



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DISTINTOS EPÍTOPES EN CD13 MODULAN DE
MANERA DIFERENTE LA ADHESIÓN DE MONOCITOS
HUMANOS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M en IBB CLAUDIA ANGÉLICA GARAY CANALES

DIRECTOR DE TESIS
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO, IIB

COMITÉ TUTOR
DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA, CINVESTAV
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA, IIB

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El proyecto de tesis fue realizado en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Enrique Ortega Soto.

Este proyecto fue financiado con los proyectos DGAPA IN210314, IN205617 y CONACyT 178803, 252428.

El Comité académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas designó el siguiente jurado para el examen de grado:

Presidente: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Secretario: Dr. Enrique Ortega Soto

Vocal: Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo

Vocal: Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Vocal: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González

RECONOCIMIENTOS

A la grandiosa Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi casa durante tantos años, proporcionándome una sólida formación y una vida profesional plena, que cambió mi vida y la de tantas generaciones, espero poder regresar algo de lo mucho que me has dado.

Agradezco al Dr. Enrique Ortega Soto por la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio, por sus enseñanzas a lo largo de tantos años. Por su apoyo para alcanzar un sueño que estaba casi dormido.

A los miembros de mi comité tutorial, infinitas gracias por sus observaciones y propuestas para mejorar el desarrollo del proyecto, a la Dra. Claudia Gonzalez por esas enriquecedoras discusiones en su laboratorio y al Dr. Alejandro Zentella por su tiempo y enorme disposición para apoyarme en la preparación de mi candidatura, por sus críticas y su gran capacidad didáctica.

Al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y en especial a la Dra. Mónica Viveros por su apoyo para proporcionarnos concentrados leucocitarios para el aislamiento de monocitos humanos. Al Dr. Carlos Rosales y la M en C Nancy Mora por la donación del anticuerpo AF-8 y por su asistencia técnica

A la MVZ Georgina Díaz Herrera y al M en C Gonzalo Acero Galindo por su experta ayuda en el manejo de los animales y por su asistencia técnica. A la Lic. Lucía Brito Ocampo y Lic Martha Cariño por su apoyo experto en la Biblioteca.

Al Labnalcit por el uso y capacitación de los equipos de citometría, especialmente al M en C Carlos Castellanos, a la Dra Andrea Bedoya y al M. en C. Erick Espindola.

Al Dr. Israel Mares y Dra. Claudia Hallal-Calleros por asistencia técnica y apoyo en la revisión del artículo de doctorado.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, especialmente a Azucena Ayala y Marisol Villafañez por su apoyo en las gestiones administrativas, siempre con una gran actitud positiva.

There are two ways of seeing life:
one is believing that miracles do not exist,
the other is believing that everything is a miracle.

Albert Einstein

Il faut beaucoup de courage pour grandir
et rester ce qu'on est réellement.
Se necesita mucho coraje para crecer
y seguir siendo lo que realmente eres.

Edward Estlin Cummings

AGRADECIMIENTOS

Al hombre de mi vida, mi amor, mi compañero Beto, por ser parte de cada una de mis locuras, aún en contra de su voluntad, por su amor y su apoyo en los buenos y no tan buenos momentos, por todas las metas que nos falta por alcanzar juntos...

A mis princesas Andy y Ale, mis orgullos más grandes, porque cada día me enseñan lo que es el amor incondicional y hacen mi vida mejor y más feliz, por echarme siempre porras y por estar conmigo siempre, con todo mi amor...

A mis padres, Alejandro y Rosalba que con su gran amor me ayudaron a ser la mujer que soy hoy, por su ejemplo de trabajo incansable y dedicación a su familia, mi amor y admiración por ser mis grandes pilares, por todos los momentos y viajes que nos falta por disfrutar

A mis hermanos Eri, Ale y Toño por ser mis primeros y más grandes compañeros, por su cariño y porque siempre puedo contar con ellos para todo, por muchos momentos juntos y por ser un gran ejemplo para sus familias

A la nueva y ampliada generación Garay, mis sobrinos queridos, Carlos, Andrea, Aram, Regina, Toñito y Marquito, por ser la alegría de la familia, ojalá logren todos sus sueños por grandes que parezcan.

A toda mi familia Garay Canales, mis tías y prim@s por todos esos momentos que guardo con cariño, a mis cuñadas Yaya, Lety y Rocío por ser no solo familia sino grandes amigas

A mi amiga/hermana Abril Jiménez por apoyarme y consentirme siempre, por esas grandes charlas y ese gran cariño que nos tenemos.

A LMB, mis queridísimas amigas de Biomédicas, Claudia Hallal, Martha, Armida, Nancy, Erika e Irenita, por las grandes celebraciones y por una amistad que ha sobrepasado el tiempo y la distancia, por su apoyo en momentos difíciles, y por más grandes momentos.

A Paula Santoyo, una de mis primeras hijas académicas, vivió muy rápido, pero muy intensamente, su legado queda en mi corazón por siempre ... gracias

A mis grandes amigas de la facultad, Moni, Adriana y Luz, por su apoyo y amistad a pesar de la distancia, por ese gran cariño y admiración

A todos los miembros del fabuloso laboratorio de Fagocichelas, a las actuales, Gina, Keny, Lau, Montse, Erandi, Pablo, Juan Carlos, Andrea, Gaby y Nataly, por su apoyo y compañía, y a todas las generaciones pasadas, mis hij@s académicos, que me han acompañado a lo largo de los años en el laboratorio, por todo lo que me han enseñado cada día, por compartir no solo su trabajo sino su amistad y cariño, en especial a la Sra Raquel y ahora su hijo Sergio, que siempre me apoyan y me animan. A todos y cada uno, gracias...

CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1.0 ANTECEDENTES	
1.1 CD13/AMINOPEPTIDASA N: Una proteína Multifuncional (Moonlighting protein)	3
1.2 Estructura	4
1.3 Expresión de CD13	7
1.4 Funciones	9
1.4.1 Actividad Enzimática e inhibidores enzimáticos	9
1.4.2 Endocitosis	10
1.4.3 Fagocitosis	12
1.4.4 Receptor de Coronavirus y Citomegalovirus	13
1.4.5 Papel de CD13 en Diagnóstico y Progresión de Cáncer	16
1.5 Adhesión y Agregación Homotípica	20
1.6 Anticuerpos Monoclonales como herramienta para la identificación de Proteínas y Terapia	23
2.0 HIPÓTESIS	26
3.0 OBJETIVO GENERAL	26
3.1 Objetivos Particulares	26
4.0 MATERIALES Y METODOS	27
4.1 Líneas Celulares y Cultivos Primarios	27
4.2 Anticuerpos	28

4.3 Inhibición de la Agregación Homotípica y desagregación	30
4.4 Inmunoprecipitación e Inmunoblot	32
4.5 Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas MALDI TOF/TOF	33
4.6 Ensayos de unión e internalización	34
4.7 Determinación de Actividad Enzimática de la Aminopeptidasa N (APN)	35
4.8 Ensayo competitivo de unión	36
4.9 Determinación del $[Ca^{2+}]$ intracelular por Citometría de Flujo	36
4.10 Fosforilación en tirosina de CD13	38
4.11 Ensayo de Adhesión Celular	39
5. RESULTADOS	41
5.1 Obtención de anticuerpos monoclonales inhibidores de la agregación homotípica	41
5.2 La inhibición de la agregación homotípica es dosis dependiente, transitoria y reversible	44
5.3 Identificación de la proteína reconocida por los anticuerpos inhibidores	47
5.4 Los anticuerpos inhibidores no compiten por el mismo epítotope reconocido por el anticuerpo 452 en la superficie de los monocitos.	51
5.5 El efecto de inhibición requiere el entrecruzamiento de CD13	54
5.6 La unión de los anticuerpos inhibidores no provoca cambios en la expresión de CD13 en superficie.	55
5.7 Inhibición de la adhesión heterofílica de células U-937 a Fibronectina con anticuerpos anti-CD13.	58
5.8 Efecto de los anticuerpos anti-CD13 sobre la adhesión heterotípica.	61
5.9 Los anticuerpos anti-CD13 tanto activadores como inhibidores son	

capaces de elevar las concentraciones intracitoplasmáticas de $[Ca^{2+}]$.	66
5.10 El entrecruzamiento de CD13 con los anticuerpos monoclonales	67
5.11 Los anticuerpos monoclonales C y E inhiben la actividad enzimática de CD13.	69
6.0 DISCUSIÓN	74
7.0 CONCLUSIONES	85
8.0 PERSPECTIVAS	86
9.0 MODELO DE AGREGACIÓN E INHIBICIÓN	88
10.0 BIBLIOGRAFIA	89
11.0 ARTÍCULO PUBLICADO	100

RESUMEN

CD13 es una glicoproteína de membrana denominada proteína multifuncional (Moonlighting protein) con variadas funciones que van desde la regulación por proteólisis de péptidos bioactivos, servir como receptor viral o receptor fagocítico primario, participación en agregación homotípica de monocitos y en adhesión heterotípica de monocitos a células endoteliales, hasta ser usado como blanco terapéutico para ciertos tipos de cáncer.

Nosotros produjimos dos anticuerpos monoclonales (C y E) capaces de bloquear la agregación homotípica de monocitos inducida por el anticuerpo anti-CD13 (clona 452) y de inhibir la adhesión heterotípica de monocitos a células endoteliales. También inhiben la unión de las células a proteínas de matriz extracelular. Además, los anticuerpos inhibidores pueden desagregar células cuya agregación fue inducida por el entrecruzamiento de CD13.

Los anticuerpos C y E reconocen a CD13 en membrana pero se unen a un epítipo diferente del reconocido por el anticuerpo 452. La actividad enzimática disminuye de un 40-90% (en monocitos o células transfectadas con CD13 humano) en presencia de los anticuerpos C o E.

También observamos que se requiere el entrecruzamiento de CD13 para la inhibición, ya que los fragmentos Fab no son suficientes. Al entrecruzar CD13 con los anticuerpos anti-CD13 C, E o 452 se observó un aumento en la concentración intracitoplasmática de $[Ca^{2+}]$ y fosforilación de CD13 en residuos de tirosina; sin embargo no encontramos diferencias significativas.

Estos anticuerpos representan importantes herramientas para estudiar interacciones entre células mediadas por CD13 en condiciones fisiológicas o bien patológicas, además de tener potencial en diagnóstico y tratamiento de neoplasias.

SUMMARY

CD13 has been described as a moonlighting protein, with a broad spectrum of functions from proteolytic regulation of bioactive peptides, viral receptor, and phagocytic receptor and has been recently linked as therapeutic target for some types of cancer, because it is implicated in angiogenesis and tumor metastasis. CD13 is a membrane glycoprotein with aminopeptidase activity, expressed on several cell types, including myeloid cells, activated endothelial cells, etc. There is a strong correlation between the expression of CD13 and the invasive ability of different tumor cell types, based not only on its enzymatic activity, but also on its ability to promote the adhesion of tumor cells to endothelium and their migration. CD13 has been proposed to participate in cell adhesion, as crosslinking of CD13 by certain CD13-specific antibodies induces homotypic aggregation of monocytes and heterotypic adhesion of monocytes to endothelial cells. We generated two monoclonal antibodies (mAbs C and E) that block homotypic aggregation of U-937 monocytic cells induced by the CD13-specific mAb 452. Moreover, the mAbs cause detachment of cells whose aggregation was induced by CD13 crosslinking. Both mAbs also inhibit heterotypic adhesion of U-937 monocytes to endothelial cells. mAbs C and E recognize membrane CD13 but bind to epitopes different from that recognized by mAbs 452. Crosslinking of CD13 by mAb C or E is required to inhibit adhesion, as monovalent Fab fragments are not sufficient. Thus, C and E antibodies recognize a distinct epitope on CD13, and binding to this epitope interferes with both CD13-mediated cell adhesion and enzymatic activity. These antibodies may represent important tools to study cell-cell interactions mediated by CD13 in physiological and pathological conditions.

