PECAM-1.

El análisis de la secuencia genómica del fragmento de 1.55 Kb *SmaI/HindIII* de PECAM-1 reveló la existencia de tres posibles sitios de unión a NF κ B. Uno, entre las posiciones -409/-418 de secuencia GGGGTTCTCC dentro de la región Alu y los otros dos dentro del fragmento *BglII/NotI* ambos, en orientación reversa y localizados entre los nucleótidos +110/+118 de secuencia GAGGAATCCCC y +76/+83 de secuencia CCCTTTGGG. Quisimos comprobar si alguno de estos sitios consenso localizados en el fragmento *BglII/NotI* era capaz de formar un complejo retardado ADN-proteína y si este complejo era estimulado por PMA. En el panel superior de la **Figura 3.18** se muestra un esquema del fragmento genómico de doble cadena usado para realizar el experimento de retardo en gel. Este fragmento de 185 pb que contenía la secuencia consenso en sentido reverso de NF κ B se obtuvo por digestión de la construcción pCD31-1.42-LUC con *BglII/NotI*. Esta sonda se marcó radiactivamente y se incubó con extractos nucleares de U-937 sin tratar o tratados durante 1 hora con PMA (100 ng/ml). Como puede apreciarse en el panel inferior de la **Figura 3.18** aparecen 3 complejos retardados ADN-proteína de los cuales los dos superiores son específicos y se compiten con el fragmento genómico de 185 pb sin marcar (calle 6). Las bandas específicas se compitieron con un oligonucleótido específico de NF κ B (calle 7), mientras que estos complejos no se alteraron con oligonucleótidos específicos para proteínas de estrés HSP (*Heat Shock Protein*) (calle 4) o AP1 (calle 5).

Se han descrito potentes inhibidores de la activación de NF κ B como son los agentes quelantes de metales y los ditiocarbamatos. De estos últimos los agentes más potentes descritos son los derivados pirrolidínicos de los ditiocarbamatos (PDTC) y además está descrito que es el más específico y su efecto es dependiente de la dosis.

Hasta ahora, hemos demostrado que el PMA induce una proteína capaz de unir una secuencia contenida en las 185 pb y formar un complejo retardado ADN-proteína. Para comprobar que este factor inducido era NF κ B se analizó por citometría de flujo, el efecto ejercido por el PDTC sobre las células U-937 tratadas previamente con PMA (40 ng/ml) durante 1 h (**Figura 3.18**). Como era de esperar la expresión de PECAM-1 en membrana de células U-937 tratadas sólo con PMA indujo 2.5 veces la expresión de PECAM-1 respecto a la expresión basal. En cambio, una concentración de 10 μ M fue capaz de inhibir esta inducción 4 veces y a 30 μ M la inhibición fue máxima (8 veces). En cambio con 70 μ M PDTC esta inhibición se redujo a 5 veces y a 80 μ M a 2.5 veces. Estos resultados corroboran el comportamiento bifásico dosis dependiente descrito para el PDTC (Schreck *et. al.*, 1992). Por otra parte, ensayamos la toxicidad de PDTC en cultivo celular en el rango entre 10-100 μ M

encontrando que las células permanecían viables en todo el rango. Sólo se detectó algo de muerte celular en un porcentaje muy bajo a partir de 100 μM . Estos resultados sugirieron que la concentración de PDTC de 30 μM era la óptima para producir la máxima inhibición de la movilización de NF κ B sin producir daño celular. En la **Figura 3.19** se muestran ensayos de retardo en gel con extractos de células U-937, HL-60 y Jurkat pretratadas durante 1 hora con PMA (40 ng/ml) o TNF- α (50 ng/ml) y tratadas posteriormente durante 6 horas con PDTC (30 μM). El PDTC sobre células pretratadas con PMA o TNF- α fue capaz de bloquear la movilización de NF κ B hasta niveles constitutivos o incluso reducir estos. Estos datos concuerdan con el efecto de PDTC sobre la expresión de PECAM-1 en membrana (datos no mostrados).

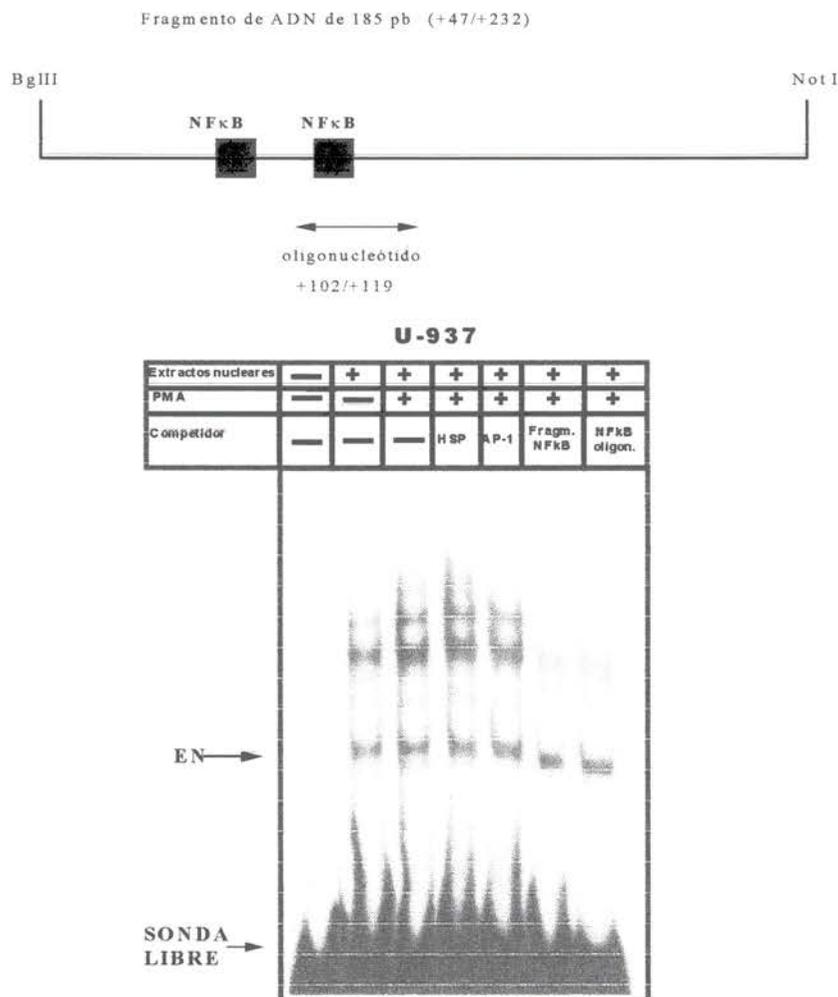
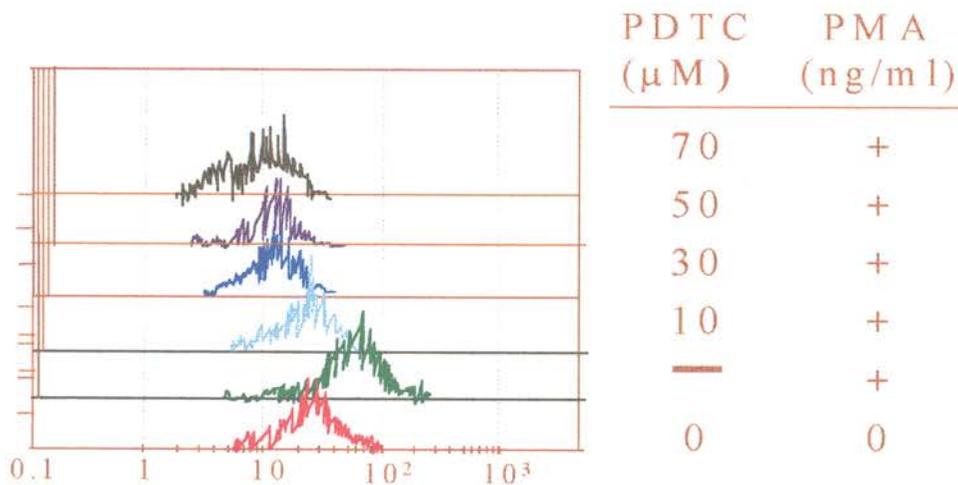


Figura 3.18.- Identificación de sitios consenso de unión para miembros de la familia Rel/ κ B en el promotor de PECAM-1 mediante gels de retardo. En la parte superior de la figura se muestran el fragmento de ADN de 185 pb *BglIII/NotI* utilizado como sonda en los gels de retardo. Las secuencias consenso de reconocimiento para NF κ B aparecen representadas por dos rectángulos negros. La localización del oligonucleótido utilizado en los gels de retraso, se representa con una doble flecha. En el panel inferior de la figura, se muestra un gel de retardo con extremos nucleares de U-937 tratadas durante 1 h en presencia (+) o ausencia (-) de PMA. Estos extractos se incubaron en presencia de un exceso del fragmento de ADN de 185 pb de doble cadena utilizado como sonda así como un exceso de 100 veces molar de fragmento sin marcar. Además, se realizaron competiciones con oligonucleótidos específicos para NF κ B (NF κ B oligon.), proteínas de estrés (HSP) o AP1. Los complejos no específicos formados se representan como EN. En la parte inferior del gel aparece el exceso de sonda no unida a proteína.

A



B

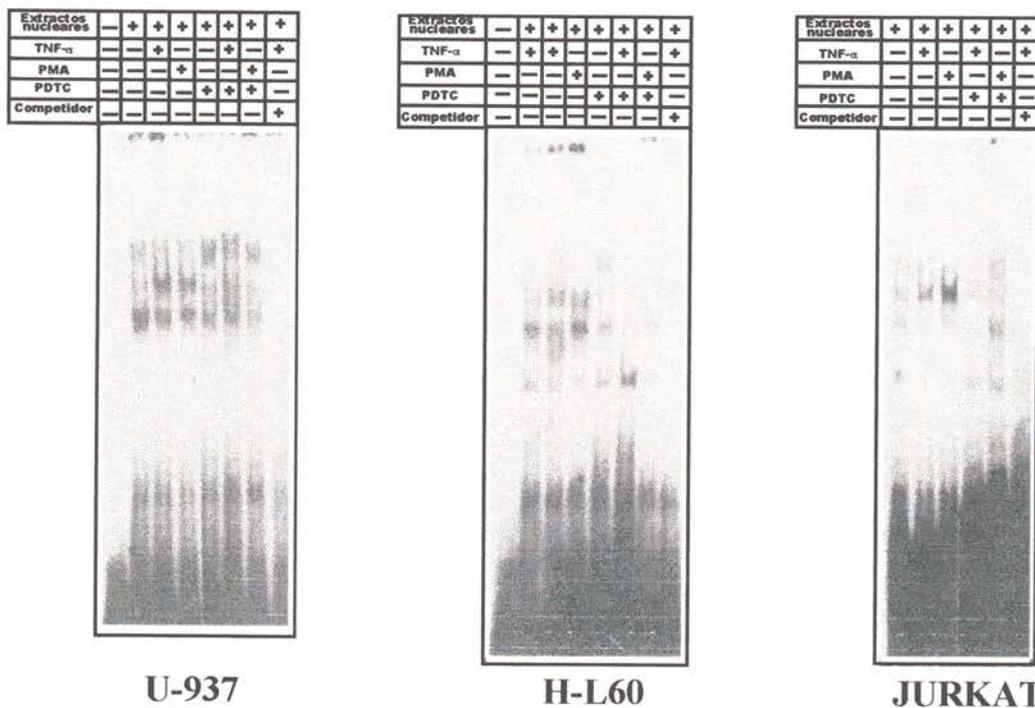


Figura 3.19.- Bloqueo de la movilización por PMA y TNF- α del factor nuclear κB mediante PDTC, un inhibidor específico de NF κB . A. Efecto ejercido por PDTC en la expresión en membrana de PECAM-1 inducido previamente con PMA (40 ng/ml). Células U-937 pretratadas durante 1 h con PMA, fueron tratadas durante 24 h con PDTC a las concentraciones que se indican en la figura. El efecto neto resultante sobre la inducción de la expresión de PECAM-1 en membrana ejercido por el PMA se analizó por citometría de flujo. Como marcador de superficie se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 (HC1/6). B. Ensayos de retardo en gel en las líneas celulares U-937, H-L60 y Jurkat. En este caso las 3 líneas fueron pretratadas durante 1 h con PMA (40 ng/ml) o con TNF- α (50 ng/ml) y tratadas posteriormente durante 6 h con PDTC (30 μM). Los extractos nucleares obtenidos se incubaron en presencia del oligonucleótido (+102/+119) marcado radiactivamente tanto en presencia (+) como en ausencia (-) de un exceso de 100 veces de oligonucleótido sin marcar como competidor. En la parte inferior del gel, se aprecia el exceso de sonda radiactiva sin unirse a proteína.

Estos resultados, en su conjunto, demuestran que el factor de transcripción movilizado con el tratamiento con el éster de forbol era un factor nuclear κ B ya que esta movilización se bloqueó con inhibidor específico para la familia κ B.

Para evaluar el significado funcional de la unión entre el promotor PECAM-1 y NF κ B se llevaron a cabo transfecciones del plásmido reportero pCD31-0.66-LUC en presencia o ausencia de un vector de expresión para la subunidad p65 de NF κ B, (pRc/CMV-p65) en el que la expresión de la subunidad p65 de NF κ B está dirigida por el promotor del Citomegalovirus. Un experimento representativo de estas transfecciones se esquematiza en la **Figura 3.20**.

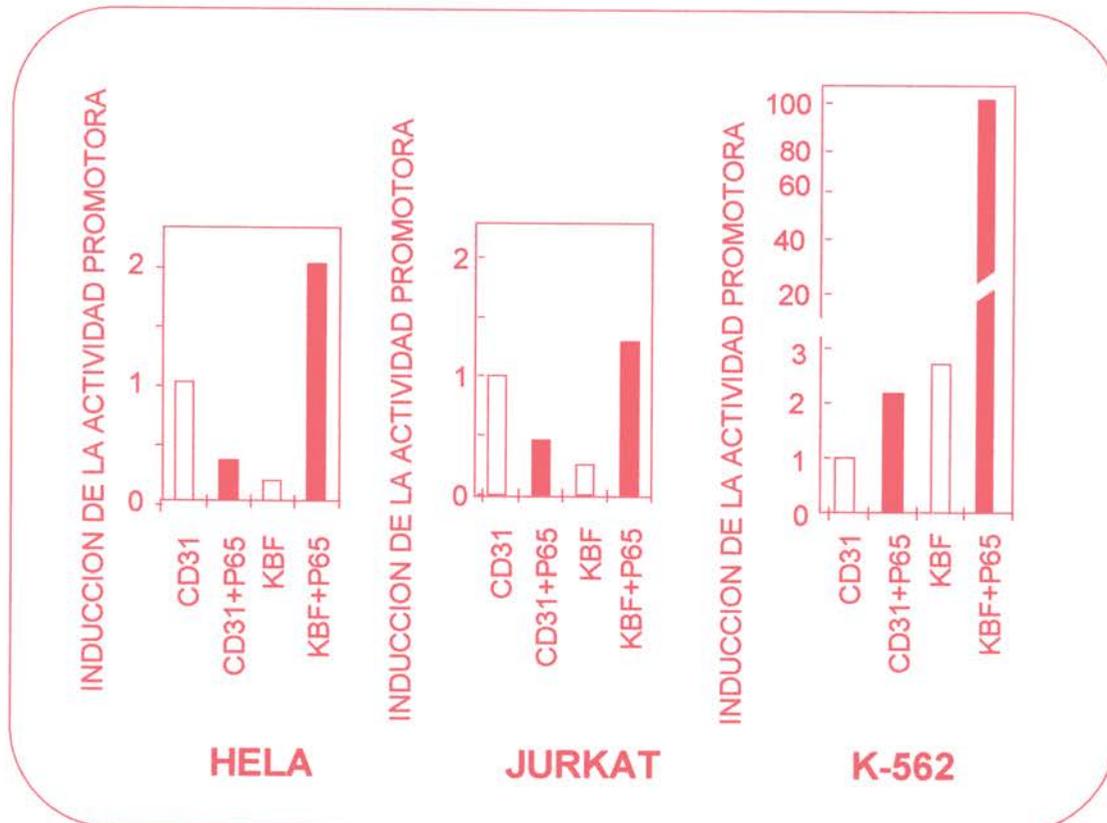


Figura 3.20.- Efecto de la sobreexpresión de la subunidad p65 sobre la actividad transcripcional de PECAM-1. Se transfectaron transitoriamente células HeLa (izquierda), K562 (derecha) y Jurkat (medio) con la construcción promotora de PECAM-1 pCD31-0.66-LUC que contiene el fragmento promotor de 0.66 Kb de PECAM-1 en presencia y ausencia del vector de expresión pRc-CMVp65 que contiene el ADNc de la subunidad p65 en el vector pRc bajo el control del citomegalovirus (CMV). En paralelo, y como control del experimento, se transfectó el promotor del gen que codifica para la subunidad p50 (KBF-1) en ausencia (barras vacías) y en presencia (barras rellenas) del vector de expresión p65. En todas las transfecciones se mantuvo constante la cantidad total de ADN mediante la adición de vector vacío como portador de ADN. La figura que se muestra, constituye un ejemplo representativo de al menos 3 experimentos independientes realizados en cada línea celular.

En células HeLa y Jurkat la sobreexpresión de p65 fue capaz de inhibir la actividad transcripcional de PECAM-1 un 70% respecto del control (CD31) mientras que la sobreexpresión de p65 fue capaz de transactivar el promotor de KBF-1 (p50) incrementando notoriamente su actividad. En el caso de HeLa, el incremento fue de 12 veces respecto al control (KBF-1) y en Jurkat la inducción de la transcripción fue de 5.5 veces. En cambio, en

células K562 la sobreexpresión de p65 indujo 2.5 veces la actividad transcripcional basal de PECAM-1 y 30 veces la actividad transcripcional de KBF-1. Estos resultados en conjunto, sugieren: primero, que NF κ B se une al sitio consenso (+110/+118) en el promotor PECAM-1 ya que se detecta la formación del complejo retardado DNA-proteína. Esta unión es específica para NF κ B porque se inhibe con un exceso de sonda fría así como por un inhibidor específico de NF κ B. Y finalmente, esta unión ADN-proteína es capaz de transactivar PECAM-1. Una vez demostrada la existencia de un sitio consenso NF κ B funcionalmente activo, quisimos estudiar qué subunidades de la familia Rel/ κ B eran las que estaban implicadas en la formación del complejo ADN-proteína. Para ello realizamos experimentos de retardo en gel con extractos nucleares de células U-937 en las que se había inducido NF κ B por tratamiento con TNF- α , y los complejos formados se compitieron con anticuerpos específicos frente a p65, p50 y c-Rel.

En la **Figura 3.21** se muestra el gel de retardo obtenido en el que al competir con un anticuerpo específico para p65 desaparece la banda superior y en cambio al competir con p50 la banda inferior es la que desaparece. No se observan cambios en el complejo al competir con la subunidad c-Rel respecto al control. Por tanto, el NF κ B movilizado por el tratamiento con TNF- α en células U-937, es un heterodímero p50/p65. Estos resultados sugieren que el heterodímero p50/p65 regula la expresión de PECAM-1.

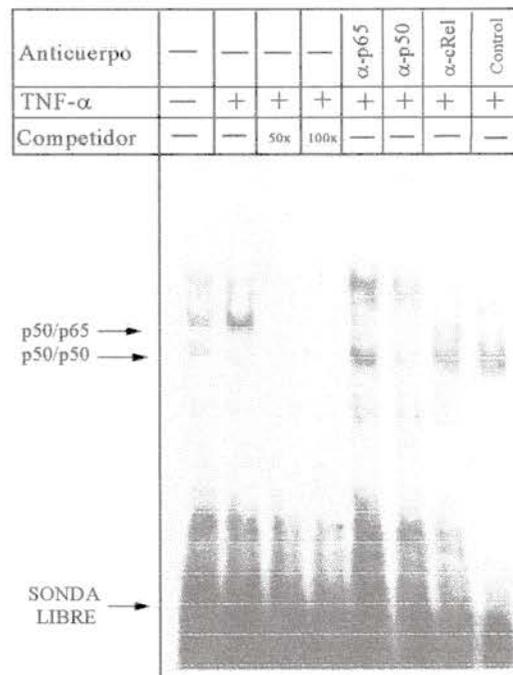


Figura 3.21.- Identificación de las subunidades NF κ B/Rel que participan en los complejos ADN-proteína de PECAM-1. Gel de retardo en el que en todos los casos se utilizó 10 μ g de extracto nuclear obtenido de células U-937 tratadas con TNF- α (100 ng/ml) durante 1 h para inducir la actividad NF κ B excepto en la calle 1 que contiene extractos de células U-937 sin tratar. Como sonda se utilizaron 0.5 ng del oligonucleótido de PECAM-1 que contiene el sitio consenso para NF κ B (+102/+119) marcado radiactivamente. La incubación de los extractos en presencia de la sonda marcada radiactivamente tuvo lugar durante 20' a 4° C. El complejo formado se compitió con un exceso de 50 veces de oligonucleótido sin marcar. Además, las calles 5-8 se incubaron durante 20' a 4° C con anticuerpos específicos frente a las subunidades p65 (calle 5), p50 (calle 6) y c-Rel (calle 7) o suero preinmune (calle 8) previa a la adición de la sonda marcada.

3.10.2.- Efecto de TNF- α (el más potente activador de la actividad NF κ B) sobre la expresión de PECAM-1.

PECAM-1, al igual que otras moléculas de adhesión está implicada en el reclutamiento de los neutrófilos y leucocitos a los sitios de inflamación. La caracterización estructural de la región promotora de las moléculas de adhesión implicadas en este proceso han identificado los sitios consenso de unión para la familia de factores nucleares- κ B además de otros grupos de activadores transcripcionales como son ATF-2 y HMG-I (Y). Esta familia de factores de transcripción κ B regulan la transcripción de moléculas de adhesión como ELAM-1 o E-selectina (Lewis *et. al.*, 1994), VCAM-1 (Shu *et. al.*, 1993) o ICAM-1 (Ledebur *et. al.*, 1995). La similitud estructural y funcional de PECAM-1 con estas moléculas de adhesión nos indujo a pensar que NF κ B también estuviera implicado en la regulación transcripcional de PECAM-1.

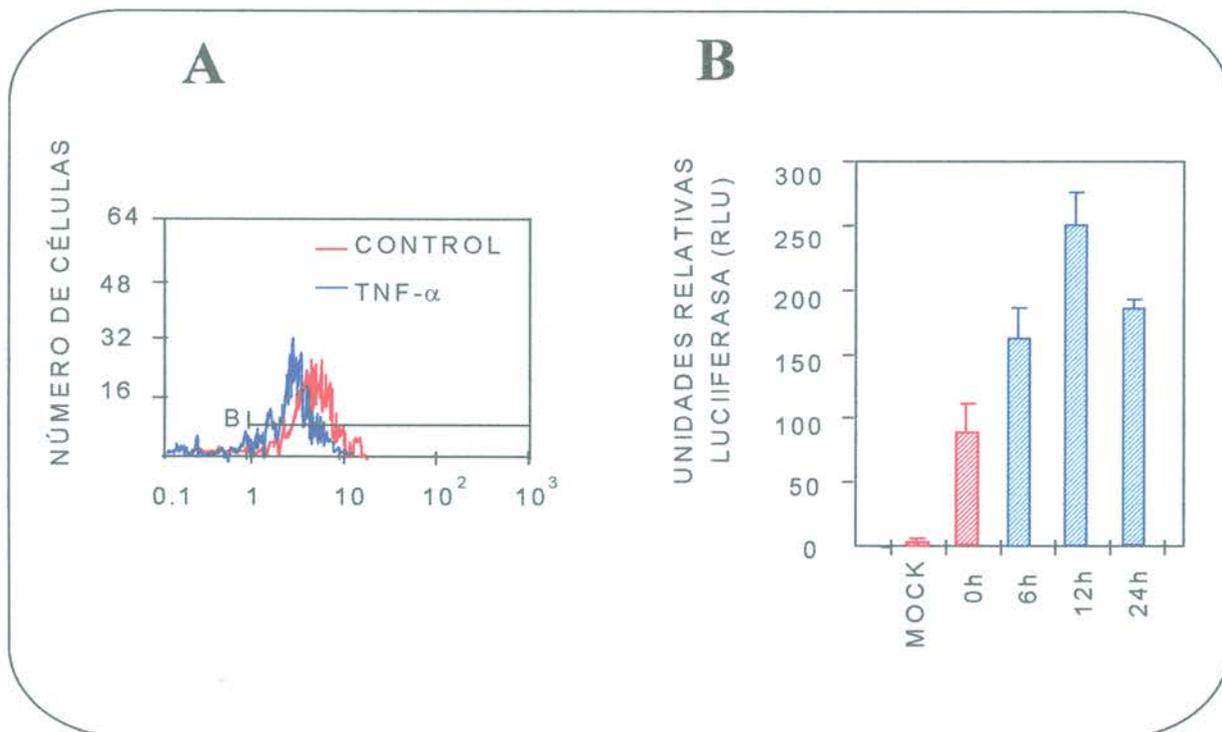


Figura 3.2.2.- Tratamiento del transfectante estable de U-937 con la construcción del promotor de PECAM-1 pCD31-1.42-LUC. A. Análisis por citometría de flujo de la expresión de PECAM-1 en la membrana del transfectante estable sin inducir (línea roja) o inducidas con TNF- α (100 ng/ml) (línea azul) durante 24 h. El eje de coordenadas muestra el porcentaje de células positivas. El control negativo está señalado con la barra (B). B. Efecto que ejerce el tratamiento del transfectante estable de U-937 con TNF- α a los tiempos indicados en la figura. Mock representa el control negativo de la transfección, es decir, el transfectante estable del vector vacío pXP2.

En un primer estudio de la posible implicación de la actividad NF κ B en la regulación de PECAM-1 utilizamos el transfectante estable de PECAM-1 en U937 para estudiar el posible efecto que pudiera ejercer TNF- α que es el más potente inductor de NF κ B conocido hasta ahora. En la **Figura 3.22A** aparece reflejado el efecto que esta citoquina ejerce sobre la

expresión en membrana de PECAM-1. Esta citoquina en células U-937 transfectadas establemente con la construcción pCD31-1.42-LUC de PECAM-1 disminuyó la expresión de PECAM-1 en la superficie. Tratamientos del transfectante estable con TNF- α , indujeron 6.5 veces la actividad transcripcional basal de PECAM-1 una vez transcurridas 12 horas desde el tratamiento con la citoquina, disminuyendo a las 24 hasta 2.4 veces la actividad transcripcional basal como se muestra en la **Figura 3.22B**. Los resultados obtenidos con el transfectante estable serían compatibles con la existencia de una desestabilización del ARNm independiente de la síntesis de la proteína. De hecho, también se analizó el efecto en la actividad promotora. Así, estudios recientes han descrito en células de la vasculatura humana y bovina (HUVEC y BAEC) una disminución tanto en ARNm como de PECAM-1 en la superficie de la célula inducido por IFN- γ y TNF- α (Stewart *et. al.*, 1996). Esta disminución de los niveles de PECAM-1 eran debidos a una fuerte desestabilización del mensajero, en ausencia de cambios en la tasa transcripcional de PECAM-1 inducidos por las citoquinas. Es decir, la inestabilidad de ARNm era independiente a la síntesis de nueva proteína.

3.11.- REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN PECAM-1 POR TGF- β 1.

PECAM-1 es una molécula de adhesión que pertenece a la IgSF, varios de cuyos miembros son regulados a nivel de función y expresión por TGF- β 1. Así por ejemplo, la expresión del antígeno carcinoembrionario (CEA) es aumentada por TGF- β 1 a través de una vía de señalización asociada a PKC (Chakrabarty *et. al.*, 1992). Por otro lado, la expresión de N-CAM, otro miembro de la IgSF está aumentada por tratamiento con TGF- β 1 (Roubin *et. al.*, 1990). En cambio, la expresión de ICAM-1 está regulada negativamente por TGF- β 1 (Lastres *et. al.*, 1994). Existe un miembro de la Superfamilia de TGF- β 1 la proteína-1 osteogénica humana (OP-1) que promueve fuertemente la agregación de células neuronales induciendo la expresión de N-CAM (Perides *et. al.*, 1993).

Estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado que TGF- β 1 es capaz de regular la función de PECAM-1 aumentando su expresión y activando la adhesión de PECAM-1 en células de linaje monocítico U-937 siendo estos dos mecanismos necesarios para la adhesión. La inducción de PECAM-1 por TGF- β 1, al igual que en el caso del CEA, también parece ser que es mediada por PKC (Lastres *et. al.*, 1994). Estos autores demostraron que TGF- β 1 induce una agregación homotípica en células U-937 provocando simultáneamente un incremento en los transcritos y en la expresión de PECAM-1 en superficie (Lastres *et. al.*, 1994).

Todos estos datos nos indujeron a estudiar la posible regulación transcripcional de PECAM-1 por TGF- β 1. Para ello, utilizamos los transfectantes estables de U-937 con el promotor de PECAM-1. En la **Figura 3.23A** se comprobaba cómo el tratamiento con TGF- β 1

induce la expresión de PECAM-1 en membrana siendo ésta máxima a las 24 horas de tratamiento (inducción de 2.5 veces respecto a la expresión basal de PECAM-1). Además, en la **Figura 3.23B** se demuestra que TGF- β 1 regula transcripcionalmente PECAM-1 induciendo su actividad transcripcional unas 2 veces en relación con la transcripción basal de PECAM-1 en las células sin tratar.

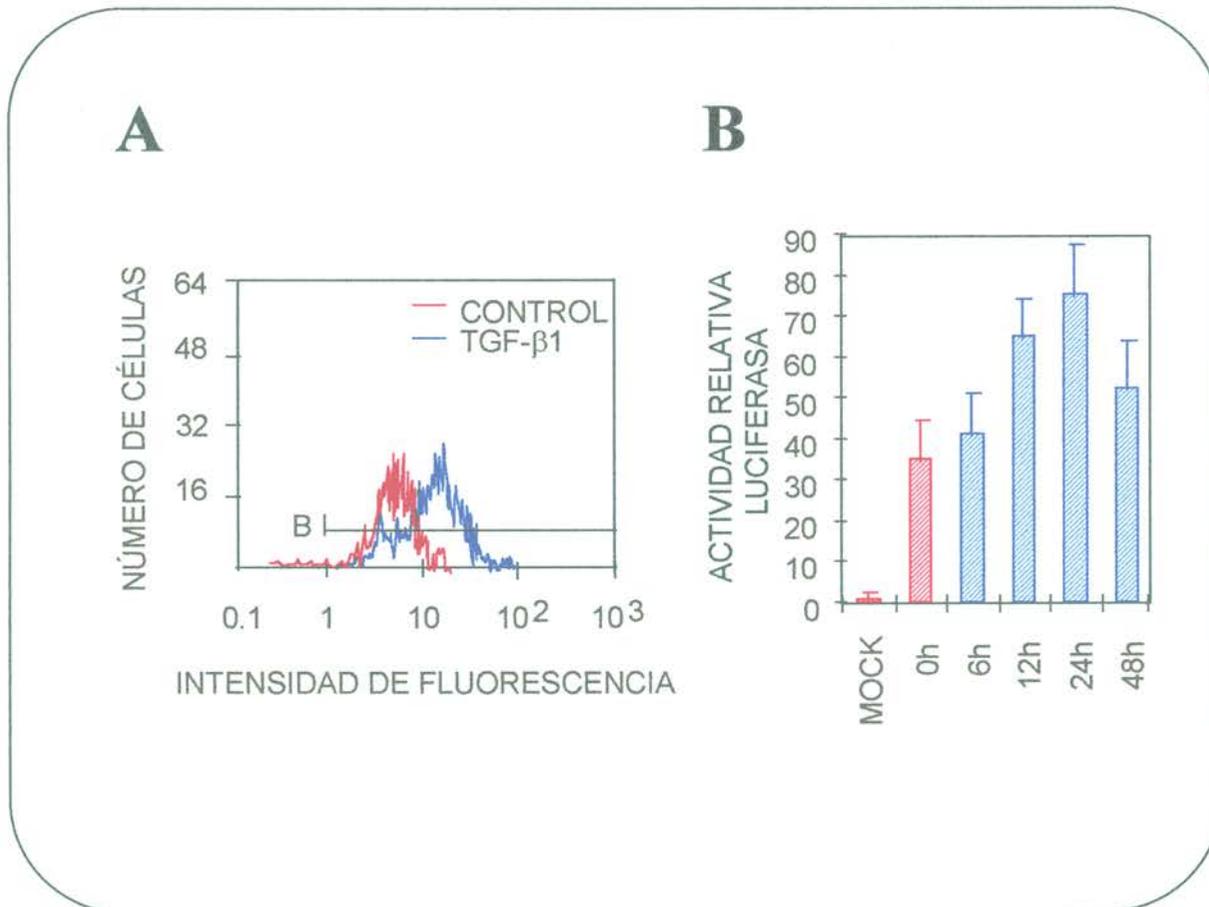


Figura 3.23.- Tratamiento con TGF- β 1 del transfectante estable de U-937 con la construcción del promotor de PECAM-1 pCD31-1.42-LUC. A. Análisis por citometría de flujo de la expresión de PECAM-1 en membrana del transfectante estable sin inducir (línea roja) o inducida durante 24 h. con TGF- β 1 (10 ng/ml) (línea azul). El eje de coordenadas muestra el porcentaje de células positivas. El control negativo está señalado con la barra (B). B. Efecto que ejerce el tratamiento del transfectante estable de U-937 con TGF- β 1 a los tiempos indicados en la figura. Mock representa el control negativo de la transfección, es decir, el transfectante estable conteniendo el vector vacío pXP2.

La regulación transcripcional de PECAM-1 frente a TGF- β 1, nos llevó a analizar la posible existencia de secuencias consenso de respuesta a TGF- β . El análisis de la secuencia de 1.55 Kb de la región 5' flanqueante de PECAM-1 reveló la existencia de diversas secuencias consenso de respuesta a TGF- β . De entre estas secuencias, unas ejercen una regulación negativa, mientras que otras, son elementos de respuesta positiva.



Figura 3.24.- Elementos de respuesta a TGF-β1 identificados en el promotor de PECAM-1. Los elementos de respuesta negativa a TGF-β (TAE, TIE, Ig-α) se representan en color rojo y los elementos de respuesta positiva a TGF-β (TAE-α2(I), NF-1(3')) se representan en color verde. La secuencia Alu está representada por la caja rosa. También, se detallan en la figura los sitios de restricción con puntas de flecha invertidas en color azul así como los dos focos principales de inicios de la transcripción descritos (negro).

Entre los elementos de respuesta negativa hallados, cabe destacar “*TGF-β Inhibitory Element*” (TIE) identificado también en otros genes que son regulados transcripcionalmente por TGF-β1 como son el gen de la transina y de la estromelina (Kerr *et. al.*, 1990), el gen de la colagenasa humana (Edwards *et. al.*, 1987), el gen de la uroquinasa (Laiho *et. al.*, 1986), elastasa (Redini *et. al.*, 1988) y *c-myc* (Takehara *et. al.*, 1987). En PECAM-1, se han identificado secuencias consenso para elementos TIE entre las posiciones: -610/-601; -354/-345; y -310/-300. Otra secuencia consenso presente en otros genes que ha resultado ser un elemento de respuesta negativa a esta citoquina es “*TGF-β Control Element*” (TCE) descrito anteriormente en el gen de la transina y estromelina (Kerr *et. al.*, 1990) así como en *c-myc* (Pietenpol *et. al.*, 1991). Este elemento de regulación negativa se ha identificado dentro de la secuencia de PECAM-1 en las regiones comprendidas entre las posiciones: -278/-269; +57/+49; +133/+22; +14/+23; +20/+27, +84/+92, y +428/+436. Otro elemento de respuesta negativo frente a TGF-β es el identificado como Ig-α, entre la posición -346/-356) para el que no se conoce el factor de transcripción implicado en la regulación por TGF-β (Lin *et. al.*, 1992).

También se han identificado en PECAM-1, secuencias consenso de respuesta a TGF-β que actúan como reguladores positivos de la transcripción. Este es el caso de la secuencia consenso TAE-α2(I) identificada inicialmente en el gen que codifica para la cadena α2 del colágeno de tipo I (Ritzenthaler *et. al.*, 1993) y localizada también en PECAM-1 en las posiciones +172/+182. En las posiciones -583/-579 y -748/-743 se ha identificado asimismo, otro elemento de respuesta positiva a TGF-β. Este elemento representado como NF-1(3') contiene el extremo 3' de la secuencia consenso (GCCAAG) del factor de transcripción NF-1 identificado en el promotor de la cadena α2 del colágeno de tipo I como regulador positivo de la transcripción frente a TGF-β. La localización de todos estos elementos descritos dentro del promotor de PECAM-1 se detalla en la **Figura 3.24**.