1. ANTECEDENTES

1.1 CD13/AMINOPEPTIDASA N: Una proteína Multifuncional (Moonlighting protein)

Las proteínas son macromoléculas que pueden llevar a cabo una gran cantidad de funciones. Las peptidasas de membrana son un grupo de ectoenzimas que se encuentran en una gran cantidad de tejidos en los que se llevan a cabo un espectro muy amplio de funciones. En el metabolismo de proteínas se encargan de la degradación de péptidos en la superficie de las microvellosidades intestinales y renales. Sin embargo, pueden llevar a cabo otras tareas más sutiles, como cortar mediadores que pueden llevar a la activación o inactivación de procesos, así como funcionar como receptores y como moléculas que participan en adhesión y transducción de señales, entre otras¹.

En 1989, se describieron los primeros ejemplos de proteínas multifuncionales que más tarde se denominarían Moonlighting proteins². Estas proteínas se describen como una sola proteína con múltiples funciones, que no son resultado de la fusión de genes, no se trata de una familia de proteínas homólogas ni de proteínas con actividades enzimáticas promiscuas. Se cree que se trata de proteínas ancestrales con una sola función que adquirieron funciones adicionales a través de la evolución³.

La aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) (APN) es una glicoproteína de membrana con actividad de aminopeptidasa dependiente de Zinc. Fue originalmente aislada en 1963 por Pfeleiderer y Celliers⁴. En 1989 se logró secuenciar la proteína de CD13 y al compararla con la secuencia de distintas

proteínas reconocieron que era idéntica a la Aminopeptidasa N, además de comprobar la unión de anticuerpos monoclonales a ambas moléculas^{5,6}.

Se ha descrito extensamente la actividad enzimática de la Aminopeptidasa N como responsable de cortar aminoácidos neutros preferentemente del extremo amino-terminal de oligopéptidos, y se sabe que fisiológicamente juega un papel importante procesando hormonas peptídicas como angiotensina III y IV⁷, neuropéptidos importantes para el dolor⁸ y quimiocinas que participan en inflamación y angiogénesis⁹. Más recientemente nuestro grupo y otros^{10, 11, 12, 13} describieron varias funciones que son independientes de su actividad enzimática, como adhesión celular, endocitosis y fagocitosis. La Aminopeptidasa N está también involucrada en la progresión de algunos tipos de cáncer¹⁴ y sirve como receptor de varios coronavirus y citomegalovirus^{15, 16, 17}. Ante estas evidencias se ha propuesto a CD13 como una proteína multifuncional¹⁸. A continuación describiremos algunas características de esta proteína para hacer notar su importancia.

1.2 Estructura

La Aminopeptidasa N (APN) es una proteína transmembranal de 967 aminoácidos con una pequeña cola citoplasmática N-terminal, un dominio transmembranal y un ectodominio grande que contiene su sitio activo como enzima¹⁹. CD13 es una glicoproteína que aparece en geles de poliacrilamida como una proteína de 150 kDa y se ha observado que es altamente glicosilada, ya que la molécula precursora es de 130 kDa y es modificada postraduccionalmente para tener la forma madura de la proteína que se expresa en membrana, de cuyo

peso aproximadamente entre el 30-40% corresponde a oligosacáridos. Se han encontrado al menos 5 subpoblaciones de CD13 que varían en la proporción de O-glicosilaciones²⁰, aunque también se han detectado N-glicosilaciones²¹. Estas modificaciones podrían provocar las diferencias en el reconocimiento de la molécula por distintos anticuerpos monoclonales.

En varias especies, CD13 existe como un homodímero. En el humano, CD13 también se expresa en la membrana de las células como un homodímero, la dimerización se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, antes de que se glicosile la proteína en el Aparato de Golgi. Gracias a experimentos de ultracentrifugación analítica se ha demostrado que el monómero dimeriza, la dimerización se debe a uniones no covalentes ya que el tratamiento con SDS puede generar monómeros como en el caso de la Aminopeptidasa N de cerdo. Ahora se sabe que la interfaz del dímero está mediada por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes de sal (salt-bridge network) que crean una especie de cavidad en la superficie de cada monómero²². En 1993, Favaloro y colaboradores describieron la forma soluble de la proteína²³.

En 2012 se describió la estructura de la Aminopeptidasa N gracias al estudio de cristales por difracción de rayos X en alta resolución²². Los monómeros poseen una estructura de 4 dominios (Dominios del I al IV), que son característicos de la familia M1 de metalopeptidasas, cuyas estructuras han sido determinadas recientemente (Figura 1). El dominio II tiene un plegado semejante a Termolisina y contiene tanto el sitio catalítico como el sitio de unión a zinc, donde se localiza el motivo consenso HEXXH que se describirá posteriormente.

Los monómeros del dímero se encuentran en una forma llamada “cerrada”, encontrada en otras enzimas tipo M1, en la cual el sitio catalítico está rodeado por una cavidad interna formando un “loop” único que al ser ocupado por un sustrato/inhibidor como la Angiotensina IV o la Amastatina, al ser un sitio con plasticidad, cambia la conformación del sitio activo y hace que la proteína adopte la forma “abierta”.

Un sustrato como la Angiotensina IV (AngIV) se une a residuos de los dominios II y IV del sitio catalítico de la APN humana, “hundiendo” 8 residuos del loop flexible; se obtiene una conformación semejante con el inhibidor Amastatina. La unión de otro inhibidor como la Bestatina induce en la proteína una conformación ligeramente diferente, pero que no permite el acceso a otros sustratos, por lo que ambos inhibidores son competitivos.

El análisis del complejo de hAPN-AngIV muestra que los residuos del dominio II y IV sirven como una especie de sándwich para el péptido sustrato en la forma cerrada y que la conversión a la forma abierta se requeriría para la unión de la Ang III y la liberación de la Ang IV. Ya que la unión del sustrato y el “loop” del dominio II y IV estabilizaría la forma cerrada, un cambio en la conformación del loop o el orden en el corte del enlace peptídico, podría promover la conversión a la forma abierta para la liberación del producto. También cabe la posibilidad que el péptido producto pudiera volver a unirse al sitio catalítico para otra ronda de corte, mientras la enzima se encuentra en la forma cerrada.

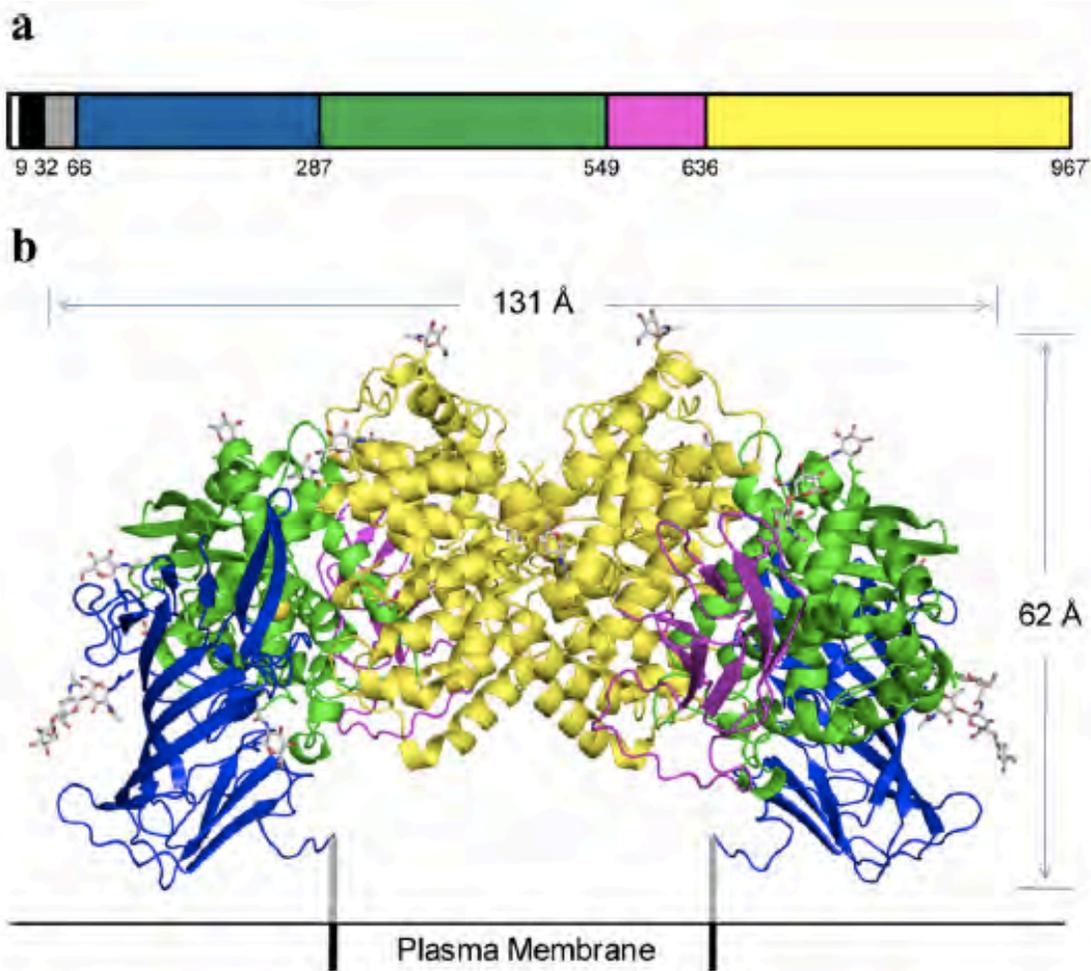


Figura 1. Estructura del dímero de CD13 humana. a) Organización de dominios de la cadena polipeptídica de CD13 humana. El dominio citoplasmático se indica en blanco; el segmento transmembranal en negro; el tallo rico en Ser/Thr es gris; los ectodominios están indicados como dominios I,II,III y IV coloreados en azul, verde, magenta y amarillo, respectivamente. Los números indican el límite del dominio. b) Diagrama de listones del dímero de CD13 humana representado en su posible orientación con respecto a la membrana plasmática. Los colores utilizados corresponden a los descritos anteriormente. Las esferas amarillas indican los iones de zinc dentro del sitio catalítico. Los oligosacáridos se muestran como bastones. Adaptada de Wong 2012²².

1.3 Expresión de CD13

El gene humano de CD13 se encuentra localizado en el cromosoma 15 (q25-q26). La Aminopeptidasa N humana es una proteína ubicua en numerosos tejidos; tiene una alta expresión en células epiteliales del túbulo proximal del riñón,

en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado, en hígado, fibroblastos, sinoviocitos, pericitos y en placenta¹⁸; en el sistema nervioso se encuentra en membranas sinápticas. Su patrón de expresión en células endoteliales es controversial, ya que algunos autores sostienen que solo se expresa en células endoteliales activadas durante procesos angiogénicos^{1, 24}. Esta diferencia en su detección, puede deberse a la sensibilidad de las técnicas utilizadas, o bien, a los anticuerpos utilizados para su detección, ya que como se mencionó anteriormente, hay algunas isoformas con distinto grado de glicosilación, lo cual puede afectar el reconocimiento de la molécula²⁰.

En el sistema hematopoyético, CD13 es expresado en células madre (stem cells) y durante la mayor parte de las etapas del desarrollo de las células mieloides. En el linaje mieloide, CD13 se encuentra en precursores, monocitos, macrófagos, células dendríticas, basófilos, eosinófilos y neutrófilos. CD13 se expresa en células comprometidas en las etapas tempranas de diferenciación de células T y B, sin embargo, estas células dejan de expresarla después de su maduración^{10, 25}. Los linfocitos de sangre periférica, de bazo o de amígdalas no expresan CD13 en membrana. En base a estas observaciones se ha considerado a CD13 como un marcador del linaje mieloide. Sin embargo, se ha encontrado RNAm de CD13 en algunas líneas celulares leucémicas de células T como la línea HUT78, que no expresa CD13 en su membrana²⁶.

En el caso de leucemias pediátricas, como la leucemia linfoblástica aguda (ALL), se puede detectar CD13 después de algunos días de cultivo²⁷. Esta expresión aberrante también denominada “co-expresión mieloide” o infidelidad de

linaje, refleja una transformación neoplásica, y el paciente tiene un pronóstico más pobre o limitado que las leucemias “típicas”²⁸.

Aunque CD13 se ha considerado marcador del linaje mieloide, en condiciones de inflamación, se ha detectado CD13 en fluido sinovial de pacientes con distintas formas de artritis, en fluido pericardial de pacientes posterior a una cirugía torácica para reemplazar válvulas del corazón o en linfocitos infiltrados en tumores como carcinomas renales. También se puede detectar la expresión de CD13 después de la incubación de células T en presencia de IL-4 o IFN- γ ¹.

1.4 Funciones

1.4.1 Actividad Enzimática e Inhibidores Enzimáticos.

La Aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) (CD13) es una enzima que libera aminoácidos neutros de la porción N-terminal de oligopéptidos²¹; el orden de preferencia para el corte es Ala>Phe>Tyr>Leu>Arg>Thr>Trp>Lys>Ser>Asp>His>Val. Esta aminopeptidasa pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas también conocidas como glunzincinas²⁹, ya que dependen de zinc para llevar a cabo su actividad enzimática.

Esta familia contiene un dominio conservado cuyo motivo es HELAH con un sitio de unión a zinc⁶. Se ha demostrado que mutaciones de los aminoácidos que permiten la unión del zinc, provocan la pérdida de la actividad enzimática, aunque mutaciones de aminoácidos del pentapéptido (del motivo conservado) que no impiden la unión del zinc también son también capaces de afectar la actividad enzimática.

Con base en estos estudios y en la estructura determinada por Wong en 2012²², se sugiere que la conformación tridimensional de la proteína es crucial para su actividad enzimática, esto también podría explicar no solo la unión sino el mecanismo de acción de algunos inhibidores o de algunos anticuerpos.

La actividad enzimática de CD13 participa en varias funciones tanto en condiciones fisiológicas como patológicas³⁰: a) su expresión en microvellosidades del intestino puede participar en las etapas finales de la digestión de pequeños péptidos, b) puede inhibir la función celular de algunas hormonas peptídicas y neuropéptidos³¹, c) puede procesar péptidos que están siendo presentados en moléculas MHC clase II³², d) en condiciones patológicas, puede participar en invasión tumoral y metástasis, ya que es capaz de degradar proteínas de la matriz extracelular como Colágeno IV.

Algunos de los péptidos que han demostrado ser procesados por CD13 dando como resultado la modificación de alguna función reguladora se resumen en la Tabla 1.

1.4.2 Endocitosis

Al ser CD13 una molécula que se expresa en la membrana de las células, puede actuar como un receptor capaz de mediar endocitosis, un proceso a través del cual el material extracelular puede pasar al compartimento endosomal para ser degradado. Sin embargo, esta capacidad de CD13 puede permitir la internalización de algunos virus actuando como receptor, en donde se ha demostrado que la actividad de aminopeptidasa no juega un papel importante¹⁵.

Tabla 1

Tejido	Sustrato	Función
Intestino	Pequeños péptidos	Degradación final de péptidos
Membrana sináptica	Neuropéptidos: Met y Leu Encefalinas (dolor),	Inactivación
Corazón	Angiotensina III, Angiotensina IV	Inhibidor del Sistema Renina-Angiotensina
Sistema inmune	IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, fMLP, Timopentina y Tufsin	Inactivación
Vénulas	Bradicinina,	Inhibición de vasodilatación
Sistema nervioso periférico y central	Sustancia P	Inhibición del neuromodulador y neurotransmisor del dolor
Articulaciones inflamadas	Endorfinas; Espinorfina, Neuroquinina, Met-Lys Bradiquinina, Somatostatina	Inhibición de opiodes endógenos involucrados en inflamación crónica

TABLA 1. Funciones dependientes de la actividad de peptidasa de CD13

La internalización de CD13 puede ser considerada como un proceso de regulación, ya que disminuye los niveles en membrana y así su actividad enzimática. Se han reportado algunas moléculas como RECK que pueden interactuar con CD13 y esta asociación puede modular su vía endocítica³³. El entrecruzamiento de CD13 utilizando algunos anticuerpos monoclonales puede llevar a la activación de algunas funciones que no afectan ni dependen directamente de su actividad enzimática, sin embargo, en algunos casos puede

observarse una actividad enzimática ligeramente disminuida, posiblemente debido a la internalización de la molécula³⁴.

También se ha encontrado en pacientes con leucemias linfoblásticas que presentan mutaciones que impiden el correcto plegamiento de la proteína, o en pacientes con polimorfismos que llevan a splicing alternativos de la proteína, por lo que puede haber una alteración de las vías endocíticas, aunque esto no necesariamente correlaciona con una alteración en la progresión de la enfermedad

³⁵, ³⁶.

1.4.3 Fagocitosis

La fagocitosis es un tipo de endocitosis en el cual se “engulle” una partícula de tamaño $\geq 0.5 \mu\text{m}$, y que depende del rearrreglo de actina para llevarse a cabo. Es un mecanismo esencial para el organismo, ya que facilita la remoción de debris y patógenos, y constituye uno de los primeros eventos para montar una respuesta inmune, por lo que juega un papel crítico en la respuesta inmune innata y adaptativa. La fagocitosis es llevada a cabo por “fagocitos profesionales” como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, osteoclastos, etc. La lista de receptores capaces de mediar fagocitosis es larga¹²; entre los más estudiados se encuentran los Fc γ R, integrinas, receptores scavenger, receptores tipo lectina C, receptores de manosa, glicoproteínas, algunas moléculas de adhesión (CEA, antígeno carcinoembriónico) y la lista sigue aumentando.

Nuestro grupo fue de los primeros en describir el papel de CD13 en la fagocitosis¹¹, cuando se demostró que los Fc γ R (especialmente el Fc γ RI) pueden

interactuar con CD13 durante la fagocitosis de eritrocitos modificados. Se demostró que al cubrir monocitos humanos de la línea celular U-937 con anticuerpos dirigidos contra ambos receptores (Fc γ RI y CD13) y entrecruzarlos con la partícula fagocítica modificada, aumenta la cantidad de eritrocitos internalizados, CD13 se relocaliza en la copa fagocítica y el eritrocito es internalizado de manera más eficiente que si la fagocitosis es mediada por un solo receptor.

Más adelante, nuestro grupo también demostró que CD13 es un receptor fagocítico primario¹², y no solo un co-receptor. Las observaciones en que se basa esta conclusión son: 1) CD13 es capaz de mediar fagocitosis a niveles similares a los Fc γ R, 2) células HEK transfectadas con hCD13 adquieren la capacidad de fagocitar a través de este receptor, 3) la fagocitosis es independiente de la actividad enzimática, 4) la fagocitosis es dependiente del rearrreglo del citoesqueleto de actina, 5) mediante el uso de distintos inhibidores se demostró la participación de Syk y 6) en macrófagos murinos transfectados con hCD13 puede detectarse la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) asociada a la fagocitosis mediada por CD13.

1.4.4 Receptor de Coronavirus y Citomegalovirus

Otra de las funciones ampliamente estudiadas de CD13 es su papel como receptor para algunos coronavirus y citomegalovirus. En 1992, Delmas *et al*,³⁷ describieron que en cerdos, CD13 funciona como un receptor para el virus de gastroenteritis transmisible (TGEV, por sus siglas en inglés), ya que se demostró

que anticuerpos monoclonales contra CD13 son capaces de inhibir la infección por estos virus. En este estudio se observó que células no susceptibles para este virus al ser transfectadas con CD13, se vuelven susceptibles para la infección ya que los viriones pueden unirse a CD13. Dentro de los coronavirus humanos responsables de infecciones del tracto respiratorio superior, el coronavirus del serogrupo HCV-229E utiliza a CD13 como receptor para infectar fibroblastos, lo cual fue demostrado gracias a la inhibición de la infección con anticuerpos monoclonales específicos para CD13, y a la transfección de CD13 en fibroblastos murinos que convierte a las células susceptibles para la infección¹⁵.

Se ha demostrado que células del cerebro como glía, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos son susceptibles a la infección por este coronavirus HCV-229E y la susceptibilidad es directamente proporcional a la expresión de CD13. Además de las infecciones por los virus de gastroenteritis en cerdos, se han detectado infecciones por virus similares en otras especies como gatos y perros, siendo la infección especie-específica; se ha propuesto que las diferencias en glicosilación de CD13 en las distintas especies pueden ser responsables del reconocimiento específico¹⁶.

Recientemente Santiago³⁸, en base a estudios de la estructura cristalográfica de la Aminopeptidasa N, encontraron tres conformaciones dinámicas: cerrada, intermedia y abierta. Las proteínas de la envoltura de los coronavirus se unen a la forma abierta en aminoácidos lejanos al sitio catalítico, sin embargo, ésta unión evita la conformación cerrada y por tanto la hidrólisis del sustrato. Por otra parte, algunos inhibidores enzimáticos también pueden inhibir la infección, presumiblemente al evitar la conformación abierta. Otro de los

coronavirus estudiados es el virus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV, por sus siglas en inglés) el cual puede utilizar a CD13 como receptor para la entrada a células susceptibles³⁹.

Los citomegalovirus humanos (HCMV, por sus siglas en inglés) son patógenos oportunistas que infectan células endoteliales, fibroblastos y macrófagos. Se ha observado que CD13 está involucrado en la infección por HCMV, como se demostró con anticuerpos específicos para CD13 que no solo bloquearon la infección, sino también la unión de los viriones de HCMV a células susceptibles. Compuestos que bloquean la actividad de aminopeptidasa de CD13 como bestatin, actinonin, 1,10-fenantrolin, o 2,2'-dipiridyl bloquearon también la infección¹⁷. Otra evidencia demostró que fibroblastos resistentes a la infección se vuelven susceptibles después de la transfección con cDNA para hCD13; a mayor expresión mayor unión del virus. Sin embargo, fibroblastos murinos transfectados con hCD13 al que le falta una porción del sitio activo de aminopeptidasa siguieron siendo susceptibles a la infección por HCMV, lo que nos indica que hCD13 parece mediar la infección por HCMV por un proceso que aumenta la unión, pero el dominio catalítico parece no ser necesario para la infección.

La unión del HCMV a monocitos impide su diferenciación a macrófagos en un proceso dependiente del influjo de calcio, este proceso puede ser replicado por algunos anticuerpos anti-CD13 como MY7 o WM15 que también inducen influjo de calcio; otro anticuerpo como SJ1D1 que se unen a CD13 pero es incapaz de inducir influjo de calcio, también es incapaz de inhibir la diferenciación de monocito a macrófago. Estos resultados sugieren que la unión de HCMV a los monocitos inducen un aumento en el influjo de calcio intracelular, que impide su

diferenciación a macrófagos y que puede constituir una estrategia del virus para causar una inmunosupresión generalizada que se observa en pacientes infectados con HCMV^{39B}.