Ensayos de transfección transitoria con las distintas deleciones del promotor de PECAM-1 en presencia o en ausencia de tratamiento con TGF-β1 nos revelaron las regiones en el gen de PECAM-1 responsables de la respuesta a TGF-β1. En la **Figura 3.25** se representa un experimento representativo de transfección transitoria en células Mv1Lu en ausencia y en presencia de TGF-β1. Estos resultados muestran que es necesario como mínimo el fragmento de 1.42 Kb *SmaI/PstI* del promotor para que TGF-β1 actúe globalmente induciendo la transcripción de PECAM-1.

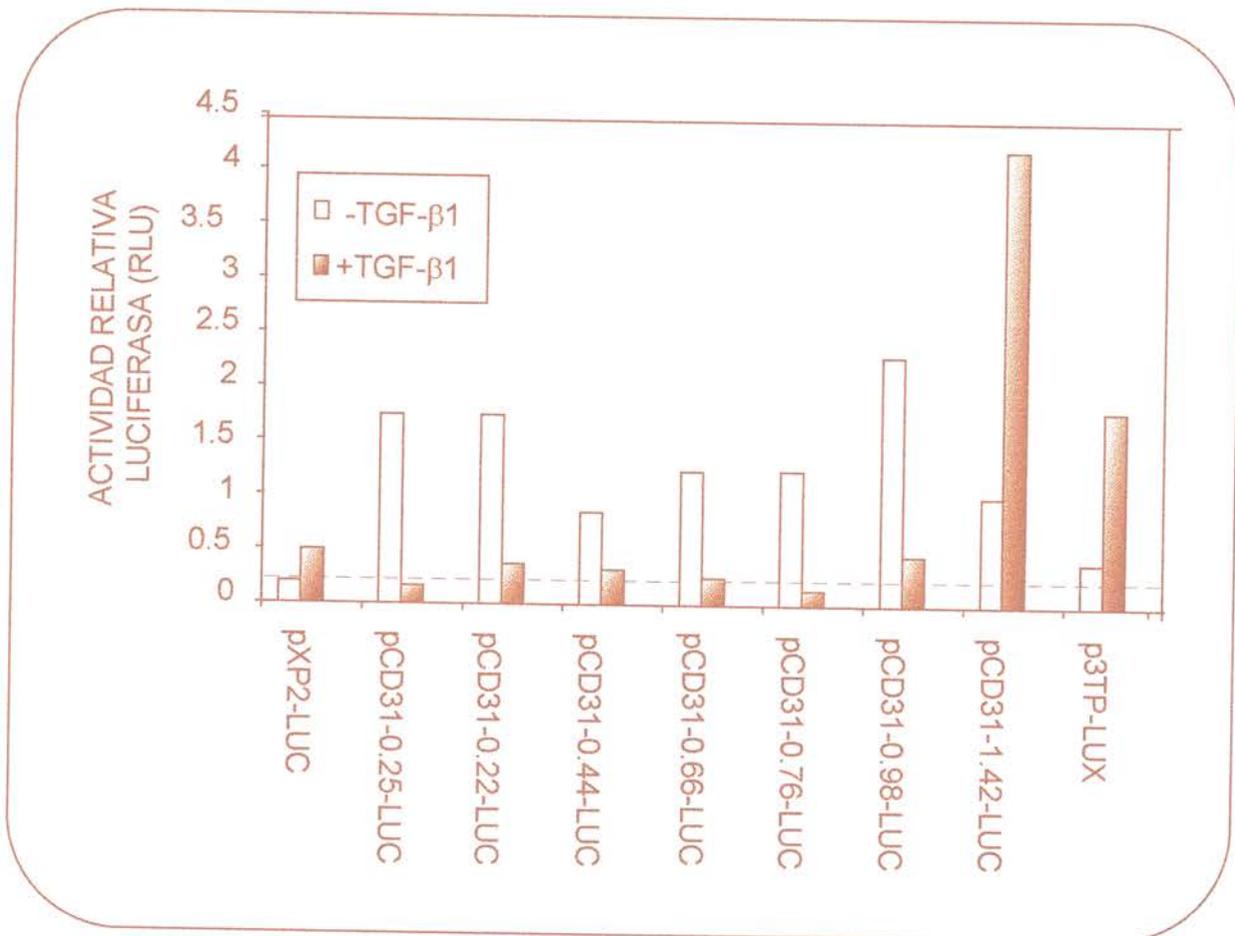


Figura 3.2.5.- Efecto de TGF-β1 (5ng/ml) en la actividad transcripcional de PECAM-1 mediante ensayos de transfección transitoria en células MvLU1. La línea de trazos representa el nivel de fondo del sistema de medida de la actividad transcripcional de PECAM-1. La normalización de la eficacia de la transfección se ha realizado por cotransfección con pCMV-βGal.

ABRIR CAPÍTULO 4





ABRIR CAPÍTULO 3

4.- DISCUSIÓN

Dado el papel fundamental de PECAM-1 en las interacciones celulares y debido a la importancia de la comprensión de los procesos celulares básicos que regulan la especificidad de la expresión del gen de PECAM-1, hemos llevado a cabo el estudio de los mecanismos que regulan la transcripción de PECAM-1 en células hematopoyéticas y endoteliales. En el presente trabajo, se describe el clonaje y la caracterización del promotor de PECAM-1, así como la identificación de secuencias que pueden regular PECAM-1 transcripcionalmente en células de la vasculatura y hematopoyéticas. Para abordar este estudio, un clon genómico *HindIII-HindIII* de 5.2 Kb conteniendo el exón I y parte del exón 2 así como la región 5' flanqueante del gen PECAM-1, fue aislado a partir de una genoteca de placenta.

4.1.- IDENTIFICACIÓN DE DOS FOCOS PRINCIPALES DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EL PROMOTOR DE PECAM-1.

El promotor de PECAM-1 a diferencia de otras moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1, carece de caja TATA o de una caja CAAT. Nuestros resultados demuestran la existencia de dos focos fundamentales de inicios de la transcripción en el promotor de PECAM-1 separados entre sí unos 300 pb. Por una parte, el foco de la transcripción en 5' constituido por múltiples sitios de inicio de la transcripción localizados dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII* y, por otro lado, el foco de inicio de la transcripción en 3' constituido a su vez por múltiples sitios de inicio de la transcripción dentro del fragmento de 0.25 Kb *NotI/PstI*. Se ha identificado una agrupación de sitios de inicio de la transcripción, específicos de linaje mieloide, dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII* localizados a unos 500 pb con respecto al inicio de la traducción de la proteína y al que hemos denominado foco de transcripción en 5' de PECAM-1, constituido a su vez por múltiples sitios de inicio de la transcripción situados concretamente en las posiciones -7, -6, +1, +9 hasta +18. No se ha encontrado caja TATA o CAAT dentro del fragmento *NheI/BglIII* de 0.22 Kb, aunque existe una caja rica en GC próxima a los sitios de transcripción descritos, concretamente en las posiciones desde -31 hasta -19 precediendo a los sitios de inicio de la transcripción mencionados. La presencia de una secuencia rica en GC dentro de la región flanqueante en 5' es una característica de genes que carecen de cajas TATA, los cuales generalmente contienen sitios de unión para Sp1, AP-2, y AP-1 (Angel *et. al.*, 1987; Imagawa *et. al.*, 1987; Mitchel *et. al.*, 1987; Kadonaga *et. al.*, 1988; Pugh *et. al.*, 1990). Experimentos de 5' RACE también han identificado la existencia de otro sitio de transcripción en la posición +253 situado dentro de la región de 0.25 Kb *NotI/PstI* y a 50 pb por encima del sitio de transcripción descrito en células endoteliales (Kirschbaum *et. al.*, 1994). En este fragmento, se ha identificado una secuencia iniciadora consenso ATTCN₁₋₃₀GCCA de reconocimiento por la ARN polimerasa II similar a la encontrada en otros genes de expresión constitutiva como el gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) y que carecen de caja TATA (Means *et. al.*, 1990; Smale *et. al.*, 1990) siendo además este iniciador distinto del encontrado en los genes cuya expresión se induce con la diferenciación y desarrollo como es el promotor del gen de la

deoxinucleotidil transferasa (TdT). Precediendo a cada uno de los inicios de transcripción descritos en esta zona se han identificado sus respectivas cajas ricas en G+C cuyas localizaciones exactas son desde +230 hasta +250 para el inicio de transcripción localizado en +253 y desde +290 hasta +300 para el inicio de transcripción en +301 pudiendo estas cajas ricas en G+C mediar el anclaje del factor de transcripción Sp1, AP-2, o AP1.

La existencia de múltiples sitios de iniciación de la transcripción es compatible en primer lugar, con la ausencia de una caja TATA y la dificultad encontrada para obtener bandas nítidas en experimentos de *primer extension* (datos no mostrados). En segundo lugar, con la presencia de dos bandas de 3.4 y 3.7 Kb respectivamente que aparecen en el análisis por *Northern blot* en células U-937 (Cabañas *et. al.*, 1989; Goldberger *et. al.*, 1994; Lastres *et. al.*, 1994). En tercer lugar, la existencia de un foco de transcripción en 5' se corrobora con la alta actividad transcripcional desarrollada por el fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII* en células mieloides.

El análisis de la región promotora de PECAM-1 ha permitido demostrar que el fragmento de 1.42 Kb *SmaI/PstI* puede dirigir la expresión específica de tejido del gen reportero de luciferasa (Figura 3.7). Experimentos de transfección transitoria utilizando las construcciones de PECAM-1 obtenidas por deleciones progresivas en dirección 5' del promotor, dan como resultado un aumento de la actividad luciferasa que alcanza el máximo con la construcción de 0.25 Kb *SmaI/PstI* (Figura 3.6). La actividad promotora de esta construcción en comparación con la obtenida con la construcción completa pCD31-1.42-LUC sugiere la existencia de elementos reguladores negativos en la región entre las posiciones -929/+231 que comprende el fragmento *SmaI/NotI*, y más concretamente dentro del fragmento *BglIII/NotI*. Transfecciones transitorias realizadas con las construcciones obtenidas a partir de deleciones progresivas en dirección 3' del promotor, mostraron que en condiciones basales la máxima actividad transcripcional de PECAM-1 era alcanzada por el fragmento *NheI/BglIII* de 0.22 Kb superando en casi 4 veces la actividad de la construcción completa pCD31-1.42-LUC y reduciéndose considerablemente la actividad promotora en la construcción pCD31-0.76-LUC en la que no está presente el fragmento de *NheI/BglIII* de 0.22 Kb. Estos datos sugerían que la región *NheI/BglIII* era relevante para la transcripción en células hematopoyéticas. Por otra parte, la construcción pCD31-0.76-LUC retiene una mínima actividad promotora. La capacidad transcripcional que conserva este fragmento *SmaI/NheI*, podría explicarse por la presencia de un elemento YY1 en el fragmento pCD31-0.76-LUC que ha sido identificado en otros promotores como una secuencia que une una proteína iniciadora capaz de dirigir y activar la transcripción *in vitro* (Seto *et. al.*, 1991).

En conclusión, los resultados obtenidos con experimentos de transfección transitoria efectuados sobre las construcciones de PECAM-1 obtenidas por deleción tanto en la dirección 3' como 5' refuerzan y apoyan la existencia de dos focos fundamentales de inicios de

la transcripción. Aparentemente, la utilización del foco en 5' o en 3' como inicio de la transcripción de PECAM-1 depende del linaje celular.

La existencia de una regulación transcripcional diferente dependiendo del tipo celular se ha descrito en otras moléculas de adhesión como es el caso de ICAM-1, la cual, es inducible por PMA, TNF- α , IL-1 o IFN- γ . En ICAM-1 se han identificado también dos sitios fundamentales de inicio de la transcripción separados entre sí 278 pb y localizados a 319 y 41 pb respectivamente respecto al sitio de inicio de la traducción de la proteína pero a diferencia de PECAM-1, ICAM-1 presenta dos cajas TATA. Experimentos realizados por Voraberger *et al.* (1991), han demostrado que en células de adenocarcinoma H5913T, que constitutivamente expresan altos niveles de ICAM-1, ó en células A549, en las que la expresión de ICAM-1 es inducida con PMA, el sitio de transcripción utilizado fundamentalmente es el situado en la localización más 5' o sea, el localizado en la posición 319 por encima del inicio de la traducción. Por el contrario, en células A549 no tratadas con PMA el sitio de iniciación utilizado principalmente, es el de localización más 3'. Estos datos, sugieren un mecanismo de regulación distinta en ambas líneas celulares. Las células endoteliales expresan constitutivamente PECAM-1 en alta cantidad (10^6 moléculas/célula), mientras que la expresión de PECAM-1 en monocitos (85×10^3 moléculas/célula) está regulada durante el proceso de diferenciación/maduración (Newman *et al.*, 1994). Un dato más a tener en cuenta, es que dentro del linaje hematopoyético, se puede apreciar cómo la transcripción basal es 4 veces superior en el fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglIII* respecto a la transcripción del fragmento *NotI/PstI* (Figuras 3.6 y 3.8). Esta diferencia en la expresión de PECAM-1 podría explicarse por una utilización preferencial de un foco de transcripción frente a otro entre células monocíticas y endoteliales. Para abordar la posible existencia de una especificidad en cuanto a la utilización de uno de los focos de inicio de la transcripción dependiendo de tipo celular, se realizaron transfecciones transitorias donde se comparó la capacidad de los dos focos identificados de inicios de la transcripción para inducir la transcripción de PECAM-1 en células mieloides (donde la expresión de PECAM-1 se induce durante la diferenciación) y endoteliales (donde la expresión de PECAM-1 es constitutiva) (Figura 3.11). Los resultados expuestos demuestran que el foco de la transcripción en 5' es fundamental para la transcripción en células monocíticas mientras que en células endoteliales, la transcripción mayoritariamente es dirigida por el foco en 3'. En el caso de PECAM-1, a diferencia de lo que ocurre en ICAM-1, no parece que cada uno de los focos de transcripción identificados, sea exclusivo de un tipo de linaje, puesto que los sitios de iniciación en ambas localizaciones son capaces de promover en mayor o menor medida la iniciación de la transcripción en los dos tipos celulares estudiados. Es decir, ninguno de los dos focos son utilizados con exclusividad dependiendo del tipo celular.

4.2.- PRESENCIA DE UN ELEMENTO INICIADOR EN EL FOCO 3' DE INICIOS DE LA TRANSCRIPCIÓN EN PROMOTOR DE PECAM-1.

PECAM-1 carece de caja TATA y la transcripción de PECAM-1 se inicia en dos focos principales localizados en el promotor y separados entre sí 300 pb. Dentro del foco de la transcripción en 3' se ha identificado en la posición +301 un elemento iniciador con secuencia consenso semejante al gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*). La caja TATA, presente en muchos genes, determina el punto exacto de inicio de la transcripción en alguna base o bases dentro de su propia secuencia (Smale *et. al.*, 1989). La presencia de caja TATA parece ser necesaria para determinar el inicio correcto de la transcripción en situaciones de alta tasa de transcripción, mientras que la presencia de iniciador (*Inr*) es suficiente en situaciones de baja tasa de síntesis de ARNm (Pellman *et. al.*, 1990). El iniciador fue descrito por primera vez en el gen de la deoxinucleotidil transferasa terminal de ratón (*TdT*) (Smale *et. al.*, 1989), y se ha encontrado después en numerosos genes virales, de levadura, de ratón y humanos (Concino *et. al.*, 1984), sólo o en presencia de caja TATA. El estudio de otros promotores sin caja TATA permitió la caracterización de los elementos iniciadores como una familia con distintas secuencias nucleotídicas. El estudio de los mecanismos implicados en la iniciación de la transcripción por la polimerasa II ha descubierto que la mayoría de los genes no contienen cajas TATA. Los promotores de este tipo de genes se pueden dividir en dos tipos. Los promotores sin caja TATA ricos en G+C, entre los cuales los primeros estudiados fueron los promotores de los genes *housekeeping* (Sehgal *et. al.*, 1988), que contenían numerosos sitios de inicio de la transcripción y sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 (Dyran *et. al.*, 1983). Una segunda clase incluye aquellos promotores sin caja TATA que no son ricos en G+C. A diferencia de los anteriores, estos promotores no son constitutivamente activos y bastantes son regulados durante la diferenciación y desarrollo e inician la transcripción en un único sitio o múltiples sitios muy cercanos entre sí. Existen distintas clases de elementos iniciadores que están presentes en los promotores, a pesar de la presencia de caja TATA como es el caso del gen Ad-ML (promotor tardío de adenovirus) o ausencia de la misma como es el caso del gen de la deoxinucleotidil transferasa terminal de ratón (*TdT*), la dihidrofolato reductasa (*dhfr*), PBGD y el gen de la proteína ribosómica S16 (*rpS16*). El hecho de que la mayoría de los promotores que carecen de caja TATA requieran todos los factores de transcripción incluyendo TFIID, sugiere que, a excepción del proceso de reconocimiento de la caja TATA, el mecanismo de iniciación no difiere del que tiene lugar en promotores con caja TATA interviniendo los factores TFIID, TFIIB, TFIIE y la ARN polimerasa II en el complejo específico sobre el fragmento de ADN reconocido por la ARN polimerasa II. Existen factores de transcripción capaces de interactuar con el *Inr* para activar la transcripción basal de los genes que contienen esta secuencia: El factor TFII-I, purificado de extractos de células HeLa, es capaz de mediar en la transcripción basal del promotor Ad-ML, entrando en contacto directo con una de sus secuencias iniciadoras (ML-1) (Roy *et. al.*, 1991). La proteína YY1, perteneciente a la familia de factores de transcripción "zinc finger", activa la iniciación de la transcripción a partir del iniciador del promotor P5 del virus asociado a adenovirus (AAV)

(Seto et.al., 1991), mediando además en la transcripción de muchos otros genes como activador o represor (Natesan et. al., 1993; Kapaettu et. al., 1993). YY1 tiene un patrón de expresión muy amplio y su estructura está muy conservada entre especies (Shrivastava et. al., 1993). El factor de transcripción USF media también en la transcripción dependiente de Inr tanto directamente como cooperando específicamente con TFII-I (Roy et. al., 1991). USF es una proteína de la familia bHLH-Lz (*basic helix-loop-helix leucine-zipper*) expresada en muchos tipos celulares (Kirschbaum et. al., 1992) que contrarresta el efecto inhibitor del protooncogen *c-myc* sobre la transcripción de ciertos genes regulados durante la diferenciación como C/EBP α y los genes de la albúmina sérica, ambos conteniendo Inr en sus promotores (Li et. al., 1994). La proteína c-Myc es capaz de inhibir la transcripción dependiente de Inr mediada por YY1 (Shrivastava et. al., 1993) y TFII-I (Roy et. al., 1993) por interacción directa con estos. c-Myc es también una proteína de la familia HLH, involucrada en transformación celular y proliferación por bloqueo de la diferenciación (Torres et. al., 1992) cuya transcripción es además activada por YY-1 (Riggs et. al., 1991). Por otro lado se sabe que la ausencia de elemento TATA permite a promotores, cuyo inicio de transcripción está regulado por un Inr, escapar a la acción represora de p53, una proteína antitumoral cuyo gen está mutado en diferentes tipos de tumores y que es expresada durante etapas proliferativas en células mieloides (Borellini et. al., 1993; Mack et. al., 1993). De este modo, el Inr parece constituir un mecanismo que permite que un gen sea regulado basalmente de modo diferente a un gen conteniendo secuencia TATA durante estadios de proliferación o transformación. Es razonable sugerir que c-Myc estaría evitando una expresión excesiva de moléculas de adhesión durante etapas de alta proliferación dando paso a mayores niveles de expresión en condiciones de diferenciación que requieren adhesión de la células al sustrato o adquisición de funciones efectoras dependientes de adhesión celular. Este modelo estaría de acuerdo con la inducción PECAM-1 durante la diferenciación mieloides y con la relación directa entre el aumento de los niveles de c-Myc e inhibición de la expresión de PECAM-1. Dado que c-Myc inhibe la transcripción del gen PECAM-1, y teniendo en cuenta que c-Myc es capaz de interactuar con YY1 y TFII-I inhibiendo la transcripción dependiente de Inr mediada por ambos factores, es razonable suponer que el Inr pueda mediar en la inhibición de PECAM-1 por c-Myc.

4.3.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA. IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS CONSENSO.

Como se muestra en la **Figura 3.4**, la región 5' no traducida del promotor de PECAM-1 es muy rica en secuencias G+C llegando a contener en algunos segmentos hasta cerca de un 70% de G+C. Por el contrario, el contenido en G+C de la región codificante de PECAM-1 es de un 40%. Estas regiones ricas en G+C se han encontrado en secuencias 5' flanqueantes de genes constitutivos aunque también se han encontrado en genes específicos de tejido. En estas regiones ricas en G+C de PECAM-1 se han identificado unas isletas CpG donde los dinucleótidos CpG aparecen en la misma proporción como las dinucleótidos GpC al contrario

de lo que ocurre en la totalidad del genoma donde la abundancia en el dinucleótido CpG es sólo de un 20% con respecto al GpC. Cabe destacar la existencia de más de 30 secuencias dinucleotídicas CpG dentro de las primeras 1.300 pb del promotor de PECAM-1 con una proporción especialmente alta en la relación CpG:GpC= 60-70% (Figura 4.1) localizados entre los 150 nucleótidos por encima y por debajo del sitio de transcripción de posición +301. Además, existen cuatro sitios de restricción *HpaII* (CCGG) en las inmediaciones de este sitio de iniciación. Esta observación sugiere que el estado de metilación de esta región puede ser un mecanismo por el cual las células suprimirían la transcripción de PECAM-1 de una forma específica de tejido (Yisraeli *et. al.*, 1988; Smith *et. al.*, 1993; Aird *et. al.*, 1994). Por otra parte, entre los 150 nucleótidos por encima y por debajo del sitio de iniciación descrito como +1, la relación CpG:GpC fue del 12.5%. Teniendo en cuenta la distinta utilización de los dos focos de la transcripción, según se trate de células monocíticas o endoteliales, la metilación podría ser un mecanismo de regulación de la expresión de PECAM-1. En eucariotas, el ADN está empaquetado junto a histonas formando la cromatina. Está descrito que la cromatina en las isletas CpG difiere del resto de la cromatina en una serie de aspectos, como son una reducción en la histona H1 y una ausencia de nucleosomas (Rosmarin *et. al.*, 1992). Además, el dinucleótido CpG puede ser una diana para la metilación del ADN dando lugar a residuos metilcisteína que alteran la interacción ADN-proteína (Tazi *et. al.*, 1990). Por ejemplo, el desarrollo y la expresión específica de tejido de genes de globulina parecen ser regulados por el estado de metilación del promotor de estos genes (Yisraeli *et. al.*, 1988). Smith *et. al.* (1993), han demostrado que la metilación del ADN de la E-selectina inhibe la transcripción mediada por NFκB e inducida por citoquinas inflamatorias. Aunque los datos obtenidos, sugieren que la metilación podría ser uno de los mecanismos por los cuales la expresión de PECAM-1 es regulada a nivel pretranscripcional, para confirmarlo será necesario llevar a cabo digestiones con *HPaII*/*MsPI*, enzimas de restricción que incluyen en su secuencia de reconocimiento secuencias CpG. La mayoría de estas enzimas no cortan el ADN si éste está metilado. La comparación mediante *Southern-blot* entre las bandas generadas por *HpaII* o *MspI* mostrarán la localización de los sitios de metilación.

El análisis de la secuencia de 1.300 pb de la región 5' no traducida de PECAM-1 sugería que se trataba de un promotor que reunía todas las características propias de un gen de expresión constitutiva o *housekeeping gene*. En primer lugar, por su alto contenido en G+C, y por carecer de una caja TATA o una caja CAAT. Además, presenta multitud de inicios de la transcripción separados entre sí y utiliza un elemento iniciador análogo al encontrado en el gen de la dihidrofolato reductasa que es un gen constitutivo. Sin embargo, dada la expresión tan restringida de PECAM-1, no se puede clasificar como un gen constitutivo. Probablemente, la expresión restringida se puede explicar por la existencia de sitios de unión de factores de transcripción dentro del promotor de PECAM-1.

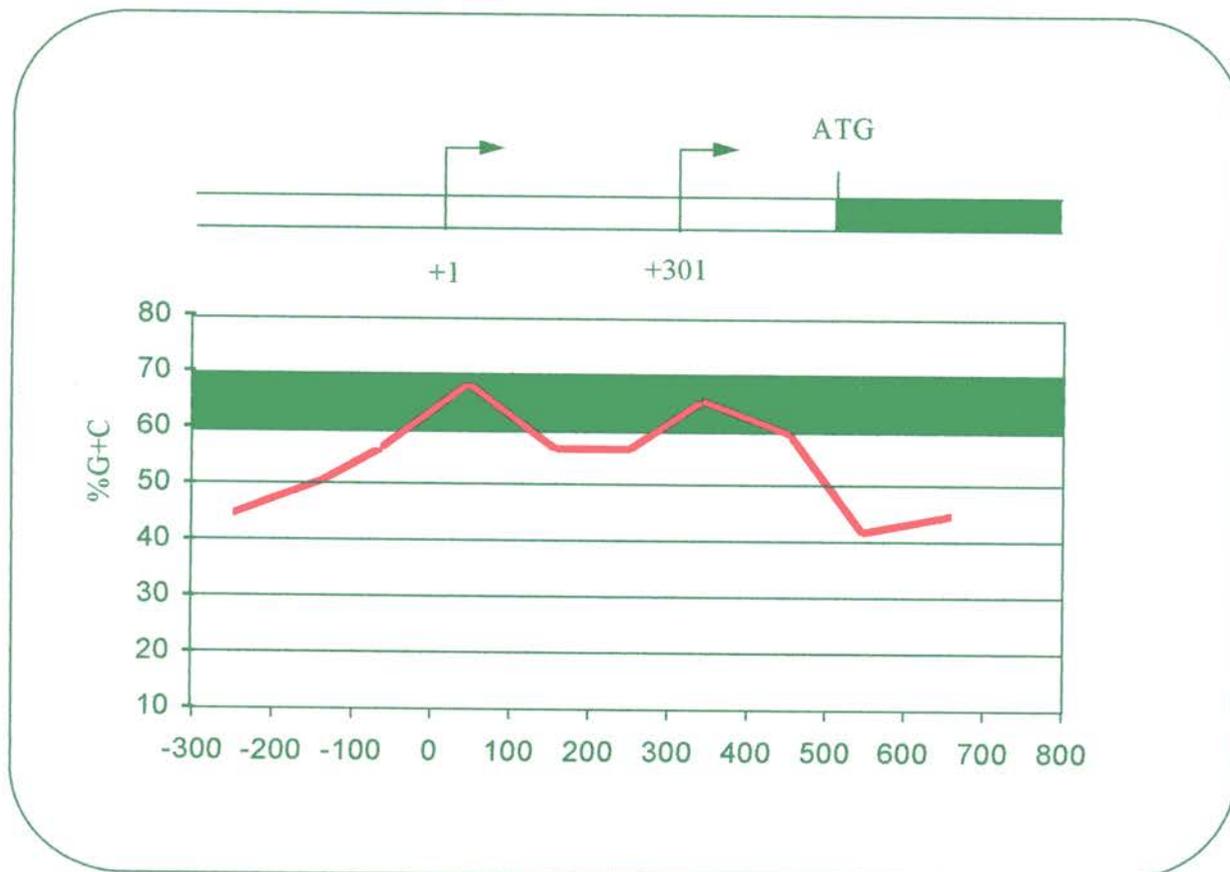


Figura 4.1.- Esquema del contenido en porcentaje de G+C del promotor de PECAM-1. En la parte superior de la figura se detalla la localización del inicio de traducción de la proteína (ATG), así como la localización de los dos focos principales de la transcripción de PECAM-1. En la gráfica se muestra cómo las dos regiones con mayor contenido en G+C (franja verde) coincide con la localización de los dos focos principales de transcripción descritos en PECAM-1.

El análisis de la secuencia nucleotídica del promotor PECAM-1 descubrió la existencia de numerosos sitios potenciales de unión para elementos reguladores como son AP-2, GATA, *ets*, PU box, Sp1, EGR-1, NFκB, elementos de respuesta a AR, E-box, elementos de respuesta a estrés mecánico (SSRE), Lyf-1 y HMG-1 (**Figura 3.4**). Un esquema que resume la localización de algunos de estos elementos de control encontrados dentro del promotor PECAM-1 se muestran en la **Tabla 4.1** y en la **Figura 4.2**.

Entre los elementos encontrados, caben destacar los tres elementos *ets* localizados en una región que se extiende entre los nucleótidos -140 y +270. Estos sitios de reconocimiento para factores de transcripción *ets* se han encontrado en numerosos promotores de origen megacariocítico, endotelial y genes que se expresan en leucocitos (resumido en la tabla 4.1). Entre los miembros de la familia de factores de transcripción *ets* que pudieran interaccionar con estos sitios se encuentran *ets-1*, PU-1 y PEA-3 (Hickstein *et. al.*, 1992). De todos estos, *ets-1* se expresa tanto en células megacariocíticas como endotelio, mientras que PU-1 se expresa en monocitos y megacariocitos. Serán necesarias investigaciones futuras para descubrir si factores de la familia *ets* participan en la regulación de la expresión de PECAM-1.

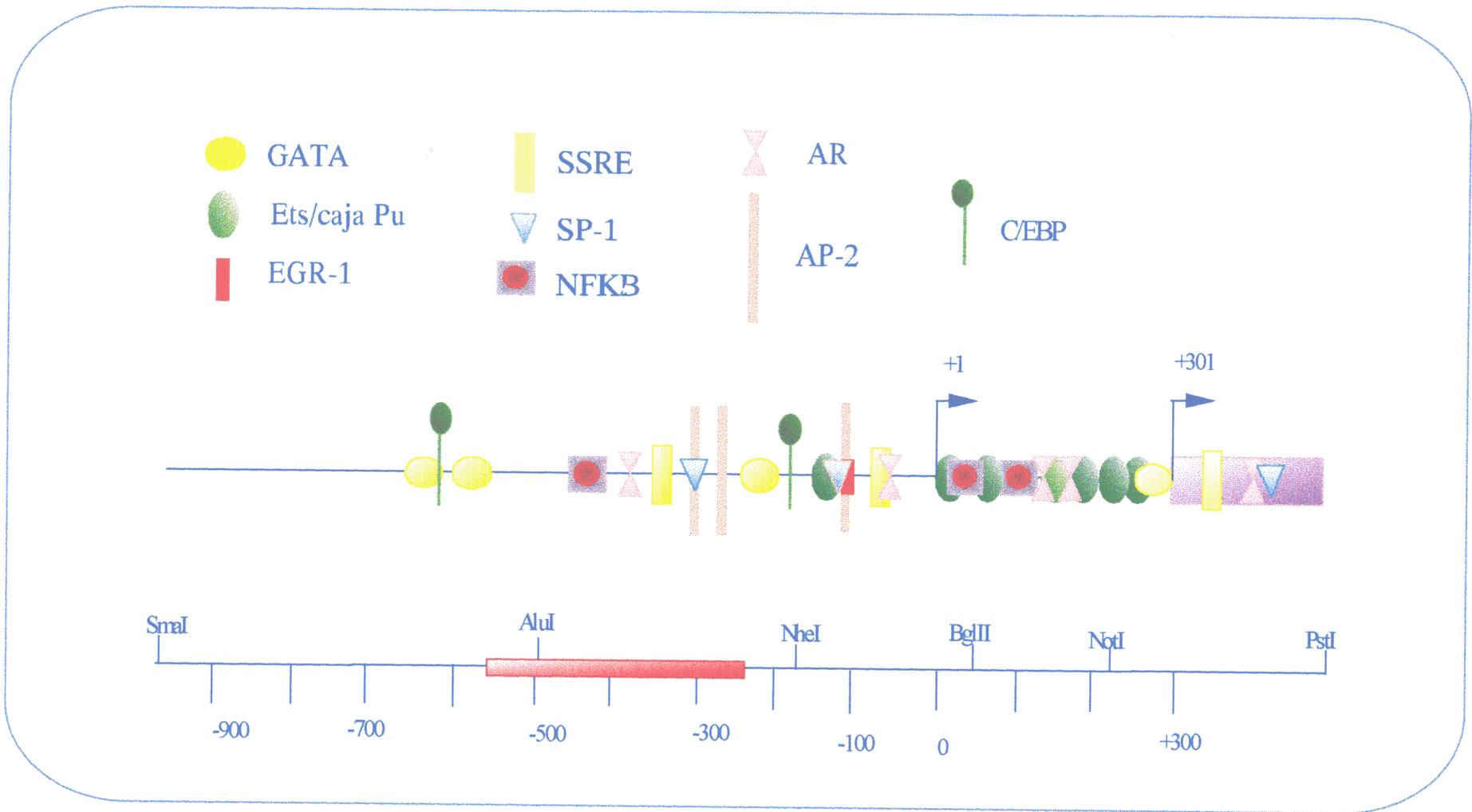


Figura 4.2.- Representación esquemática de la región flanqueante 5' de PECAM-1. El promotor de PECAM-1 carece de caja TATA y de caja CAAT, y contiene numerosos sitios de inicio de la transcripción cercanos a los dos focos principales de transcripción representados en la figura como +1 y +301. En la figura, aparecen los posibles elementos de regulación como son sitios de reconocimiento para AP-2, EGR-1, Sp1, cajas GATA, *ets*, NFκB, elementos de respuesta a ácido retinoico (AR), así como SSRE y elementos C/EBP. Es de destacar la presencia de una región Alu que en el presente esquema aparece representada en el panel inferior de la figura con un recuadro rojo.

TABLA 4.1.- Resumen de los elementos de control contenidos en el promotor de PECAM-1.

SITIO	SECUENCIA CONSENSO	SECUENCIA/POSICIÓN	GENES ENDOTELIALES
Elemento Iniciador	ATTTCN ₁₋₃₀ GCCA	ATTGTTCCCG (+301)	GPIIb, rPF4, hPF4, GPIX
GATA	(T/A)GATA(GA/G)	AGATAT (+267) CTATCT (-208) (R) TTATCG (-588) (R) CGATAT (-608)	GPIIb, rPF4, hPF4, GPIba, GPIX, vWF, P-Selectina, Endotelina-1, α -4, CD11b
<i>ets</i>	(G/C)AGGAA	GAGGAG (+329) CAGGAAT (+108) GGGGAA (+18) TTCCTC (-190) (R)	GPIIb, rPF4, hPF4, GPIba, GPIX, vWF, P-Selectina, Endotelina, VCAM-1, vWF, ICAM-1, E-selectina, α -4, CD11a, CD11b, CD11c
Sp1	(G/T)(A/G)GGCG(G/T)(G/A)	GGCGGG (-398) CCGCCC (-369) (R) CCCGCC (-372)	GPIIb, rPF4, hPF4, GPIba, GPIX, vWF, P-Selectina, Endotelina, VCAM-1, ICAM-1, vWF, E-selectina, α -4, CD11a, CD11b, CD11c, CD18
AP-2	(G/C)CCNNN(G/C)(G/C)	GCCCAGGC (+290) GCCTGCCC -109) CCGCCCCG (-370) GGCCTCCC (-380)	GPIIb, rPF4, hPF4, GPIba, GPIX, vWF, P-Selectina, Endotelina-1, ICAM-1, vWF, E-Selectina, CD11c
EGR-1	GCGC(G/T)GGGCG	GCCTGCCCCAGC (-86)	PDGF-A, Trombospondina, ICAM-1, CD44
NF κ B	GGG(A/G)(C/A/T)T(C/T)(C/T)CC	GGAATCCCC (+110) (R) CCCTTGGG (+75) (R) GGGGTTCTCC -506	VCAM-1, ICAM-1, E-Selectina, CD11c
AR	T(G/C)AC(C/A)T	TCACAG (+401) TCACAG (+119) TCACAA (+133) TGTC A (+187) TCACCA (-445)	GPIIb, rPF4, hPF4, GPIba, GPIX, vWF, P-Selectina, Endotelina, VCAM-1, vWF, E-Selectina
E-Box	CANNIG	CACTTG (+191) CAAATG (+184)	P-Selectina, hPF4, hGPIX, GPIba, Endotelina-1
SSRE	GAGACC	GGTCTC (+353) (R) GGTCTC (-125) (R) GGTCTC (-344) (R)	VCAM-1, ICAM-1, E-Selectina

PF4: Factor de plaquetas 4 (h)=humano, (r)= de ratón.; vWf: Factor de von Willebrand.; α -4: VLA-4= α ₄ β ₁.

TABLA 4.2.- Elementos consenso *ets* y GATA descritos en genes que se expresan en células endoteliales.