1.4.5 Papel de CD13 en Diagnóstico y Progresión de Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, tan solo en 2018 se reportaron 18.1 millones de nuevos casos (según la International Agency for Research on Cancer, 2018). A pesar del desarrollo de nuevas terapias, cerca del 90% de la morbilidad y mortalidad de los pacientes con cáncer son causados por la metástasis: por su naturaleza sistémica y la resistencia de las células metastásicas a los agentes terapéuticos actuales⁴⁰.

La progresión de tumores depende de varios factores, entre ellos los más importantes son: el crecimiento descontrolado del tumor, la invasión y la diseminación del tumor a distintos sitios en el cuerpo⁴¹. Los mecanismos que utilizan las células de cáncer para llevarlos a cabo son muy variados e involucran distintas moléculas. Para el crecimiento descontrolado del tumor, se requiere entre otros, insensibilidad de las células de cáncer a señales apoptóticas, además de una eficiente angiogénesis, y para la diseminación del tumor a otros tejidos (metástasis), se requiere primero que células tumorales desprendidas del tumor alcancen los vasos sanguíneos o linfáticos y viajen por la sangre o linfa, para en algún momento unirse al endotelio, salir del vaso sanguíneo y degradar proteínas de la matriz extracelular para colonizar al nuevo tejido.

En varios tipos de cáncer humano se ha encontrado que la sobreexpresión de varias enzimas hidrolíticas como peptidasas, esterases y proteasas están

involucradas en el rápido crecimiento y fenotipos agresivos del cáncer⁴². Por ejemplo, se ha observado una correlación entre la sobreexpresión y la alta capacidad enzimática de la Matriz Metaloproteinasa (MMP), durante la progresión de cáncer de colón, lo que lleva a aumentar la agresividad del tumor y se ha propuesto como marcador de diagnóstico y blanco terapéutico ^{41B}.

CD13 es una de las aminopeptidasas más estudiadas y parece ser un candidato con potencial para ser utilizado como blanco terapéutico. Se ha encontrado evidencia de que la sobreexpresión de CD13 correlaciona con el aumento en procesos de invasión, diferenciación, proliferación, apoptosis, motilidad y angiogénesis asociados a la progresión tumoral^{43, 44, 45, 46}. Se ha demostrado que altas concentraciones de CD13 en suero o plasma ayuda en el diagnóstico temprano y de progresión en cáncer de mama, tiroides ⁴⁷ y más recientemente en páncreas⁴⁸. El descubrimiento de Células Madre de Cáncer (CSC, por sus siglas en inglés Cancer Stem Cells) en Hepatocarcinoma de Hígado con una alta expresión de CD13 ha empezado a explicar algunas de las fallas en su tratamiento^{49, 50}.

Existen varios anticuerpos que son capaces de reconocer a CD13 y se usan para evaluar su expresión por inmunohistoquímica en muestras de tejidos con cáncer. En la clínica, se ha utilizado la expresión de CD13 como un biomarcador de diagnóstico para evaluar la etapa de la enfermedad y como factor para predecir la supervivencia general del paciente⁵¹. Sin embargo, cada anticuerpo anti-CD13 tiene especificidad por las distintas isoformas glicosiladas de la proteína. Los sitios de glicosilación de CD13 pueden variar dependiendo de la célula que lo expresa y aunque no cambian la actividad enzimática de la proteína, si alteran el

reconocimiento por los anticuerpos^{52, 53}. En un estudio en el que compararon tres distintos anticuerpos anti-CD13: WM15, BF10 y 3D8, todos ellos detectaron la expresión de CD13 en la vasculatura de tumores; sin embargo la reactividad variaba entre los anticuerpos. Solo el anticuerpo anti-CD13 WM15 fue capaz de detectar la expresión de CD13 intratumor y en capilares peritumorales²⁴. Sin embargo, este anticuerpo se une a vasos en el hígado, lo que limita su uso para imagen *in vivo* o terapia⁵⁴. Por otra parte, el anticuerpo WM15 puede detectar la expresión de CD13 en células mieloides en homeostasis derivadas de médula ósea, mientras que el péptido NGR parece solo detectar células cancerígenas⁵⁵. Esto nos demuestra que para el uso de anticuerpos monoclonales con fines de diagnóstico o terapia, se debe ser cuidadoso con la clona que se utiliza para obtener el resultado apropiado.

Aún con estas limitantes, si bien CD13 no se usa como único marcador en cáncer, existen reportes de que la sobreexpresión de CD13 circulante o en membrana está correlacionada con una progresión avanzada del tumor, y por eso es importante su cuantificación: a) En tumores sólidos como en el cáncer de pulmón de células no pequeñas⁵⁶ se ha visto que la sobreexpresión de CD13 se asocia a una pobre respuesta a quimioterapia, y una baja tasa de supervivencia de los pacientes; además, se ha demostrado la asociación de CD13 con el Antígeno L6 asociado a tumor (TAL6, por sus siglas en inglés Tumor Associated L6 antigen TAL6) lo que aumenta la motilidad del tumor⁵⁷. b) En pacientes con Leucemia Promielocítica Aguda (APL por sus siglas en inglés Acute promyelocytic Leukemia)⁵⁸, después del tratamiento con all-trans ácido retinoico, si se presenta sobreexpresión de CD13 generalmente se puede desencadenar una complicación

denominada Síndrome de Ácido Retinoico (RAS, por sus siglas en inglés), por tanto, el diagnóstico de los niveles de CD13 en estos pacientes puede ser limitante para recibir este tratamiento y así evitar el RAS. c) Es difícil la cuantificación de CD13 en vesículas extracelulares, por su tamaño pequeño y su bajo número de copias, por lo que se desarrolló un ensayo llamado *in situ* proximity ligation, que utiliza anticuerpos contra proteínas más abundantes en las vesículas, luego se agrega el anticuerpo anti-CD13 acopladas a oligonucleótidos de DNA y se amplifica la señal, incorporándose fluoróforos para reportar el nivel de expresión de CD13⁵⁹.

Se ha demostrado en cáncer de mama y en carcinoma de próstata, que estas células se unen al endotelio a través de CD13^{60, 61}, lo que inicia la cascada de metástasis. En cáncer de hígado se han encontrado células madre de cáncer que expresan CD13 y se ha propuesto un tratamiento para este cáncer refractario usando inhibidores de CD13⁶².

La participación de CD13 no solo se ha encontrado en tumores sólidos, en el caso de Leucemia Mieloide Aguda (AML, por sus siglas en inglés Acute Myeloid Leukemia), se encontró que CD13 promueve el crecimiento y supervivencia de las células, y que la inhibición de ésta molécula con anticuerpos monoclonales puede inhibir el crecimiento de las células e inducir apoptosis, a través de moléculas como Bcl-2 y Mcl-1 después de internalizar los complejos CD13-Anticuerpo; se demostró además que esta función es independiente de su actividad enzimática⁶³. En pacientes con Leucemia Linfoblástica B Aguda (ALL-B, por sus siglas en inglés Acute lymphoblastic B leukemia), se encontró que la sobreexpresión de CD13

favorece la proliferación de las células precursoras de esta leucemia, y que la proliferación puede ser inhibida con anticuerpos específicos⁶⁴.

Se ha demostrado ampliamente la participación de CD13 en angiogénesis: a) se identificó que el motivo NGR (Asparagina-Glicina-Arginina), conocido por sus propiedades de localización de tumores “tumor homing peptide”, se une exclusivamente al endotelio angiogénico y no al endotelio que no está en angiogénesis y que su receptor es CD13⁶⁵; b) se ha detectado un aumento de CD13 en el endotelio de tejido humano proveniente de neoplasias²⁴; c) inhibidores de CD13 evitan la neovascularización en retina sometida a hipoxia⁶⁶, o en membrana corioalantoidea⁶⁷ o en crecimiento de xenoinjertos; d) aumentan los niveles de CD13 en respuesta a hipoxia, factores de crecimiento angiogénicos, y señales reguladoras de formación de tubos capilares durante la angiogénesis⁶⁸.

Anteriormente se ha descrito el papel de CD13 en la proliferación⁶³ e invasión de células tumorales. Estudios de esta última, han utilizado inhibidores como la Bestatina o algunos anticuerpos monoclonales, donde se ha relacionado la disminución en la invasión con una menor actividad enzimática y una disminución en la degradación de Colágena tipo IV⁶⁹.

1.5 Adhesión y Agregación Homotípica

En cualquier organismo multicelular, el desarrollo y las funciones multicelulares dependen en gran medida de las interacciones adhesivas específicas, ya sea entre células, o entre células y proteínas de la matriz extracelular⁷⁰. Los receptores de superficie capaces de mediar estas interacciones se denominan moléculas de adhesión celular (CAMs, por sus siglas

en inglés Cellular Adhesion Molecules,). Las moléculas “clásicas” de adhesión celular se agrupan en familias dependiendo de su estructura, así podemos encontrar: Integrinas, Ig-CAM, Caderinas, etc.

Existen también moléculas de adhesión que no son “clásicas” ya que pueden mediar la adhesión además de otras funciones, entre estas moléculas se encuentran varias enzimas y otros receptores de membrana como: CD43⁷¹, CD98⁷², CD137⁷³, CD147⁷², entre otras. En la figura 2 se muestran algunos tipos de adhesión dependiendo si la unión es entre receptores idénticos o diferentes y dependiendo también del linaje celular involucrado.

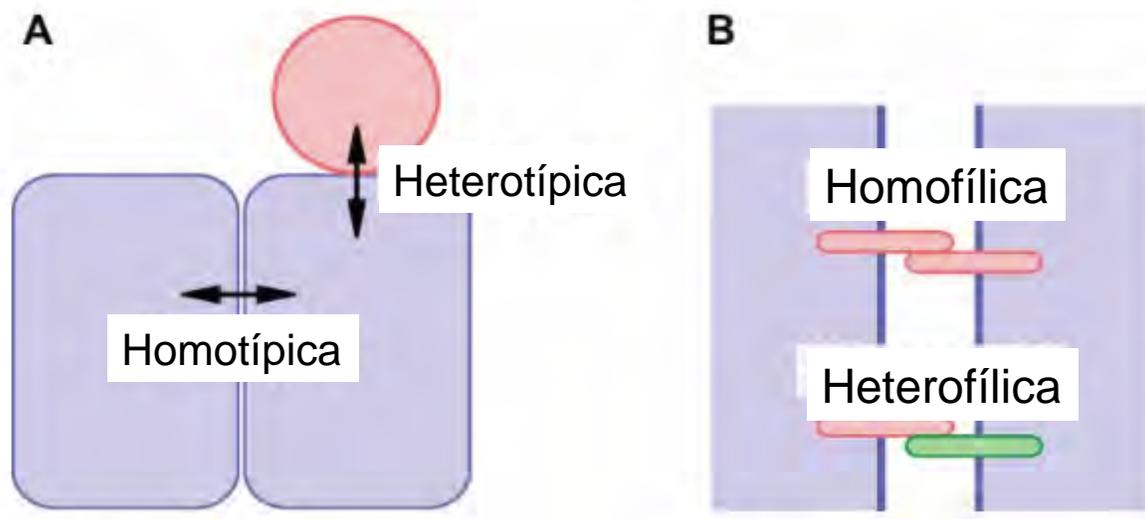


Figura 2. Tipos de adhesión célula-célula. A) La adhesión si es entre células del mismo linaje se denomina homotípica y si es entre células de linajes distintos se denomina heterotípica. B) Se le llama adhesión homofílica cuando los receptores en ambas células son idénticos y adhesión heterofílica cuando las moléculas involucradas son diferentes.