PROMOTOR	ELEMENTOS GATA	ELEMENTOS <i>ets</i>	TIPO DE PROMOTOR	EXPRESIÓN CELULAR
hGPIIb	TTATCG (-468) TGATAA (-56)	AGGAAGT (-517) ACTTCCT (-144)	TdT	PLAQUETAS/MEGACARIOCITOS
rPF4	AGATAA (-33)	CCGGAG (-581) CGGGAAG (-374)	TdT	PLAQUETAS/MEGACARIOCITOS
hPF4	CTATCT (-101) GGATAA (-32)	CGGGAAG (-112) TCTTTCCC (-80)	TATA	PLAQUETAS/MEGACARIOCITOS
hGPIX	GGATAA (-68)	AGTTCCT (-57) GCTTCCG (-48) CTGGAAG (-45)	TdT	PLAQUETAS/MEGACARIOCITOS
hGPIIba	CTATCA (-107)	AGGAAAG (-207) GCGGAG (-200) CTTCCTT (-74)	“Housekeeping”	PLAQUETAS/MEGACARIOCITOS
hPS	AGATAG (-759) TTATCA (-158)	TCTTCCATG (-230) GAAGG (-224) GGGAAGG (-137) TAGGAAG (-104)	“Housekeeping”	PLAQUETAS/MEGACARIOCITOS ENDOTELIO
h ν WF	TTATCA (-86) AGATAG (+218)	TAGGAAG (-398)	TATA	ENDOTELIO
hET-1	TTATCT (-136)	CAGGAAG (-295)	TATA	AMPLIA EXPRESIÓN ENDOTELIO
hES	GGATAT (-142)	TAGGAAG (-971)	TATA	ENDOTELIO
hVCAM-1	AGATA (-245) TTATCT (-259)	AGAGGA (-162)	TATA	ENDOTELIO
hICAM-1		GAGGA (-166) AGGAAG (-221) AGAGGAA (-981) GGAGGAT (-1033) (-156)	TATA	ENDOTELIO
hCD18	AATCTC (-784)	AGAGGAA (-55) ACTTCCTC (-70)	“Housekeeping”	LEUCOCITOS
hCD11b	TGATAG (-42)	GGAGGAA (-134) TTCTC (-120)	“Housekeeping”	MIELOIDES
hCD11a		AGAGGAA (-67)	TdT	LINFOCITOS/MONOCITOS
hPECAM-1	AGATAT (+278) CTATCT (-203)(R) CTTATCG (-583)(R) CGATAT (-608)	GAGGAG (+273) CAGGAAG (+252) GAGGAA (+108) GAGGAA (+18) TTCCTC (-134)	TdT	PLAQUETAS/MEGACARIOCITOS ENDOTELIO LEUCOCITOS

En el promotor de PECAM-1 también existen secuencias consenso para factores de transcripción implicados en la diferenciación hematopoyética, pudiendo contribuir a la regulación de PECAM-1 en este linaje. La mayoría de los promotores de genes cuya expresión está limitada a células de la vasculatura contienen uno ó más elementos *ets* o GATA. Muchos de estos genes al igual que PECAM-1 se expresan constitutivamente y carecen de una caja TATA típica de los promotores inducibles por citoquinas. Se han identificado elementos GATA funcionalmente activos en el promotor de una gran número de genes que se expresan constitutivamente en la vasculatura como se puede apreciar en la **Tabla 4.1**. Estudios *in vitro* han demostrado que dichas cajas GATA pueden servir como sitios de reconocimiento para factores de transcripción en condiciones basales y, que en algunos casos estas proteínas que se unen a las cajas GATA pueden inhibir la transcripción mediante inhibición de la formación del complejo de preiniciación (Prandini *et. al.*, 1988). Dentro de los 720 primeros nucleótidos de PECAM-1 anteriores al inicio de la traducción de la proteína se han identificado cuatro secuencias consenso GATA que podrían ser necesarias para la actividad transcripcional de PECAM-1 (Martin *et. al.*, 1990; Orkin *et.al.*, 1992; Martin *et. al.*, 1993; Weiss *et. al.*, 1995).

Se han identificado elementos GATA dentro del promotor de un gran número de genes que constitutivamente se expresan en vasculatura y que al igual que PECAM-1, todos carecen de caja TATA como es el factor plaquetario 4 de rata (rPF4), GPIIb humano, y GPIX humano (**Tabla 4.1**). Es curioso cómo estos genes, de forma similar a PECAM-1, presentan un elemento GATA localizado a unos 30 pb por encima del inicio de la transcripción, que es funcionalmente importante para una óptima transcripción basal en estos genes. Es importante destacar la existencia de dos elementos GATA en las posiciones -589 y -613 distanciados entre sí 24 pb y en orientación transcripcionalmente invertida. Una distribución similar de dos elementos GATA se han encontrado en otros promotores. Concretamente, existen dos elementos GATA importantes en la inducción de la transcripción de VCAM-1 por TNF- α (TTATCTTTCCAGTAAAGATAG) (Andrew *et. al.*, 1992). Estos elementos GATA se encuentran distanciados 20 pb entre sí y en orientación transcripcionalmente opuesta, como es el caso de PECAM-1. Otro ejemplo ilustrativo de esta distribución característica de los sitios GATA se ha descrito en el promotor de la γ -globina (CAGATATTTGCATTGAGATAGT) (Tsai *et. al.*, 1989). Incluso el promotor del gen GATA-1 cuenta también, con estos 2 elementos en este caso, separados entre sí 5 pb (CTGATAAGACTTATCTG) (Tsai *et. al.*, 1991).

Es conocida la interacción de la familia de factores de transcripción GATA con otros factores transactivadores. En el caso del promotor de VCAM-1, los factores de transcripción que se unen a sitios GATA y los factores que reconocen el sitio NF κ B parece que interaccionan para generar una respuesta completa de VCAM-1 a citoquinas inflamatorias. Es muy posible, que estos dos elementos GATA contiguos localizados en PECAM-1 jueguen un papel importante en la regulación transcripcional de PECAM-1 mediada por citoquinas

inflamatorias. Un dato que apoyaría esta afirmación es el hecho que tratamientos de la construcción completa de PECAM-1, pCD31-1.42-LUC con TNF- α induce la transcripción de PECAM-1 en los transfectantes estables de U-937 (**Figura 3.22**). El elemento GATA localizado a unas 30 pb por encima del inicio de la transcripción +301 posiblemente juegue un papel fundamental en la transcripción basal de PECAM-1, si tenemos en cuenta que este inicio de la transcripción es principalmente activo en células endoteliales, donde la expresión de PECAM-1 es constitutivamente muy elevada. Experimentos de retardo en gel, así como transfecciones transitorias con construcciones mutadas puntualmente en estos elementos nos permitirán conocer el papel que GATA juega en la regulación de PECAM-1.

A lo largo de todo el promotor de PECAM-1, se han identificado secuencias de reconocimiento para elementos de respuesta a *shear stress* (SSRE) inducibles por fuerzas mecánicas. El flujo sanguíneo en su paso a través del sistema circulatorio genera fuerzas mecánicas que actúan sobre los vasos sanguíneos modulando la función y la estructura intrínseca de los mismos (Fangos *et. al.*, 1993; Resnick *et. al.*, 1995). Estas fuerzas hemodinámicas incluyen presión hidrostática así como fuerzas pulsátiles y de fricción sobre la pared de los vasos, constituyendo estímulos fisiológicos que además de los estímulos químicos conocidos, pueden provocar respuestas biológicas importantes en las células que componen la pared de los vasos sanguíneos. Así, en células endoteliales en cultivo expuestas a fuerzas hemodinámicas *in vitro* se han observado cambios en la morfología celular, estados de crecimiento y la producción de secreciones de varias moléculas efectoras (Caro *et. al.*, 1971; Nerem *et. al.*, 1981; Bussolari *et. al.*, 1982; Ku *et. al.*, 1985; Langille *et. al.*, 1986; Asakura *et. al.*, 1990). Muchos de estos cambios dependen bien directa o indirectamente de la expresión génica. Resnik *et. al.* (1992) demostraron que fuerzas mecánicas, aplicadas sobre células de la vasculatura endotelial pueden regular la expresión génica a nivel transcripcional. En la **Tabla 4.2** se muestran SSRE encontrados en los promotores de genes que son regulados por *shear stress*. Curiosamente, miembros de la familia de moléculas de adhesión como ICAM-1 que contienen en su promotor regiones con SSRE son regulados positivamente, habiéndose detectado un incremento de los niveles de proteína y ARNm en células endoteliales de la vasculatura humana en cultivo sometidos a *shear stress*. Por el contrario, otras moléculas de adhesión expresadas en endotelio como son E-selectina y VCAM-1 que no son reguladas por una exposición a *shear stress* (White *et. al.*, 1983) no presentan elementos de respuesta a SSRE en el promotor (Diamond *et. al.*, 1990; Davies *et. al.*, 1995). Estos datos sugieren una regulación selectiva de las moléculas de adhesión endotelial por *shear stress* que se correlaciona con la presencia o ausencia de elementos SSRE. PECAM-1 es una molécula de adhesión endotelial en cuyo promotor se han encontrado elementos SSRE y curiosamente, todos los tipos celulares que expresan PECAM-1 están sujetos a fuerzas hemodinámicas por flujo sanguíneo *in vivo* sugiriendo por tanto, que los elementos de respuesta a *shear stress* encontrados en PECAM-1 pudieran jugar un papel importante en la regulación de la transcripción de PECAM-1, aunque por el momento desconocemos qué condiciones de estrés

mecánico pudieran influir en la expresión de PECAM-1 en células endoteliales sujetas continuamente a estas fuerzas hemodinámicas.

TABLA 4.3.- Genes endoteliales que tienen elementos SSRE en su promotor.

GEN	ESPECIE	LOCALIZACIÓN	SECUENCIA	REFERENCIAS
PDGF-B	humano	-125	GAGACC	Pech <i>et. al.</i> 1989
	gato	-125	GAGACC	V der Ouweland <i>et. al.</i> 1986
	ratón	-125	GAGACC	Bonthron <i>et. al.</i> 1991
tPA	humano	-345	GAGACC	Feng <i>et. al.</i> 1990
	gato	-252	GAGACC	Feng <i>et. al.</i> 1990
	ratón	-252	GAGACC	Feng <i>et. al.</i> 1990
TGF- β 1	humano	-1219	GGTCTC	Kim <i>et. al.</i> 1989
	ratón	-401	GGTCTC	Geiser <i>et. al.</i> 1991
MCP-1	humano	-202	GGTCTC	Shyy <i>et. al.</i> 1994
		-1919	GAGACC	
Endotelina-1	humano	-236	GGTCTC	Malek <i>et. al.</i> 1993; 1994
ec-NOS	humano	-999	GGTCTC	Nishida <i>et. al.</i> 1992
		-1286	GAGACC	
c-fos	humano	-216	GAGACC	Hsieh <i>et. al.</i> 1993
ICAM-1	humano	-644	GAGACC	Degitz <i>et. al.</i> 1991
PECAM-1	humano	-340	GGTCTC	Almendro <i>et. al.</i> 1996
		-79	GGTCTC	
		+353	GGTCTC	

Los elementos de respuesta a ácido retinoico (AR), han sido implicados en el desarrollo hematopoyético (Orkin *et. al.*, 1992). Curiosamente, se han identificado 5 posibles elementos de respuesta a AR en el promotor de PECAM-1 (Figura 4.2) situados en las posiciones: +401, +119, +133, +187 y -445 que nos indujeron a pensar que el AR pudiera regular transcripcionalmente PECAM-1. Efectivamente, tratamientos de los transfectantes estables de U-937 con este agente inducen notablemente la transcripción de PECAM-1 siendo por tanto

interesante una identificación futura de la mínima región de PECAM-1 capaz de responder a AR.

Ciertos miembros de la familia de proteínas que unen elementos de las cajas HLH conocidas como cajas hélice-vuelta-hélice, se requieren para el desarrollo apropiado de células B y el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (Murre *et. al.*, 1994). Por otra parte, la presencia de una secuencia de octámero imperfecto localizada por debajo de la secuencia del heptámero, como ocurre en PECAM-1, es una característica conservada que se requiere para la actividad específica de tejido en el linaje linfoide de numerosos promotores de las inmunoglobulinas (Poellinger *et. al.*, 1989).

LyF-1 actúa regulando la transcripción de genes cuya expresión está restringida al linaje linfoide (Lo *et. al.*, 1991). La presencia de estos elementos específicos en el promotor de PECAM-1 estaría de acuerdo con la expresión de PECAM-1 en algunas subpoblaciones de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ (Tanaka *et. al.*, 1992). De todos los factores de transcripción que regulan la expresión de genes en linfocitos Oct-2, *ets-1*, PU-1, HLH o HMG, LyF-1 parece estar más relacionado con los miembros de la familia *ets* por la similitud con la secuencia consenso de unión para estas proteínas. De hecho, el factor de transcripción LyF-1 es capaz de unirse a algunas secuencias *ets-1* y PU-1, en cambio, se ha encontrado que *ets-1* y PU-1 unen únicamente una subpoblación muy restringida de sitios LyF-1 (Lo *et. al.*, 1991), no conociéndose hasta ahora el papel que juega LyF-1 en diferenciación hematopoyética y linfocítica.

La existencia de motivos ubícuos sugieren una regulación transcripcional del gen PECAM-1 por estos elementos reguladores. Existen entre los nucleótidos +200 hasta +229 cuatro secuencias colocadas en tándem de reconocimiento para el factor SRY que pertenecen a la familia de las denominadas HMG-1/-2, sugiriendo que esta región juega un papel importante en la configuración del promotor de PECAM-1 ya que las proteínas HMG son capaces de provocar un plegamiento del ADN permitiendo un ordenamiento óptimo del complejo de proteínas nucleares para que tenga lugar la transcripción (Bianchi *et. al.*, 1995). La cromatina no sólo sirve para empaquetar el ADN en el núcleo, sino que proporciona un mecanismo de control de la accesibilidad de factores de transcripción a las secuencias específicas del ADN, además de potenciar las interacciones entre los elementos reguladores distales (Grunstein *et. al.*, 1990; Wolffe *et. al.*, 1994). Curiosamente, estas secuencias consenso en tándem para las proteínas HMG se localizan en las inmediaciones del foco de transcripción en 3', cuya actividad podría estar regulada mediante procesos de metilación debido a su alto contenido en CG. Está reportado que la cromatina en las isletas CpG difiere del resto de la cromatina en una serie de aspectos como es una reducción en la histona H1 y una ausencia general de nucleosomas (Murre *et. al.*, 1994). van Holde *et. al.* (1987) y Wolffe *et. al.* (1992) demostraron que las proteínas HMG-1/-2 *in vivo*, al igual que las histonas H1 y H5, se unen generalmente a la región contenida entre 2 nucleosomas dentro de la masa de cromatina

eucariótica. Investigaciones recientes han descrito que mientras que H1 es un represor de la transcripción (Zlatanova *et. al.*, 1992), las proteínas HMG-1/-2 como es el caso de SRY, que son factores generales cromatínicos, pueden tanto estimular (Tremethick *et. al.*, 1986, 1988; Watt *et. al.*, 1988; Singh *et. al.*, 1990; Aizawa *et. al.*, 1994; Onate *et. al.*, 1994) como reprimir de forma reversible (Ge *et. al.*, 1994; Seltzer *et. al.*, 1994) la transcripción de la ARN polimerasa II. El mecanismo molecular por el cual estas dos proteínas reprimen o activan la transcripción *in vivo* se desconoce. HMG-1 puede competir con H1 pero no con H5 por la unión *in vitro* sugiriendo que el reemplazamiento de H1 por HMG-1 puede jugar un papel importante en parte de la activación transcripcional de la cromatina por HMG-1 (Varga-Weisz *et. al.*, 1994).

Se han identificado en la secuencia de PECAM-1 elementos de respuesta a procesos en fase aguda, elementos que se han encontrado en genes que codifican para proteínas en fase aguda, tales como los de la α 2-macroglobulina y el kininógeno T, los cuales son inducidos frente a infecciones e inflamaciones (Hattori *et. al.*, 1990; Mann *et. al.*, 1991). En este sentido, nuestros datos indican que la citoquina inflamatoria TNF- α , es capaz de regular la transcripción de PECAM-1. Todos estos procesos inflamatorios se relacionan con el reclutamiento de macrófagos a los sitios donde se ha realizado el daño tisular y si tenemos en cuenta que PECAM-1 está implicado en la migración transendotelial de los monocitos, podríamos especular que la expresión de PECAM-1 en células endoteliales y monocitos podría estar regulada por estos elementos de respuesta en fase aguda.

La presencia de un motivo de respuesta a glucocorticoides, TGTTCT, sugiere que la expresión de PECAM-1 también podría estar regulada por hormonas esteroideas durante los procesos inflamatorios. Especialmente interesante es la existencia de tres regiones en las que aparecen agrupadas secuencias consenso para NF-IL6 y NF- κ B, presentes en numerosos genes relacionados con respuesta inmune e inflamatoria (Kishimoto *et. al.*, 1994). Estas secuencias parecen ser funcionales tal y como se ha demostrado por estudios de cotransfección en los genes de IL-8 (Kunsch *et. al.*, 1994) e IL-6 (Matsusaka *et. al.*, 1993). Dentro de la secuencia del promotor de PECAM-1 hay que destacar también la presencia de una secuencia de reconocimiento para el factor de transcripción YY1 en la posición -193 situado en la proximidad a un sitio GATA (-203) y una secuencia CCACC (-267). Una agrupación similar de estos factores de transcripción se ha descrito dentro de una región silenciadora del gen de la ϵ -globina humana, donde tanto GATA como YY1 actúan como represores de la expresión del gen de la ϵ -globina humana durante el desarrollo (Raich *et. al.*, 1995). Puesto que YY1 es un factor de transcripción multifuncional que puede actuar como un represor de la transcripción de genes de numerosos mamíferos, la existencia de estos elementos de regulación en el promotor de PECAM-1, podría contribuir de alguna manera a regular la actividad transcripcional diferencial entre las distintas líneas celulares. De hecho, en experimentos de transfección transitoria, la construcción de CD31-0.66-LUC que carece de estos tres

elementos YYI, CCAC y GATA muestra una actividad notoriamente mayor que la construcción completa CD31-1.42-LUC.

En el gen de PECAM-1 destaca la presencia de una secuencia Alu entre -242 y -571 pb por delante de los dos focos principales de inicio de la transcripción, respectivamente. Las repeticiones Alu humanas pertenecen a una familia de secuencias que son exclusivas de primates y que son relativamente abundantes en el genoma humano donde aparecen más de 500.000 copias de estos elementos separados entre sí por un promedio de 5 Kb aunque también pueden aparecer agrupados (Batzer *et. al.*, 1990). El nombre de las secuencias Alu deriva del hecho de que la mayoría de estas secuencias contienen un sitio de restricción único para el enzima de restricción *AluI* cercano a la mitad de la totalidad de la secuencia Alu. En el genoma humano existen casi 10^6 de secuencias Alu, constituyendo entre el 3-6% del ADN celular total. Esto significa que de cada 5 Kb hay una gran probabilidad de encontrar una secuencia Alu. Estas secuencias tienen unas 300 pb de longitud y se componen de dos unidades dispuestas en tándem flanqueadas por cortas repeticiones directas generadas durante el proceso de inserción en el ADN cromosómico. Se supone que los elementos Alu se movilizan por mecanismos dependientes de la ARN polimerasa III y se ha comprobado que algunas familias de estas secuencias Alu son transcripcionalmente activas, lo que indica que los procesos de movilización/inserción pueden estar todavía teniendo lugar en la actualidad. Estas pequeñas repeticiones polimórficas interpuestas ubicuamente en el genoma se han encontrado también en la región 5' flanqueante de unidades reguladoras de la transcripción (Nueda *et. al.*, 1993; López-Cabrera *et. al.*, 1993; Shelley *et. al.*, 1991; Assouline *et. al.*, 1988; Wang *et. al.*, 1995; Bennett *et. al.*, 1995; Brini *et. al.*, 1993). Esto refuerza la idea de que el promotor de PECAM-1 estaría contenido entre la secuencia Alu y el inicio de la transcripción. Se han identificado secuencias Alu colocadas de forma similar, en el promotor de otros genes expresados en células hematopoyéticas tales como CD11a, CD11b y CD11c (Nueda *et. al.*, 1993; López-Cabrera *et. al.*, 1993; Shelley *et. al.*, 1991) o en células endoteliales como el promotor del factor de Von Willebrand (Assouline *et. al.*, 1988). Aún cuando el papel que juegan estas secuencias Alu en el promotor no se conoce, algunos investigadores han postulado su implicación en la regulación transcripcional de células hematopoyéticas (Brini *et. al.*, 1993). Curiosamente, en la región Alu de PECAM-1 se identifican secuencias consenso tales como NFκB, SSRE, Sp1/AP2 que en otras moléculas de adhesión descritas como ICAM-1, VCAM-1 o ELAM-1 son secuencias transcripcionalmente muy relevantes, lo que implicaría que estas secuencias Alu podrían estar contribuyendo a aumentar las posibilidades de control transcripcional del promotor de PECAM-1. Está descrito que secuencias Alu intervienen en la regulación específica de tejido de genes como el receptor del fragmento Fc y el receptor para el antígeno en las células T (Brini *et. al.*, 1993), demostrándose la presencia de secuencias de unión para factores de transcripción reguladoras en las repeticiones Alu del gen CD8α, expresado específicamente en células T (Hambor *et. al.*, 1993).

4.4.- IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PKC EN LA REGULACIÓN DE PECAM-1 EN CÉLULAS MONOCÍTICAS.

Los niveles de PECAM-1 están incrementados durante la diferenciación *in vitro* de monocitos a macrófagos y durante la diferenciación macrofágica inducida en HL-60 y U-937 con ésteres de forbol. Esto está de acuerdo con la expresión de PECAM-1 sobre macrófagos tisulares (Cabañas *et. al.*, 1989). Se sabe que la actividad de la proteína quinasa C (PKC) está implicada en el control del crecimiento y la diferenciación de numerosos tipos celulares (Nishizuka *et. al.*, 1992), incluyendo líneas macrofágicas (Whetton *et. al.*, 1994). En este sentido, la línea monocítica leucémica U-937 ha sido ampliamente utilizada en nuestro laboratorio, como modelo de estudio de diferenciación hacia el fenotipo macrofágico tras la exposición a ésteres de forbol, los cuales, son capaces de unir y activar PKC (Harris *et. al.*, 1985). Por otro lado, la activación de PKC en condiciones fisiológicas está mediada por los diacilgliceroles (DAG) generados por la hidrólisis de los fosfoinosítidos catalizada por la fosfolipasa C. Tanto los ésteres de forbol como los análogos sintéticos de DAG fueron capaces de inducir la expresión de PECAM-1 en células monocíticas indicando que la actividad PKC era la responsable del incremento de la expresión de este antígeno de superficie celular (**Figura 3.12A**). Curiosamente, PECAM-1 sufre una fosforilación en sus residuos citoplásmicos de residuos serina y treonina (Ser/Thr) por PKC, una vez tiene lugar la activación celular, y esta fosforilación regula la asociación con el citoesqueleto, así como las propiedades adhesivas de PECAM-1 (Lastres *et. al.*, 1994; Newman *et. al.*, 1992; Zehnder *et. al.*, 1992).

El análisis del posible mecanismo de inducción en células U-937 tratadas con PMA reveló una correlación entre el incremento de la expresión en superficie de PECAM-1 y el aumento de los transcritos específicos de PECAM-1 (**Figura 3.12A,B**). Este aumento de los niveles de ARNm y de la proteína son el resultado de una activación transcripcional por los ésteres de forbol, como indican los resultados de transfección transitoria con U-937, así como de un aumento de la estabilidad del ARNm (Bellón, tesis doctoral. 1991). La utilización del transfectante estable de la línea monocítica U-937 conteniendo el fragmento *Sma/PstI* de la zona promotora 5' de PECAM-1, ha confirmado la capacidad de inducción por PMA en procesos de diferenciación de este promotor, lo que estaba de acuerdo con los resultados obtenidos con transfecciones transitorias (**Figura 3.13**). Además, los ésteres de forbol, conocidos activadores de PKC, son capaces de incrementar la actividad promotora de PECAM-1, sugiriendo la implicación de esta actividad enzimática en la transcripción del gen de PECAM-1. Tratamientos con PMA en experimentos de transfección transitoria de células monocíticas U-937 han permitido identificar el fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglII* como el fragmento mínimo que proporciona una contribución mayoritaria a la regulación transcripcional de PECAM-1 (**Figura 3.14**). En cambio, el fragmento de 0.25 Kb *NotI/PstI*, que carece en su secuencia de elementos de respuesta a PMA y presenta una elevada contribución a la actividad transcripcional basal de PECAM-1, no responde al tratamiento con PMA. Dentro del fragmento de 0.22Kb *NheI/BglII* de PECAM-1 se han identificado tres

elementos que responden a ésteres de forbol como son EGR-1, AP2 y Sp1 (Cao *et. al.*, 1993; Williams *et. al.*, 1993) como posibles elementos de respuesta a los ésteres de forbol. De estos tres elementos, la secuencia solapante Sp1/EGR-1, pero no la de AP-2, ha sido identificada como elemento que responde a ésteres de forbol en experimentos de retardo en gel, sugiriendo su implicación en la activación de la transcripción por PMA del promotor de PECAM-1. Se sabe que el PMA, induce la expresión de EGR-1 en células del linaje mieloide (Kharbanda *et. al.*, 1991, 1994; Nguyen *et. al.*, 1993) y resulta curioso que EGR-1 sea esencial para la diferenciación macrofágica (Nguyen *et. al.*, 1993). Estos datos están de acuerdo con la actividad transcripcional específica mieloide encontrada en el fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglII*. El tratamiento de las células con ésteres de forbol, un activador de PKC, o ácido okadaico, un inhibidor de proteínas fosfatasa de serinas y treoninas, también inducen la unión de EGR-1 a sus secuencias consenso, lo que está de acuerdo con la hipótesis propuesta por otros autores de que la expresión de EGR-1 en las células está regulada por acciones opuestas entre proteínas quinasas y proteínas fosfatasas (Cao *et. al.*, 1992). Se ha estudiado el mecanismo por el cual el PMA induce la actividad del promotor de PECAM-1 en células U-937 para poder identificar los factores de transcripción que intervienen en la expresión de esta proteína por PMA. En el presente estudio, hemos demostrado que la unión de EGR-1 y Sp1 a la secuencia consenso encontrada en PECAM-1 se induce en respuesta a PMA (**Figura 3.15**).

Los experimentos descritos, constituyen la primera evidencia que implican a EGR-1 en la activación transcripcional del gen PECAM-1, aumentando por tanto la lista de genes que son regulados por EGR-1 que incluyen los de la timidina kinasa de ratón (Molnar *et. al.*, 1994), adenosina deaminasa (Ackerman *et. al.*, 1991), genes acetil colinesterasa (Li *et. al.*, 1993), la cadena pesada de la α -miosina cardíaca de ratón (Gupta *et. al.*, 1991), feniletanolamina N-metil transferasa (Ebert *et. al.*, 1994), PDGF-A (Wang *et. al.*, 1992), TGF- β 1 e IL-3 (Koyano-Nakagawa *et. al.*, 1994). EGR-1 puede activar o reprimir estos promotores aunque este efecto depende del tipo celular y del contexto del promotor (ICAM-1, CD44 y MDR-1).

La activación transcripcional mediada por EGR-1 pudiera ser un elemento común que integrara el daño tisular con un patrón específico de regulación de la expresión génica. El reconocimiento de posibles secuencias nucleotídicas por EGR-1 aparece en el promotor de un número importante de genes patofisiológicos de inducción rápida como son TGF- β 1 (Kim *et. al.*, 1989), el factor tisular (TF) (Mackman *et. al.*, 1995), el activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA) (Verde *et. al.*, 1988), PDGF-A (Khachigian *et. al.*, 1995), PDGF-B (Khachigian *et. al.*, 1996) así como el propio EGR-1 (Cao *et. al.*, 1993). En todos estos casos, las regiones que responden a PMA en estos promotores cuentan con elementos que pueden interactuar específicamente con ambos factores EGR-1 y Sp1.

4.5.- c-Myc COMO MEDIADOR DE LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1.

En el promotor de PECAM-1, se han identificado dos elementos b-HLH-Lz contiguos. Dada la relevancia que algunos factores de transcripción b-HLH-Lz tienen en la progresión y proliferación del ciclo celular, era interesante analizar el papel que USF y c-Myc juegan sobre el promotor de PECAM-1.

Las proteínas de unión a ADN conocidas como HLH básicas (b-HLH) son factores de transcripción que reconocen específicamente la secuencia CANNTG a través de la región básica y que bien homodimerizan o heterodimerizan a través de su dominio HLH (Murre *et. al.*, 1994). Una subclase de las proteínas bHLH son las b-HLH-Lz que contienen además, una cremallera de leucinas (Lz) y que incluyen factores de transcripción tales como la familia Myc (Myc, Max, Mad, Mxi), TFE 3, TFE-B y E-box y USF (factor que se une al iniciador) (Murre *et. al.*, 1994). Estos factores de transcripción b-HLH-Lz participan en la expresión específica de tejido y en la regulación de la expresión durante el desarrollo de numerosos genes (Murre *et. al.*, 1994). Estos factores reconocen elementos comunes de ADN aunque USF reconoce también secuencias iniciadoras (Roy *et. al.*, 1991; Murre *et. al.*, 1994). Además de las propiedades transactivadoras, Myc también reconoce sitios C/EBP (Mink *et. al.*, 1996) y también puede inhibir la actividad transcripcional dependiente de USF mediada por el iniciador (Du *et. al.*, 1993; Li *et. al.*, 1994; Lee *et. al.*, 1996).

En el presente trabajo, hemos identificado y caracterizado el efecto inhibitorio que la expresión de c-Myc ejerce sobre la actividad promotora de PECAM-1, localizando la región de respuesta a c-Myc dentro del fragmento de 0.66 Kb *NheI/PstI*. La cotransfección de vectores de expresión de c-Myc con vectores reporteros conteniendo el fragmento *NheI/PstI* de 0.66 Kb del promotor de PECAM-1 en distintas líneas celulares, nos ha permitido estudiar el efecto que ejerce c-Myc sobre la transcripción de PECAM-1. La sobreexpresión de c-Myc en células HeLa, transfectadas transitoriamente con la construcción de 0.66 Kb de PECAM-1, redujo la capacidad transcripcional basal de PECAM-1 a la mitad (**Figura 3.17**). Este efecto inhibitorio se ha comprobado mediante experimentos de cotransfección utilizando la línea K562 establemente transfectada con el gen inducible *c-myc*. Futuros estudios con geles de retardo, así como deleciones y mutaciones puntuales nos permitirán localizar los elementos que participan en la inhibición de la transcripción del promotor PECAM-1 mediada por c-Myc dentro de la construcción pCD31-0.66-LUC. Estudios anteriores sobre la inhibición ejercida por c-Myc sobre otras regiones reguladoras, han demostrado la implicación de secuencias iniciadoras (Li *et. al.*, 1994; Du *et. al.*, 1993; Phillip *et. al.*, 1994; Lee *et. al.*, 1996). Los sitios de unión de USF han demostrado ser elementos que contribuyen positivamente a la regulación de numerosos genes (Gregor *et. al.*, 1990) e incluso que contribuyen a la especificidad de tejido de los mismos o a la regulación de la expresión de estos genes durante el desarrollo (Gregor *et. al.*, 1990; Cogswell *et. al.*, 1995). Se ha encontrado una contribución positiva de

USF sobre el promotor de PECAM-1 en experimentos de transactivación en células HeLa, donde la transfección de un plásmido de expresión de USF1 (pCX-USF) produjo un incremento del 80% de la actividad promotora basal de PECAM-1. Este resultado nos indica que USF se une a un elemento HLH en la secuencia de PECAM-1 contribuyendo fuertemente a la activación transcripcional de PECAM-1. Tanto USF como c-Myc reconocen elementos comunes del ADN (Murre *et. al.*, 1994; Li *et. al.*, 1994) y es conocida la capacidad de USF para unirse a elementos iniciadores, así como la capacidad de c-Myc de inhibir la activación transcripcional dependiente de USF (Roy *et. al.*, 1991; Du *et. al.*, 1993; Li *et. al.*, 1994). Dado que c-Myc ejerce un efecto negativo en la expresión de PECAM-1 sería muy interesante estudiar si la inhibición global ejercida por c-Myc es dependiente de la secuencia iniciadora, tal como se ha descrito en otros genes (Li *et. al.*, 1994; Philip *et. al.*, 1994; Lee *et. al.*, 1996). El efecto inhibitorio de c-Myc está de acuerdo con una expresión de PECAM-1 aumentada en células con un potencial proliferativo menor y en las últimas etapas de la diferenciación terminal. Esta inhibición transcripcional de PECAM-1 también ha sido descrita en genes de otras moléculas de adhesión como son las integrinas leucocitarias CD11a y CD11c, sugiriendo que c-Myc ejerce un papel importante en el acoplamiento de la transcripción de estas moléculas de adhesión en función de su estado proliferativo. El sistema celular U-937 ha sido ampliamente utilizado como modelo de diferenciación mieloide mediante el tratamiento con PMA. Junto con esta inducción de la diferenciación se produce un aumento de las actividades promotoras de PECAM-1, así como de CD11a y CD11c, en paralelo con una disminución en los niveles de c-Myc. Probablemente, la disminución de los niveles de c-Myc permite que los factores inducidos durante la diferenciación mieloide transactiven tanto PECAM-1 como CD11a y CD11c. Transfecciones transitorias sobre la línea U-937 demuestran que el tratamiento con PMA provoca un aumento en la actividad de los promotores PECAM-1, CD11a y CD11c, lo que estaría de acuerdo con el modelo descrito.

4.6.- PAPEL DE NFκB EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1. REGULACIÓN DE PECAM-1 POR CITOQUINAS INFLAMATORIAS (TNF-α).

NFκB fue descrito inicialmente, como una proteína que unía la secuencia GGGACTTCC de la región amplificadora de la cadena ligera del gen de la Igκ, regulando su actividad en células B (Sen *et. al.*, 1986). Desde entonces, NFκB se ha asociado con la transcripción de una gran cantidad de citoquinas, así como de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria como son CD69, ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1. Está descrito que las citoquinas TNF-α, IL-1 o IFN-γ inducen la activación de factores de transcripción de la familia κB en una gran variedad de tipos celulares (Sen *et. al.*, 1986; Osborn *et. al.*, 1989; Lowenstein *et. al.*, 1993). Entre los genes en los que NFκB juega un papel regulador fundamental de la transcripción destacan: IL-1 (Hoyos *et. al.*, 1989), IL-2Rα (Leung *et. al.*, 1988), IFN-β (Lenardo *et. al.*, 1989), IL-6 (Lieberman *et. al.*, 1990; Shimizu *et. al.*, 1990; Zhang *et. al.*,

1990), GM-CSF (Schreck *et. al.*, 1990), TNF- α (Collart *et. al.*, 1990), IL-8 (Mukaida *et. al.*, 1990), angiotensina (Ron *et. al.*, 1990), MHC clase I (Baldwin *et. al.*, 1988) y clase II (Blonar *et. al.*, 1989) y el gen de la citoquina estimuladora del crecimiento de melanomas (gro humana) (Anisowicz *et. al.*, 1991).

El tratamiento de los transfectantes estables de PECAM-1 en U-937 con TNF- α , demuestra que PECAM-1 está regulado transcripcionalmente por esta citoquina inflamatoria resultando ser ésta una regulación positiva que induce la actividad transcripcional basal de PECAM-1 en esta línea celular (Figura 3.22). Además, esta regulación positiva de la transcripción de PECAM-1 por citoquinas inflamatorias está mediada por la activación de NF κ B. Esta afirmación esta apoyada en los siguientes resultados experimentales:

En primer lugar, experimentos de retardo en gel utilizando como sonda el fragmento de 185 pb *BglII/NotI*, que contiene dos sitios consenso para NF κ B, demuestran que existe una proteína nuclear inducida en los extractos nucleares de células U-937 tratadas con PMA o TNF- α que se une a este fragmento formando un complejo retardado ADN-proteína (Figura 3.18). En segundo lugar, la formación de este complejo pudo ser competida con un exceso del fragmento de 185 pb no marcado así como con un exceso de un oligonucleótido de doble cadena que contiene el sitio NF κ B localizado en las posiciones +102/+119 de PECAM-1. Como control, las secuencias no relacionadas con la familia κ B como son (*Heat Shock Protein*) HSP y AP-1, no fueron capaces de competir con la sonda por la unión al ADN, demostrando así que tanto TNF- α como PMA activan y movilizan NF κ B de PECAM-1 en las líneas celulares estudiadas (Jurkat, HL-60 y K562). Además, hemos identificado el heterodímero p50/p65 como el responsable de la interacción con la región κ B de PECAM-1 en células U-937, mediante análisis por geles de retardo utilizando anticuerpos específicos frente a las subunidades p50, p65 y c-Rel.

El grupo de Bauerle describió en 1992 cómo concentraciones μ M de PDTC, un derivado de los carbamatos, era capaz de suprimir reversiblemente la liberación de la subunidad inhibidora I κ B (responsable de mantener en estado inactivo al NF κ B del citoplasma de las células), cuando las células eran tratadas con PMA, IL-1 o TNF- α . En este sentido, otra evidencia que constata la especificidad de la unión del factor NF κ B al promotor de PECAM-1, es la inhibición de su complejo retardado ADN-proteína en extractos de células Jurkat, K562, U-937 o HL-60 cuando, previo al tratamiento con PMA, las células se trataron con el inhibidor PDTC específico de NF κ B (Figura 3.19).