Una de las primeras evidencias de la participación de CD13 en adhesión fue la observación de Menrad⁷⁴ en 1993, donde la tinción de CD13 con un anticuerpo monoclonal (clona 452) en células de mieloma aisladas mostraba una

localización difusa, mientras que cuando las células en cultivo formaban pequeñas colonias, CD13 se encontró en los sitios de contacto célula-célula.

La adhesión puede tener repercusiones en la expresión de CD13 en células que de manera fisiológica no la expresan, este es el caso de linfocitos T y B, como se ha demostrado experimentalmente. En condiciones de inflamación, es necesario el contacto célula-célula, por ejemplo entre monocitos o células del endotelio y los linfocitos para inducir la expresión de CD13 en forma transitoria¹. El curso temporal de la expresión de CD13 en linfocitos es rápido y diferente a la de los monocitos, por ejemplo, en células B y T de amígdala, después de tan solo 1 hora de estimulación con sinoviocitos, se detecta la expresión de CD13. Esta expresión puede ser como proteína en membrana o como ARNm y se mantiene hasta por 16 horas⁷⁵.

Nuestro grupo describió por primera vez³⁴ que CD13 es capaz de inducir la agregación homotípica usando como modelo monocitos humanos de la línea celular U-937. En este trabajo se describió que al entrecruzar CD13 con algunos anticuerpos monoclonales se observa la agregación de las células y que esta agregación es dependiente de energía y de vías de señalización intracelulares. Se descartó: 1) que se tratara de una simple aglutinación causada por anticuerpos bivalentes, 2) la participación de su actividad enzimática, 3) que cualquier anticuerpo que reconoce proteínas expresadas en la superficie de los monocitos como anticuerpos anti-CD33, etc, inclusive distintos anticuerpos anti-CD13 fueran capaces de inducir la agregación.

Durante los procesos inflamatorios, las moléculas de adhesión intervienen en la adhesión y migración de los leucocitos a través del endotelio. El grupo de

Shapiro¹⁰ demostró que al entrecruzar CD13 con anticuerpos monoclonales o bien con partículas virales se induce la adhesión celular monocito/endotelio dependiente de transducción de señales intracelulares, el rearreglo del citoesqueleto y la formación de filopodia.

1.6 Anticuerpos Monoclonales como herramienta para la identificación de Proteínas y Terapia

Los anticuerpos son proteínas que pueden reconocer pequeñas diferencias en una misma molécula ya que son altamente específicas. Gracias al desarrollo de los anticuerpos monoclonales por Köhler y Milstein en 1975⁷⁶ basada en la Teoría de Selección Clonal, donde se combinan el núcleo de células normales productoras de anticuerpos con su contraparte maligna, se pueden obtener moléculas de anticuerpo purificadas, específicas, únicas y en cantidades inagotables. Esta técnica ha sido enormemente utilizada con aplicaciones en diagnóstico y terapia, en los últimos 35 años ha tenido un desarrollo exponencial y un gran número de anticuerpos monoclonales están siendo patentados para investigación, en clínica, etc⁷⁷

En los años 90 en la búsqueda de biomarcadores para cáncer y gracias a la producción de anticuerpos monoclonales, se describieron numerosas moléculas expresadas en la superficie de células de cáncer, tal es el caso de la Aminopeptidasa N/CD13 encontrada gracias al anticuerpo monoclonal: clona 452 (anti-CD13)⁷⁴ presente en células de melanoma humano pero no en melanocitos normales. Originalmente, se buscaron antígenos únicos en las células de cáncer, sin embargo, se identificaron algunas moléculas presentes en las células de

manera fisiológica; posteriormente se describió que en algunos casos lo que cambiaba era el nivel de expresión o la presencia de isoformas y esto confería a la célula de cáncer características que le permitían mayor poder de invasión, angiogénesis, resistencia a la apoptosis, etc. Se observó también la utilidad de la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales para encontrar moléculas presentes en las células que pueden expresarse como consecuencia por algún estímulo o bien, por alguna transformación de la célula.

Para algunas leucemias, como la Leucemia mieloide aguda, el tratamiento de elección es quimioterapia y solo en casos refractarios pueden recibir terapia con células madre con resultados discretos en cuanto a la supervivencia del paciente. La inmunoterapia que incluye terapia con anticuerpos, parece prometedora y puede clasificarse en a) anticuerpos clásicos sin conjugar, b) anticuerpos multivalentes recombinantes (bi, tri, tetra-específicos), c) anticuerpos conjugados a toxinas, o d) anticuerpos conjugados con radio isótopos. Mientras que los anticuerpos sin conjugar pueden facilitar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés cell antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) mediada por células NK (Natural Killer), los anticuerpos multivalentes pueden favorecer la acción de NK o linfocitos CD8 citotóxicos para desencadenar la ADCC de manera más eficiente. Finalmente, los anticuerpos conjugados a toxinas o a radio isótopos pueden aumentar la potencia de las terapias con anticuerpos⁷⁸. El reto consiste en decidir cuales son los antígenos que se utilizarán, dentro de los principales candidatos para la Leucemia mieloide aguda se encuentran CD33, CD123, CD13, CLL-1 y CD38 presentes tanto en blastos como en células madre.

Con el uso de distintos agentes citotóxicos se ha observado varios casos de Multidrogo-resistencia, utilizando un modelo de Hepatocarcinoma celular se encontró que algunas drogas citotóxicas aumentan la expresión de CD13 y la supervivencia de las células y al inhibir la función de CD13 con anticuerpos neutralizantes o inhibidores como la bestatina o siRNAs se incrementa el efecto citotóxico del 5-fluorouracil. La inhibición de CD13 lleva a un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno lo que aumenta la sensibilidad a drogas citotóxicas⁷⁹. Por lo anterior, al utilizar drogas híbridas como Bestatina acoplada a 5-fluorouracil se obtiene un efecto sinérgico importante lo que aumenta significativamente la supervivencia de los ratones experimentales utilizados. Por lo anterior, es de gran interés contar con anticuerpos que reconozcan a proteínas involucradas en distintas etapas de invasión, proliferación y escape de células malignas y sean a la vez capaces de inhibir una o varias de sus funciones

2.0 HIPÓTESIS

Con el uso de anticuerpos monoclonales podremos identificar moléculas participantes en el proceso de adhesión celular inducido por el entrecruzamiento de CD13.

3.0 OBJETIVO GENERAL

Conocer el mecanismo y las moléculas que participan en el proceso de agregación homotípica de monocitos inducido al entrecruzar CD13 con anticuerpos monoclonales específicos.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener anticuerpos monoclonales capaces de inhibir la agregación homotípica de monocitos inducida por el entrecruzamiento de CD13
2. Caracterizar los anticuerpos obtenidos.
3. Identificar las moléculas que reconocen los anticuerpos inhibidores
4. Caracterizar la inhibición de la adhesión homotípica de monocitos y la adhesión heterotípica entre monocitos y células endoteliales
5. Determinar el posible mecanismo a través del cual se lleva a cabo la inhibición de la agregación homotípica y de la adhesión

4.0 MATERIALES Y METODOS

4.1 Líneas celulares y cultivos primarios

Monocitos humanos de las líneas celulares U-937 y THP-1 (ambas obtenidas de ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA USA) y de la línea THP-1 L2 (Células THP-1 con baja expresión de CD13)¹² fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Invitrogen) complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB-GIBCO), 2 mM L-glutamina, Aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, penicilina y estreptomycin. Las células HEK-293 (ATCC) y HEK-ANPEP (HEK-293 que expresan CD13-GFP humano, obtenidas como se describe por Licona-Limón¹²), fueron cultivadas en DMEM (Invitrogen) complementado como se detalla anteriormente para el medio RPMI-1640. Las células endoteliales de microvasculatura humana HMEC-1 (originalmente del ATCC, donadas por la Dra. Dolores Correa, Instituto Nacional de Pediatría, México) fueron cultivadas en medio MCDB-131 suplementado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Macrófagos murinos de la línea J744 que expresan CD13 humano (J744-hCD13) fueron cultivados en DMEM (Invitrogen) complementado como se describe para el medio RPMI-1640.

Monocitos humanos de sangre periférica fueron obtenidos de concentrados leucocitarios de donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (generosamente donados por la Dra. Mónica Viveros Rogel). Las células mononucleares fueron aisladas por gradientes de Lymphoprep (Axis Shield) y los monocitos fueron seleccionados por adherencia en cajas petri sensibilizadas con suero autólogo. Las células fueron cultivadas en

medio RPMI-1640 (Invitrogen) complementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y suplementos como se describe anteriormente.

4.2 Anticuerpos

Los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales C (IgG1) o anticuerpo E (IgG2b) fueron obtenidos siguiendo el protocolo de producción de anticuerpos monoclonales descrito por Zelig en 1985⁸⁰. Brevemente, ratones hembras de la cepa BALB/c, de 4 semanas de edad, fueron inmunizados cada dos semanas durante dos meses vía intraperitoneal con 5×10^6 células U-937 agregadas después de la estimulación con el AcMo anti-CD13 clona 452 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por dos horas) por cada animal. Al final del esquema de inmunización, se dejaron descansar los ratones por 3 semanas y se dio un refuerzo tres y cuatro días antes de la fusión.

Los animales se manejaron y se sacrificaron de acuerdo a los lineamientos establecidos por el CICUAL (Comité de cuidado y uso de animales de experimentación) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para la obtención de los hibridomas, se aislaron las células del bazo de los ratones inmunizados, y se mezclaron con células de mieloma P3X63Ag8U.1 (obtenidas del ATCC[®] CRL-1597[™]) seleccionadas como células deficientes de la enzima HGPRT con 8-azaguanina, (Sigma). Para la fusión se utilizó PEG 1550 (SERVA, Heidelberg, Alemania).

Los hibridomas fueron seleccionados en base a su capacidad de secretar anticuerpos capaces de inhibir la agregación homotípica (AH) de células U-937

inducida por el anticuerpo anti-CD13 (clona 452). El ensayo de selección se realizó incubando 50 μ l de sobrenadante de cultivo de los hibridomas a 37° C, durante 60 min en placas de 96 pozos en presencia de una suspensión de células U-937 (100,00 células/pozo). Al final de la incubación se agregó el anticuerpo 452 para inducir la agregación homotípica (concentración final 1 μ g/ml) y las células se incubaron por 2 horas adicionales. La inhibición de la agregación homotípica fue determinada visualizando cada pozo en el microscopio invertido Axiovert 25 (Zeiss, Alemania); solo se consideró como clona positiva, aquellos sobrenadantes que causaron una inhibición total de la agregación.

Los hibridomas seleccionados por su capacidad de inhibir la agregación homotípica fueron clonados por dilución limitante en placas con 0.5, 1 y 10 células/pozo. Las clonas obtenidas fueron expandidas y caracterizadas. Se determinó el isotipo de los anticuerpos secretados con un kit (Invitrogen, CA, USA). El Anticuerpo monoclonal C es de isotipo IgG1 y el anticuerpo monoclonal E es de isotipo IgG2b. Los anticuerpos obtenidos fueron purificados por cromatografía de afinidad en columnas de proteína G o proteína A unidas a agarosa, respectivamente.

El anticuerpo 452 (IgG1), fue purificado a partir del sobrenadante de cultivo del hibridoma, generosamente donado por el Dr. Meenhard Herlyn del Wistar Institute of Anatomy and Biology en Philadelphia, PA. La purificación del anticuerpo se llevó a cabo en columnas de proteína G-agarosa.