Experimentos de cotransfección realizados con la construcción pCD31-0.66-LUC de PECAM-1, y un vector de expresión para la subunidad p65 (RelA) mostraron que PECAM-1 es transactivado por p65 en células K562. En cambio, el efecto ejercido por la sobreexpresión de la subunidad p65 en células Jurkat o HL-60 produjo un efecto inhibitorio sobre la

transcripción basal de PECAM-1 (Figura 3.20). En su conjunto todos estos datos sugieren que NF κ B modula la transcripción de PECAM-1 inducida por el tratamiento con TNF- α así como con PMA. Concretamente, la movilización y activación del heterodímero p50/p65 es el que aparentemente regula la transcripción de PECAM-1 (Figura 3.21).

Los resultados obtenidos en los experimentos de sobreexpresión de la subunidad p65, muestran un efecto distinto dependiendo del tipo celular. En concreto, merece especial atención el efecto inhibitor sobre la transcripción basal encontrado en las células Jurkat y HL-60. Aunque nuestros estudios se han centrado sobre el sitio consenso NF κ B de la posición +102/+119, también existen otros sitios consenso a lo largo del promotor que podrían influir en la regulación global de la transcripción de PECAM-1. En este sentido, el análisis de los promotores de otras moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 o E-selectina muestra en todos ellos, múltiples elementos NF κ B, y se ha demostrado cómo la totalidad de estos elementos deben interaccionar cooperativamente para inducir la transcripción del gen de una forma óptima (Whelan *et al.*, 1991; Schindler *et al.*, 1994; Whitley *et al.*, 1994; Parry *et al.*, 1994; Mansky *et al.*, 1994). Estos mismos autores han demostrado que la supresión de alguno de estos elementos, produce una reducción en la capacidad de activar la transcripción génica por citoquinas inflamatorias. A este respecto, es necesario hacer notar que los ensayos de sobreexpresión de la subunidad p65 se han realizado en la construcción p-CD31-0.66-LUC, la cual, únicamente contiene dos de los tres elementos NF κ B presentes en el promotor de PECAM-1. Por otro lado, se ha demostrado además, la necesidad de una cooperación sinérgica entre distintos factores de transcripción mediante mecanismos de asociación proteína-proteína que posibilitan la transactivación de los genes estudiados. Así, es imprescindible para la expresión de VCAM-1 inducida por TNF- α una asociación directa entre los factores IRF-1 y NF κ B (Neish *et al.*, 1995), así como de NF κ B con Sp1 (Perkins *et al.*, 1993) para activar la transcripción de VCAM-1. De forma similar, ICAM-1 requiere de la interacción entre los factores de transcripción NF κ B y C/EBP β (Stein *et al.*, 1993) para ejercer un efecto transactivador. En PECAM-1 existen dos elementos de unión para C/EBP pero estos, se encuentran ausentes en la construcción pCD31-0.66-LUC. Es probable entonces, que para poder activar la transcripción de PECAM-1 sea necesaria esa interacción sinérgica entre los factores C/EBP y NF κ B. En la construcción de p-CD31-0.66-LUC inmediatamente por encima de los dos NF κ B descritos, existe una secuencia NF-IL6 así como un octámero. Ambas han sido descritas como esenciales para la activación de la transcripción de IL-8 por TNF- α . También en esta construcción se identifican 4 sitios en tándem pertenecientes a la familia de factores HMG que probablemente ejerzan una función de reordenamiento espacial de los elementos funcionalmente importantes de PECAM-1 favoreciendo la interacción de los factores de transcripción con posiciones específicas de la cadena del ADN.

El tratamiento con TNF- α de las células mieloides U-937 produce una reducción de la expresión de PECAM-1 en membrana (Figura 3.22A). Este resultado está corroborado por

datos recientes obtenidos por Rival *et. al.* (1996) en células endoteliales (HUVEC) y por Stewart *et. al.* (1995) en BAEC, HUVEC, y microvasculatura. Anteriormente, Romer *et. al.* (1995) detectaron además una redistribución de PECAM-1 en la superficie celular, inducida por TNF- α , que iba acompañada de la desaparición de las uniones intercelulares característica de PECAM-1 en células endoteliales. En estos casos, no se encontró inhibición de la transcripción por TNF- α en células endoteliales, mientras que en células hematopoyéticas se encontró un incremento de la actividad transcripcional de PECAM-1. Esta aparente contradicción entre la disminución de PECAM-1 en la membrana y la ausencia de cambio o aumento de la actividad transcripcional de su promotor merece ser comentada. El tratamiento con TNF- α no afecta a los niveles de ARNm de PECAM-1 (Romer *et. al.*, 1995; Rival *et. al.*, 1996) y por tanto, es probable que esta citoquina ejerza un efecto desestabilizador del ARNm sintetizado, es decir, induzca su degradación. Nuestros datos, están de acuerdo con esta posibilidad, pues TNF- α activa la transcripción de PECAM-1 en U-937. En apoyo de esta hipótesis se encuentra el hecho de que el tratamiento conjunto de TNF- α e IFN- γ de células endoteliales (BAEC) produce una fuerte desestabilización del mensajero resultando ser ésta independiente de la síntesis de proteína (Stewart *et. al.*, 1995). Muy pocos son los casos descritos sobre la desestabilización del ARNm por citoquinas inflamatorias. Entre estos, tenemos el gen de la sintetasa del óxido nítrico (Yoshizumi *et. al.*, 1993) y la β -actina de la microvasculatura de células endoteliales (Khono *et. al.*, 1993). Ambos genes, al igual que PECAM-1, son constitutivos de células endoteliales, pero a diferencia de lo que ocurre en PECAM-1, la desestabilización del mensajero inducida por TNF- α es dependiente de la síntesis de proteína. Elementos ricos A-U de la región 3' no traducida de ARNm están implicados en la degradación del ARNm. Estos elementos ricos A-U se unen a factores activadores *en trans* que conducen a la degradación de ARNm. Se han detectado secuencias reguladoras *en cis* de ARNm AUUUA que están conservadas en la región 3' no traducida del ADN bovino de PECAM-1 y que pueden estar implicadas en la desestabilización del ARNm de PECAM-1 por citoquinas. Un mecanismo postulado podría ser una inhibición tónica del elemento rico A-U por una proteína *en trans* que pudiera ser desplazado por un mecanismo señalizador a través de las citoquinas. Otro posible mecanismo pudiera ser la existencia de una proteína citosólica no lábil que se uniera al elemento rico A-U en respuesta a estas citoquinas. Esto podría explicar que aun cuando la actividad transcripcional está aumentada no se modifiquen los niveles de ARNm. Dicho aumento de la actividad transcripcional podría ser debido a que el tratamiento con TNF- α indujera un procesamiento alternativo del ARNm de PECAM-1. En este sentido, se han descrito diversas isoformas alternativas de PECAM-1, incluida una forma soluble (Goldberger *et. al.*, 1994; Kirshbaum *et. al.*, 1994). Además, una inducción selectiva por TNF- α de la transcripción del ARNm que codifica para la isoforma soluble de PECAM-1 podría justificar la inhibición por TNF- α de la expresión de PECAM-1 en la superficie celular. Las citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α o IFN- γ incrementan la expresión de E-selectina, ICAM-1 o VCAM-1 en células endoteliales (Bevilacqua *et. al.*, 1987; Dustin *et. al.*, 1986; Masinovsky *et. al.*, 1990). El tratamiento con TNF- α produce una disminución de los

niveles de PECAM-1 en la superficie celular, por lo que es de interés resaltar la regulación recíproca de los transcritos de moléculas de adhesión ICAM-1/PECAM-1. Un caso similar se ha reportado con CD34, una sialomucina y ligando de L-selectina (Baumhueter *et. al.*, 1993) presente en el endotelio vascular y cuya expresión también está inhibida por citoquinas inflamatorias (Delia *et. al.*, 1993). Al igual que PECAM-1, CD34, se concentra en las uniones intercelulares de las células endoteliales vasculares (Fina *et. al.*, 1990). Dada la implicación de ICAM-1 y PECAM-1 en la regulación de la transmigración de los leucocitos a través del endotelio vascular es muy posible que los niveles de expresión de PECAM-1 sirvan como un mecanismo de regulación de dicha función. La desaparición de PECAM-1 de las uniones intercelulares como consecuencia del tratamiento con TNF- α , va acompañada de una marcada reducción de la migración leucocitaria a través de las células endoteliales, demostrando que PECAM-1 es una diana específica para las citoquinas inflamatorias (Rival *et. al.*, 1996).

4.7.- BASES MOLECULARES DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PECAM-1 POR TGF- β 1.

TGF- β 1 regula la proliferación y diferenciación celular e influye directamente en las respuesta inflamatoria e inmune, en la migración celular y en la producción y degradación de componentes de la matriz extracelular (Massagué *et. al.*, 1987; Sporn *et. al.*, 1987).

Estudios previos en nuestro laboratorio, demostraron que TGF- β 1 regula la función de PECAM-1 aumentando su expresión e induciendo su capacidad adhesiva en células monocíticas (Lastres *et. al.*, 1994). Estos estudios pusieron de manifiesto que TGF- β 1 aumenta tanto la expresión de PECAM-1 en la superficie celular, como sus niveles de ARNm. Además, el tratamiento del transfectante estable de PECAM-1 en U-937 con TGF- β 1, demuestra que esta citoquina regula positivamente la transcripción de PECAM-1 (Figura 3.23).

En el promotor de PECAM-1, se han identificado numerosas secuencias consenso de respuesta a TGF- β (Tabla 4.4 y Figura 3.24) de las cuales, unas corresponden a elementos de respuesta activadora mientras que otras corresponden a elementos de respuesta inhibidora de la transcripción. Esta diversidad funcional encontrada entre los múltiples y distintos elementos de respuesta a TGF- β , nos sugería que muy probablemente, la estimulación /inhibición de la expresión de PECAM-1 por TGF- β 1 pudiera estar mediada por distintos elementos que actúen *en cis* y *en trans* dentro del promotor de PECAM-1. En la Figura 4.3 se representa un esquema de la distribución de los elementos de respuesta a TGF- β 1 encontrados en el promotor de PECAM-1. Curiosamente, se ha descrito que TGF- β ejerce un efecto selectivo sobre las moléculas de adhesión. Gamble *et. al.* (1993) han descrito una inhibición de la expresión de la E-selectina en células endoteliales. Concretamente, se han identificado

TABLA 4.4.- Elementos de respuesta TGF-β1

	SECUENCIA CONSENSO	SECUENCIA DE PECAM-1	POSICIÓN	REFERENCIAS
TIE	GNNTTGGTGA	TATTTGGTTA ATGTTGGTCA GCCTTGGCCT	-610/-600 -354/-345 -310/-300	Kerr <i>et. al.</i> , 1990
TCE	GCGTGGGGA	GCGTGAGCCA TTTTGGGGA GATGGGGGA TGATGGGGGA TGGTGGGTGG TTGTGGGCA	-269/-278 +49/+57 +14/+22 +12/+21 +84/+92 +428/+436	Pietenpol <i>et. al.</i> , 1991
Ig-α	CACAG (G) CCAGAC	CACAGCCGGTC	+346/+357	Lin <i>et. al.</i> , 1991
TAE- α 2(I)	TCG (N) ₅ GCCAAG	TCAAGAACGCCAAG	+169/+182	Rossi <i>et. al.</i> , 1988
NF-1 (3')	. . .GCCATG	GCCACG GCCATG	-748/-743 -583/-578	Ritzenthaler <i>et. al.</i> , 1991

siete elementos inhibidores de la transcripción por TGF- β (TIE) en el promotor de la E-selectina. Estos mismos autores, en cambio, no han detectado cambios significativos en la expresión de ICAM-1 o VCAM-1 en células HUVEC tratadas con TGF- β 1 (Gamble *et. al.*, 1988). Este efecto selectivo que ejerce TGF- β 1 sobre las moléculas de adhesión puede ser importante dado el diferente papel que juegan estas moléculas de adhesión en el endotelio. E-selectina juega un papel fundamental en la captura de los leucocitos que circulan en sangre. ICAM-1 y VCAM-1, por otra parte, interaccionan con integrinas β_2 y $\alpha_4\beta_1$ respectivamente, permitiendo la adhesión de las células donde el flujo sanguíneo es bajo; y PECAM-1 es un elemento imprescindible en el proceso de trans migración celular. Además, se ha visto que TGF- β 1 no inhibe la capacidad de las células HUVEC de permitir la trans migración de las células. Por tanto, es previsible, que en áreas donde la sangre esté estancada, o haya poco flujo sanguíneo el efecto inhibitor de TGF- β 1 no sea significativo.

Experimentos de transfección transitoria en Mv1Lu han mostrado la existencia de una región silenciadora de la expresión de PECAM-1 en respuesta a TGF- β 1 (Figura 3.25). Esta región se ha localizado a los largo del fragmento *NheI/PstI* y dentro de esta región, en el fragmento *NotI/PstI* se detecta la mayor inhibición de la transcripción ejercida por esta citoquina con respecto a la transcripción basal de PECAM-1, llegando incluso a inhibir totalmente la transcripción basal. Este dato, está de acuerdo con la identificación en este fragmento de únicamente elementos de respuesta negativos a TGF- β 1 (Figura 4.3) como son TIE, TCE, Ig- α (Kerr *et. al.*, 1990; Pietenpol *et. al.*, 1991; Lin *et. al.*, 1992). Es de destacar, que este fragmento de 0.25Kb *NotI/PstI* contiene únicamente el foco de inicio de la transcripción en 3', que es utilizado fundamentalmente en la transcripción de PECAM-1 en células endoteliales. No hay que olvidar que es en este foco de la transcripción donde se había sugerido en apartados anteriores una posible regulación de la transcripción por metilación.

Aunque el efecto global que ejerce TGF- β 1 sobre la transcripción de PECAM-1 en el fragmento *BglIII/PstI* es inhibitor (Figura 3.25), se detecta una reducción de un 25% del efecto inhibitor ejercido por TGF- β 1 con respecto al fragmento *NotI/PstI*. Este hecho, estaría de acuerdo con la identificación de un elemento positivo localizado en esta región. Se trata de un elemento activador de la transcripción identificado en el promotor del gen que codifica para la cadena α_2 del colágeno de tipo I [TAE- α_2 (I)] (Rossi *et. al.*, 1988). Además, el fragmento +57/+92, existen tres posibles elementos de respuesta negativa a TGF- β 1 (TCE) (Pietenpol *et. al.*, 1991), que según el resultado obtenido en las transfecciones transitorias pudieran explicar la existencia de una regulación negativa global de la transcripción de PECAM-1 en este fragmento. Además, entre los elementos TCE +14/+22 y +84/+92, se ha localizado un sitio consenso para Fos. Está reportado por Kerr *et. al.* (1990), que la inhibición de la expresión del gen de la transina por TGF- β 1 es mediada por la inducción de Fos y la unión de éste, en un complejo multimérico al elemento de respuesta inhibitor de TGF- β 1. En este sentido, datos aportados por Lastres *et. al.* (1994) en células monocíticas U-937, demuestran que el

tratamiento con TGF- β 1 induce la expresión de Fos y Jun, mientras que inhibe los niveles de c-Myc. Esto sugiere que el efecto ejercido por TGF- β 1 no sólo pudiera deberse a una interacción *en cis* entre regiones del ADN que responden a esta citoquina, sino que la inhibición ejercida por TGF- β 1 pudiera estar mediada por la inducción de Fos y la formación de un complejo proteico multimérico que interaccionara con este elemento inhibidor de la transcripción de PECAM-1.

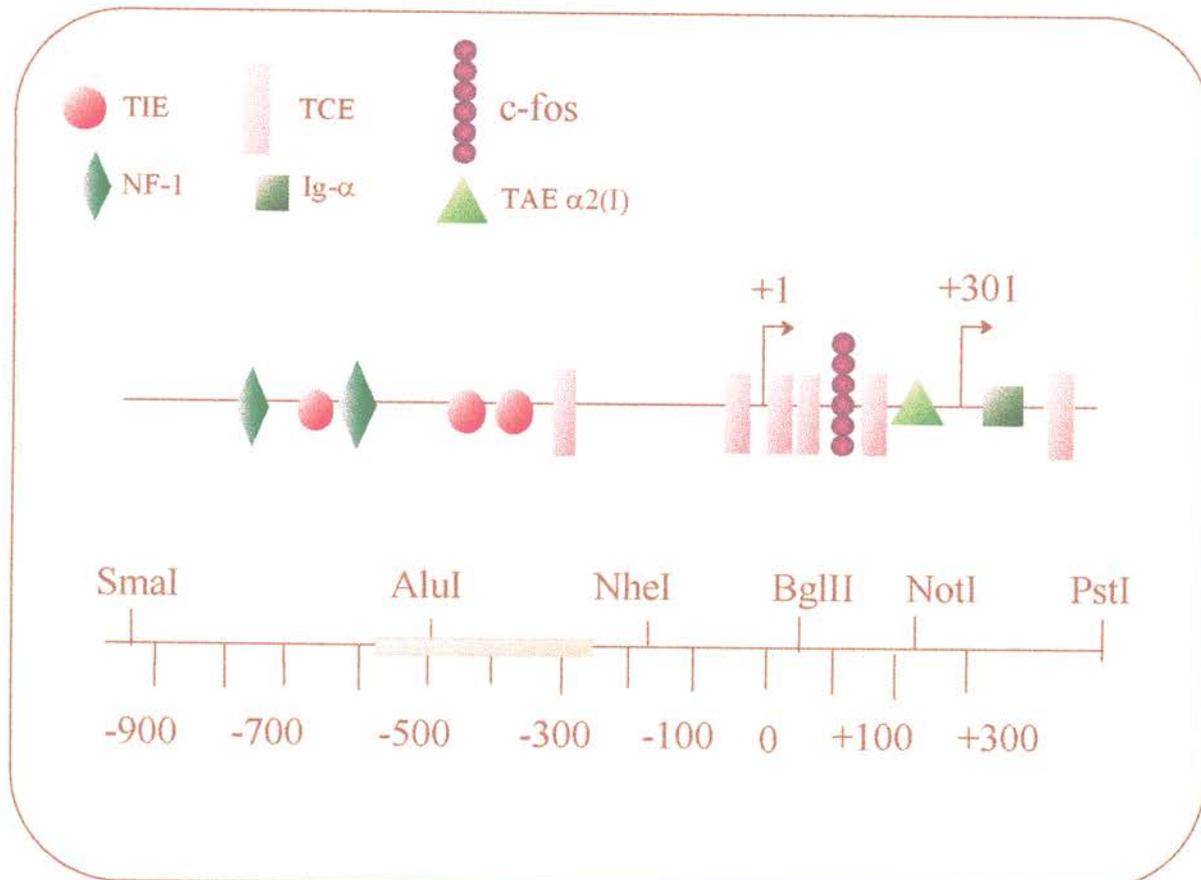


Figura 4.3.- Esquema que representa los elementos de respuesta a TGF- β 1 localizados dentro del fragmento genómico *Smal/PstI* de 1.42 Kb del promotor de PECAM-1. Las flechas, representan los dos focos principales de la transcripción encontrados. La caja de color beige representa la región Alu . Los elementos de respuesta negativa a TGF- β (TIE, TCE, Ig- α) están representados por figuras de distinta tonalidad rojo-rosado. En cambio, los elementos de respuesta positiva a TGF- β (TAE- α 2(I), NF-1) se identifican con tonalidades de color verde.

Se ha descrito que NF-1 juega un papel importante como inductor de la transcripción en numerosos promotores como es el gen de la cadena α 2 del colágeno de tipo I o el gen de la globina. Cordingley *et. al.* (1987) han descrito que la estimulación de la transcripción inducida por esteroides y bajo el control de un promotor vírico es inhibida cuando se elimina la región NF-1 del promotor. Esto sugiere que la interacción entre las secuencias del elemento de respuesta a esteroides y de NF-1 con sus factores de transcripción correspondientes, son necesarias para una inducción óptima de la transcripción (Miksicek *et. al.*, 1987). Este mismo requerimiento podría explicar la fuerte inducción de la transcripción de PECAM-1 por TGF- β 1

obtenida con la construcción completa del promotor pCD31-1.42-LUC y una inhibición de la misma con deleciones consecutivas a partir de esta construcción. Es muy probable, y todos nuestros resultados apuntan en esa dirección, que sea necesaria la presencia simultánea de los elementos NF-1(3') y del elemento TAE- α 2(I) para que TGF- β 1 ejerza un efecto global positivo sobre la transcripción de PECAM-1.

Ristiniemi *et. al.* (1989), aislaron el factor purificado NF-1 y vieron que en muchos aspectos era idéntico a la histona H1. De hecho, la histona H1 es capaz de unirse a la secuencia NF-1 del promotor del gen que codifica para la cadena α 2 del colágeno de tipo I de ratón. Se ha demostrado que NF-1 es capaz de activar la transcripción de algunos genes eucariotas bajo la dirección tanto de promotores celulares como virales. En la cromatina, el ADN genómico está empaquetado en nucleosomas siendo junto con la histona H1, el elemento de unión entre estos nucleosomas. Aunque la función de la histona H1 permanece desconocida, se ha postulado que sea un elemento que empaquete la cromatina en una forma condensada no activa (Reeves *et. al.*, 1984; Butler *et. al.*, 1984; Thomas *et. al.*, 1984; Marion *et. al.*, 1985; Roche *et. al.*, 1985; Jin *et. al.*, 1986), actuando como un represor (Weintraub *et. al.*, 1985). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la cromatina en estado activo contiene menos histonas H1 (Weintraub *et. al.*, 1984; Lennox *et. al.*, 1984). Además, algunos datos sugieren que la estructura del nucleosoma es claramente diferente en áreas transcripcionalmente activas (Prior *et. al.*, 1983). La estructura de la cromatina, podría estar alterada por TGF- β ya que se ha visto que la histona H1 se une a sitios TAE- α 2-TAE(I) y NF1 (Ristiniemi *et. al.*, 1989). La localización de los nucleosomas se ha visto que inhiben la accesibilidad de NF-1 hasta los sitios de unión (Pina *et. al.*, 1990)

Todos estos datos tomados en conjunto, sugieren la posibilidad de una regulación de PECAM-1 mediante 2 tipos de mecanismos distintos: Por un lado la necesidad de la disponibilidad conjunta de NF-1 y TAE- α 2(I) que permitan la regulación transcripcional positiva de PECAM-1, por otro lado, existe la posibilidad de una regulación de la expresión de PECAM-1 por un mecanismo de metilación que implicaría una alteración de la estructura de la cromatina, una diferente localización nucleosómica y una unión de la histona H1 a los sitios NF-1.

5.- CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES:

1.- En PECAM-1 existen dos focos principales de inicio de la transcripción separados entre sí por 300 pb: El foco en 5', localizado dentro del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglII*, y el foco en 3', dentro del fragmento de 0.25 Kb *NotI/PstI*.

2.- El análisis de la región promotora de PECAM-1 ha permitido demostrar que el fragmento de 1.42 Kb *NotI/PstI* puede dirigir la expresión específica de tejido del gen PECAM-1.

3.- La identificación de una secuencia Alu interpuesta entre las posiciones -242 y -571 por delante de los dos focos principales de inicio de la transcripción, refuerza la idea de que el promotor está contenido entre la secuencia Alu y el inicio de la transcripción.

4.- Se ha demostrado una actividad transcripcional específica del fragmento de 0.22 Kb *NheI/BglII* (foco de la transcripción en 5') en linaje hematopoyético mientras que el fragmento de 0.25 Kb (foco de la transcripción en 3') dirige fundamentalmente la transcripción en células endoteliales.

5.- El promotor del gen PECAM-1, es capaz de responder a la activación por ésteres de forbol en condiciones de diferenciación celular. Se ha demostrado la implicación de la actividad PKC en la expresión de PECAM-1 y se ha identificado la región de 0.22 Kb *NheI/BglII* como la principal responsable de la respuesta a PMA. Experimentos de retardo en gel han identificado dos sitios solapantes en la secuencia de PECAM-1: Sp1/Egr-1 como los implicados en la activación transcripcional de PECAM-1 por ésteres de forbol.

6.- Se ha caracterizado el efecto inhibitor que la expresión de c-Myc ejerce sobre la actividad promotora de PECAM-1, localizando la región de respuesta a cMyc dentro del fragmento de 0.66 Kb *NheI/PstI*.

7.- Se han identificado elementos de respuesta a AR en el promotor de PECAM-1, y se ha demostrado una inducción de la actividad transcripcional de PECAM-1 por este agente diferenciador, que demuestran la existencia de una regulación transcripcional de PECAM-1 por AR.

8.- Citoquinas inflamatorias como TNF- α ejercen una regulación positiva sobre la transcripción de PECAM-1 que está mediada por la activación de factores de la familia Rel/NF κ B. Concretamente el heterodímero p50/p65 es el responsable de la interacción con la región κ B.

9.- Se han identificado numerosos elementos de respuesta a TGF- β 1 de los cuales unos corresponden a elementos de respuesta activadora de la transcripción, mientras que otros corresponden a elementos de respuesta inhibidora de la transcripción de PECAM-1. La región *SmaI/PstI* resultó ser la mínima región promotora requerida para detectar un efecto neto positivo ejercido por TGF- β 1 sobre la actividad transcripcional de PECAM-1.

6.- REFERENCIAS

- Ackerman S.L., Minden A.G., Williams G.T., Bobonis C., Yeung C.-Y. 1991. Functional significance of an overlapping consensus binding motif for Sp1 and Zif268 in the murine adenosine deaminase gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7523-7527
- Agura E.D., Howard M. and Collins S. J. 1992. Identification and sequence analysis of the promoter for the Leukocyte Integrin β -Subunit (CD18): A Retinoic Acid-Inducible Gene. *Blood* 79, 3 : 602-609
- Ahmad S., Banville D., Zhao Z., Fischer E.H. and Shen, S.-H. 1993. A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2197-2201
- Aird W.C., Parven J.D., Sharp P. A., Rosenberg R. D. 1994. The interaction of GATA-binding proteins and basal transcription factor with GATA box-containing core promoters. *J. Biol. Chem.* 269: 883
- Aizawa S., Nishino H., Saito K., Kimura K., Shirakawa H., Yoshida M. 1994. Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein. Essential role of the acidic carboxyl-terminal region. *Biochem.* 33, 14690-14695
- Anisowicz A., Messineo M., Lee S.W., Sager R. 1991. An NF κ B-like transcription factor mediates IL-1/TNF- α induction of *gro* in human fibroblasts. *J. Immunology* 147; 520-527
- Albelda S.M., P.D. Oliver, L.H. Romer and C.A. Buck. 1990. EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 110:1227-1237
- Albelda S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M. and Buck, C.A. 1990. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the β_3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 50: 6757-6764
- Albelda S.M., W.A. Muller C.A. Buck and P.J. Newman.1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 114:1059-1068
- Albelda S.M., DeLisser HM., Yan HC., Muller WA., Buck CA., Newman PJ (1992). Multiple binding domains regulate heterophilic binding of the vascular cell-cell adhesion molecule, PECAM-1. *Clin Res*, 40: 355A
- Albelda S.M., C.W. Smith and P.A. Ward. 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8:504-512
- Almendro N., Bellón T., Rius C., Lastres P., Langa C., Corbí A., Bernabéu C. 1996. Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization. *J. Immunology* 157, 5411-5421
- Anderson A.O., Anderson N.D. and White J.D. 1982. Lymphocyte locomotion, lymphatic tissues and lymphocyte circulation in the rat. In "Animal Models of Immunological Processes" (J.B.- Hay De.), pp. 25-95. Academic Press, New York
- Andrew S.N., Williams A.J., Palmer H.J., Whitley M.Z., and Collins T. 1992. Functional analysis of the human Vascular Cell Adhesion Molecule 1 promoter. *J. Exp. Med.* 176: 1583-1593
- Arroyo A.G., Sánchez-Mateos P., Campanero M.R., Martín-Padura I., Dejana E., Sánchez-Madrid F. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the β_1 subunit. *J. Cell Biol.* 117: 659-670
- Asakura T., Karino T. 1990. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ. Res.* 66, 1045-1066
- Ashman L.K. and G.W. Aylett. 1991. Expression of CD31 epitopes on human lymphocytes: CD31 monoclonal antibodies differentiate between naive (CD45 RA+) and memory (CD45 RA-) CD4 positive T cells. *Tissue Antigens* 38:208-212
- Ashman L.K., G.W. Aylett, A.C. Cambareri and S.R. Cole. 1991. Different epitopes of the CD31 antigen identified by monoclonal antibodies: cell type-specific patterns of expression. *Tissue Antigens* 38:199-207
- Assouline Z., Kerbirou-Nabias D., Pietu G., Thomas N., Bahnak B.R., Meyer D. 1988. The human gene for von Willebrand factor: identification of repetitive Alu sequences 5' to the transcription initiation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1159

- Ayalon O.**, H. Sabanai, M-G. Lampugnani, E. Dejana and B. Geiger. 1994. Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 126: 247-258
- Bajt M.L.**, Goodman T. and McGuire S.L. 1995. β_2 (CD18) mutations abolish ligand recognition by I domain integrins LFA-1 (alfaL β_2 , CD11a/CD18) and MAC-1(alfaM β_2 , CD11b/CD18). *J. Biol. Chem.* 270: 94-978
- Baeuerle P.A.** and Henkel T. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141
- Baldwin A.S.**, Sharp P.A. 1988. Two transcription factor NF κ B and H2TF1, interact with a single regulatory sequence in the class I major histocompatibility complex promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 723
- Baldwin H.S.**, H. M. Shen, H-C. Yan, *et. al.* 1994. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 120: 2539-2553
- Barclay A.N.**, Birkeland M.L., Brown M.H., Beyers A.D., Davis S.J., Somoza C. and Williams A.F. 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book, Academic Press, London, 1993
- Barklay A.N.**, Birkeland M.L., Brown M.H., Beyers A.D., Davis S.J., Somoza C. and Williams A.F. 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book, Academic Press, London
- Batzer M.A.**, Kilroy G.E., Richard P.E., Shaikh T.H., Desselle T.D., Hoppens C.L., Deininger P.L. 1990. Structure and variability of recently inserted Alu family members. *Nucl. Acid Res.* 18: 6793-6798
- Baumhueter S.**, Singer M.S., Henzel W., Hemmerich S., Renz M., Rosen S.D., Lasky L.A. 1993. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262: 436
- Beg A.A.**, Baldwin A.S. 1993. The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF κ B transcription factors. *Genes Dev.* 7, 2064-2070
- Behar E.**, Chao N.J., Hirake D.D. Krishnaswamy S., Brown B.W., Zehnder J.L. and Grumet F.C. 1996. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 334:286-291
- Bennet J.**, Sun D., Karikó K. 1995. Sequence analysis of the 5.34 Kb 5' flanking region of the human rhodopsin-encoding gene. *Gene* 167: 317
- Benton W.D.**, & Davis R. W. (1977). Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196: 161-163
- Berman M.E.**, and W.A. Muller. 1992. Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) stimulates adhesive activity of leukocyte integrin CD11b/CD18 *FASEB J.* 6:A1888
- Berman M.E.** and Muller W.A. 1995. Ligation of Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 154: 299-307
- Berman M.E.**, Xie Y, and Muller W.A. 1996. Roles of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in natural killer cell transendothelial migration and β_2 integrin activation. *J. Immunol.* 156: 1515-1524
- Bevilacqua M.P.**, Pober J.S., Mendrick D.L., Cotran, R.S. and Gimbrone M.A. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 84, 9238-9242
- Bevilacqua M.P.**, Stengelin S., Gimbrone M.A., Seed B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165
- Bevilacqua M.P.**, Butcher E., Furie B., Gallatin M., Gimbrone M., Harlan J., Kishimoto K., Lasky L., McEver R., Paulson J., Rosen S., Seed B., Siegelman M., Springer T., Stoolman L., Tedder T., Varki A., Wagner D., Weissaman Y., Zimmerman G. 1991. Selectins: A family of adhesion receptor. *Cell* 67, 233
- Bevilacqua M.** and Nelson, R.M. 1993. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91: 379-387
- Beynon H. L. C.**, Haskard O., Davies K.A., Haroutunian R. and Walport M.J. 1993. Combinations of low concentrations of cytokines and acute agonists synergize in increasing the permeability of endothelial monolayers. *Clin. Exp.Immunol.* 91: 14

- Bianchi M.E.** 1995. The HMG-box domain in DNA-protein structural interactions. D. M.J. Lilley, de. Oxford University Press, Oxford p177
- Binns R.M.**, Licence S.T. and Pabst R. 1992. Homing of blood, splenic, and lung emigrant lymphoblasts: Comparison with the behavior of lymphocytes from these sources. *Int. Immunol.* 4, 1011-1019
- Birnboim H. C. & Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7: 1513
- Bischoff J.** 1995. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 5: 69-74
- Blanar M.A.**, Burkly L.C., Flavell R.A. 1989. NF κ B binds within a region required for B-cell-specific expression of the major histocompatibility complex class II gene *E α* . *Mol. Cell. Biol.* 9: 844
- Bogen S.**, J. Park, M. Garifallou, X. Deng and W.A. Muller. 1994. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J. Exp. Med.* 179:1059-1064
- Bonthron D.T.**, Sultan P. Collins T. 1991. Structure of the murine c-sis proto-oncogene (sis, PDGFB) encoding the B chain of platelet-derived growth factor. *Genomics* 10, 287-292
- Borellini F.**, Glazer R.I. 1993. Induction of Sp1-p53 ADN binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony stimulating factor-dependent proliferation. *J. Biol. Chem.* 268; 7923-7928
- Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brasier A. R.**, Tate J. E. & Habener J. F. (1989). Optimized use of the firefly luciferase assay in mammalian cell lines. *Biotechniques* 7: 1116-1122
- Brett J.**, Gerlach H., Nawroth P., Steinberg S., Godman G. and Stern D. 1989. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J. Exp. Med.* 169: 1977
- Brini A.T.**, Lee G.M., Kinet J.P. 1993. Involvement of Alu sequences in the cell-specific regulation of transcription of the γ chain of Fc and T cell receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 1355
- Brooks P.C.**, Clark R.A. and Cheresh D.A. 1994. Requirement of vascular integrin α v β 3 for angiogenesis. *Science* (Wash. D.C.) 264: 569-571
- Brooks P.C.**, Montgomery A.M.P., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G. and Cheresh D.A. 1994. Integrin α V β 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 79: 1157-1164
- Brooks P.C.**, Montgomery A.M.P., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G. and Cheresh D.A. 1994. Integrin α β β 3 antagonists promote tumor regression by inducing membrane-bound alkaline phosphatase as a reporter enzyme. *Gene* (Amst.): 87: 285-289
- Brown K.**, Park S., Kanno T., Franzoso G., Siebenlist U. 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor I κ B α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2532-2536
- Buckley C.D.**, Doyonnas R., Newton P.J., Blystone S.D., Brown E.J., Watt S.M; Simmons D.L. 1996. Identification of α β β 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J. Cell Science* 109, 437-445
- Burn P.**, Kupfer A.C., Singer S.J. 1988. Dynamic membrane-cytoskeletal interactions-specific association of integrin and talin arises in vivo after phorbol ester treatment of peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 497-501
- Busslinger M. J.**, Hurst J., and Flavell R. A. 1983. DNA methylation and the regulation of Globin gene expression. *Cell* 34, 197-206
- Bussolari S.R.**, Dewey C.F., Gimbrone M.A. 1982. Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev. Sci. Instrum.* 53, 1851-1854
- Butcher E.C.** 1991. Leukocyte endothelial cell migration: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036
- Butcher E.C.** and Picker L.J. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60
- Butler P.J.G.** 1984. *EMBO J.* 3, 2599-2604

- Cabañas C.**, F. Sánchez-Madrid, T. Bellón, C.G. Figdor, A.A. Te Velde, J.M. Fernández, A. Acevedo and C. Bernabéu. 1989. Characterization of a novel myeloid differentiation antigen regulated during differentiation of monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* 19:1373-1378
- Cao X.**, Mahendran R., Guy G.R., Tan Y.H. 1992. Protein phosphatase inhibitors induce the sustained expression of the Egr-1 gene and the hyperphosphorylation of its gene product. *J. Biol Chem.* 267: 12991-12997
- Cao X.**, Guy G.R., Sukhatme V.P., Tan Y.H. 1992. Regulation of the Egr-1 gene by tumor necrosis factor and interferons in primary human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267, 1345-1349
- Cao X.**, Mahendran R., Guy G. R. and Y. H. Tan. 1993. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* 268: 16949
- Carlos T.M.** and Harlan J.M. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068
- Cardin A.D.** and H.J.R. Weintraub. 1989. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycans interactions. *Arteriosclerosis* 9:21-32
- Caro C.G.**, Fitz-Gerald J.M., Schroter R.C. 1971. Atheroma and arterial wall shear observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc. Royal Soc. London (Biol.)* 177, 109-159
- Cebrián M.**, Redondo J. M., López-Rivas A, Rodríguez-Tarduchy G., De Landázuri M.O. and F. Sánchez-Madrid. 1989. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur. J. Immunol.* 19: 809
- Cepek K.L.**, Shaw S.K., Parker C.M., Russell G.J., Morrow J.S., Rimm D.L. and Brenner M.B. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha_5\beta_7$ integrin. *Nature* 372. 190-193
- Chakrabarty S.** 1992. Role of protein kinase C in transforming growth factor- β 1 induction of carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma cells. *J. Cell Physiol.* 152:494-499
- Chan B.M.C.**, Elices M.J., Murphy E. and Hemler M.E. 1992. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin: Comparison of $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) and $\alpha_4\beta_7$ on the human B cell line JY. *J. Biol. Chem.* 267, 8366-8370
- Chang E.**, Goldberg H. 1995. Requirements for transforming growth factor- β . Regulation of the pro- α 2(I) collagen and plasminogen activator inhibitor-1 promoters. *J. Biol. Chem.* 270, 4473-4477
- Chen C.** and Okayama H. 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid ADN. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-2752
- Cheng Q.**, Cant C.A., Moll T., Hofer-Warbinek R., Wagner E., Birmstiel M.L., Bach F.H., de Martin R. 1994. NF- κ B subunit-specific regulation of the I κ B α promoter. *J. Biol. Chem.* 269, 13551-13557
- Cheresh D.A.**, Pytela R., Pierschbacher M.D., Klier F.G., Ruoslahti E., Reisfeld R.A. 1987. An Arg-Gly-Asp-directed receptor on the surface of human melanoma cells exists in a divalent cation-dependent functional complex with the disialoganglioside GD2. *J. Cell Biol.* 105: 1163-1173
- Cheresh D.A.** 1987. Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 6471
- Chirgwin J.**, Przybyla A. E., Macdonald R. J. & Rutter W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294
- Chodosh L. A.**, Carthew R. W. & Sharp P. A. (1986). A single polypeptide possesses the binding and activities of the adenovirus major late transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 6: 4723-4733
- Chomczynski P.** and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159
- Chung C.T.**, Miller R.H. 1993. Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Methods of enzymology.* 218: 621-627
- Clackson T.T.**, Güssow, D., and Jones, P.T. (1991). General applications of PCR to gene cloning and manipulation. In *PCR, a practical approach*. Oxford University Press, New York. De: Mc Pherson, M. j., Quieke, P., and Taylor, G.R.

- Cogswell J.P.**, Godlevski M.M., Bonham M., Bisi J., Babiss L. 1995. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2782
- Collart M.A.**, Baeuerle P., Vassalli. 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF κ B. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1498
- Collins T.**, Williams A., Johnson G.I., Kim J., Eddy R., Shows T., Gimbrone M.A., Bevilacqua M.P. 1991. Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* 166, 2466-2473
- Collins T.**, Read M.A., Neish A.S., Whitley M., Thanos D. and Maniatis T. 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9: 899
- Concino M.F.**, Lee M.F., Merryweather J.P. Weismann R. 1984. The adenovirus major late promoter TATA box and initiation sites are both necessary for transcription in vitro. *Nucl. Acid Res.* 12; 7423-7433
- Corbí A.L.** 1996. Molecular biology intelligence unit. Leukocyte integrins; structure, expression and function. Springer. University press
- Cordingley M.G.**, Riegel A.T., Hager G.L. Steroid-dependent interaction of transcription factors with the inducible promoter of mouse mammary tumor virus *in vivo*. 1987. *Cell* 48, 261-270
- Cramer E.M.**, G. Berger and M.C. Berndt. 1994. Platelet α -granule and plasma membrane share two new components: CD9 and PECAM-1. *Blood* 84:1722-1730
- Cronstein B.N.**, Kimmel S.C., Levin R.I., Martiniuk F., Weissmann G. 1992. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9991-9995
- Cybulsky M.I.**, J.W.U. Fries, A.J. Williams, et. al. 1991. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM-1 gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:7859-7863
- Davies P.F.**, Remuzzi A., Gordon E., Dewey F., Gimbrone M.A. 1986. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2114-2117
- Davies P.F.** 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 75: 519-560
- Defilippi P.**, Truffa G., Stefanuto G., Altruda F., Silengo L. and Tarone G. 1991. TNF- α and IFN γ modulate expression of the vitronectin receptor (integrin β_3) in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 266, 7638-7645
- Defilippi P.**, Silengo L. and Tarone G. 1992. α_6/β_1 integrin (laminin receptor) is down regulated by TNF α and IL-1 β in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 18303-18307
- de Fougerolles A.R.** and Springer T.A. 1992. Intercellular adhesion molecule-3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175, 185-190
- de Fougerolles A.R.**, Klickstein L.B. and Springer T. 1993. Cloning and expression of intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J. Exp. Med.* 177, 1187-1192
- de Fougerolles A.R.** and Springer T.A. 1994. Characterization of the function of intercellular adhesion molecules (ICAM-3) and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J. Exp. Med.* 179, 619-629
- Degitz K.**, Lian-Jie L., Caughman S.W. 1991. Cloning and characterization of the 5' transcriptional regulatory region of the human intercellular molecule I gene. *J. Biol. Chem.* 266, 14024-14030
- Dejana E.M.**, Corada M. and Lampugnani M.G. 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9: 910
- de la Luna S.**, Soria I., Pulido D., Ortín J., Jiménez A. 1988. Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene*, 62: 121-126

- DeLisser H.M.**, H-C. Yan, W.A. Muller, P.J. Newman, C.A. Buck and S.M. Albelda. 1993. Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 268:16037-16046
- DeLisser H.M.**, J. Chilkotowsky, H-C. Yang, M. Daise, C.A. Buck and S.M. Albelda. 1994a. Deletions in the cytoplasmic domain of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties. *J. Cell Biol.* 124:195-203
- DeLisser H.M.**, Newman P.J. and Albelda S.M. 1994. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunology Today* 15: 490-495
- Delgado M. D.**, Lerga A., Cañelles M., Gómez-Casares M. T. and León J. 1995. Differential regulation of Max and role of c-Myc during erythroid and myelomonocytic differentiation of K562 cells. *Oncogene* 10: 1659-1665
- Delia D.**, Lampuganani M.G., Resnati M., Dejana E., Aiello A., Fortaneela E., Soligo D., Pierotti M.A., Greaves M.F. 1993. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cell in vitro. *Blood* 81: 1001
- de Martin R.**, Vanhove B., Cheng Q., Hofer E., Csizmadia V., Winkler H., Bach F.H. 1993. Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I κ B α -like gene is regulated by NF- κ B. *EMBO J.* 12, 2773-2779
- de Thé JH.**, Vivanco-Ruiz M., Tiollais P., Stunnenberg H. and A. Dejean. 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature* 343:177
- Diamond S.L.**, Sharefkin J.B., Diffenbach Cl., Frasier-Scott K., McIntire L.V., Eskin S.G. 1990. Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J. Cell. Physiol.* 143, 364-371
- Du X.**, Plow E.F., Frelinger A.L. III., O'Toole T.E., Loftus J.C., Ginsberg M.H. 1991. Ligands "active" integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet GPIIb-IIIa). *Cell* 65: 409-416
- Du H.**, Roy A. L, and Roeder R. G. 1993. Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator elements of the HIV-1 and the Ad-ML promoters. *EMBO J.* 12: 501-5011
- Du W.**, Thanos D., Maniatis T. 1993. Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74, 887-898
- Du W.**, Maniatis T. 1994. The high mobility group protein HMG-I(Y) can stimulate or inhibit the binding of distinct transcription factor ATF-2 isoforms to the interferon- β gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11318-11322
- Dunon D.**, Schwager J., Dangy J.P., Cooper M.D. and Imhof B.A. 1994. T cell migration during development: Homing is not related to TCR V β 1 repertoire selection. *EMBO J.* 13, 808-815
- Duperray A.**, Mantovani A., Introna M. and Dejana E. 1995. Endothelial cell regulation of leukocyte infiltration in inflammatory tissues. *Mediat. Inflamm.* 4: 322
- Dustin M.L.**, Rothlein R., Bhan A.K., Dinarello Cl.A. and Springer T.A. 1986. Induction by IL1 and interferon-gamma: Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137, 245-254
- Dustin M.L.**, Springer T.A. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341: 619-624
- Dustin M.L.** and Springer T.A. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. immunol.* 9: 27-66
- Dynan W.S.**, Tjian R. 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87
- Ebeling O.**, Duczmal A., Aigner S., Geiger C., Schöllhammer S., Kemshead J.T., Möller P., Albiez R.S.; Altevogt P. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to integrin. *Eur. J. Immunol.* 26: 2508-2516
- Ebert S.N.**, Balt S.L., Hunter J.P.B., Gashler A., Sukhatme V., Wong D.L., 1994. EGR-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* 269: 20885-20898
- Edwards D.R.**, Murphy G., Reynolds J.J., Wwhitham S.E., Docherty A.J., Angel P., Heath J.K. 1987. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloprotease inhibitor. *EMBO J.* 6, 1899-1904

- Elices M.J.**, Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyj S., Hemler M.E. and Lobb R.R. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 577-584
- Fangos J.A.** 1993. Physical forces and the mammalian cell. Academic, San Diego, California
- Fina L.**, Holgaard H.V., Robertson D., Bradley N.J., Monaghan P., Delia D., Sutherland D.R., Baker M.A., Greaves M.F. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417
- Faissner A.**, Teplow D.B., Kübler D., Keilhauer G., Kinzler V. and Schachner M. 1985. Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *EMBO. J.* 4: 3105-3113.
- Fawcett J.**, Buckley C, Holness C.L., Bird I.N., Spragg J.H., Saunders J., Harris A. and Simmons D.L. 1995. Mapping the homotypic binding sites in CD31 and the role of CD31 adhesion in the formation of interendothelial cell contacts. *J. Cell Biol.* 128, 6: 1229-1241
- Feinberg A.P.**, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabelling ADN restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem* 132, 6-13
- Felding-Hebermann B.**, Mueller B.M., Romerdahl C.A. and Cheresch D.A., 1992. Involvement of integrin α_v gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J. Clin. Invest.* 89: 2018-2022
- Feng D.**, Ohlsson M., Ny T. 1990. The structure of the TATA-less rat tissue-type plasminogen activator gene. Species-specific sequence divergences in the promoter predict differences in regulation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 26, 2022-2027
- Feng G-S.**, Hui C.-C, and Pawson T. 1993. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259: 1607-1610
- Feng G.** and Pawson T. 1994. Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. *Trends Genet* 10: 54-58
- Fischer G.**, Künemund V. and Schachner M. 1986. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J. Neurosci.* 6: 605-612
- Frangos J.A.**, Eskin S.G., McIntire L.V., Ives C.L. 1985. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227, 1477-1479
- Freeman R.M.**, Plutzky J. and Beel B.G. 1992. Identification of a human src homology 2-containing protein tyrosine-phosphatase: A putative homolog of Drosophila corkscrew. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11239-11243
- Frelinger A.L. III.**, Lam S.C.-T., Plow E.F., Smith M.A., Loftus J.C., Ginsberg M.H. 1988. Occupancy of an adhesion glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 263: 12397-12402
- Friedlander D. R.**, Milev P., Karthikeyan L., Margolis R. K., Margolis R. U., and Grumet. M. 1995. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* 125: 669-680
- Furchgott R.F.**, Vanhoutte P.M. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3, 2007-2018
- Gamble J.R.** and M.A. Vadas. 1988. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor- β . *Science* 242:97-99
- Gamble J.R.**, Khew-Goodall Y., Vadas M.A. 1993. TGF- β inhibits E-selectin expression of human endothelial cells. *J. Immunology.* 150: 4494-4503
- Ge H.**, Roeder R.G. 1994. The high mobility group protein HMG-1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA binding protein. *JBC* 269, 17136-17140
- Gehlsen K.R.**, Davis G.E. and Spiramaro P. 1992. Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clin. Exp. Metastasis.* 10: 111-120
- Geiser A.G.**, Kim S.J., Roberts A.B., Sporn M.B. 1991. Characterization of the mouse transforming growth factor-beta 1 promoter and activation by the HA-ras oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 11, 84-92
- Geng J.G.**, Bevilacqua M.P., Moore K.L., McIntyre T.M., Prescott S.M., Kim J.M., Bliss G.A., Zimmerman G.A. and McEver R.P. 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343, 757-76

- Goldberger A., K.A. Middleton and P.J. Newman.** 1994. Changes in expression of the cell adhesion molecule PECAM-1 (CD31) during differentiation of human leukemic cell lines. *Tissue Antigens* 44: 285-293
- Goldberger A., Middleton K.A., Oliver J.A., Paddock C., Yan H.-C., DeLisser H.M., Albelda S.M., Newman P.J.** 1994. Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form. *J. Biol. Chem.* 269, 17183-17191
- Goyert S.M., E.M. Ferrero, S.V. Seremetis, R.J. Winchester, J. Silver and A.C. Mattison.** 1986. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J. Immunol.* 137:3909-3914
- Gregor P. D., Sawadogo M. and Roeder R. G.** 1990. The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to ADN as a dimer. *Genes Dev.* 4: 1730-1740
- Grilli M., Harlan J.M.** 1994. NF- κ B and Rel, participants in a multiform transcriptional regulatory system. In *International Review of Cytology. A Survey of Cell Biology*, pp. 1-62. Academic Press, San Diego, California
- Groves R., Ross, E., Barker J.N.W.N., Ross J.S., Camp R.D.R. and McDonald D.D.M.** 1992. Effect of in vivo interleukin-1 on adhesion molecule expression in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 98, 384-387
- Grumet M. and G.M. Edelman.** 1988. Neuron-Glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanism. *J. Cell Biol.* 106:487-503
- Grumet M.,** 1992. Structure, expression and function of Ng-CAM, a member of the immunoglobulin superfamily involved in neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *J. Neuro-Sci. Res.* 31: 1-13
- Grumet M., Friedlander D. R., and Edelman G. M.** 1993. Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhesion Commun.* 1: 177-190
- Grunstein M.** 1990. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 643-678
- Gumina R.J., Kirschbaum N. E., Rao P. N., vanTuinen P., Newman P.J.** 1996. The human PECAM-1 gene maps to 17q23. *Genomics* 34, 229-232
- Gumina R.J., Schultz J., Yao, Z., Kenny D., Wartier D.C., Newman P.J. and Gross, G.** 1997. Antibody to PECAM-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* (In Press)
- Gupta M.P., Gupta M., Zak R. and Sukhatme V.P.** 1991. EGR-1 a serum-inducible zinc finger protein regulates transcription of the rat cardiac α -myosin heavy chain gene. *J. Biol. Chem.* 266: 12813-12816
- Hahne M., Jäger U., Isenmann S., Hallmann R., Vestweber D.** 1993. Five TNF-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J. Cell Biol.* 121: 655-664
- Halnon N.J., Collins T., Gimbrone M.A., Resnick N.** 1994. Regulation of the endothelial PDGF-A gene by shear stress. *Circulation* 90, (IV) 0468 (abstr.)
- Hambor J.E., Mennorn J., Coon M.E., Hanke J.H., Kavathas P.** 1993. Identification and characterization of an Alu-containing T-cell specific enhancer located in the last intron of the human CD8 α gene. *Mol. Cell Biol.* 13: 7056-7070
- Harris P., Ralph P.** 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U-937 cell lines. *J. Leukocyte Biol.* 37: 407
- Hattori M., Abraham L.J., Northermann W., Fey G.H.** 1990. Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat α 2-macroglobulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2364
- Hautanen A., Gailit J., Mann D.M., Ruoslahti E.** 1989. Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 1437-1442
- Hermanowski-Vosatka A., Van Strijp J.A.G., Swiggard W.J., Wright SD.** 1992. Integrin modulating factor-1: a lipid that alters the function of leukocyte integrins. *Cell* 68: 341-352
- Hickstein D.D., Baker D.M., Gollahon K.A., Back A. L.,** 1992. Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2105
- Hinck L., Nathke I.S., Papkoff J., Nelson W.J.** 1994. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell. Biol.* 125, 1327-1340

- Hsieh H.-J.**, Li N.-Q., Frangos J.A. 1991. Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor messenger RNA levels. *Am. J. Physiol.* 260, H642-H646
- Ho I. C.**, Bhat, N. K., Gottschalk, L. R., Lindsten, T., Thompson, C. B., Papas, T. S. and M. Leiden. 1990. Sequence-specific binding of human Ets-1 to the Tcell receptor alpha gene enhancer. *Science* 250:814
- Hooft van Huijsduijnen, R.**, Whelan, J., Pescini, R., Becker-Andre, M., Schenk, A-M., De Lararter, J.F. 1992. A T-cell enhancer cooperates with NF- κ B to yield cytokine induction of E-selectin gene transcription in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267: 22385-22391
- Horley K.J.**, Carpenito C., Baker B., Takei F. 1989. Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *EMBO J.* 8, 2889-2896
- Hoschuetzky H.**, Aberle H., Kemler R. β -Catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell. Biol.* 127: 1375-1880
- Hou J.**, Baichwal V., Cao Z. 1994. Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding ICAM-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1641-11645
- Hoyos B.**, Ballard D.W., Bohnlein E., Siekevitz M., Greene W.C. 1989. Kappa B-specific DNA binding proteins role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 244: 4567
- Hubbe M.**, Kowitz A., Schirmacher V., Schachner M. and Altevogt P. 1993. L1 adhesion molecule on mouse leucocytes: regulation and involvement in endothelial cell binding. *Eur. J. Immunol.* 23: 2927-2931
- Hynes R.O.** 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25
- Imagawa M.**, Chiu R., and Karin M. 1987. Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways protein kinase C and cAMP. *Cell* 51: 251-260
- Ish-Horowitz D.**, Burke J.F. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acid Res.* 9: 2989-3014
- Israel A.**, Le Bail O., Hatat D., Piette J., Keran M., Logeat F., Wallach D., Fellous M., Kourilsky P. 1989. TNF- α stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF- κ B like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J.* 8: 3793-3800
- Jaattela M.** 1991. Biologic activities and mechanisms of action of TNF- α /cachectin. *Lab. Invest.* 64: 724-742
- Jahnke A.**, Johnson J.P. 1994. Synergistic activation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by TNF- α and IFN- γ is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat 1 α (p91) that can be activated by both IFN- γ and IFN- α . *FEBS lett.* 354, 220-26
- Jin Y.**, Cole R.D. 1986. H1 histone exchange is limited to particular regions of chromatin that differ in aggregation properties. *J. Biol. Chem.* 261, 3420-3427
- Johnston G.I.**, Cook, R.G. and McEver, R.P. 1989. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: Sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 56, 1033-1044
- Kadmon G.**, Kowitz A., Altevogt P. and Schachner M. 1990. The functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J. Cell Biol.* 10: 2092-18
- Kadmon G.**, von Bohlen and Halbach F., Eckert M., Altevogt P. and Schachner M. 1995. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7: 993-1004
- Kadonaga J.T.**, Courey A.J., Ladika J., Tjian R. 1988. Distinct regions of Sp1 modulate ADN binding and transcriptional activation. *Science* 242. 1566-1570
- Kapaettu S.**, Park K., Atchinson M.L., Howe C.C. 1993. The intracisternal A-particle upstream element interacts with transcription factor YY1 on distinct ADN promoter elements. *Mol. Cell Biol.* 13: 6621-6628
- Khachigian L.M.**, Resnick N., Gimbrone M.A., Collins T. 1995. Nuclear factor- κ B interacts functionally with the PDGF-B chain shear-stress-response-element in vascular endothelial cells exposed to shear stress. *J. Clin. Invest.* 92: 1169-1175
- Khachigian L.M.**, Willians A.J., Collins T. 1995. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27679-27686

- Khachigian L.M.**, Lindner V., Williams A.J., Collins T. 1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271; 1427-1431
- Kharbanda S.**, Nakamura T., Stone R., Hass R., Bernstein S., Datta R., Sukhatme V.P., Kufe D. 1991. Expression of the early growth response 1 and 2 zinc finger genes during induction of monocytic differentiation. *J. Clin. Invest.* 88: 5711-577
- Kharbanda S.**, Salleem A., Hirano M., Emoto Y., Sukhatme V., Blenis J., Kufe D. 1994. Activation of early growth response 1 gene transcription and pp90^{ras} during induction of monocytic differentiation. *Cell Growth Differ.* 5: 259-265
- Kaszubka W.**, Hooft van Huijsduijnen R., Ghersa P., DeRaemy-Schenk A.-M., Chen B.P.C., Hai T., DeLamarter J.F., Whelan J. 1993. Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF- κ B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7180-7190
- Khono K.**, Gamanaka R., Abe T., Nomura Y., Morimoto A., Izumi H., Shimizu K., Ono M., Duwano M. 1993. Morphological change and destabilization of β -actin mRNA by tumor necrosis factor in human microvasculatr endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 208: 498
- Kerr I.D.**, Olashaw N.E., Matrisian L.M. 1988. Transforming growth factor- β 1 and cAMP inhibit transcription of the epidermal growth factor- and oncogene- induced transin RNA. *J. Biol. Chem.* 263: 16999-17005
- Kerr L.D.**, D.B. Miller and L.M. Matrisian. 1990. TGF- β 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61:267-278
- Kerr L.D.**, Ransone L.J., Wamsley P., Schmitt M.J., Boyer T.G., Zhou, Q., Berk A.J., Verma I.J. 1993. Association between proto-oncoprotein Rel and TATA-binding protein mediates transcriptional activation by NF- κ B. *Nature* 365, 412-419
- Kikuchi G.E.**, Roberts K., Shevach E.M. and Coligan J.E. 1992. Gene transfer demonstrates that the V gamma I.I.C gamma 4V delta 6C delta T cell receptor is essential for autoreactivity. *J. Immunol.* 148: 1302-1307
- Kim S.J.**, Jeany K.T., Glick A.B., Sporn M.B., Roberts A.B. 1989. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J. Biol. Chem.* 264, 402-488
- Kirschbaum B.S.**, Pognonec P., Roeder R.G. 1992. Definition of the transcriptional activation domain of recombinant 43 kDa USF. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5049-5101
- Kirschbaum N. E.**, Gumina R. J. and P.J. Newman. 1994. Organization of the human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 shows alternatively spliced isoforms and a functionally complex cytoplasmic domain. *Blood* 84: 4028
- Kishimoto T.K.**, O'Connor K., Lee, A., Roberts T.M., Springer T.A. 1987. Cloning of the β subunit of the leukocyte adhesion proteins: Homology to an extracelular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell* 48: 681-690
- Kishimoto T.K.**, Jutila, M.A., Berg, E.L., Butcher, E.C. 1989b. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245: 1238-1241
- Klemsz M.J.**, McKercher S.R., Celada A., Van-Beveren C.C., Madi R.A. 1990. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 61: 113
- Knapp W.**, B.Dorcken, P. Reiber, R.E. Schmidt, H. Stein and A.E. von dem Borne. 1989. CD Antigens 1989. *Blood* 74:1448-1450
- Koch A.E.**, Halloran M.M., Haskell C.J., Shah M.R., Polverini P.J. 1995. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*, 376: 517-519
- Kouns W.C.**, Wall C.D., White M.M., Foxk C.F., Jennings L.K. 1990. A conformation-dependent epitope of human platelet glycoprotein IIIa. *J. Biol. Chem.* 265: 20594-20601
- Kowitz A.**, Kadmon G., Verschuere H., Remels L., De Baetselier P., Hubbe M., Schachner M., Schirmacher V. and Altevogt P. 1993. Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 11: 419-429
- Kowitz A.** Kadmon G., Eckert M., Schirmacher V., Schachner M. and Altevogt, P. 1992. Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 22: 1199-1205

- Koyano-Nakagawa N.**, Nishida J., Baldwin D., Arai K.-I., Yokota T. 1994. Molecular cloning of a novel human cDNA encoding a zinc finger protein that binds to the interleukin-3 promoter. *Mol. Cell Biol.* 14: 5099-5107
- Ku D.N.**, Giddens D.P., Zarins C.K., Glasgow S. 1985. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation: positive correlation between plaque location and low and oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 5, 293-302
- Kuhne M.R.**, Pawson A., Leinhard G.E. and Feng G. 1993. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Supl. *J Biol.Chem.* 268: 11479-11481
- Kunsch Ch.**, Lang R.K., Rosen C.A., Shannon F.M. 1994. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF- κ B and NF-IL6. *J. Immunol.* 153: 153-164
- Laiho M.**, O. Saksela P.A., Andreasen and J. Keski-Oja. 1986. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor- β 1. *J. Cell Biol.* 103: 2403-2410
- Langille L.**, O'Donnell F. 1986. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 231, 405-407
- Larsen E.**, Palabrica T., Sajer S., Gilbert G.E., Wagner D.D., Furie B.C. and Furie B. 1990. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* 63, 467-474
- Larsson L. G.**, Ivhed, Y., Gidlund, M., Patterson, U. M., Vennström, B., and Nilsson, K. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,; 2638-2642
- Lasky L.A.**, Singer M.S., Yednock T.A., Dowbenko D., Fennie C., Rodríguez H., Nguyen T., Stachel S. and Rosen S.D. 1989. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* 56, 1045-1055
- Lasky L.A.** 1992. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*, 258: 964-969
- Lastres P.**, Almendro N., Bellón T., López-Gerrero J. A., Eritja R. and Bernabéu C. 1994. Functional regulation of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 by TGF- β 1 in promonocytic U-937 cells. *J. Immunology*, 153: 4206-4218
- Lauri D.**, Needhan L., Martin-Padura Y., Dejana E. 1991. Tumor cell adhesion to endothelial cells: endothelial cell adhesion molecule 1 as an inducible adhesive receptor specific for colon carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 1321-1324
- Leavesley K.I.**, Oliver J.M., Swart B.W., Berndt M.C., Haylock D.N. and Simmons P.J. 1994. Signals from Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34⁺ hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 153: 4673-4683
- Leavesley D.I.**, Ferguson G.D., Wayner E.A. and Cheresch D. A. 1992. Requirements of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J. Cell Biol.* 117: 1101
- Le Bail O.**, Schmidt-Ullrich R., Israël A. 1993. *EMBO. J.* 12, 5043-5049
- Lechleider R.J.**, Freeman R.M. and Neel, B.G. 1993. Tyrosyl phosphorylation and growth factor receptor association of the human corkscrew homologue, SH-PTP2. *J. Biol. Chem.* 268: 13434-13438
- Ledebur H. C.**, and Parks T. P. (1995). Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 933-943
- Lee W.**, Mitchell P., Tjian R. 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49: 741-752
- Lee L.A.**, Dolde C., Barrett J., Wu C.S., Dang C.V. 1996. A link between c-myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. *J. Clin. Invest.* 97: 1687
- Lenardo M.J.**, Fan C.-M., Maniatis T., Baltimore D. 1989. The involvement of NF κ B in β -interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell* 57: 287
- Lennox R.W.** 1984. *J. Biol. Chem.* 259, 669-672
- Leung K.**, Nabel G.J. 1988. HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF κ B like factor. *Nature* 333: 776

- Lewis H., Kaszubska W., DeLamarter J.F., and Whelan J. (1994). Cooperativity between two NF- κ B complexes, mediated by high-mobility-group protein I (Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5701-5709
- Li L., Nerlov C., Prendergast G., MacGregor D. and Ziff E. B. 1994. c-Myc represses transcription *in vivo* by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J.* 13: 4070-4079
- Li Y., Camp S., Rachinsky T.L., Bongoirno C., Taylor P. 1993. Promoter elements and transcriptional control of the mouse acetylcholinesterase gene. *J. Biol. Chem.* 268: 3563-3572
- Li L.H., Nerlov C., Prendergast G., McGregor D. Ziff E.B. 1994. c-Myc represses transcription *in vivo* by a novel mechanism dependent on the Initiator element and Myc box II. *EMBO J.* 13: 4070-4079
- Liao F., Huynh H. K. Eiroa A., Greene T., Polizzi E., Muller W. A. 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J. Exp. Med.* 182: 1337-1343
- Liberman T.A., Baltimore D. 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF κ B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 10: 2327
- Lin H.Y., X-F. Wang, E. Ng-Eaton, R.A. Weinberg and H.F. Lodish. 1992. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68:775-785
- Lo S.K., Detmers P.A., Levin S.M., Wright S.D. 1989a. Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J. Exp. Med.* 169: 1779-1793
- Lo S.K., Van Seventer G.A., Levin S.M., Wright S.D. 1989b. Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J. immunol.* 143: 3325-3329
- Lo K., Landau N.R., Smale S.T. 1991. LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5229
- López-Cabrera M., Nueda A., Vara A., García-Aguilar J., Tugores A., Corbí A.L. 1993. Characterization of the p150,95 leukocyte integrin α subunit gene promoter. *J. Biol. Chem.* 268: 1187
- López-Rodríguez C., Almendro N., Delgado D., Nueda A., Muñoz E., León J., Bernabéu C., and Corbí A. 1996. Myc and USF proteins modulate CD11c/CD18 integrin expression: Myc-mediated transcriptional repression of the CD11c promoter activity. *In press*
- Lowenstein C.J., Alley E.W., Raval P., Snowman A.M., Snyder S.H., *et al.*, 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9730-9734
- Lowrance J.H., F.X. O'Sullivan, T.E. Caver, W. Waegell and M.D. Greshman. 1994. Spontaneous elaboration of transforming growth factor β suppress host defense against bacterial infection in autoimmune T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180:1693-1703
- Lu T.T., Yan L.G. and Madri J.A. 1996. Integrin engagement mediates tyrosine dephosphorylation on PECAM-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11808-11813
- Luna E.J., Hitt A.L. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. 1992. *Science* 258, 955-964
- Machida C.M., Muldoon L.L., Rodland K.D., Magun B.E. 1988. Transcriptional modulation of transin gene expression by epidermal growth factor and transforming growth factor beta. *Mol. Cell Biol.* 8: 2479-2483
- Mack D.H., Vartikar J., Pipas J.M., Laimins L.A. 1993. Specific repression of TATA-mediated but not Initiator mediated transcription by wild type p53. *Nature* 363: 281-283
- Mackay, C.R. and Imhof, B.A. 1993. Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Today* 14, 99-102
- MacLellan W.R., Lee T.-C., Schwartz R.J., Schneider M.D. 1994. Transforming growth factor- β response elements of the skeletal α -actin gene. Combinatorial action of serum response factor, YY1, and the SV40 enhancer-binding protein, TEF-1. *J. Biol. Chem.* 269, 16754-16760
- Mackman N. 1995. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J.* 9, 883-889
- Maeurer M.J., Martin D., Walter W., Jin K., Zitvogel L., Halnsczack K., Rabinowich H., Duquesnoy R., Storkns W., Lotze M.T. Human intestinal V delta 1⁺ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J. Exp. Med.* 183: 1681-1696

- Malek A.M.**, Gibbons G.H., Dzau V.J., Izumo S. 1993. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J. Clin. Invest.* 92, 2013-2021
- Malek A.M.**, Izumo S. 1994. Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell (editorial review). *J. Hypertension* 12, 989-999
- Mancuso D. J.**, Tuley E. A., Westfield L. A., Worrall N. K., Shelton-Inloes B. B., Sorace J. M., Alevy Y. G., Sadler J. E., 1989. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 264: 19514
- Mann E.A.**, Croyle M.L., Lingrel J.B. 1991. Identification of sequences mediating interleukin-6 induction of a rat kininogen gene. *J. Biol. Chem.* 266: 16931
- Mansky P.**, Brown W.M., Park, J.-H., Choi J.W., Yang S.Y. 1994. The second κ B element, κ B2, of the HLA-a class I regulatory complex is an essential part of the promoter. *J. Immunol.* 153, 5082-5090
- Mantovani A.**, Bussolino F. and Dejana E. 1992. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* 6: 2591
- Marchuk D.**, Drumm M., Saulinio A., and Collins F.S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl. Acids Res.* 19: 1154.
- Marfaing-Koka A.**, Devergne O., Gorgone G., Portier A., Schall T.J., Galanaud P. and Emilie D. 1995. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. *J. Immunol.* 154: 1870
- Marion C.**, Roche J., Roux B., Gorka C. 1985. Differences in the condensation of chromatin by individual subfractions of histone H1: implications for the role of H1 degree in the structural organization of chromatin. *Biochemistry* 24, 6328-6335
- Marshall J.F.**, Nesbitt S.A., Helfrich M.H., Horton M.A., Polakova K. and Hart I.R. 1991. Integrin expression in human melanoma cell lines: heterogeneity of vitronectin receptor composition and function. *Int. J. Cancer.* 49: 924-931
- Martin D.I.K.**, Zon L.I., Mutter G., Orkin S.H. 1990. Expression of the erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 344:444
- Martin F.**, Prandini M-H., Thevenon D., Harguerie G., Uzan G. 1993. The transcription factor GATA-1 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene. *J. Biol. Chem.* 268: 21606
- Martini R.** and Schachner M. 1986. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic. *J. Cell Biol.* 103: 2439
- Masimovsky B.**, Urdal D., Gallatin W.M. 1990. IL-4 acts synergistically with IL-1 β to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 145: 2886
- Massagué J.**, S. Cheifetz T. Endo and B. Nadal-Guinard. 1986. Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8206-8210
- Massagué J.** 1987. Identification of receptors for type- β transforming growth factor. *Method Enzymol.* 146:174-195
- Massagué J.** 1990. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597-641
- Massagué J.** 1992. Receptors for the TGF- β family. *Cell* 69:1067-1070
- Matrisian L.M.**, Bowden G.T., Krieg P., Furstenberger G., Briand J.P., LeRou P., Breathnach R. 1986. The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9413-9417
- Matsusaka T.**, Fujikawa K., Nishio Y., Mukaida N., Matsushima K., Kishimoto T., Akira S. 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, IL-6 and IL-8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10193- 10197
- Matzner Y.**, Gavison R., Rachmilowitz E.A. Fibach E. 1987. Expression of granulocytic functions by leukemic promyelocytic HL.60 cells: differential induction by dimethylsulfoxide and retinoic acid. *Chakrabarty:* 21: 261-269
- Mauro V.P.**, L.A. Krushel, B.A. Cunningham and G.M. Edelman. 1992. Homophilic and heterophilic binding activities of Nr-CAM, a nervous system cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* 119:191-202

- McCormik B.A.** and Zetter B.R. 1992. Adhesive interactions in angiogenesis metastasis. *Pharmacol Ther.* 53: 239-260
- McEver R.P.** 1992. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 840-849
- Meacock S.**, Pescini-Gobert R., DeLamarter J.F., van Huijsduijnen R.H. 1994. Transcription factor-induced, phased bending of the E-selectin promoter. *J. Biol. Chem.* 269, 31756-31762
- Means A.L.**, Farnham, P.J. 1990. Transcription initiation sites from the dihydrofolate reductase promoter is positioned by HIP1 binding at the initiation site. *Mol. Cell. Biol.* 10:653.
- Messing J.** (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101: 20-78.
- Metzelaar M.J.**, J. Korteweg., J.J. Sixma and H.K. Nieuwenhuis. 1991. Biochemical characterization of PECAM-1 (CD31 antigen) on human platelets. *Thromb. Haemostasis* 66:700-707
- Miksicek R.**, Borgmeyer U., Nowock J. 1987. Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus. *EMBO J.* 6, 1355-1360
- Milev P.**, Friendlander D. R. Sakurai T. Kathikeyan M., Flad R. K., Margolis M., Grumet M., and Margolis R. U. 1995. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 127: 1703-1715
- Mink S.**, Mutschler B., Weiskirchen R., Bister K.M., Klempnauer K.-H. 1996. A novel function for Myc: Inhibition of C/EBP-dependent gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93: 6635
- Mitchell P.J.**, Sang C., Tjian R. 1987. Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T-antigen. *Cell* 50: 847-861
- Modderman P.W.**, von dem Borne A.E.G.K. and Sonnenberg A. 1994. Tyrosine phosphorylation of P-selectin in intact platelets and in a disulfide-linked complex with immunoprecipitated pp60^{c-SRC}. *Biochem. J.* 299: 613-621
- Molnar G.**, Crozat A., Pardee A.B. 1994. The immediate-early gene EGR-1 regulates the activity of the thymidine kinase promoter at the G₀ to G₁ transition of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5242-5248
- Montgomery A.M.P.**, Becker J.C., Siu C-H; Lemmon V.P., Cheresch D.A., Pancook J.D., Zhao X. and Reisfeld R.A., 1996. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligand for integrin alpha V beta 3. *J. Cell Biol.* 132: 475-485
- Moos M.**, Tacke R., Scherer H., Teplow D., Früh k. and Schachner M. 1988. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334: 701-703
- Moulder K.**, Roberts K., Shevach E.M. and Coligan J.E. 1991. The mouse vitronectin receptor is a T cell activation antigen. *J. Exp. Med.* 173: 343
- Muller W.A.**, Gimbrone M.A. 1986. Plasmalemmal protein of cultured vascular endothelial cells exhibit apical-basal polarity: Analysis by surface-selective iodination. *J. Cell Biol.* 103: 399-414
- Mukaida N.**, Mahe Y., Matsushima K. 1990. Cooperative interaction of nuclear factor κB and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265: 21128
- Muller W. A.**, C.M. Ratti, S.L. McDonnell and Z.A. Cohn. 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemma protein enriched in intercellular junctions. *J. Exp. Med.* 170:399-414
- Muller W.A.**, M.E. Berman, P.J. Newman, H.M. DeLisser and S.M. Albelda. 1992. A heterophilic adhesion mechanism for platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J. Exp. Med.* 175:1401-1404
- Muller W.A.**, S.A. Weigl, X. Deng and D.M. Philips. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178:449-460
- Murray B.A.** and J.J. Jensen. 1992. Evidence for heterophilic adhesion of embryonic retinal cells and neuroblastoma cells to substratum-adsorbed NCAM. *J. Cell Biol.* 117:1311-1320
- Murre C.**, Bain G., van Dijk M. A., Engel I., Furnari B. A., Massari M. E., Matthews J. R., Quong M. W., Reverra R. R. and Stuver M. H. 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 1218: 129-135