Se prepararon fragmentos Fab a partir de los anticuerpos purificados utilizando Ficina (IgG1) o papaína (IgG2b) inmovilizadas (Pierce, Thermo

Scientific, Rockford, IL, USA). La digestión se realizó por 5 horas a 37° C de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos anti-CD13 fueron marcados directamente con biotina, utilizando N-hidroxysuccinimido-biotina (SIGMA, St Louis MO, USA) en buffer de bicarbonato pH=8.2 por 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos C, E y 452 fueron acoplados en nuestro laboratorio directamente con FITC (Sigma, St Louis, MO, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Otro anticuerpo anti-CD13 utilizado fue el producido por la clona WM15 acoplado a APC (Biolegend, USA). Los fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos anti-IgG murina fueron adquiridos a Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Los anticuerpos secundarios Goat anti-mouse-FITC (para citometría) o goat anti-mouse-HRP (para western blot) fueron adquiridos de Zymed (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

El cóctel de anticuerpos anti-fosfotirosina fue preparado con los anticuerpos 4G10 (Upstate Biotechnology, Inc), PY20 (Santa Cruz Biotechnology) y AFT-8 (donado generosamente por el Dr. Carlos Rosales, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

4.3 Inhibición de la agregación homotípica y desagregación

Monocitos humanos de la línea celular U-937 (100,000 células/50 µl de RPMI-1640 complementado) fueron colocados en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning, NY, USA) y fueron incubadas con anticuerpos a las concentraciones indicadas por 60 min a 37° C en incubadora con 6% de CO₂ y

humedad controlada. Al cabo de la incubación se adicionó el anticuerpo activador 452 anti-CD13 (1 µg/ml) a cada pozo, y las células fueron incubadas por dos horas adicionales a 37° C. La agregación homotípica fue evaluada con imágenes de cada pozo captadas con una cámara Canon unida a un microscopio invertido Zeiss Axiovert 25. Las células en los agregados fueron cuantificadas usando el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA), con la función de contar colonias.

Los datos son presentados como índice de agregación (IA):

IA= [número de células detectadas por software como colonia azul en cada imagen (células agregadas)/número total de células detectadas x 100], como se describió previamente³⁴. El efecto de los anticuerpos inhibidores se expresa como el porcentaje del IA. Se ajustó el software para detectar como colonias azules, aquellas que formaban agregados con más de 3-4 células, y con una densidad óptica suficiente para evitar errores de detección. El IA fue menor al encontrado cuando se cuentan manualmente las colonias, pero comparable, fue necesaria esta medida porque se obtenían agregados grandes, difíciles de cuantificar y queríamos evitar subjetividad. El análisis estadístico se llevó a cabo usando una prueba de varianza (one way anova) con una $p < 0.0001$ realizado con GraphPad PRISM versión 5 para Mac.

Para evaluar si los anticuerpos C y E eran capaces de desagregar complejos ya formados, incubamos los monocitos U-937 primero con el anticuerpo 452 (1 µg/ml) inductor de la agregación por dos horas a 37° C. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos monoclonales C (0.3 µg/ml), E (0.1 µg/ml), o IgG control (0.3 µg/ml) y se determinó el IA como se mencionó anteriormente,

observando las células a distintos tiempos hasta las 24 horas. El análisis estadístico ANOVA de dos vías mostró una significancia $p < 0.0001$ realizado con GraphPad PRISM versión 5 para Mac.

4.4 Inmunoprecipitación e inmunoblot

Para identificar la proteína reconocida por los anticuerpos monoclonales inhibidores se lisaron monocitos U-937 (10×10^6 células) en buffer de lisis con 1% de NP-40 (Sigma) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Después de agitar vigorosamente en el vórtex por algunos segundos, los lisados se incubaron por 15 min en hielo y fueron centrifugados a $20817 \times g$ por 15 min a $4^\circ C$. Se transfirieron los sobrenadantes y se hizo un preaclaramiento con perlas de sefarosa por 1 hora a $4^\circ C$ y nuevamente el sobrenadante obtenido se transfirió a tubos nuevos con perlas de proteína A/G agarosa cubiertas con los sobrenadantes de cultivo de los anticuerpos C, E, o los anticuerpos purificados 452 o IgG control. La inmunoprecipitación se incubó toda la noche a $4^\circ C$ en agitación suave. Las perlas lavadas con los inmunoprecipitados o los lisados totales fueron hervidos con buffer de Laemmli con agente reductor, las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (7.5%) (Hoeffer, Invitrogen) y fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa en cámara semiseca (Bio-Rad). Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario relevante correspondiente C, E, o 452 ($2 \mu g/ml$) y se reveló la presencia de las bandas reconocidas con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (goat anti-mouse IgG-HRP, Zymed-ThermoFisher, Rockford, IL, USA) diluído 1:10,000. Las bandas

se detectaron con el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford IL, USA).

Los monocitos humanos aislados de donadores sanos (5×10^6) y las células endoteliales HMEC-1 (2×10^6) fueron lisadas y probadas en condiciones similares a las descritas anteriormente, inmunoprecipitando con perlas cubiertas con los anticuerpos C o E y revelando la presencia de CD13 en blot con el AcMo 452 y un anticuerpo secundario goat-anti mouse HRP.

4.5 Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas MALDI TOF/TOF.

Lisados de los monocitos U-937 fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos C, E o 452, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida como se describió anteriormente y el gel se tiñó con azul de Coomassie. Se cortó la banda de interés con un peso de 160 kDa. La porción de gel obtenida fue lavada y digerida en el gel con tripsina (Promega) por 6 h a 37° C. Los péptidos obtenidos fueron extraídos en dos etapas, secados parcialmente y disueltos en 0.1% TFA (Aldrich, Milwaukee, WI). Las sales fueron retiradas por extracción en fase sólida utilizando C18-ZipTip (Millipore, Bedford, MA) con 10 μ l de una mezcla 1:1 TFA: acetonitrilo. Los péptidos fueron analizados por Espectrometría de masas MALDI TOF/TOF en el laboratorio del Dr. Jose Luis Gallegos en el INMEGEN, México. Para la identificación de las proteínas se hizo una búsqueda en las bases de datos de espectro de MALDI TOF/TOF utilizando el algoritmo de búsqueda de MASCOT contra la taxonomía solo de *Homo sapiens* en la base de

datos no redundantes del (NCBIInr) (versión 1.6b9; MatrixScience, London,UK, disponible en <http://www.matrixscience.com/>).

4.6 Ensayos de unión e internalización

La unión de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 a distintas células fue evaluada por citometría de flujo. Brevemente, en placas de 96 pozos con fondo en “U” se incubaron las células (2×10^5) a las concentraciones indicadas de anticuerpos monoclonales anti-CD13 o IgG control por 30 min a 4° C. Se lavaron las células dos veces y se agregó el anticuerpo secundario goat-anti-mouse IgG acoplado a FITC (1:400) por 30 min a 4° C, cubiertos de la luz. Después de lavar, las células se fijaron con 1% de PFA (Sigma) en PBS por 20 min a 4° C y se analizó la unión en el citómetro Azul-Violeta de Applied Biosystems Attune Acoustic Focusing (Carlsbad, CA USA).

Para determinar la internalización de CD13 en presencia de los distintos anticuerpos monoclonales anti-CD13 se incubaron los monocitos U-937 con las concentraciones indicadas de los anticuerpos por dos horas a 4 o 37° C. Las células se transfirieron a 4°C, se lavaron con buffer de lavados y fueron fijadas con 1% PFA en PBS por 20 min a 4° C. Después de lavar, las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD13 acoplado a FITC que no compitiera por el mismo epítipo (452 vs anticuerpo C-FITC o E-FITC y viceversa), la expresión en membrana de CD13 fue evaluada por citometría de flujo como se indicó anteriormente.

4.7 Determinación de actividad enzimática de la Aminopeptidasa N (APN)

La actividad enzimática de APN fue determinada por un ensayo colorimétrico basado en la hidrólisis del sustrato L-alanine-4-nitroanilide hydrochloride (Sigma, USA), descrito previamente⁸¹. Brevemente, se colocaron monocitos humanos U-937 (100,000 células/50 μ l PBS con 10% SFB) en placas de fondo plano de 96 pozos (Corning) y se incubaron con las concentraciones indicadas de los anticuerpos monoclonales o del inhibidor de APN Bestatina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA) durante 1 h a 37^o C. Para observar el máximo efecto de la bestatina sin afectar la viabilidad de las células se utilizaron las dosis de 4 μ g/ml para U-937 o 40 μ g/ml para HEK-ANP. Después de la incubación de las células, se adicionó el sustrato a una concentración final de 6 mM y las placas se incubaron por 1 h a 37^o C. Las placas se centrifugaron y se determinó inmediatamente la absorbancia de los sobrenadantes a 405 nm en lector de ELISA (Multiskan Ascent, Labsystems). Las muestras se trabajaron en triplicado y los datos se presentan como el porcentaje de la actividad enzimática de las células control, las cuales no fueron incubadas con estímulo o anticuerpo antes de la adición del sustrato comparado con los experimentales. Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos independientes por triplicado, el análisis estadístico se llevó a cabo usando una ANOVA de dos vías con un nivel de significancia de 0.0001.

4.8 Ensayo competitivo de unión

Monocitos U-937 (2×10^5) se incubaron con concentraciones saturantes de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 o IgG control (no marcados con fluorocromo) en buffer de lavados para FACS por 30 min a 4° C. Después de lavar las células, se agregaron concentraciones saturantes de los anticuerpos anti-CD13 conjugados directamente con FITC y se incubaron por 30 min a 4° C. Las células se lavaron y se fijaron con 1% de paraformaldehído (PFA) en PBS y se determinó la unión de los anticuerpos fluorescentes por citometría de flujo en los equipo Azul-Rojo (Applied Biosystems Attune Acoustic Focusing Cytometer, Carlsbad, CA USA).

4.9 Determinación del $[Ca^{2+}]$ intracelular por Citometría de flujo.

Monocitos humanos de la línea celular U-937 se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/ml en RPMI-1640 con 2% SFB (Gibco, Invitrogen USA). Los indicadores fluorescentes de $[Ca^{2+}]$ se disolvieron en DMSO (50 μ g en 50 μ l) y luego se preparó una solución de colorante 2x con 30 μ l de Fluo3 (6 μ g/ml) y 50 μ l de FuraRed (10 μ g/ml) en 5 ml de RPMI 2% SFB. A la suspensión celular se adicionó la solución de colorante 2x (1:1) v/v para una concentración final de 2.5 μ M de Fluo-3-AM y 4.6 μ M de Fura Red (Invitrogen, Molecular Probes), y se incubaron con agitación suave y constante durante 45 min a 37° C cubiertos de la luz. Las células se lavaron dos veces con medio sin suero y se dejaron incubando por 45 min adicionales a temperatura ambiente en medio sin suero con agitación suave y constante, cubiertas de la luz. Después de lavar, las

células se resuspendieron en medio sin suero a la concentración de 5×10^6 células/ml y se mantuvieron a 4° C cubiertas de la luz hasta que se pasaron por el citómetro.

De la suspensión de células, se transfirieron 1×10^6 células a 37° C por 3 min y se adicionó 800 μ l de medio sin suero a 37° C. El tubo se llevó al citómetro, manteniéndolo en un baño de agua a 37° C, donde se colectaron las células a velocidad media durante 2 min hasta observar una línea basal estable, en ese momento se adicionaron los estímulos: 2 μ g/ml de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 C, E, o 452, anti-Fc γ RI AcMo 32.2 (como control positivo), y se colectaron las células durante 3 min. Para entrecruzar los anticuerpos se adicionaron 12 μ g/ml de fragmentos F(ab) $'_2$ de goat anti-mouse y se continuó colectando la muestra por 5 minutos adicionales; como control positivo se agregó Ionomicina (100 nM) y como control negativo se probó IgG control.