- Murohara T., Delyani J.A., Albelda S.M. and Lefer A.M.** 1996. Blockade of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J. Immunol.* 156: 3550-3557
- Natesan S., Gilman M.Z.** 1993. ADN bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. *Genes and dev.* 7, 2497-2509
- Neish A.S., Williams A.J., Palmer H.J., Whitley M.Z. and Collins T.** 1992. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J. Exp. Med.* 176, 1583-1593
- Neish A.S., Read M.A., Thanos D., Pine R., Maniatis T., Collins T.** 1995. Endothelial IRF-1 cooperates with NF κ B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule-1. *Mol. Cell Biol.* 15, 2558-2569
- Nerem R.M., Levesque M.J., Cornhill J.F.** 1981. Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J. Biomech. Eng.* 103, 172-176
- Newman P.J., M.C. Berndt, J.Gorski, G.C. White II, S. Lyman, C. Paddock, W.A. Muller.** 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219-1222
- Newman P.J., Hillery C.A., Albecht R., Parise L.V., Berndt M.C., Mazurov A.V., Dunlop L.C., Zhang J., Rittenhouse S.E.** 1992. Activation-dependent changes in human platelet PECAM-1: phosphorylation cytoskeletal association, and surface membrane redistribution. *J. Cell Biol.* 119: 239
- Newman P.J.** 1994. The role of PECAM-1 in vascular cell Biology. *Ann. New York Acad. Sci.* 714:165-174
- Newman P.J.** 1997. Perspectives series: Cell adhesion in vascular biology. The biology of PECAM-1. *J. Clin. Investig.* 99, 3-8
- Nguyen H. Q., Hoffman-Liebermann B. and D. A. Liebermann.** 1993. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 72: 197-209
- Nishida K., Harrison D.G., Navas J.P., Fisher A.A., Docjery S.P., Uematsu M., et. al.,** 1992. Molecular cloning and characterization of constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 90, 2092-2096
- Nishizuka Y.** 1992. Intracellular signaling by hidrolisis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614
- Nordeen S. K.** (1988). Luciferase Reporter Gene Vectors for Analysis of Promoters and Enhancers. *Biotechniques* 6: 454-457.
- Norton J., Sloane J.P., Delia D. and Greaves M.F.** 1993. Reciprocal expression of CD34 and cell adhesion ELAM-1 on vascular endothelium in acute cutaneous graft-versus-host disease. *J. Pathol.* 170, 173-177
- Nueda A., López-Cabrera M., Vara A., Corbí A.L.** 1993. Characterization of the CD11a integrin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 268: 19305
- Offerman M.K., Medford R.M.** 1994. Antioxidants and atherosclerosis: A molecular perspective. *Heart Dis. and Stroke* 3, 52-57
- Ohto H., H. Maeda, Y. Shibata, et. al.** 1985. A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120 kDa molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. *Blood* 66: 873-881
- Onate S.A., Prendergast P., Wagner J.P., Nissen M., Reeves R., Pettijohn D.E., Edwards P.D.** 1994. The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target ADN sequences. *MCBiol.* 14, 3376-3391
- Orkin S.H.** 1992. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80:575.
- O'Reilly M., Geiser A.G., Kim S-J., Bruggeman L.A., Luu A.X., Roberts A.B., Sporn M.B. J.** 1992. Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the human transforming growth factor- β 2 promoter. *J. Biol. Chem.* 28, 19938-19943
- Osborn L., Kunkel S., Nabel G.J.** 1989. Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2336

- Osborn L., Hession C., Tizard R., Vassallo C., Luhowskyj S., Chi R.G., Lobb R. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211
- Osborn L., Vassallo C. and Benjamin C.D. 1992. Activated endothelium binds lymphocytes through novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Exp. Med.* 176, 99-107
- Palombella V.J., Rando O.J., Goldberg A.L., Maniatis T. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78, 773-785
- Page C., M. Rose, M Yacoub and R. Piggott. 1992. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 141:673-683
- Parry G.C., Mackman N. 1994. A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain κ B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J. Biol. Chem.* 269-20823-20825
- Paul W.E. 1993. *Fundamental Immunology*. 3rd. ed. Raven Press, New York
- Perides G., G. Hu, D.C. Rueger and M.E. Charness. 1993. Osteogenic protein-1 regulates L1 and neural cell adhesion molecule gene expression in neural cells. *J. Biol. Chem.* 268:25197-25205
- Pech M., Rao C.D., Robbins K.C., Aaronson S.A. 1989. Functional identification of regulatory elements within the promoter region of platelet-derived growth factor-2. *Mol. Cell. Biol.* 9, 396-405
- Perkins N.D., Edwards N.L., Duckett C.S., Agranoff A.B. Schmid R.M., Nabel G.J. 1993. A cooperative interaction between NF κ B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* 12, 3551-3558
- Philip A., Schneider A., Vasrik Y., Finke K., Xiong Y., Beach D., Alitalo K., Eilers M. 1994. Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4032
- Philips D.R., Charo I.F., Scarborough R.M. 1991. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65: 359-362
- Piali L., S.M. Albelda, H.S. Baldwin, P. Hammel, R.H. Gisler and B.A. Imhof. 1993. Murine Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1)/CD31 modulates β 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2464-2471
- Piali L., P.Hammel, C. Uherek, F. Bachmann, R.H. Gisler, D. Dunon and B.A. Imhof. 1995. CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha_v\beta_3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J. Cell Biol.* 130:451-460
- Picker L.J., Terstappen L.W., Rott L.S., Streeter P.R., Stein H. and Butcher E.C. 1990. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J. Immunol.* 145: 3247-3255
- Pietenpol J.A., K. Münger, P.M. Howley, R.W. Stein and H.L. Moses. 1991. Factor-binding element in the human c-myc promoter involved in transcriptional regulation by transforming growth factor β 1 and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10227-10231
- Piggott R. and Power C. 1993. *The Adhesion Facts Book*, Academic Press, London
- Piggott R., Dillon L.P., Hemingway I.H. and Gearing A.J.H. 1992. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 584-589
- Pober J.S. and Cotran R.S. 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537-544
- Poellinger L., Yoza B.K. and Roeder R.G. 1989. Functional cooperativity between protein molecules bound at two distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Nature* 337: 573
- Pohl F., Holtz J., Busse R., Bassenge E. 1986. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow *in vivo*. *Hypertension* 7, 37-44
- Pohlman T.H., Munford R.S. and Haan J.M. 1987. Deacylated lipopolysaccharide inhibits neutrophil adherence to endothelium induced by lipopolysaccharide *in vitro*. *J. Exp. Med.* 165, 1393-1402
- Prandini M.H., Denarier E., Frachet P., Uzan G., Harguerie G. 1988. Isolation of the human platelet glycoprotein IIb gene and characterization of the 5' flanking region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156: 595

- Prior C.P., Cantor C.R., Johnson E.M., Littau V.C., Allfrey V.G. 1983. *Cell* 34, 1039-1042
- Pugh B.F., and R. Tijan. 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 57: 103
- Rabinowich H., Lin W., Amoscato Al., Herberman R.B. and Whiteside T.L. 1995. Expression of vitronectin receptor on human NK cells and its role in protein phosphorylation, cytokine production and cell proliferation. *J. Immunol.* 154: 1124-1135
- Raich N., Clegg C.H., Grofti J., Roméo P.-H., Stamatoyannopoulos G. 1995. GATA-1 and YY1 are developmental repressors of the human ϵ -globin gene. *EMBO J.* 14:801
- Rao Y., X. Wu, J. Garipey, U. Rutishauser and C. Siu. 1992. Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule N-CAM *J. Cell Biol.* 118:937-949
- Rathjen F.G. and Schachner M. 1984. *EMBO J.* 3:1
- Redini F., Lafuma C., Pujo J.-P., Robert L., and Hornebeck W. 1988. Effect of cytokines and growth factors on the expression of elastase activity by human synoviocytes, dermal fibroblasts and rabbit articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 786-793
- Read M.A.I., Whitley M.Z., Williams A.J., Collins T. 1994. NF- κ B and I κ B- α : An inducible regulatory system in endothelial activation. *J. Exp. Med.* 179, 503-512
- Read M.A., Neish A.S., Luscinskas F.W., Palombella V. J. Maniatis T. Collins T. 1995. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 2, 493-506
- Read M.A., Neish A.S., Gerritsen M.E., Collins T. 1995. Nuclear I κ B- α and the post-induction transcriptional repression of the E-selectin and VCAM-1 genes. *FASEB J.* 9, A126
- Reed K. C. & Mann D. A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acid. Res.* 13: 7207-7221
- Reeves R. 1984. *Biochim. Biophys. Acta* 782, 343-393
- Resnick N. and Gimbrone M.A. 1995. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 9:874
- Reyes A. A., Akeson R., Brezina L., and Cole G.J. 1990. Structural requirements for neural cell adhesion molecule-heparin interaction. *Cell. Reg.* 1: 567-576
- Rice G.E., Bevilacqua M. 1989. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246: 1303-1306
- Riggs K.J., Merrel K.T., Wilson G., Calame K. 1991. Common factor 1 is a transcriptional activator which binds in the c-myc promoter, the skeletal α -actin promoter, and the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1765-1769
- Ristiniemi J., Oikarinen J. 1989. Histone H1 binds to the putative nuclear factor I recognition sequence in the mouse $\alpha_2(I)$ Collagen promoter. *J. Biol. Chem.* 264, 2164-2173
- Ritzenthaler J.D., R.H. Goldstein, A. Fine, A. Litchler, D.W. Rowe and B.D. Smith. 1991. Transforming growth factor β activation elements in the distal promoter region of the rat type I collagen gene. *Biochem. J.* 280:157-162
- Rival Y., Del Maschio A., Rabiet M.J., Dejana E. and Duperray A. 1996. Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in endothelial cells by the combined action of TNF- α and IFN γ . *J. Immunology* 157: 1233-1241
- Roche J., Gorka Cl., Goeltz P., Lawrence J.J. 1985. Association of histone H1 with a gene repressed during liver development. *Nature* 314, 197-198
- Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771
- Rodríguez C., Almendro N., Delgado M.D., Nueda A., Muñoz E., León J., Bernabéu C., Corbí A. 1997. c-Myc-mediated repression of CD11c, CD31 and CD11a gene promoter activity. Mapping of a USF-binding site and a c-Myc-responsive element in the CD11c integrin gene promoter. Sometido
- Rohlein R., Czajkowski M., O'Neill M.M., Marlin S.D., Mainolki E. and Merluzzi M.J. 1988. Induction of cellular adhesion molecule-1 on primary and continuous cell lines by proinflammatory

- cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 141, 1665-1669
- Romer H. L., McLean N. V., Yan H.-C., Daise M., Sun J. and DeLisser M. H.** 1995. IFN- γ and TNF- α induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J. Immunology*, 154: 6582-6592
- Ron D., Brasier A.R., Wright K.A., Tate J.E., Habener J.F.** 1990. An inducible 50-kilodalton NF κ B like protein and a constitutive protein both bind the acute-phase response element of the angiotensinogen gene. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1023
- Rosenkranz-Weiss P., Sessa W.C., Milstien S., Kaufman S., Watson C.A. and Pobe, J.S.** 1993. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 93: 2236
- Rosenstein Y., Park J.K., Hahn W.C., Rosen F.S., Bierer B.E. and Burakoff S.J.** 1991. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature.* 354: 233-235
- Rosmarin A.G., Levy R., Tenen D.G.** 1992. Cloning and analysis of the CD18 promoter. *Blood* 79: 2598
- Roossien F.F., de-Rijk D., Bikker A., Roos E.** 1989. Involvement of LFA-1 in lymphoma invasion and metastasis demonstrated with LFA-1-deficient mutants. *J. Cell Biol.* 108: 1979-1989
- Rossi P., G. Karsenty A.B. Roberts N.S. Roche, M.B. Sporn and B. de Crombrugge.** 1988. A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor- β . *Cell* 52: 405-414
- Roubin R., H. Deagostini-Bazin, M.R. Hirsch and C. Goridis.** 1990. Modulation of N-CAM expression by transforming growth factor- β serum, and autocrine factors. *J. Cell Biol.* 111: 673-684
- Roy A., Meisterernst M., Pognonec P., Roeder R.G.** 1991. Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 354: 245
- Roy A.L., Carruthers C., Gutjahr T., Roeder R.G.** 1993. Direct role of c-Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* 365, 359-361
- Rubanyi G.M., Romero J.C., Vanhoutte P.M.** 1986. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 250, H1145-H1149
- Ruoslahti E. and M.D. Pierschbacher.** 1987. New perspectives en cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-495
- Ruppert M., Aigner S., Hubbe M., Yagita H. and Altevogt P.,** 1995. Constitutive alpha V beta 3 integrin-mediated adhesion of human lymphoid B cells to vitronectin substrate. *J. Cell Biol.* 131:1881
- Salcedo R. and Patarroyo M.** 1995. Constitutive alpha V beta 3 integrin-mediated adhesion of human lymphoid B cells to vitronectin substrate. *Cell. Immunol.* 160: 165-172
- Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Vol. 3: sec 16. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sanders W.E., Wilson R.W., Ballantyne C.M., Beaudet A.L.** 1992. Molecular cloning and analysis of *in vivo* expression of murine P-selectin. *Blood* 80: 795-800
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463-5467.
- Sato D., Chang X-J., Barone K.M., Vachino G.M, White H.M., Shaw G., Veldman G.M., Bean K.M., Ahern T.J., Furie B., Cumming D.A. and Larsen G.R.** 1993. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75, 1-20
- Schleimer R.P., Sterbinsky S.A., Kaiser J., Bickel C.A., Klunk D.A., Tomioka K., Newman N., Lusinskas M.A., Gimbrone M.A., McIntyre B.W., Bochner B.S.** 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. *J. Immunol.* 148: 1086
- Schmits R., Kundig T.M., Baker D.M., Shumaker G., Simard J.J., Duncan G., Wakeham A.** LFA-1-deficient mice shows normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. 1996. *J. Exp. Med.* 183: 1681
- Schimmenti L.A., Yan H.-C., Madri J.A. and Albelda S.M.** 1992. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1, modulates cell migration. *J. Cell. Physiol.* 153: 417-428

- Schreck R.**, Bauerle P.A. 1990. NF κ B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1281
- Schreck R.**, Meier B., Männel M. D., Dröge W. and Baeuerle A. P. 1992. Dithiocarbamates as potent inhibitors of Nuclear Factor κ B activation in intact Cells. *J. Exp. Med.* 175: 1181-1194
- Schreiber E.** 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with miniextracts prepared from a small number of cells. *Nucl. Acid Res.* 17: 6419
- Scott M.L.**, Fujita T., Liou H.-C., Nolan G.P., Baltimore D. 1993. The p65 subunit of NF- κ B regulates I κ B by two distinct mechanisms. *Genes Dev.* 7, 1266-1276
- Sehgal A.**, Patil N., Chao M. 1988. A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol. Cel. Biol.* 8, 3160-3167
- Sen R.**, Baltimore D. 1986. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF κ B by a postranslational mechanism. *Cell* 4: 921
- Seto E.**, Shi Y., and Shenk T. 1991. YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature* 354: 241-244
- Schindeler U.**, Baichwal V.R. 1994. Three NF- κ B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5820-5831
- Shankar R.**, de la Motte C., DiCorleto P.E. 1992. 3-deazaadenosine inhibits thrombin-stimulated platelet-derived growth factor production and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 mediated monocytic cell adhesion in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267: 9376-9382
- Shelley C.S.**, Arnaout M.A. 1991. The promoter of the CD11b gene directs myeloid-specific and developmentally regulated expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10525
- Shimizu H.**, Mitomo K., Watanabe T., Okamoto S., Yamamoto K.-I. 1990. Involvement of a NF κ B like transcriptional factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol. Cell. Biol.* 10: 561
- Shimizu Y.**, Van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. 1990a. Regulated expression and binding of three VLA (β_1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345: 250-253
- Shimizu Y.**, Shaw S., Graber N., Gopal T.V., Horgan K.J., Van Seventer G.A. and Newman W. 1991. Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1. *Nature*, 349: 799-802
- Shimizu Y.**, W. Newman Y. Tanaka and S. Shaw. 1992. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today* 13:106-112
- Shimizu Y.**, Van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. 1990b. Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and co stimulation. *Immunol. Rev.* 114: 109-143
- Singh J.**, Dixon G.H. 1990. High mobility group proteins 1 and 2 functions as general class II transcription factors. *Biochem* 29, 6295-6302
- Shirakawa F.**, Chedid M., Suttles J., Pollok B.A., Mizel S.B. 1989. Interleukin 1 and cyclic AMP induce κ immunoglobulin lightchain expression via activation of an NF κ B like DNA-binding protein . *Mol. Cel. Biol.* 9: 959
- Shu H. B.**, Agranoff A. B. Nabel E. G., Leung K., Duchett C. S., Neish A. S., Collins T., and Nabel G. (1993). Differential regulation of vascular cell adhesion molecule 1 gene is medited by NF- κ B subunits in endothelial and epithelial cels. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6283-6289
- Shull M.M.**, Y. Ormsby, A.B. Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, N. Annunziata and T. Doetschman. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699
- Shyy Y.-J.**, Hsieh H.-J., Usami S., Chien S. 1994. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4678-4682
- Siegelman M.H.**, van den Rijn M. and Weissman I.L. 1989. Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science* 243, 1165-1172
- Simmons D.**, Makgoba M.W., Seed B. 1988. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339, 61-64

- Simmons D.L.**, C. Walker, C. Power and R. Piggot. 1990. Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. *J. Exp. Med.* 171:2147-2152
- Sims P.J.**, Ginsberg M.H., Plow E.F., Shattil S.J. 1991. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 266: 7345-7352
- Skubitz K.M.**, S.A. Goueli. 1994. CD31 (PECAM-1), Cdw32 (FcγRII) and anti-HLA Class I monoclonal antibodies recognize phosphotyrosine-containing proteins on the surface of human neutrophils. *J. Immunol.* 152:5902-5911
- Smale S.T.**, Baltimore D. 1989. The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103
- Smith C.W.** 1993. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 76-87
- Smith G.M.**, Whelan J., Pescani R., Ghersa P., DeLamarter F., v. Huijsduijnen R.H. 1993. ADN methylation of the E-selectin promoter represses NF-kappa B transactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 215
- Smith G.M.**, Whelan J., Pescani R., Ghersa P., DeLamarter F., and v. Huijsduijnen R. H. 1993. DNA-methylation of the E-Selectin promoter represses NFκB transactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 215-221
- Solomon D.L.C.**, Amati B. and Land H. 1993. *Nucleic Acids Res.* 21: 5372-5376
- Southern E.P.** 1975. Detection of specific ADN sequences among ADN fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- Southern P.J.** and P. Berg. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* 1:327-341
- Sporn M.B.**, Roberts A.B., Wakefield L.M., de Crombrughe B. 1987. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* 105: 1039
- Springer T.A.** 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-433
- Springer T.A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314
- Staunton D.E.**, Dustin M.L., Springer T.A. 1989. Functional cloning of ICAM-1, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339, 61-64
- Stein B.**, Cogswell P.C., Baldwin A.S. 1993. Functional and physical associations between NFκB and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3964-3974
- Stelzer G.**, Goppelt A., Lottspeich F., Meisterernst, M. 1994. Repression of basal transcription by HMG2 is counteracted by TFIIH-associated factors in an ATP-dependent process. *M.C.Biol.* 14, 4712-4721
- Stewart R. J.**, Kashour T.S., and Marsden P.A. 1996. Vascular endothelial platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF-α and IFN-γ. *J. Immunology*, 156: 1221-1228
- Stockinger H.**, S.J. Gadd, R. Eher, et. al. 1990. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J. Immunol.* 145:3889-3897
- Stolpen A.H.**, Guinan E.C., Fiers W. and Pober J.S. 1986. Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayer. *Am. J. Pathol* 123: 16
- Stolpen A.H.**, Golan E. and Pober J.S. 1988. Tumor necrosis factor and immune interferon act in concert to slow the lateral diffusion of proteins and lipids in human endothelial cell membranes. *J. Cell Biol.* 107: 781
- Stone R.L.**, Dixon J.E. 1994. Protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol.Chem.* 269: 31323-31326
- Stoolman L.M.** and Kaldjian E. 1992. Adhesion molecules involved in the trafficking of normal and malignant leukocytes. *Invasion Metastasis* 12: 101-111
- Strauch U.G.**, Lifka A., Gossler U., Kilshaw P.J., Clements J. and Holzmann B. 1994. Distinct binding specificities of integrins α4β7 (LPAM-1), α4β1 (VLA-4), and αIELβ7. *Int. Immunol.* 6, 263-275
- Streeter P.R.**, Berg E.I.L., Rouse B.T.N., Bargatze, R.F. and Butcher E.C. 1988. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331, 41-46

- Streuli M.** 1996. Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 182-188
- Stone R.L.** and **Dixon J.E.** 1994. Protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 269: 31323-31326
- Sugama Y., Tirupathi C., Janakidevi K., Andersen T.T., Fenton J.W.II., Malik A.A.** 1992. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J. Cell Biol.* 119: 935-944
- Sun S.-C., Ganchi P., Ballard D., Greene W.** 1993. NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-1915
- Suzuki Y., Wang W., Vu T.H., Raffin T.A.** 1992. Effect of NADPH oxidase inhibition on endothelial cell ELAM-1 mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184: 1339-1343
- Takahashi N., Ueda S., Obata M., Nikaido T., Nakai S., Honjo T.** 1982. Structure of human Immunoglobulin gamma genes: Implications for evolution of a gene family. *Cell* 29: 671
- Takehara K., LeRou E.C., Grotendorst G.R.** 1987. TGF- β inhibition of endothelial cell proliferation alteration of the EGF binding and EGF-induced growth-regulatory (competence) gene regulation. *Cell* 49: 419-422
- Takeichi M.** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. 1991. *Science*, 251, 1451-1455
- Takeuchi M., Baichwal V.R.** 1995. Tumor necrosis factor-alpha induction of MAdCAM-1 gene is mediated by NF- κ B proteins. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 92, 3561-3565
- Tamatani T., Kitamura F., Kuida K., Shirao M., Mochizuki M., Suematsu M., Schmid-Schönbein G.W., Watanabe K., Tsurufuji S. and Miyasaki M.** 1993. Characterization of rat LECAM-1 (1-selectin) by the use of monoclonal antibodies and evidence for the presence of soluble LECAM-1 in rat sera. *Eur. J. Immunol.* 23, 2181-2188
- Tanaka Y., S.M. Albelda, K.J. Horgan, et. al.** 1992. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of β 1 integrin-mediated adhesion. *J.Exp.Med.* 176: 245-253
- Tazi J., Bird A.** 1990. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60: 909
- Tedder T.F., Isaacs C.M., Ernst T.J., Demetri G.D., Adler D.A. and Disteché C.M.** 1989. Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins. *J.Exp. Med.* 170,123-133
- Teng D.J., Y.Q. Chen, P.J. Newman, et. al.** 1993. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J. Biol. Chem.* 268: 22833-22894
- Terry R.W., Kwee L., Levine J.F. and Labow M.A.** 1993. Cytokine induction of an alternatively spliced murine vascular cell adhesion molecule (VCAM) mRNA encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored VCAM protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5919-5923
- Thanos D., Maniatis T.** 1995. NF- κ B: a lesson in family values. *Cell*, 80. 529-532
- Thomas J.O.** 1984. *J.Cell Sci. Suppl.* 1, 1-20
- Thompson J.E., Philips R.J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Ghosh S.** 1995. I κ B- β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell*, 80; 573-582
- Thornhill M.H., Haskard D.O.** 1990. IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor or IFN- γ . *J. Immunol.* 145: 865-872
- Torimoto Y., D.M. Rothstein, N.H. Dang, S.F. Schlossman and C. Morimoto.** 1992. CD31, a novel cell surface marker for CD4 cells of suppressor lineage, unaltered by state of activation *J. Immunol.* 148:388-396
- Torres R., Schreiber-Agus N., Morgenbesser S.D., DePinho R.A.** 1992. Myc and Max: a putative transcriptional complex in search of a cellular target. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 468-474
- Traenckner E.B.-M., Wilk S., Baeuerle P.A.** 1994. A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B. *EMBO J.* 13, 5433-5441
- Tremethick D.J., Molloy P.L.,** 1986. High mobility group proteins 1 and 2 stimulate transcription *in vitro* by RNA polymerase II and III. *JBC* 261, 6986
- Tremethick D.J., Molloy P.L.** 1988. Effects of high mobility group proteins 1 and 2 of initiation and elongation of specific transcription by RNA polymerase II *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* 16, 11, 1107

- Tsai S.F., Martin K.I.K., Lzon L.I., D' Andrea A.D., Wong G.G., and Orkin S.H. 1989. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature (Lond.)* 339: 446
- Tsai S.F., Strauss E., and Orkin S.H. 1991. Functional analysis and *in vivo* footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes and Dev.* 5: 919
- Van de Wiel-Van Kemenade E., Van Kooyk Y., De Boer A., Huijbens R.J.F., Weder P., Van de Kastele W., Melief C.J.M., Figdor C.G. 1992. Adhesion of T and B lymphocytes to extracellular matrix and endothelial cells can be regulated through the β -subunit of VLA. *J. Cell Biol.* 117: 461-470
- Van den Ouweland A.M.W., Roebroek A.J., Schalken J.A., Claesen C.A.A., Bloemers H.P.J., Van den Ven W.J.M. Structure and nucleotide sequence of the 5' region of the human feline-c-sis proto-oncogenes. *Nucleic Acids Res.* 14, 5028-5037
- Van Hinsbergh V.W.M., Van den Berg E.A., Fiers W., Dooijewaard G. 1990. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blood* 75: 1991-1998
- van Holde K.E. 1989. Chromatin. Springer-Verlag. New York
- van Kooyk Y., Van der Wiel-van Kemenade P., Weder P., Kruijpers T.W., Figdor C.G. 1989. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342: 811-812
- van Kooyk Y., Van de Wiel van Kemenade E., Weder, P., Huijbens J.F. and Figdor C.G. 1993. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) dominates very late antigen 4 (VLA-4) in binding of activated T cells to endothelium. *J. Exp. Med.* 177: 185-190
- van Mourik J.A., O.C. Leeksa, J.H. Reinders, P.G. de Groot and J. Zandbergen-Spaargaren. 1985. Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa. *J. Biol. Chem.* 260:11300-11306
- Vaporician A.A., H.M. DeLisser H-C. Yan *et al.*, 1993. Involvement of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 in Neutrophil Recruitment *in vivo*. *Science* 262:1580-1582
- Varga-Weisz P., van Holde K.E., Zlatanova J. 1994. Competition between linker histones and HMG-1 for binding to four-way junction ADN: implications for transcription. *BBRC* 203, 1904
- Verde P., Boast S., Franze A., Robbiati F., Blasi F. 1988. An upstream enhancer and a negative element in the 5' flanking region of the human urokinase plasminogen activator gene. *Nucleic Acids Res.* 16, 10699-10716
- Vogel W., Lammers R., Huang J. and Ullrich A. 1993. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* 259: 1611-1614
- von Andrian U.H., Chambers J.D., McEvoy L.M., Bargatze R.F., Arfors K., and Butcher E.C. 1991. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β_2 integrins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7538-7542
- Voraberger G., R. Schafer and C. Stratowa. 1991. Cloning of the human gene for the intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J. Immunol.* 147:2777-2786
- Wang Z.Y., Madden S.L., Deuel T.F., Rauscher F.J. 1992. The Wilms' tumor gene product, WT-1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J. Biol. Chem.* 267: 21999-22002
- Wasylyk B. 1993. The *ets* family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211: 7-18
- Watson M.L., Kingsmore S.F., Johnston G.I., Siegelman M.H., Le BM., Lemons R.S., Bora N.S., Howard T.A., Weissman I.L., McEver R.p., *et al.* 1990. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome I. *J. Exp. Med.* 172, 263-272
- Watt F., Mollouy P. 1988. High mobility group proteins 1 and 2 stimulate binding of a specific transcription major late promoter factor to the adenovirus major late promoter. *Nucl. Acids Res.* 16, 14711486

- Watt S.M., J. Williamson, H. Genevier, *et. al.* 1993. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule es expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 82:2649-2663
- Weintraub H. 1984. *Cell* 38, 17-27
- Weintraub H. 1985. Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell* 42, 705-711
- Weiss L., Orr F.W. and Honn K.V. 1989. Interactions between cells and the microvasculature: a rate-regulator for metastasis. *Clin. invest. Metastasis*. 7: 127-167
- Weiss M.J., Orkin S.H., 1995. GATA transcription factors. Key regulators of hematopoiesis. *Experimental Hematology* 23: 99
- Weissman I.L. and Cooper M.D. 1993. How the immune system develops. *Sci.Am.* 269 (3): 33-39
- Weller A., Isenmann S. and Vestweber D. 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins: Expression of both E and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 267, 15176-15183
- Wellicome R.L., Kapahi P., Mason J.C., Lebranchu Y., Yarwood H. and Haskard D.O. 1993. Detection of a circulating form of vascular cell adhesion molecule-1: Raised levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 92, 412-418
- Whelan J., Ghersa P., Hooft van Huijsduijnen R., Gray J., Chandra G., Talabot F., DeLamarter J.F. 1991. An NF κ B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic Acids Res* 19: 2645-2653
- Whelan J. 1996. Selectin synthesis and inflammation. *TIBS* 21, 65-69
- Whetton A.D., Heyworth C.M., Nicholls S.E., Evans C.A., Lord J.M., Dexter T.M., Owen-Lynch P.J. 1994. Cytokine-mediated protein kinase C activation is a signal for lineage determination in bipotential granulocyte macrophage colony-forming cells. *J. Cell Biol.* 125: 651
- White G.E., Gimbrone M.A., Fujiwara K. 1983. Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ. *J. Cell. Biol.* 97, 416-424
- Whitley M.Z., Thanos D., Read M.A., Maniatis T., Collins T. 1994. A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol. Cell- Biol.* 14, 6464-6475
- Weller A., Isenmann S., Vestweber D. 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins: expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem* 267: 15176-15183
- Williams T. and R. Tijan. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes & Dev.* 5: 670
- Wolffe A. 1992. Chromatin: Structure and function. Academic Press, San Diego. CA.
- Wolffe A.P. Transcription in tune with the histones. 1994. *Cell* 77,13-16
- Wood K. V. (1991). Bioluminescence: Current Status. Eds. Stanley P. & Kricka, L. John Wiley & Sons Ltd. Chichester
- Wong E.V., Kenwrick S., Willems P. and Lemmon V. 1995. Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *Trend. Neurosci.* 18: 168-172
- Wrana J.L., Attisano L., Cárcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X.-F., Massagué J. 1992. TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71. 1003-1014
- Xie Y. and W.A. Muller. 1993. Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5569-5573
- Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R., Lawhorne L. & Treiber G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. *Virology* 40: 734
- Yano O., Kanellopoulos J., Kieran M., Le Bail O., Israël A., Kourilsky P. 1987. Purification of KBF1, a common factor binding to both H-2 and beta2-microglobulin enhancers. *EMBO J.* 6, 3317-3324
- Yi, E.S. and Ulich, T.R. 1992. Endotoxin, interleukin-1 and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. *Am. J. Pathol.* 140: 659
- Yisraeli J., Adelstein D., Melloul D., Nudel D., Nudel U., Yaffe D., Cedar H. 1988. Effect of in vitro ADN methylation on β globin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4638

- Yoshizumi M.**, Kurihara H., Sugiyama T., Takaku F., Yanagisawa M., Masaki T., Yazaki Y. 1989. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 859-864
- Yoshizumi M.**, Perrella M. A., Burnett J.C.J. and Lee M. C. 1993. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ. Res.* 73:205
- Zehnder J.L.**, J. Hirai., M. Shatsky., J.L. McGregor., L.J Levitt and L.L.K. Leung. 1992. The cell adhesion molecule CD31 is phosphorylated after cell activation. *J. Biol. Chem.* 267:5243-5249.
- Zhang Y.**, Lin J.-X., Vilcek J. 1990. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a κ B-like sequence. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3818
- Zlatanova J.**, van Holde K.E. 1992. Histona H1 and transcription: still an enigma ?. *J.Cell Sci.* 103, 889-895
- Zimmerman G.A.**, Prescott S.M., McIntyre T.M. 1992. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol. Today* 13: 93-100

7.- ANEXO

Parte del trabajo experimental descrito en la presente tesis ha sido publicado en las revistas científicas que se detallan a continuación:

Almendro N., Bellón T., Rius C., Lastres P., Langa C., Corbí A., Bernabéu C. 1996. Cloning of the human PECAM-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization. 1996. *J. Immunology*, 157: 5411-5421

Lastres P., **Almendro N.**, Bellón T., López-Guerrero J.A., Eritja R., Bernabéu Carmelo. Functional regulation of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 by TGF- β 1 in promonocytic U-937 cells. 1994. *J. Immunology*, 153: 4206-4218

López-Rodríguez C., **Almendro N.**, Delgado D., Nueda A., Muñoz E., León J., Bernabéu C., Corbí A.L. 1996. C-Myc as a repressor of the transcriptional activity of CD11a, CD11c and CD31. Sometido.

Cloning of the Human Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Promoter and Its Tissue-Specific Expression

Structural and Functional Characterization^{1,2}

Nuria Almendro,* Teresa Bellón,* Carlos Rius,* Pedro Lastres,* Carmen Langa,* Angel Corbí,[†] and Carmelo Bernabéu^{3*}

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1; CD31) is a cell adhesion molecule involved in transendothelial migration and expressed by hemopoietic and endothelial cells. To understand the mechanisms underlying its regulated expression, a genomic clone containing 1555 bp of the 5'-flanking region and the first exon of the human PECAM-1 gene has been isolated. The 5'-flanking region of the PECAM-1 gene lacks a consensus TATA box, but contains consensus motifs for Sp1, EGR1, ets, helix-loop-helix (HLH) box, GATA, AP-2, C/EBP, YY1, CCACC, LyF-1, imperfect octamer, heptamer, high mobility group proteins (HMG) box, and nuclear factor- κ B, as well as shear stress-, retinoic acid-, glucocorticoid-, and acute phase-responsive elements, and an Alu sequence. Successive 5' to 3' or 3' to 5' deletions revealed tissue-specific promoter activity within the two contiguous 0.22-kb *NheI/BglII* and 0.44-kb *BglII/PstI* fragments. The transcriptional activity displayed by the 0.22-kb *NheI/BglII* fragment was specific for the myeloid lineage, whereas the promoter activity of the 0.44-kb *BglII/PstI* fragment was apparently restricted to endothelial cells. The transcriptional activity of the 0.22-kb *NheI/BglII* fragment was confirmed by 5' RACE (rapid amplification of 5' cDNA ends) and S1 nuclease protection experiments that revealed previously unidentified transcription start sites. The 0.22-kb *NheI/BglII* promoter exhibited PMA inducibility in myeloid cells and contained a PMA-responsive element recognized by Sp1 and EGR-1 transcription factors. Isolation and characterization of the human PECAM-1 promoter represent an initial step in elucidating the controlled expression of the PECAM-1 gene. *The Journal of Immunology*, 1996, 157: 5411–5421.

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1),⁴ also known as CD31, is a single chain membrane glycoprotein present in platelets, monocytes, macrophages, granulocytes, a subpopulation of T cells, and endothelium (1). Within the myeloid lineage, PECAM-1 expression increases during the macrophage differentiation process (2–6). Also, the expression of PECAM-1 is greatly increased in a PKC-dependent manner upon treatment of monocytic cell lines with TGF- β (7). PECAM-1 is an important mediator of endothelium/myeloid cell interactions, as Abs to PECAM-1 are able to interfere neutrophil and monocyte recruitment and transendothelial migration (8, 9). The intercellular adhesion mechanism mediated by PECAM-1 in-

volves at least three different types of interactions: 1) homophilic PECAM-1/PECAM-1 (10), 2) heterophilic PECAM-1/ $\alpha_v\beta_3$ (11), and 3) heterophilic PECAM-1 with an unidentified proteoglycan (12). On the other hand, triggering of cellular adhesion mediated by β_1 and β_2 integrins in T cells upon engagement of PECAM-1 has been reported (13, 14). Several lines of evidence support an important role of the cytoplasmic domain in modulating the adhesive properties of PECAM-1. First, recombinant PECAM-1 constructs lacking part of the cytoplasmic domain change from heterophilic to homophilic binding (15). Second, cellular activation of platelets or treatment with TGF- β 1 of monocytic cells leads to phosphorylation of the cytoplasmic region of PECAM-1 and association with cytoskeletal components (7, 16, 17). In addition, alternative splicing of the cytoplasmic tail appears to generate multiple PECAM-1 isoforms that may regulate phosphorylation, cytoskeletal association, and binding specificity of the mature protein (18–20).

Molecular cloning of its cDNA demonstrated that it contains six extracellular Ig-like domains of the C2 type that are characteristic of the Ig superfamily members known as cell-cell adhesion molecules (10, 21–23). The PECAM-1 gene has been localized to human chromosome 17 and is a single copy gene, approximately 65 kb in length, containing 16 exons broken by introns ranging in size from 86 to >12,000 bp (20). The 5' boundary of the first exon has been determined by primer extension analysis in endothelial cells, which revealed a transcription initiation site 204 bp upstream from the translation start site. To gain further insight into the regulatory regions of PECAM-1 gene expression in myeloid cells, we have isolated and characterized a genomic clone containing the PECAM-1 promoter.

Materials and Methods

Screening of genomic library

A human placenta genomic library in phage λ EMBL3 was screened by plaque hybridization with the synthetic oligonucleotide PE 2 (5'-GTTGA

*Department of Immunology, Center of Biological Investigations, High Council of Scientific Investigations, Madrid; [†]Institute of Parasitology and Biomedicine, High Council of Scientific Investigations, Granada, Spain

Received for publication February 27, 1996. Accepted for publication September 23, 1996.

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

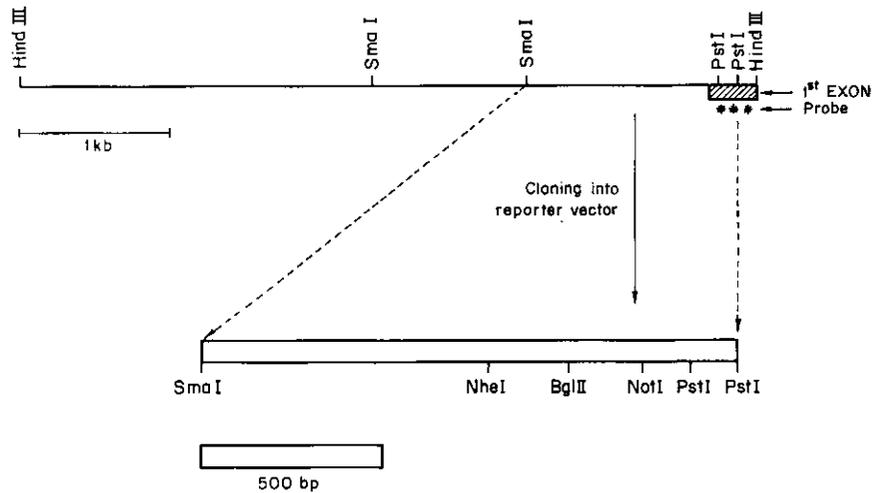
¹ This work was supported by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT-SAF94-0791), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM), and Biomed Program of the European Community (BMH4-CT95-0995; to C.B.) and from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM95/0101; to A.C.).

² The sequences discussed herein have been deposited in EMBL/GenBank under accession numbers X96848 and X96849.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Carmelo Bernabéu, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, 28006 Madrid, Spain.

⁴ Abbreviations used in this paper: PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1; PKC, protein kinase C; DOG, 1,2-dioctanoylglycerol; OAG, 1-octanoyl-2-acetylglycerol; H7, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine; BAEC, bovine aortic endothelial cells; 5' RACE, rapid amplification of 5' complementary deoxyribonucleic acid ends; wt, wild type; HLH, helix-loop-helix; HMG, high mobility group proteins; NF- κ B, nuclear factor- κ B; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1.

FIGURE 1. Partial restriction enzyme map of the 5'-flanking region and part of exon 1 of the PECAM-1 gene. The top line indicates a 5-kb *HindIII* fragment containing part of the first exon (hatched box) and the location of the probe (asterisks) used for the screening. The 1.42-kb *SmaI/PstI* fragment (large open box) and derived subfragments were cloned into a luciferase promoter-reporter vector.



GAAACCCGCCCTGTGAAAAGC-3') corresponding to the 5' region of PECAM-1 cDNA (10). The oligonucleotide probe was end-labeled with [γ - 32 P]ATP using polynucleotide kinase and hybridized with the library at 65°C overnight in a 6 \times SSC/0.5% SDS/5 \times Denhardt's solution. Filters were washed at 65°C with 2 \times SSC/0.1% SDS. After four rounds of screenings, positive clones were isolated, and one of them (no. 4121) was selected for further analysis. A 5-kb *HindIII* genomic fragment that encodes the 5' untranslated region of PECAM-1 mRNA was inserted in a *HindIII*-digested pBS plasmid (Fig. 1). Sequencing was performed using the dideoxynucleotide chain termination method (Pharmacia, Uppsala, Sweden) with plasmid- and PECAM-1-specific primers.

Plasmid constructions

To assay for promoter activity, the 1.42-kb *SmaI/PstI* genomic fragment contained within the 5-kb *HindIII* insert in pBS (Fig. 1) was made blunt and inserted into *SmaI*-digested pXP2 that contains the promoterless firefly luciferase gene (24), resulting in pCD31-1.42-LUC. To generate deletions of the PECAM-1 promoter, we used unique restriction sites inside the genomic 1.42-kb *SmaI/PstI* fragment. Reporter plasmids containing the following fragments were constructed: 0.66-kb *NheI/PstI* (pCD31-0.66-LUC), 0.44-kb *BglII/PstI* (pCD31-0.44-LUC), 0.25-kb *NotI/PstI* (pCD31-0.25-LUC), 0.98-kb *SmaI/BglII* (pCD31-0.98-LUC), 0.76-kb *SmaI/NheI* (pCD31-0.76-LUC), and 0.22-kb *NheI/BglII* (pCD31-0.22-LUC). Correct orientation was verified in each construct.

Cells

U-937 (human promonocytic), HEL (human erythromegakaryoblast), K562 (human erythroleukemia), HeLa (human cervical carcinoma), and NCTC-929 (mouse fibroblast) cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml), and gentamicin (25 μ g/ml) in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Flow cytometry and Northern blot analyses revealed that U-937, HEL, and K562 are positive for PECAM-1 expression, whereas HeLa and NCTC-929 lack PECAM-1 expression (5, 6, 25) (data not shown). PKC activation in U-937 cells was performed in the presence of 10 ng/ml PMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 100 μ g/ml 1,2-dioctanoylglycerol (DOG), or 100 μ g/ml 1-octanoyl-2-acetyl-glycerol (OAG) for 2 days. Experiments with the inhibitors of PKC, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine (H-7) and staurosporine, were conducted by culturing 5×10^5 cells/ml with 50 to 200 μ M H-7 or 100 nM staurosporine for 30 min before PMA or DAG treatment. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were isolated from cannulated vessels incubated in the presence of collagenase for 20 min at 37°C. Detached cells were plated in gelatin-coated flasks and grown in DMEM supplemented with 10% FCS. BAEC have been shown to express PECAM-1 at the cell surface (10).

Transfection

Plasmid DNA was obtained using the alkaline lysis method and purified using polyethylene glycol (26). Transfections on U-937, HEL, and K562 cells were performed by electroporation (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with a single pulse at 250 V and 960 μ F capacitance conducted across a cuvette of a 0.4-cm electrode gap. The decay constant for these electroporations was generally 30 ms. Each cuvette contained 500 μ l of RPMI 1640 or HEBS medium (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM

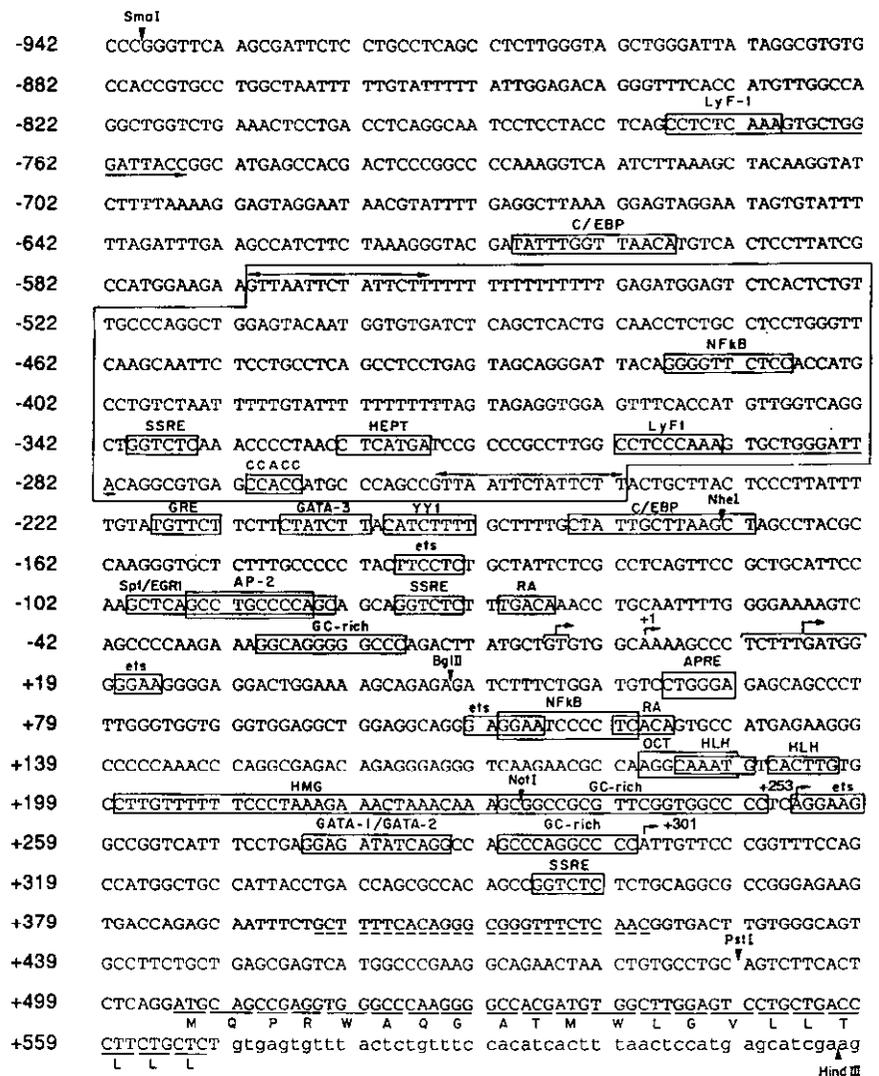
Na₂HPO₄, 6 mM dextrose, and 20 mM HEPES, pH 7.05) with 2×10^7 cells, 40 μ g of the appropriate PECAM-1 luciferase vector, and 10 μ g of β -galactosidase (pCMV β gal) or alkaline phosphatase (pSEAP-control vector, Clontech) expression vectors as an internal control. Cells were incubated on ice for 15 min before and after electroporation and then resuspended in 10 ml of RPMI 1640 containing 10% FCS in a 75-cm² flask (Costar, Cambridge, MA). After 14 h, transfected cells were lysed in 50 μ l of cell reporter lysis buffer (Promega), and luciferase, β -galactosidase, and alkaline phosphatase activities were estimated. The effect of phorbol ester on promoter activity was assayed by the addition of PMA (40 ng/ml) to half of the transfected cells immediately after electroporation. HeLa and NTC-929 cells were transfected using lipofectin (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Briefly, 15 μ g of the test plasmid and 7.5 μ g of CMV β gal were mixed with 20 μ g of lipofectin in RPMI 1640, and the mixture was incubated with the cells for 24 h. Then, RPMI 1640 containing 10% FCS was added, the cells were incubated for an additional 24-h period, and the corresponding enzymatic activities were assayed. Transfections of BAEC were performed following the calcium phosphate technique. Briefly, cells were plated at 4×10^5 cells/60-mm culture dish, and the following day they were transfected with calcium phosphate precipitates containing 7.5 μ g of CMV β gal mixed with 15 μ g of the test plasmid. After transfection, cultures were washed and replenished with complete medium. Cells were harvested 48 h after transfection, and the enzymatic activities were estimated.

Internal normalization was performed by cotransfection of the test plasmids with β -galactosidase or alkaline phosphatase expression vectors. After normalization, the activity of the reporter constructs was referred to the activity of the pSV40-Luc (SV40 promoter linked to the luciferase gene) plasmid in each cell line.

Rapid amplification of 5' cDNA ends (5' RACE)

The 5' RACE experiments were conducted to map the transcriptional start site. For cDNA synthesis, 10 μ g of total RNA from PMA-treated U-937 cells was reverse transcribed at 44°C for 30 min using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Clontech) and primer PE 3 (5'-CATCCTGAGAGTGAAGACTGCAGGCACAGTTAGTTCTGCCTTC-3'), corresponding to the 5' region of the PECAM-1 cDNA sequence (10). After hydrolysis of the RNA using NaOH, the cDNA was purified using a glass matrix support (GENOBIND particles, Clontech). A single-stranded 35-mer anchor oligonucleotide (Clontech) was ligated to the 3' end of the cDNA by T4 RNA ligase. The anchor-ligated cDNA was then used as template for PCR amplification using Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) in the presence of the anchor oligonucleotide and either PE 4 or PE 5 nested primers. The sequence of the primer PE 4 was: 5'-TGAAAAGCAGAAATTGCTCT-3'. The sequence of the primer PE 5 was: 5'-AGAGAGACCGGCTGTGGCGC-3'. The reaction was conducted for 30 cycles with 5 μ M of each primer in 100 μ l of reaction mixture using a step program (95°C, 45 s; 56°C, 45 s; 72°C, 1 s), followed by a 10-min final extension at 72°C. The PCR products were annealed into the TA CLONING PCR II vector (Invitrogen, San Diego, CA). After annealing of the insert DNA to the vector, the plasmid was transformed into DH5 α competent cells and spread on plates containing ampicillin and X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Twenty-four white colonies were selected for plasmid purification. DNA sequencing was performed to identify the recombinant clones.

FIGURE 2. The nucleotide sequence of the 5'-flanking region and part of the first exon of the PECAM-1 gene. Numbers at the left margin refer to the transcription start site (+1) determined by 5' RACE analysis in this paper. Arrows indicate the transcription start sites reported here (positions -7, -6, +1, +9 to +18, and +253) or elsewhere (position +301) (20). The location of the oligonucleotide used for screening and sequencing is underlined with a dashed line. Consensus sequences for binding to transcription factors are boxed and labeled. These include binding sites for ubiquitous, cell type-specific, and differentiation-dependent transcription factors, including Sp1, EGR-1, LyF-1, AP-2, ets, YY1, GATA-1, GATA-2, GATA-3, CCACC, NF- κ B, heptamer (HEPT), imperfect octamer (OCT), HLH, HMG, and glucocorticoid (GRE)-, retinoic acid (RA)-, acute phase (APRE)-, and shear stress (SSRE)-responsive elements. The two LyF-1 sites are flanked at the 3' region by an identical 13-nucleotides sequence (underlined). An Alu sequence, located between -571 and -242, is boxed. Two short direct repeats of 15 nucleotides (overlined) flank the Alu sequence. This nucleotide sequence has been assigned the EMBL/GenBank accession number X96848. The derived amino acid sequence is shown underneath the coding region of the first exon, using the single letter code.



S1 nuclease protection analysis

S1 nuclease analysis was performed using a commercial kit (S1 assay, Ambion, Inc., Houston, TX). The oligonucleotide PECAM-1-4as (5'-GTCTGTCTTTTCCAGTCTCCCTTCCCCATCAAAGAGGGCTTTT GCCACACAGCATAAGT-3') was 5' labeled with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase. Approximately 5 × 10⁵ cpm of the probe was hybridized to 25 μg of total RNA from either PMA-treated U937 cells or yeast at 42°C for 18 h in a hybridization buffer containing 80% deionized formamide; 100 mM sodium citrate, pH 6.4; 300 mM sodium acetate, pH 6.4; and 1 mM EDTA. The hybrids were digested for 30 min at 37°C in an S1 nuclease buffer containing 250 U/ml of enzyme. Following ethanol precipitation, protected fragments were analyzed on a denaturing 8% polyacrylamide gel. The m.w. markers included a 5' end-labeled *Hinf*I-digested ΦX174 phage DNA. Radiolabeled bands were detected using a PhosphorImager 410A and ImageQuant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Flow cytometry determinations

Flow cytometric analyses were performed with an EPICS-CS (Coulter Cificca, Mostoles, Spain), using logarithmic amplifiers. Cells were incubated with HC1/6 (anti-CD31) (5) or TPI/8 (anti-CD69) (27) (gift from Dr. Sánchez-Madrid) mAbs for 30 min at 4°C. After two washes with PBS containing 0.1% BSA and 0.04% sodium azide, FITC-labeled F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) was added, and incubation proceeded for an additional 30-min period at 4°C. Finally, cells were washed twice, and their fluorescence was estimated.

Northern blot analysis

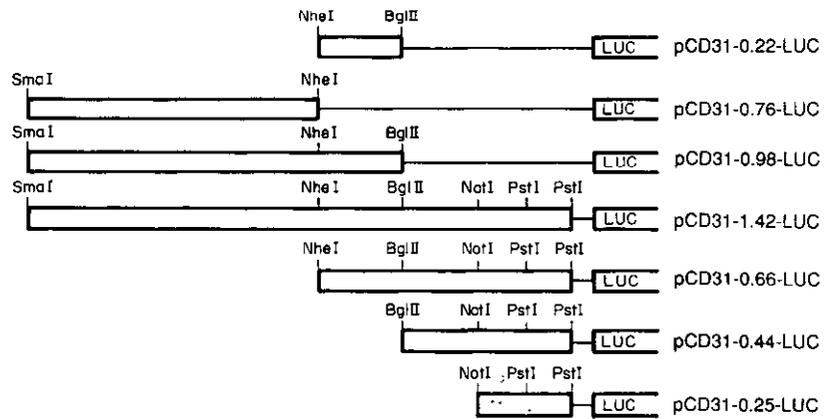
Total cellular RNA was isolated using guanidinium thiocyanate and a cesium chloride ultracentrifugation step (28). RNA samples (10 μg) were

denatured, fractionated in 1.1% agarose/formaldehyde gels, and blotted onto nitrocellulose. Membranes were hybridized in 50% formamide at 42°C with excess ³²P-labeled probes, washed under highly stringent conditions (0.2× SSC and 0.5% SDS at 65°C), and finally autoradiographed. The probe used was a 0.7-kb *Xho*I fragment of PECAM-1 cDNA.

Electrophoretic mobility shift assays

Exponentially growing U937 or K562 cells were stimulated with 100 ng/ml of PMA for 1, 24, or 48 h and washed in PBS at 4°C, and nuclear extracts from treated and untreated cells were obtained as previously described (29). The probe for the electrophoretic mobility shift assay was prepared by annealing complementary synthetic oligonucleotides and end labeling with [α -³²P]dCTP and Klenow fragment. The binding reaction was performed by preincubating 10 μg of nuclear proteins with 4 μg of poly(dI-dC) in a buffer containing 70 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 0.5 mM DTT, 0.05% (w/v) Nonidet P-40, 12% glycerol, 1 mg/ml BSA, and 20 mM HEPES, pH 7.5, on ice for 10 min. Amounts of 0.5 to 2 ng of end-labeled probe (30,000–50,000 cpm) were added to the reaction mixture containing the nuclear extract and incubated for 20 min at 4°C. Samples were electrophoresed on a 5% polyacrylamide gel in 0.5× TBE (TBE contains 89 μM Tris borate, 89 μM boric acid, and 2 mM EDTA) buffer at 150 V at room temperature for 2 h. For the competition experiments, 100-fold excesses of unlabeled oligonucleotides were incubated with the reaction mixture for 20 min before the addition of the radiolabeled probe. Similarly, Abs against Sp1 (gift from Dr. S. Jackson, Cambridge, U.K.) or EGR-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were incubated with the nuclear extracts before the radiolabeled probe was added to the reaction mixture. The sequences of the oligonucleotide probe and competitors (and their complements) used in this study were as follows: probe CD31-wild type (wt), 5'-GCATTCCAAGCTCAGCCTGCCACGACGAGGTC-3' (nucleotides -109 to -76 from the PECAM-1 genomic sequence); Sp1/

FIGURE 3. Diagram of PECAM-1 promoter-luciferase constructs. Fragments obtained by restriction enzymes digestion (open boxes) were inserted into the pXP2 reporter vector containing the luciferase gene (LUC). The positions of some reference restriction sites are indicated.



EGR1-wt, 5'-GCGTACTCTGCCCGCCCCCTCTGACTC-3'; Sp1/EGR1-Mut, 5'-GCGTACTCTGCCGAATTCCTCTGACTC-3'; AP-2-wt, 5'-CTCCCTGAACCCCTGCGGTTTCACAACCTCTG-3'; and AP-2-Mut, 5'-CTCCCTGAACCCGAATTCCTTTCACAACCTCTG-3'. The sequence of Sp1/EGR1-wt corresponds to nucleotides -81 to -55 of the CD11c promoter and contains consensus Sp1 and EGR1 sites (30). The sequence of AP-2-wt corresponds to nucleotides -110 to -80 of the CD11a promoter and contains a consensus AP-2 site (30).

Results

Sequence of the 5'-flanking region of the PECAM-1 gene

Sequence analysis of the entire 1.55-kb *SmaI/HindIII* fragment (Fig. 2) revealed the presence of 50 nucleotides from the first intron, 268 nucleotides from the first exon, and the immediate upstream 492 nucleotides from the 5' untranslated region of PECAM-1 gene previously reported (20). In addition, we were able to extend the sequence 750 nucleotides along the 5' region, described here for the first time.

The 5'-flanking region of PECAM-1 gene lacks a consensus TATA box, but contains several putative regulatory elements, such as AP-2 (-86), Sp1 (-84), YY1 (-193), two adjacent helix-loop-helix (HLH) boxes (+184 and +191), a tandem array of four high mobility group proteins (HMG) boxes (+200, +214, +218, and +223), and two C/EBP sites (-598 and -172); shear stress (+353, -74, and -335)-, glucocorticoid (-213)-, and acute phase (+63)-responsive elements were also identified. Moreover, other motifs associated with hemopoietic differentiation were found. Three consensus sites for the ets family of transcription factors (31, 32) are located at +20, +108, and +253; three GATA sites at +275 and -202 may direct gene expression during differentiation along the erythroid/megakaryocytic and mast cell lineages (33); one consensus site for the zinc finger transcription factor EGR-1 (34) is located at -83; two consensus sites for NF- κ B map at +110 and -409; two retinoic acid-responsive motifs (35) map at +119 and -67. Also, three potential regulatory sequences related to the lymphocytic lineage were detected: imperfect octamer (+181), heptamer (-317), and LyF-1 (-770 and -294). Interestingly, the two LyF-1 sites were flanked at the 3' region with an identical 13-nucleotides sequence, suggesting a functional role for both fragments. An Alu sequence expanding from -571 to -242 contains some of the consensus sequences described above (shear stress, heptamer, NF- κ B, LyF-1, Sp1, and AP-2), and as expected, it is flanked at the 5' and 3' regions by short direct repeats of 15 nucleotides.

The 5'-flanking region of the PECAM-1 gene displays tissue-specific promoter activity

To determine whether the 5'-flanking region of the PECAM-1 gene functions to direct transcription in a cell type-dependent manner, the 1.42-kb *SmaI/PstI* genomic fragment spanning -939 to

+488 as well as several deletion subfragments were placed upstream of the luciferase gene (Fig. 3). The promoter activity of the genomic constructs was determined by transient transfections into U-937 (CD31⁺ human promonocytic), HEL (CD31⁺ human erythromegakaryoblast), K562 (CD31⁺ human erythroleukemia), HeLa (CD31⁻ human cervical carcinoma), and NCTC-929 (CD31⁻ mouse fibroblast) cell lines. Figure 4 shows that luciferase activity in these cell types is indeed reflective of PECAM-1 expression. The promoter constructs displayed the greatest activity in K562 cells, followed by an important activity in U937 and HEL cells. By contrast, the PECAM-1 promoter displayed negligible luciferase activity in HeLa and NCTC-929 cells. Thus, relative to HeLa and NCTC-929 cells, the promoter activity was 11- to 575-fold in K562 cells, 4- to 77-fold in HEL cells, and 2- to 57-fold in U-937 cells. The promoter activity of the pXP2 basic vector was at background levels, whereas luciferase activity from the vector containing the SV40 promoter and enhancer regions (a positive control for expression) was arbitrarily set at 100.

To determine the minimal promoter capable of acting in a tissue-specific manner, the activities of a set of 5' to 3' PECAM-1 promoter truncations (pCD31-1.42-LUC, pCD31-0.66-LUC, pCD31-0.44-LUC, and pCD31-0.25-LUC) were compared. The largest construct, pCD31-1.42-LUC, and its pCD31-0.44-LUC derivative displayed average activities, similar to those of the SV40 construct in PECAM-1⁺ cells. Constructs pCD31-0.66-LUC and pCD31-0.25-LUC showed twofold increased activity with respect to the 1.42-kb fragment in K562 cells, whereas their activities in U937 and HEL cells were similar to those of the SV40 construct. Since the 0.25-kb *NotI/PstI* fragment comprises nucleotides from +232 to +488, the promoter activity of the pCD31-0.25-LUC suggests that the minimal fragment required to drive PECAM-1 transcription from the initiation site reported at +301 (20) is located within its immediate upstream 69 nucleotides. This region contains the consensus initiator ATTTTC, followed by GCCA, as well as putative enhancer elements, such as ets, GATA, and shear stress.

Additional promoter activity within the *NheI/BglII* fragment

To further characterize the 5'-flanking region required for promoter activity, several related deletion constructs (pCD31-0.98-LUC, pCD31-0.22-LUC, and pCD31-0.76-LUC) were analyzed. Surprisingly, the activity of pCD31-0.98-LUC construct was 12-fold higher than that of the SV40-based construct and 3-fold higher than that of the *NotI/PstI* 0.25-LUC construct in K562 cells (Fig. 4). Luciferase activity was clearly diminished in the *SmaI/NheI* construct, which lacks the *NheI/BglII* fragment, suggesting that this region is responsible for the promoter activity found in the pCD31-0.98-LUC construct. In fact, the pCD31-0.22-LUC construct containing the *NheI/BglII* fragment displayed a remarkable

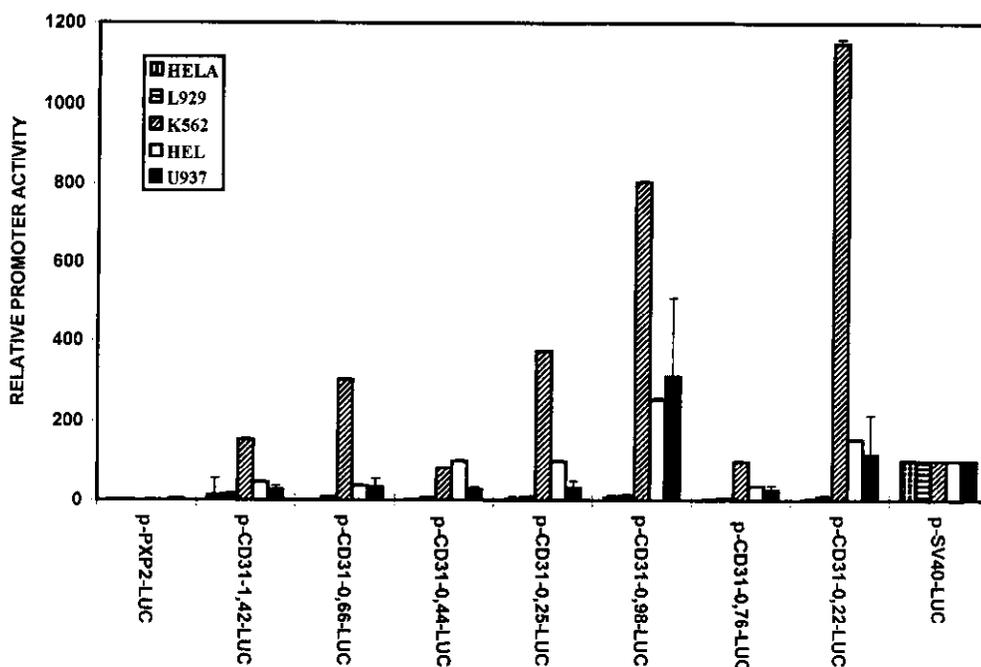


FIGURE 4. Tissue-specific expression of the PECAM-1 promoter. Hemopoietic PECAM-1⁺ U937 (promonocytic), K562 (erythroleukemia), and HEL (erythromegakaryoblast) human cell lines and nonhemopoietic PECAM-1⁻ HeLa (human cervical carcinoma) and NCTC-929 (fibroblasts) cell lines were transiently transfected with the indicated promoter constructs. Luciferase activity was determined 14 h after transfection. Correction for transfection efficiency was made by cotransfection with β -galactosidase (K562, HEL, HeLa, NTC-929, and K562) or alkaline phosphatase (U937) expression vectors. In addition, cells were transfected in parallel with the SV40-luciferase vector, which contains the strong viral promoter activity. The mean of five different experiments is shown.

promoter activity in the myeloid cell lines tested, especially in K562. The 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment contains a putative ets binding site, sometimes associated with transcription initiation (36); consensus AP-2, Sp1, and EGR-1 sequences; and shear stress- and retinoic acid-responsive elements.

To determine whether a functional transcription start site mapped within the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment, 5' RACE experiments were performed (Fig. 5). Primer PE 3 was used for cDNA synthesis of total RNA from endothelial and PMA-treated U-937 cells. Then, an anchor oligonucleotide was ligated to the 3' end of the synthesized cDNA. Nested primers PE 4 and PE 5 and the anchor complementary oligonucleotide were used to amplify the 5' region of PECAM-1 mRNA (Fig. 5A). Electrophoretic analysis indicated that the PCR amplification resulted in two distinct pairs of bands of approximately 400 bp (a and b) and 100 bp (c and d) in PMA-treated U-937 cells and endothelial cells (Fig. 5B). The sizes of the specific pairs of bands c/d and a/b are compatible with transcription initiation sites within the 0.44-kb *BglIII/PstI* and 0.22-kb *NheI/BglIII* fragments, respectively. Transcription initiation sites corresponding to the 0.22-kb *NheI/BglIII* and 0.44-kb *BglIII/PstI* fragments were found in U937 cells, whereas endothelial cells yielded only PCR products corresponding to a transcription initiation within the 0.44-kb *BglIII/PstI* fragment. The bands were recovered from the gel and cloned for sequencing. As shown in Figure 5C, sequencing of the 400-bp band revealed transcription initiation at an adenosine within the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment (numbered +1), suggesting that the upstream 173-nt region is responsible for the myeloid-specific transcription activity of the pCD31-0.22-LUC construct. Furthermore, sequencing of the smallest clone (Fig. 5D), showed transcription initiation at position +253, which is located 48 nucleotides upstream from the reported endothelial transcription initiation (20). To confirm the transcription initiation within the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment, an S1 nuclease protection assay was performed (Fig. 6). A 63-nt spanning

the 3' region of this fragment was 5'-labeled, hybridized to total RNA from PMA treated U937 cells, and digested with S1 nuclease. As shown in Figure 6A, two different clusters of protected bands (fragments 1 and 2) were revealed, suggesting multiple transcription initiation sites within a 25-bp region. Interestingly, the initiation site determined by 5' RACE (Fig. 5), precisely mapped within this region (Fig. 6B). Taken together, the results of 5' RACE and S1 nuclease experiments demonstrate that the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment contains a transcription initiation site, further supporting its promoter activity exhibited in reporter gene constructs.

Next, we analyzed whether the 0.22-kb *NheI/BglIII* construct displayed a different tissue specificity with respect to that of the contiguous 0.44-kb *BglIII/PstI* fragment. To that end, transient transfections were conducted in BAEC, and the results were compared with those obtained in U937 cells. As depicted in Figure 7, both the 0.44-kb *BglIII/PstI* and the 0.25-kb *NotI/PstI* constructs displayed a higher transcriptional activity than the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment in endothelial cells. Conversely, the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment showed a higher transcriptional activity than the 0.44-kb *BglIII/PstI* or the 0.25-kb *NotI/PstI* construct in monocytic cells. These findings are in agreement with the results of the 5' RACE experiments and suggest that the transcriptional activity contained within the 0.44-kb *BglIII/PstI* fragment is mainly displayed by endothelial cells, whereas the promoter activity of the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment seems to be more specific for the myeloid lineage.

Involvement of PKC activity in PECAM-1 expression

PECAM-1 expression is up-regulated upon treatment of monocytic cell lines with phorbol esters (5, 6). Since phorbol esters activate PKC, we analyzed whether this enzymatic activity was involved in the expression of PECAM-1. First, addition of the PKC inhibitors H7 and staurosporine to PMA-treated U-937 cells diminished the surface expression of PECAM-1 (Fig. 8A). This inhibitory effect

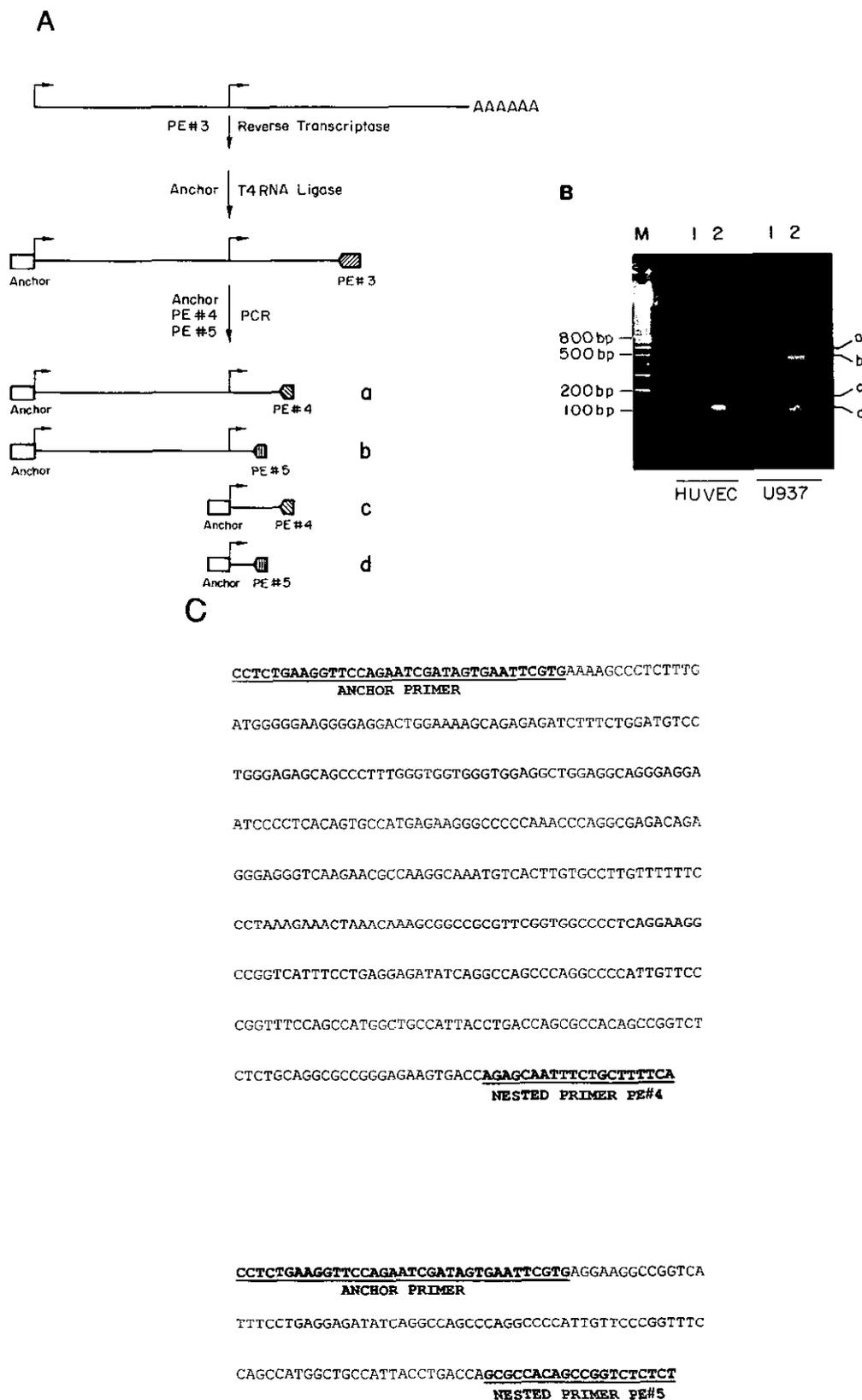


FIGURE 5. 5' RACE analysis of the transcriptional start site of the PECAM-1 gene. *A*, Nested PCR amplification reaction. cDNA synthesized using the primer PE 3 and containing an anchor oligonucleotide ligated at the 5' region was used as a template in a PCR reaction. Amplifications were carried out with the anchor oligonucleotide in the presence of either PE 5 or PE 4 primers, resulting in the PCR products a, b, c, and d. Arrows denote transcription start sites. *B*, Electrophoresis analysis of PCR products. Amplifications from endothelial or U-937 cells carried out in the presence of either PE 5 (*lanes 1*) or PE 4 (*lanes 2*) primers, as described in *A*, were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel. Bands were visualized by ethidium bromide staining. *C*, Nucleotide sequence of the cloned 5' RACE products. PCR products were isolated from the gel, cloned into plasmids, and sequenced. The underlined sequences indicate the complementary sequences for the anchor and the nested primers used for PCR reaction. The nucleotide sequence of the 0.4-kb fragment has been assigned the EMBL/GenBank accession number X96849.