El análisis de citometría del flujo de [Ca $^{2+}$] intracelular se llevó a cabo en un Citómetro de Flujo FACScalibur (Becton–Dickinson, Heidelberg, Alemania) con una excitación del láser de 488 nm, las emisiones de fluorescencia fueron colectadas con los filtros FL1 para Fluo-3 en escala lineal y FL3 para FuraRed en escala logarítmica. Los datos obtenidos fueron procesados con el programa FACSASSIST (Becton–Dickinson) tomando el cociente de FL1/FL3 con respecto al tiempo y graficando con el programa GraphPad PRISM versión 5 para Mac.

4.10 Fosforilación en tirosina de CD13.

Las células U-937 fueron incubadas en medio RPMI-1640 complementado sin suero durante 2 horas a 37° C. Se ajustó la concentración a 2×10^7 células/muestra y se trataron con los anticuerpos anti-CD13 activadores (452, 1 $\mu\text{g/ml}$) o inhibidores (C, 0.3 $\mu\text{g/ml}$, o E, 0.1 $\mu\text{g/ml}$) por los tiempos indicados a 37° C en medio de cultivo con 3.5% de SFB (Invitrogen). Inmediatamente después de la estimulación, la reacción se paró adicionando un volumen igual de TBS frío, las células se lavaron una vez y los monocitos se lisaron en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH =7.4 con 1% NP-40) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas por 15 minutos a 4° C. La suspensión celular se agitó vigorosamente en el vórtex y los lisados fueron centrifugados a 20817 x g por 15 minutos a 4° C.

Se tomó el sobrenadante que fue incubado primero con perlas de sefarosa por 60 minutos a 4° C, seguido de una incubación toda la noche a 4° C con perlas de proteína G agarosa cubiertas con el anticuerpo monoclonal C o 452 (20 $\mu\text{g}/20$ μl de perlas). Después de lavar, las perlas se resuspendieron en buffer de Laemmli reductor y se incubaron 5 min en agua hirviendo. Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 7,5% y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió anteriormente. Las membranas se bloquearon toda la noche a 4° C con 3% BSA en TBS-tween 0.1%, pH = 7.4.

La fosforilación de CD13 fue detectada en las membranas con una mezcla de anticuerpos anti-fosfotirosina (PY-20 Santa Cruz, 4G10 Upstate Biotechnology, y AFT-8 donado generosamente por el Dr. Carlos Rosales, IIB, UNAM) a una

concentración de 2 µg/ml de cada anticuerpo en la solución de bloqueo, incubando durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave y constante. Para detectar CD13, los blots fueron probados con el anticuerpo monoclonal anti-CD13 452 a una concentración de 2 µg/ml. Después de la incubación con los anticuerpos primarios relevantes, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario goat-anti mouse HRP (Zymed) (1:10,000) y las proteínas fueron visualizadas con el kit SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

4.11 Ensayo de adhesión celular.

El ensayo de adhesión de monocitos a placas sensibilizadas con fibronectina (10 µg/ml) fue descrito previamente⁸². En este trabajo se utilizaron células HEK-ANPEP-GFP tratadas o no con diferentes dosis de los distintos anticuerpos anti-CD13: 452, WM15, C, o E, por 30 min a 37° C. Después de estimular las células se transfirieron a las placas cubiertas con fibronectina (Calbiochem, San Diego CA, USA) o solo bloqueadas con BSA y se dejaron incubando por 15 min a 37° C para permitir la adherencia. Las células se lavaron por las paredes con 100 µl/pozo de medio DMEM sin suero y sin rojo de fenol (a 37° C), con mucho cuidado para no despegar las células. La fluorescencia de las células que permanecieron adheridas fue determinada a 485/530 nm en un Espectrofluorómetro de microplaca Cytation 3 (BIOTEK Winooski, VT USA).

Para los ensayos de adhesión heterotípica utilizamos células endoteliales de la línea celular HMEC-1, que fueron cultivadas en placas de 48 pozos (25,000

células/ pozo) durante 48 horas a 37° C en incubadora húmeda con 6% de CO₂. Por otro lado, se marcaron monocitos humanos de la línea celular U-937 con 1 µl/3x10⁶ células de una solución 10 mM de CFSE (Invitrogen) en DMSO. Las células resuspendidas en medio sin suero fueron incubadas durante 7 min a 37° C protegidas de la luz con agitación ocasional. Los monocitos marcados con CFSE fueron tratados o no con los anticuerpos monoclonales anti-CD13 452, C, o E (10 µg/ml) o IgG control por 3 horas a 37° C. Después de lavar las células, se ajustó la concentración a 100,000 células / 50 µl, se dejaron sedimentar por 5 min a temperatura ambiente sobre la monocapa de células HMEC-1, después se incubaron las células 15 min a 37° C, y se lavaron los pozos muy suavemente con RPMI sin rojo de fenol. Finalmente, las células se resuspendieron en 50 µl del mismo medio. La fluorescencia (de los monocitos U-937 marcados con CFSE que permanecieron adheridos a las endoteliales HMEC-1) fue medida a 485/530 nm en un Lector Multimodal Modulus II (Turner BioSystems, Inc, USA)

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de anticuerpos monoclonales inhibidores de la agregación homotípica

Utilizando como modelo monocitos humanos de la línea celular U-937, nuestro grupo de trabajo reportó previamente que al entrecruzar CD13 con ciertos anticuerpos monoclonales se induce la agregación homotípica³⁴. Este fenómeno es un proceso que requiere energía metabólica ya que, por un lado, solo se lleva a cabo a 37° C, además de que inhibidores de la glicólisis detienen el proceso. Estas características sugieren que la agregación de las células observada no se trata de una simple aglutinación ocasionada por los anticuerpos, la cual podría ocurrir aún a 4° C.

Con el propósito de identificar moléculas de membrana participantes en el proceso de agregación homotípica, decidimos abordar el problema generando anticuerpos monoclonales capaces de inhibir el proceso de agregación homotípica inducido por el anticuerpo anti-CD13 (clona 452) y usar dichos anticuerpos para identificar la proteína reconocida.

Para cumplir con este objetivo, inmunizamos 5 ratones Balb/c con monocitos humanos de la línea celular U-937 que previamente fueron incubadas con el anticuerpo anti-CD13 (clona 452) por 2 h a 37° C. Cuando se observó una clara agregación, las células se lavaron y se inocularon por vía intraperitoneal en los ratones, siguiendo un protocolo con inmunizaciones cada 15 días. Después de concluir la inmunización como se indica en Materiales y Métodos, un ratón fue sacrificado, se obtuvo el bazo, y los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma de la línea celular P3X63Ag8U.1 (obtenida del ATCC® CRL-1597™)

Las células fusionadas se sembraron en 4 cajas Petri de 96 pozos y se dejaron en la incubadora de CO₂ a 37° C. Al día 10 se observó el crecimiento de 140 colonias de los 240 pozos utilizados, en algunos pozos se observaron más de 1 colonia/pozo, y en otros pozos no hubo crecimiento de células, esto constituye el 58.33% de pozos con crecimiento de células. El proceso de selección se llevó a cabo determinando la capacidad de los sobrenadantes de los hibridomas resultantes para inhibir la agregación homotípica de células U-937 inducida por el anticuerpo anti-CD13 (clona 452). Monocitos humanos U-937 se incubaron en presencia de los sobrenadantes de los hibridomas durante 1 h a 37° C. Posteriormente, se agregó el anticuerpo que induce la agregación homotípica de estas células (clona 452) y se incubó durante dos horas más. Al cabo de este tiempo, se observaron al microscopio óptico las células en cada pozo para evaluar el grado de agregación obtenido, detectando así aquellos hibridomas productores de anticuerpos capaces de inhibir la agregación homotípica (Figura 3).

Se obtuvieron 5 hibridomas productores de anticuerpos inhibidores de la agregación homotípica, que fueron nombrados de acuerdo a su ubicación en la placa de la fusión y después fueron designados con las letras A- E. En la tabla 2 se muestran los hibridomas obtenidos. Los hibridomas B y D dejaron de proliferar al cabo de algunas semanas y los hibridomas A, C y E fueron clonados y caracterizados. La primera prueba que se realizó fue determinar la clase y subclase de cada anticuerpo, para lo cual se utilizó un kit comercial de Sigma. En la Tabla 2 se indica la clase y subclase a la que pertenece cada anticuerpo.

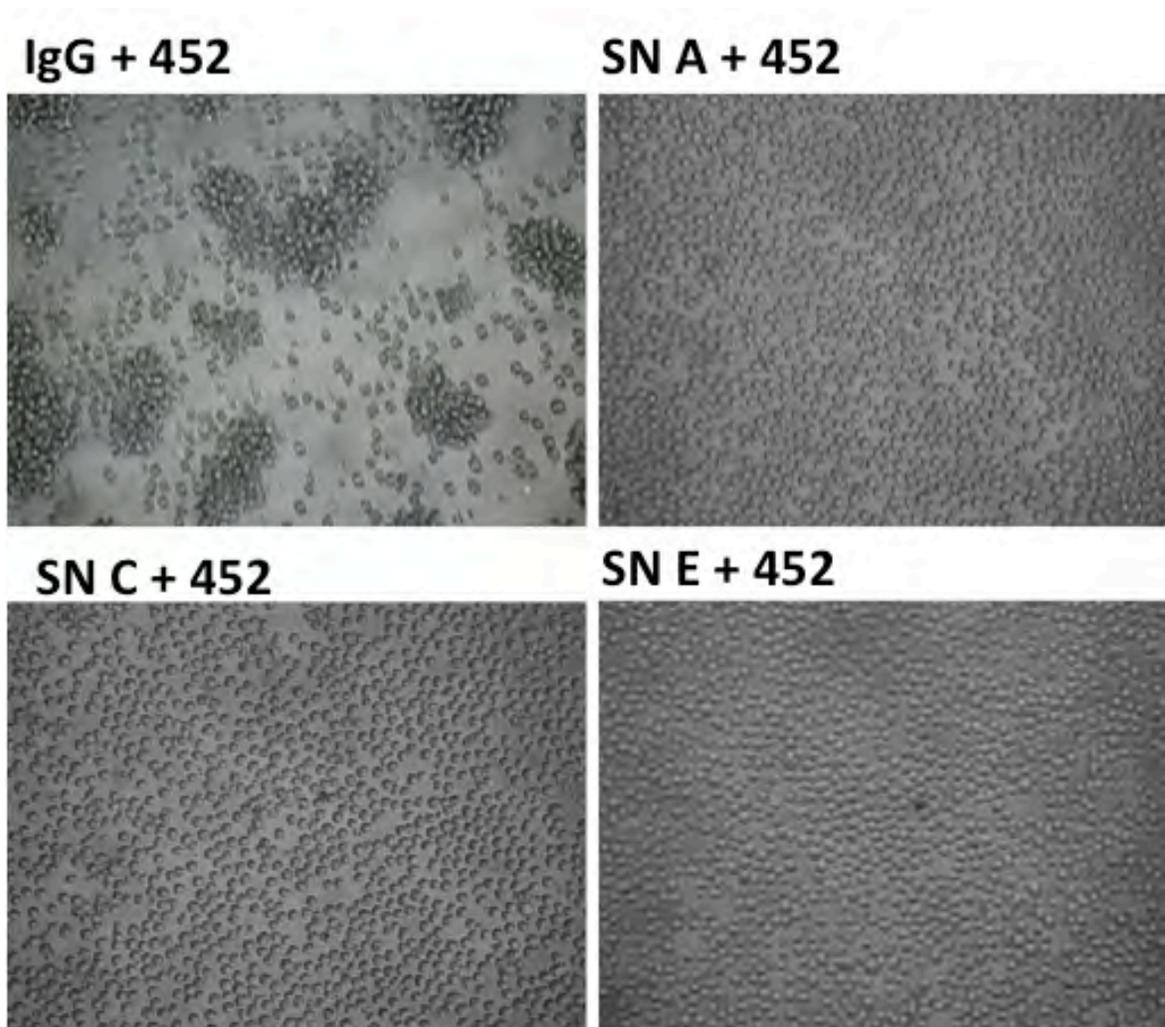


Figura 3. Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas seleccionados inhiben la Agregación Homotípica. Monocitos humanos de la línea U-937 fueron incubados con IgG o con sobrenadante de los hibridomas A (SN A), hibridoma C (SN C), hibridoma E (SN E) durante 1 h a 37° C, posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-CD13 (clona 452) para inducir la agregación homotípica y se dejó incubar durante 2 h más. Después se determinó la agregación o inhibición de la misma al microscopio.