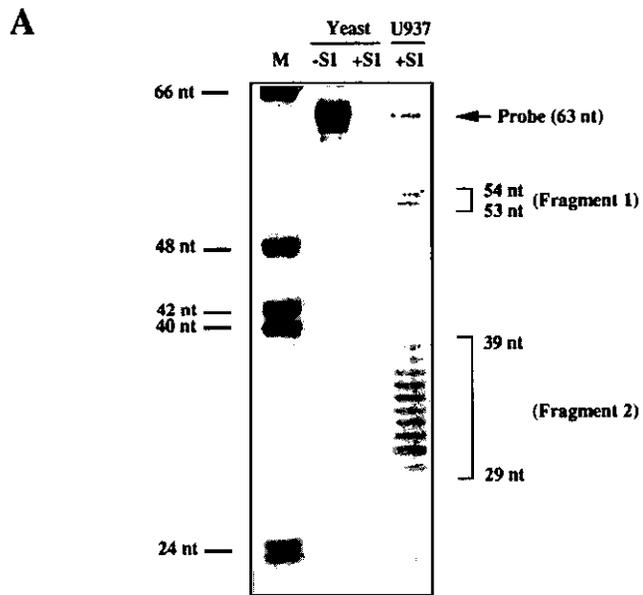
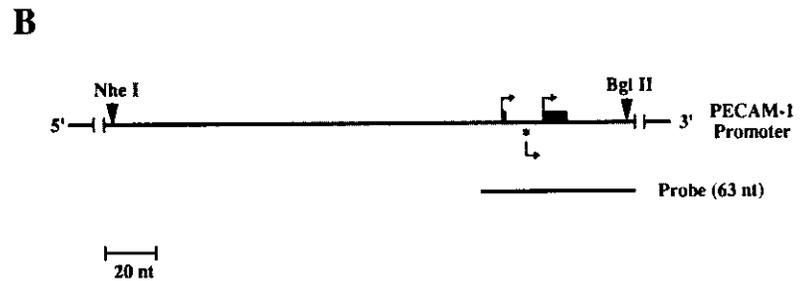


FIGURE 6. S1 nuclease protection analysis. **A**, The 5' end-labeled oligonucleotide PECAM-1-4as spanning from -16 to +46 (complementary sequence), used as a probe, was annealed to total RNA from either PMA-treated U937 cells or yeast. The RNA-DNA hybrids were incubated in the absence (-S1) or in the presence (+S1) of S1 nuclease, and the protected fragments were analyzed on a denaturing 8% polyacrylamide gel. Two sets of protected fragments, 53 to 54 or 39 to 29 nucleotides in length, were identified in the mRNA from U937 cells. As a control, a complete digestion of the probe was obtained in the presence of yeast RNA. The m.w. markers (M) include a 5' end-labeled *Hinf*I-digested Φ X174 phage DNA. **B**, Schematic representation of the S1 nuclease protection assay. Transcription initiation sites are indicated by boxes 1 and 2, which correspond to protected fragments 1 and 2 (see **A**), respectively. The asterisk indicates the transcription start site determined by 5' RACE (see Fig. 5).



was dose dependent up to a concentration of 250 μ M H7 (Fig. 8B). As a control, the expression of CD69, which is PKC dependent (37), showed a similar inhibition in the presence of H7 (Fig. 8B). Furthermore, DOG and OAG, two synthetic diacylglycerol compounds that mimic the physiologic activator of PKC, were also able to induce the expression of PECAM-1 (Fig. 8A). Again, H7 inhibited the PECAM-1 expression induced in the presence of diacylglycerol analogues. Next, Northern blot analysis demonstrated that the levels of PECAM-1-specific transcripts of 3.7 and 3.4 kb steadily increased during PMA-induced differentiation of U-937 cells (Fig. 8C). These results suggest the involvement of PKC activity in the regulated expression of PECAM-1. Furthermore, run-on experiments indicated that the transcriptional activity of PECAM-1 gene was induced by phorbol esters in U-937 cells (data not shown).

To locate the specific fragments involved in the PMA-triggered increase in PECAM-1 mRNA levels, we conducted transient transfection experiments in the presence of phorbol esters (Fig. 8D). The promoter induction levels obtained with pCD31-0.25-LUC, pCD31-0.44-LUC, pCD31-0.76-LUC, and pCD31-1.42-LUC were low (between 1- and 2.5-fold), whereas the luciferase activities of pCD31-0.98-LUC and pCD31-0.22-LUC constructs were clearly augmented upon stimulation with phorbol esters, giving rise to promoter activity induction values ranging from 4- to 6-fold. Since the 0.22-kb *Nhe*I/*Bgl*III fragment is contained within the pCD31-0.98-LUC, these results suggest that the major PMA-responsive region maps within the 0.22-kb *Nhe*I/*Bgl*III fragment. As this fragment contains one EGR-1

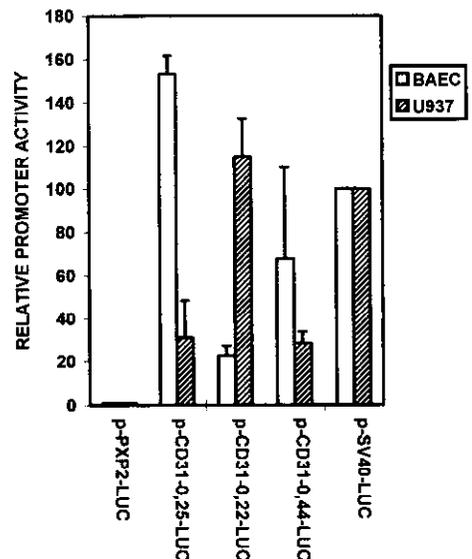


FIGURE 7. Promoter activity of 0.22-kb *Nhe*I/*Bgl*III and 0.44-kb *Bgl*III/*Pst*I fragments in endothelial cells. BAEC were transiently transfected with the indicated promoter constructs, and luciferase activity was determined 48 h after transfection. Correction for transfection efficiency was made by cotransfection with β -galactosidase expression vectors and parallel transfections with the SV40-luciferase vector. The mean of three different experiments is shown. For comparative purposes, the promoter activity in the myeloid cell line U937 is also depicted.

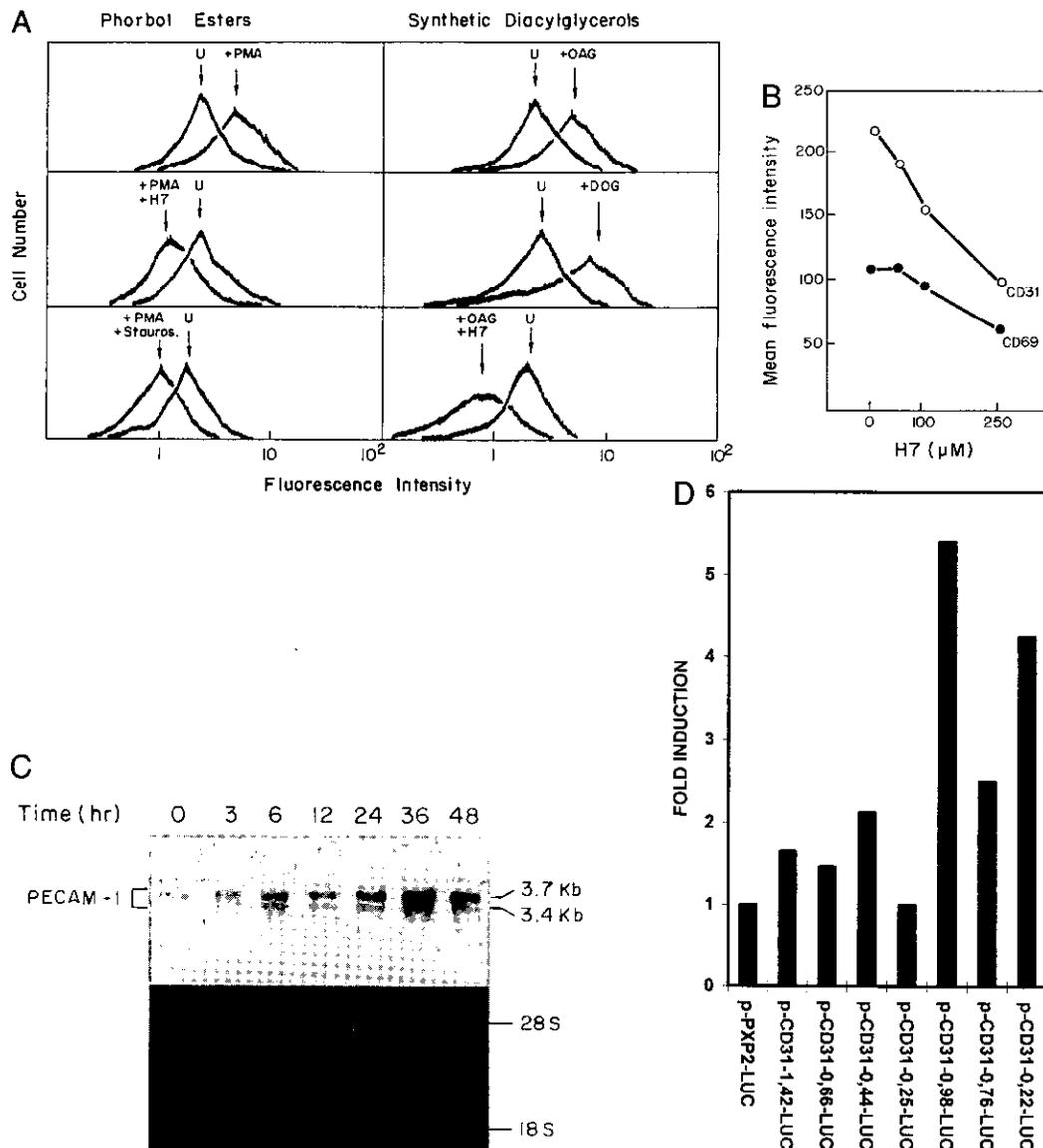


FIGURE 8. Involvement of PKC in the expression of PECAM-1 gene. *A*, Flow cytometric analysis. U-937 cells were treated with the PKC activators PMA, OAG, and DOG, resulting in an increased expression of PECAM-1 compared with that in untreated cells (U). This up-regulated expression of PECAM-1 was abolished in the presence of the PKC inhibitors H7 and staurosporine (Stauros). Cells were stained with HC1/6 (anti-PECAM-1) mAb and analyzed by flow cytometry. *B*, Effect of increasing concentrations of a PKC inhibitor on PECAM-1 expression. U-937 cells were treated with PMA in the presence of increasing concentrations of the PKC inhibitor H7. Cells were stained with HC1/6 (anti-PECAM-1) or TP1/8 (anti-CD69), and their mean fluorescence intensity was estimated. *C*, Northern blot analysis. U-937 cells were treated with PMA for the times indicated. RNA blots (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were hybridized with a PECAM-1 probe, and the specific bands were detected by autoradiography. A control staining with ethidium bromide to visualize the ribosomal RNA is also shown. *D*, Transient transfection experiments of the PECAM-1 promoter. PECAM-1 promoter constructs were electroporated in U937 cells, and PMA was added to half the transfected cells. Luciferase activity was determined 14 h after transfection. Promoter activity induction is referred to as the fold induction respect to the activity of untreated cells. A representative experiment of three is shown.

and one AP-2 putative element reported to be responsive to phorbol esters (38, 39), we analyzed whether PMA could induce EGR-1 and/or AP-2 binding to these consensus sequences. For this purpose, an oligonucleotide spanning from -109 to -76 of the genomic PECAM-1 was used as a probe in electrophoretic mobility shift assays (Fig. 9). Kinetic studies with nuclear extracts from PMA-treated U937 or K562 cells demonstrated an early induction (1 h) of a protein that formed a specific complex, as evidenced by competition with unlabeled oligonucleotide (Fig. 9A). This complex usually appeared as a doublet, suggesting the involvement of at least two different proteins. Characterization of the complex was performed using competitor oligonucleotides and specific Abs. The formation of the complex was inhibited by double-stranded oligonucle-

otides corresponding to Sp1/EGR-1 consensus binding sites, but not by oligonucleotides containing an AP-2 binding site (Fig. 9B). Furthermore, Abs to either EGR-1 or Sp1 allowed identification of the lower band as an EGR-1-containing complex and the upper band as an Sp1-containing complex (Fig. 9C). Together, these data suggest that induction of EGR-1 by PMA might contribute to the PMA responsiveness of the 0.22-kb *NheI/BglI* fragment.

Discussion

In the present study we describe the functional characterization of the promoter for the human PECAM-1 gene. To this end, a genomic clone encompassing the 5'-flanking region of the

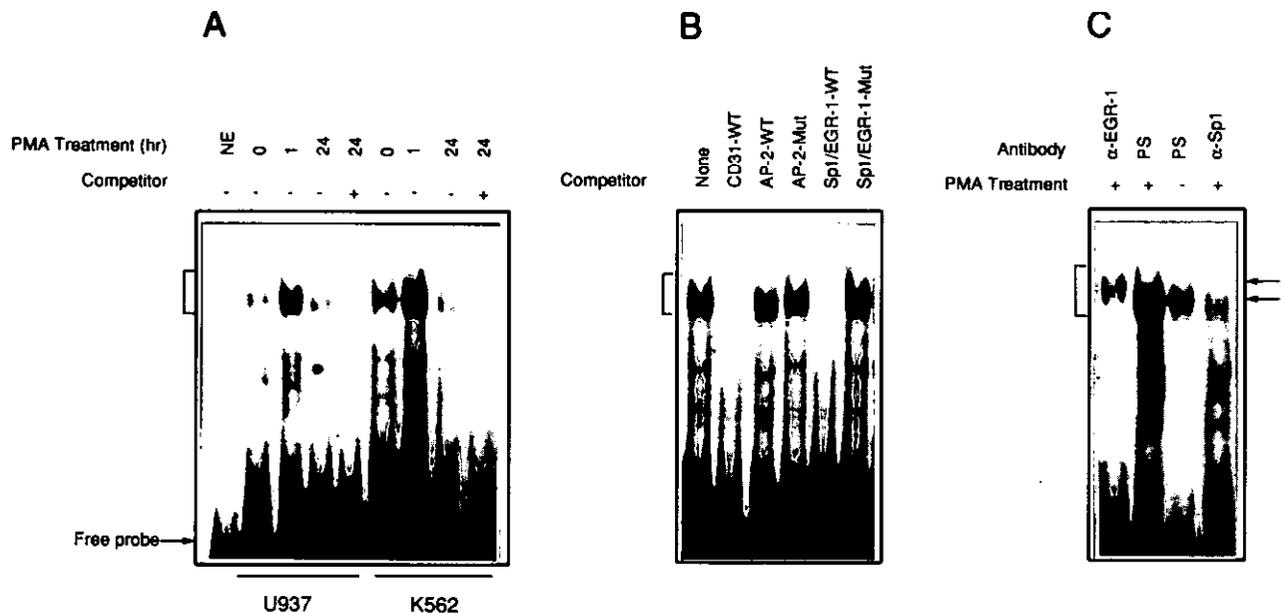


FIGURE 9. Identification of a PMA-responsive Sp1/EGR-1 motif within the 0.22-kb *NheI/BglII* fragment. Nuclear extracts from U937 or K562 cells were incubated with the 32 P-labeled oligonucleotide CD31-wt (-109 to -76) in the absence or the presence of competitor oligonucleotides or specific Abs, as indicated. Samples were electrophoresed on a 5% polyacrylamide gel and autoradiographed. The presence of specific complexes is indicated by brackets. **A**, Kinetic study of the complex formation in U937 and K562 cells. Nuclear extracts from cells activated with PMA for the times indicated were incubated with the radiolabeled probe in either the absence ($-$) or the presence ($+$) of a 100-fold excess of unlabeled probe. NE, no extract added. **B**, Nuclear extracts from U937 cells activated for 1 h with PMA were incubated with the radiolabeled probe in either the absence or the presence of a 100-fold excess of the competitor oligonucleotides CD31-wt, Sp1/EGR-1-wt, Sp1/EGR-1-Mut, AP-2-wt, and AP-2-Mut. **C**, Nuclear extracts from U937 cells untreated or treated for 1 h with PMA were incubated with the radiolabeled probe in either the absence or the presence of specific Abs to Sp1 or EGR-1; a preimmune serum was used as a negative control (PS). Sp1- and EGR-1-containing complexes are indicated by arrows.

PECAM-1 gene was isolated and sequenced from a human genomic library. A myeloid-specific cluster of transcriptional start sites has been identified within the 0.22-kb *NheI/BglII* fragment, in agreement with the high promoter activity displayed by this construct. No consensus TATA or CCAAT boxes were found within the 0.22-kb *NheI/BglII* fragment, but a GC-rich box was localized near the initiation site. The presence of a GC-rich sequence within the 5'-flanking region is a feature of TATA-less genes, which usually contain Sp1 binding sites (40). 5' RACE experiments also indicated the existence of a second transcription initiation site at $+253$ within the *NotI/PstI* region, near the transcription initiation site at position $+301$ described in endothelial cells. The existence of different transcription initiation sites is compatible with the presence of at least two distinct bands of 3.4 and 3.7 kb revealed by Northern blot analyses (5–7) and with the difficulty of obtaining discrete bands in primer extension experiments (data not shown) as well as with the lack of a TATA box. Our results indicate the existence of a transcription initiation site in monocytic cells contained within the 0.22-kb *NheI/BglII* fragment, which apparently is not present in endothelial cells. By contrast, the 0.44-kb *BglII/PstI* fragment appears to exhibit promoter activity preferentially in endothelial cells. Based on these results, we postulate the existence of two promoters with distinct cell type specificities. Endothelial cells constitutively express PECAM-1 at high levels, whereas PECAM-1 expression is regulated during differentiation/maturation of monocytic cells (6). As flanking sequences at the 5' end of the mRNA have been reported to be responsible for the stability of the message, the existence of distinct transcripts between endothelial and monocytic cells might contribute to the differential regulated expression of PECAM-1 by these cell types. It is worth noting that each of the transcription initiation sites mentioned

(positions -7 , -6 , $+1$, $+9$ to $+18$, $+253$, and $+301$) are preceded by GC-rich boxes (-30 to -19 , $+230$ to 250 , and 290 to $+300$, respectively) that could mediate anchoring of the Sp1 transcription factor.

Unlike VCAM-1 and ICAM-1, members of the Ig family of adhesion receptors, the PECAM-1 promoter does not contain any TATA-like element in close proximity with the transcription start point. The presence of TATA-less promoters has been described in housekeeping genes and is usually associated with multiple transcription start sites. The latter feature would be in agreement with the different transcription initiation sites described for PECAM-1 at positions -7 , -6 , $+1$, $+9$ to $+18$, and $+253$ (this report) and $+301$ (20). By contrast, the restricted expression of PECAM-1 does not correspond to the housekeeping class of genes. Thus, specific potential transcription factor binding sites within the promoter might account for the restricted cell expression of PECAM-1. Shear stress and NF- κ B motifs, present throughout the PECAM-1 promoter, are responsive to mechanical forces (41–43). Interestingly, all the cell types expressing PECAM-1 are subjected to the hemodynamic forces of the bloodstream, suggesting that the three shear stress and two NF- κ B consensus sequences found in the promoter might regulate PECAM-1 transcription. In this sense, NF- κ B and the shear stress-responsive elements are present in several endothelial genes encoding surface Ags such as the ICAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), and VCAM-1 (42, 43). On the other hand, the existence of several motifs involved in hemopoietic differentiation might contribute to the regulated expression of PECAM-1 within this lineage. Thus, the GATA sequences have been identified in the *cis*-regulatory region of globin and other erythroid-specific genes (32) and are present in the promoter of VCAM-1 gene, another member of the

CAM family (44). Certain members of the protein family that bind to the HLH box elements, usually referred to as helix-loop-helix proteins, are required for proper B cell development and Ig gene rearrangements (45). The retinoic acid-responsive elements are apparently involved in hemopoietic development (33). The presence of an octamer motif located downstream of an heptamer sequence, as in PECAM-1, is a conserved characteristic required for the full lymphoid cell-specific activity of several Ig V_H promoters (46). LyF-1 is a transcriptional regulator that interacts with promoters for lymphocyte-specific genes (47). The presence of these lymphocyte-specific elements in the PECAM-1 promoter is in agreement with the reported expression of PECAM-1 in certain subpopulations of CD4 and CD8 lymphocytes (13).

The existence of ubiquitous motifs suggests additional transcriptional regulatory elements of the PECAM-1 gene. Thus, the presence of a tandem array of four HMG motifs within the fragment +200 to +229 suggests an important role for this region in the configuration of the PECAM-1 promoter, as HMG proteins are able to bind and bend DNA, allowing the optimal spatial arrangement of nucleoprotein complexes for transcription (48). Acute phase reactant-responsive elements, like that found in the PECAM-1 promoter, typically lie in the genes for acute phase proteins such as α_2 -macroglobulin and T kininogen, which are induced by infection or inflammation (49, 50). Since these processes are associated with macrophage recruitment to the site of injury, and PECAM-1 is involved in the transendothelial migration of monocytes, it is tempting to speculate that the expression of PECAM-1 by endothelial cells and monocytes could be regulated by the acute phase-responsive element. The presence of the glucocorticoid-responsive motif, TGTTCT, suggests that PECAM-1 expression might also be regulated by these steroid hormones. A consensus site for the ubiquitous YY1 factor (-193) was found near GATA (-202) and CCACC (-267) sites. A similar cluster of transcription factors has been described within a silencer region of the human ϵ -globin gene, where GATA and YY1 were identified as developmental repressors (51). Since YY1 is a multifunctional transcription factor that can act as a repressor of transcription of many mammalian genes, the existence of these regulatory elements might contribute to a differential promoter activity among distinct cell lineages.

An Alu sequence was found along the 5' region of the PECAM-1 promoter. The polymorphic short interspersed elements of the Alu family are ubiquitous in the genome of primates and are often found within the 5'-flanking regions of regular transcription units (52-58). This supports the idea that the PECAM-1 promoter region should be contained between the Alu sequence and the transcription initiation site. Similar arrangements of Alu sequences located 5' to the promoter have been described for several genes expressed either by hemopoietic cells, such as the CD11a, CD11b, and CD11c integrins (52-54), or by endothelial cells, such as the von Willebrand factor (55). Although the roles of these Alu repeats in promoter function are unclear, some researchers have postulated their involvement in the transcriptional regulation of hemopoietic cells (58).

PKC activity is known to be involved in the control of growth and differentiation of various cell types (59), including the macrophage lineage (60). In this context, the monocytic leukemia cell line U-937 is widely used to study differentiation toward a macrophage-like phenotype following exposure to phorbol esters, which are able to bind to and activate PKC (61). On the other hand, the activation of PKC under physiologic conditions is mediated by diacylglycerol generated by hydrolysis of phosphoinositides catalyzed by phospholipase C. Both phorbol esters and synthetic analogues of diacylglycerol displayed the capacity to induce the ex-

pression of PECAM-1 on monocytic cells, indicating that the activation of PKC is responsible for the increased expression of this surface Ag. Interestingly, PECAM-1 becomes phosphorylated in Ser/Thr cytoplasmic residues by PKC upon cellular activation, and this phosphorylation seems to regulate the association with the cytoskeleton and adhesive properties of PECAM-1 (7, 16, 17). In addition, phorbol ester, a known activator of PKC, was able to enhance PECAM-1 promoter activity, suggesting the involvement of this enzymatic activity in the transcription of the PECAM-1 gene. EGR-1 and AP-2 putative elements, previously reported to be responsive to phorbol esters (38, 39), were found within the minimal phorbol ester-responsive construct, identified as the 0.22-kb *NheI/BglII* fragment. However, the overlapping Sp1/EGR-1 sequence, but not AP-2, was identified as a PMA-responsive element, suggesting its involvement in the PMA-dependent activation of the promoter function. In this sense, overlapping Sp1/EGR-1 binding motifs are common in EGR-1-regulated genes (62-66), and EGR-1 has been described to be necessary for the PMA-induced activity of ICAM-1, CD44, and MDR1 (64-66) promoters. Interestingly, EGR-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage (34), in agreement with the myeloid-specific promoter activity of the 0.22-kb *NheI/BglIII* fragment. Taken together, these findings strongly suggest that PKC regulate the expression and function of PECAM-1.

Acknowledgments

We thank Drs. Peter J. Newman and Richard J. Gumina (Blood Research Institute, Milwaukee, WI) for helpful discussions and for sharing their unpublished data; Dr. Santiago Lamas and Octavio Hernandez-Perera for providing endothelial cells; Drs. Santiago Rodríguez de Córdoba, Juan M. Redondo, Eduardo Muñoz, and Peter Cowan for their comments; Victoria Muñoz and Mónica Fontela for photography; and Aurelio Hurtado for delineation.

References

- DeLisser, H. M., P. J. Newman, and S. M. Albelda. 1994. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol. Today* 15:490.
- Ohto, H., H. Maeda, Y. Shibata, R.-F. Chen, Y. Qzaki, M. Higashihara, A. Takeuchi, and H. Tohyama. 1985. A novel leukocyte differentiation antigens: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kD molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. *Blood* 66:873.
- Goyert, S. M., E. M. Ferrero, S. V. Serementis, R. J. Winchester, J. Silver, and A. C. Mattison. 1986. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J. Immunol.* 137:3909.
- Lyons, A. B., S. J. Cooper, S. R. Cole, and K. Ashman. 1988. Human myeloid differentiation antigens identified by monoclonal antibodies to the myelomonocytic leukemia cell line RC-2A. *Pathology* 20:137.
- Cabañas, C., F. Sánchez-Madrid, T. Bellón, C. G. Figdor, A. A. Te Velde, J. M. Fernández, A. Acevedo, and C. Bernabéu. 1989. Characterization of a novel myeloid antigen regulated during differentiation of monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* 19:1373.
- Goldberger, A., K. A. Middleton, and P. J. Newman. 1994. Changes in expression of the cell adhesion molecule PECAM-1 (CD31) during differentiation of human leukemic cell lines. *Tissue Antigens* 44:285.
- Lastres, P., N. Almendro, T. Bellón, J. A. López-Guerrero, R. Eritja, and C. Bernabéu. 1994. Functional regulation of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 by TGF- β 1 in promonocytic U-937 cells. *J. Immunol.* 153:4206.
- Muller, W. A., S. A. Weigl, X. Deng, and D. M. Phillips. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178:449.
- Vaporciyan, A. A., H. M. DeLisser, H. Yan, I. I. Mendiguren, S. R. Thom, M. L. Jones, and S. M. Albelda. 1993. Involvement of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 262:1580.
- Albelda, S. M., W. A. Muller, C. A. Buck, and P. J. Newman. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 114:1059.
- Piali, L., P. Hammel, C. Uherek, F. Bachmann, R. H. Gisler, D. Dunon, and B. A. Imhof. 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.
- DeLisser, H. M., C. Y. Yan, P. J. Newman, W. A. Muller, C. A. Buck, and S. M. Albelda. 1993. PECAM-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 268:16037.
- Tanaka, Y., S. M. Albelda, K. J. Horgan, G. van Seventer, Y. Shimizu, W. Newman, J. Hallam, P. J. Newman, C. A. Buck, and S. Shaw. 1992. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of β 1 integrin-mediated adhesion. *J. Exp. Med.* 176:245.

14. Piali, L., S. M. Albelda, H. S. Baldwin, P. Hammel, R. H. Gisler, and B. A. Imhof. 1993. Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates β_2 integrins on lymphokine-activated killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2464.
15. DeLisser, H. M., J. Chilkotowsky, H.-C. Yan, M. Daise, C. A. Buck, and S. M. Albelda. 1994. Deletions in the cytoplasmic domain of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties. *J. Cell Biol.* 124:195.
16. Newman, P. J., C. A. Hillery, R. Albrecht, L. V. Parise, M. C. Berndt, A. V. Mazurov, L. C. Dunlop, J. Zhang, and S. E. Rittenhouse. 1992. Activation-dependent changes in human platelet PECAM-1: phosphorylation cytoskeletal association, and surface membrane redistribution. *J. Cell Biol.* 119:239.
17. Zehnder, J. L., K. Hirai, M. Shatsky, J. L. McGregor, L. J. Leviitt, and L. K. Leung. 1992. The cell adhesion molecule CD31 is phosphorylated after cell activation: down-regulation of CD31 in activated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 267:5243.
18. Baldwin, H. S., H. M. Shen, A. Chung, C. Mickanin, T. Trask, H. Yan, H. M. DeLisser, S. M. Albelda, N. Kirschbaum, P. J. Newman, and C. A. Buck. 1994. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during early mammalian cardiovascular development. *Development* 120:2539.
19. Goldberger, A., K. A. Middleton, J. A. Oliver, C. Paddock, H. Yan, H. M. DeLisser, S. M. Albelda, and P. J. Newman. 1994. Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form. *J. Biol. Chem.* 269:17183.
20. Kirschbaum, N. E., R. J. Gumina, and P. J. Newman. 1994. Organization of the human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 shows alternatively spliced isoforms and a functionally complex cytoplasmic domain. *Blood* 84:4028.
21. Newman, P. J., M. C. Berndt, J. Gorsky, G. C. White, L. S. Paddock, and W. A. Muller. 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219.
22. Simmons, D. L., C. Walker, C. Power, and R. Pigott. 1990. Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. *J. Exp. Med.* 171:2147.
23. Stockinger, H., S. J. Gadd, R. Eher, O. Majdic, W. Schreiber, W. Kasinrerker, B. Strass, E. Schnabl, and W. Knapp. 1990. Molecular characterization and functional analysis of leucocyte surface protein CD31. *J. Immunol.* 145:3889.
24. Nordeen, S. K. 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6:454.
25. Von dem Borne A., E. G. Kr., and P. W. Moderman. 1989. Cluster report: CD31. In *Leucocyte Typing*, Vol. 4. W. Knap, B. Dorken, W. R. Gilks, E. P. Rieber, R. E. Schmidt, H. Stein, and A. E. G. Kr. Von dem Borne, eds. Oxford University Press, New York, p. 995.
26. Sambrook, J. E., Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
27. Cebrián, M., E. Yagüe, M. Rincón, M. López-Botet, M. O. De Landázuri, and F. Sánchez-Madrid. 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule. *J. Exp. Med.* 168:1621.
28. Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294.
29. Schreiber, E., P. Mathias, M. M. Müller, and W. Schaffer. 1988. Identification of a novel lymphoid specific octamer protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCBA). *EMBO J.* 7:4221.
30. López-Rodríguez, C., H. M. Chen, D. G. Tenen, and A. L. Corbí. 1995. Identification of Sp1 binding sites in the CD11c (p150, 95- α) and CD11a (LFA-1- α) integrin subunit promoters and their involvement in the tissue specific expression of CD11c. *Eur. J. Immunol.* 25:3496.
31. Klemsz, M. J., S. R. McKercher, A. Celada, C. Van-Beveren, and R. A. Maki. 1990. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 61:113.
32. Ho, I. C., N. K. Bhat, L. R. Gottschalk, T. Lindsten, C. B. Thompson, T. S. Pappas, and M. Leiden. 1990. Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor alpha gene enhancer. *Science* 250:814.
33. Orkin, S. H. 1992. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80:575.
34. Nguyen, H. Q., B. Hoffman-Liebermann, and D. A. Liebermann. 1993. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 72:197.
35. de Thé, H., M. M. Vivanco-Ruiz, P. Tiollais, H. Stunnenberg, and A. Dejean. 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature* 343:177.
36. Waslyk, B. 1993. The ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211:7.
37. Cebrián, M., J. M. Redondo, A. López-Rivas, G. Rodríguez-Tarduchy, M. O. De Landázuri, and F. Sánchez-Madrid. 1989. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur. J. Immunol.* 19:809.
38. Cao, X., R. Mahendran, G. R. Guy, and Y. H. Tan. 1993. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* 268:16949.
39. Williams, T., and R. Tijan. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5:670.
40. Pugh, B. F., and R. Tijan. 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 57:103.
41. Collins, T., M. A. Read, A. S. Neish, M. Whitley, D. Thanos, and T. Maniatis. 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9:899.
42. Baeuerle, P. A., and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12:141.
43. Resnick, N., and M. A. Gimbrone. 1995. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 9:874.
44. Cybulsky, M. I., J. W. U. Fries, A. J. Williams, P. Sultan, R. Eddy, M. Byers, T. Shows, M. A. Gimbrone, and T. Collins. 1991. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7859.
45. Murre, C., G. Bain, M. A. van Dijk, I. Engel, B. A. Furnari, M. E. Massari, J. R. Mathews, M. W. Quong, R. R. Rivera, and M. H. Stuver. 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1218:129.
46. Poellinger, L., B. K. Yoza, and R. G. Roeder. 1989. Functional cooperativity between protein molecules bound at two distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Nature* 337:573.
47. Lo, K., N. R. Landau, and S. T. Smale. 1991. LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. *Mol. Cell. Biol.* 11:5229.
48. Bianchi, M. E. 1995. The HMG-box domain. In *DNA-Protein Structural Interactions*. D. M. J. Lilley, ed. Oxford University Press, Oxford, p. 177.
49. Hattori, M., L. J. Abraham, W. Northermann, and G. H. Fey. 1990. Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat α_2 -macroglobulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2364.
50. Mann, E. A., M. L. Croyle, and J. B. Lingrel. 1991. Identification of sequences mediating interleukin-6 induction of a rat kininogen gene. *J. Biol. Chem.* 266:16931.
51. Raich, N., C. H. Clegg, J. Groffit, P.-H. Roméo, and G. Stamatoyannopoulos. 1995. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human ϵ -globin gene. *EMBO J.* 14:801.
52. Nueda, A., M. López-Cabrera, A. Vara, and A. L. Corbí. 1993. Characterization of the CD11a (alpha L, LFA-1 alpha) integrin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 268:19305.
53. López-Cabrera, M., A. Nueda, A. Vara, J. García-Aguilar, A. Tugores, and A. L. Corbí. 1993. Characterization of the p150,95 leukocyte integrin α subunit (CD11c) gene promoter. *J. Biol. Chem.* 268:1187.
54. Shelley, C. S., and M. A. Arnaut. 1991. The promoter of the CD11b gene directs myeloid-specific and developmentally regulated expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10525.
55. Assouline, Z., D. Kerbirou-Nabias, G. Pietu, N. Thomas, B. R. Bahnak, and D. Meyer. 1988. The human gene for von Willebrand factor: identification of repetitive Alu sequences 5' to the transcription initiation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1159.
56. Wang, X. Y., C. Ohtaka-Maruyama, M. M. Pisano, C. J. Jaworski, and A. B. Chepelinsky. 1995. Isolation and characterization of the 5'-flanking sequence of the human ocular lens MIP gene. *Gene* 167:321.
57. Bennett, J., D. Sun, and K. Karikó. 1995. Sequence analysis of the 5.34-kb 5' flanking region of the human rhodopsin-encoding gene. *Gene* 167:317.
58. Brini, A. T., G. M. Lee, and J. P. Kinet. 1993. Involvement of Alu sequences in the cell-specific regulation of transcription of the γ chain of Fc and T cell receptors. *J. Biol. Chem.* 268:1355.
59. Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607.
60. Whetton, A. D., C. M. Heyworth, S. E. Nicholls, C. A. Evans, J. M. Lord, T. M. Dexter, and P. J. Owen-Lynch. 1994. Cytokine-mediated protein kinase C activation is a signal for lineage determination in bipotential granulocyte macrophage colony-forming cells. *J. Cell Biol.* 125:651.
61. Harris, P., and P. Ralph. 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U-937 cell lines. *J. Leukocyte Biol.* 37:407.
62. Ackerman, S. L., A. G. Minden, G. T. Williams, C. Bobonis, and C. Y. Yeung. 1991. Functional significance of an overlapping consensus binding motif for Sp1 and Zif268 in the murine adenosine deaminase gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7523.
63. Ebert, S. N., and D. L. Wong. 1995. Differential activation of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene by Sp1 and EGR1. *J. Biol. Chem.* 270:17299.
64. Maltzman, J. S., J. A. Carman, and J. G. Monroe. 1996. Transcriptional regulation of the Icam-1 gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor EGR1. *J. Exp. Med.* 183:1747.
65. McCoy, C., D. E. Smith, and M. M. Cornwell. 1995. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the MDRI promoter is mediated by EGR1. *Mol. Cell. Biol.* 15:6100.
66. Khachigian, L. M., V. Lindner, A. J. Williams, and T. Collins. 1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271:1427.