Para asegurarnos de la monoclonalidad de los hibridomas se utilizó la técnica de clonación por dilución limitante, donde se calculó sembrar 0.5, 1 ó 5 células/pozo, en placas de 96 pozos. Después de verificar en el microscopio al cabo de 10 a 14 días aquellos pozos en los que hubo la presencia de una única clona, se tomó el sobrenadante de los pozos y se realizó nuevamente la prueba de

la inhibición de la agregación homotípica. Se seleccionaron aquellos pozos con mayor inhibición y se expandieron en cultivo. Se congelaron alícuotas de células de esas clonas y se colectó sobrenadante de los cultivos para purificar los anticuerpos monoclonales.

HIBRIDOMAS	UBICACIÓN	ISOTIPO
A	1C4	IgA
B	1E8	—
C	1D9	IgG1
D	3E9	—
E	3D10	IgG2b

Tabla 2. Listado de hibridomas inhibidores de la Agregación Homotípica.

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad a partir del sobrenadante de cultivo de los hibridomas A, C y E, utilizando perlas de agarosa recubiertas con proteína A/G, proteína G y proteína A respectivamente.

Como el anticuerpo A es de la clase de anticuerpo IgA y su purificación y sus controles de isotipo son más complicados, se decidió continuar el proyecto trabajando solamente con los anticuerpos C y E.

5.2 La inhibición de la agregación homotípica es dosis dependiente, transitoria y reversible.

Una vez con los anticuerpos purificados, se probó si la inhibición de la agregación homotípica era dosis dependiente, para lo cual se incubaron monocitos

humanos U-937 con un amplio rango de concentraciones (entre 0.001 y 250 $\mu\text{g/ml}$) de los anticuerpos inhibidores o de una IgG control, durante 1 h. Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-CD13 (clona 452) que induce la agregación y se determinó al microscopio la agregación después de 2 horas de incubación a 37° C. Como se puede observar en la Figura 4 A, se obtiene el 100% de inhibición desde las concentraciones de 0.1 y 0.03 $\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos C y E respectivamente. El efecto de inhibición se observó desde el principio de la incubación con el anticuerpo inhibidor y permanece hasta las 24 horas. Después de este tiempo, algunas células se observan en pequeños agregados.

Probamos en las células U-937 si había un efecto sobre la proliferación en presencia de los anticuerpos 452, C y E, las células se marcaron con CFSE y se incubaron en presencia de los anticuerpos a las concentraciones de 452 (1 $\mu\text{g/ml}$), C (0.3 $\mu\text{g/ml}$) y E (0.1 $\mu\text{g/ml}$) donde se obtuvo el mayor efecto en la inhibición de la agregación homotípica, se determinó la proliferación por citometría de flujo. A estas concentraciones no se observó efecto sobre la proliferación comparado con una IgG control (datos nos mostrados). Aunque existen reportes en el que la unión de anticuerpos anti-CD13 como el MY7 detienen la proliferación de células de leucemia mieloide aguda⁸³, las concentraciones en las que se observa este efecto son 100 veces mayor a las concentraciones en las que probamos nuestros anticuerpos.

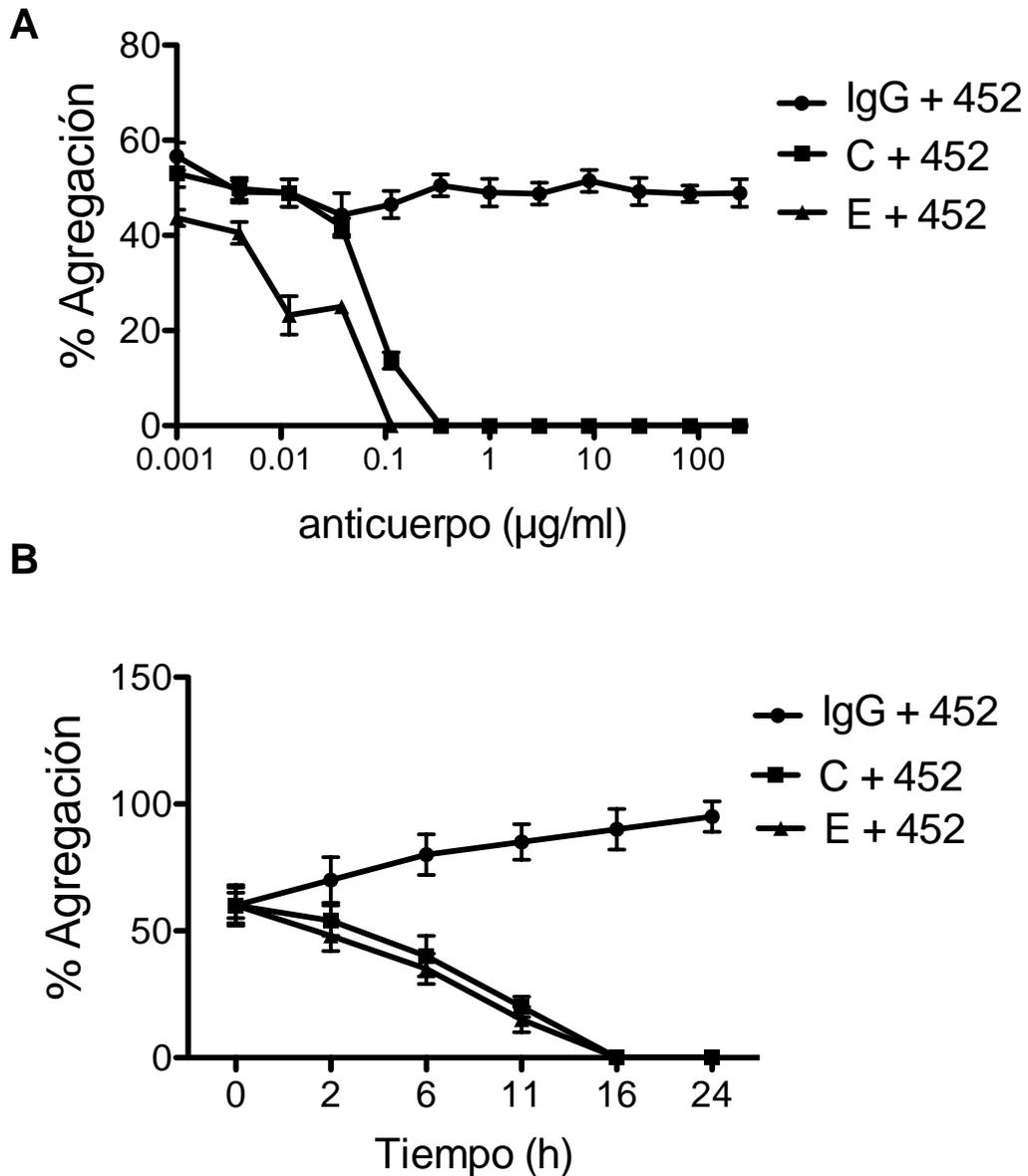


Figura 4. La inhibición de la agregación homotípica es dosis dependiente, transitoria y reversible. A) Monocitos U-937 fueron incubados con los anticuerpos C, E o IgG control a las concentraciones indicadas por 2 h a 37° C, posteriormente se adicionó el anti-CD13 (clona 452), el porcentaje de agregación se evaluó 2 h después por microscopía. B) Células U-937 fueron agregadas con el anti-CD13 (clona 452) durante 2 h a 37° C, posteriormente se adicionó el anticuerpo C, E o IgG control y se determinó la agregación a lo largo de 24 h por microscopía. n=3 p<0.001

Después nos preguntamos si los anticuerpos son capaces de desagregar células que ya están agregadas por la estimulación con el anticuerpo 452, para lo cual, incubamos primero los monocitos con el anticuerpo activador por 2 horas a

37° C y una vez que era evidente la agregación, añadimos los anticuerpos inhibidores C y E a la concentración en la que se obtiene el 100% de inhibición (0.3 y 0.1 µg/ml respectivamente). Seguimos la agregación en el microscopio durante 24 horas. Como se observa en la figura 4B, en presencia de los anticuerpos inhibidores la agregación comienza a disminuir desde las 2 horas, mientras que con el anticuerpo control sigue aumentando conforme avanza el tiempo. La inhibición total se alcanza después de las 16 horas y permanece al menos 24 horas.

5.3 Identificación de la proteína reconocida por los anticuerpos inhibidores

Como una primera estrategia para identificar las proteínas reconocidas por los anticuerpos inhibidores, se hizo un western blot utilizando lisados de monocitos U-937 inmunoprecipitados con cada uno de los anticuerpos: ya sea el activador de la agregación homotípica anti-CD13 (clona 452), o cada uno de los anticuerpos inhibidores C o E y como control IgG. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS que fueron transferidos a nitrocelulosa. En los blots se reveló la presencia de las proteínas reconocidas utilizando cada uno de los sobrenadantes de los hibridomas productores de anticuerpos inhibidores y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

En la figura 5A se muestra un blot con los inmunoprecipitados de los anticuerpos 452, C, E y como control negativo una IgG no específica, revelados con el sobrenadante del anticuerpo C y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, visualizando las proteínas por quimioluminiscencia en placas

fotográficas. En este blot se observa en el carril del inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-CD13 (clona 452) una proteína cuyo peso corresponde a CD13 (160 kDa), además de la cadena pesada y ligera del anticuerpo, tal como se esperaba; lo que nos sorprendió encontrar fue una proteína del mismo peso de CD13 (160 kDa) en los inmunoprecipitados de los anticuerpo C y E (que inhiben la agregación). Este hallazgo lo encontramos también en blots con inmunoprecipitados similares, al revelarlos tanto con el anticuerpo 452 como con el anticuerpo E (datos no mostrados).

En los inmunoprecipitados con los anticuerpos inhibidores C y E se observan además de la cadena pesada y ligera del anticuerpo, otras bandas de bajo peso molecular, algunas de estas bandas se encuentran también en el control de isotipo con IgG, también se debe tomar en cuenta que este blot se reveló con el sobrenadante del anticuerpo C y podrían encontrarse proteínas que se pegen inespecíficamente a proteínas presente en los lisados, por lo que podemos concluir que algunas de estas bandas son inespecíficas. Sin embargo es claro que si se compara los inmunoprecipitados tanto del anticuerpo 452 como de los anticuerpos inhibidores se detecta la presencia de una proteína de 160 kDa. Esto nos sugirió que la proteína que reconocen los anticuerpos inhibidores es CD13.

Para descartar que la banda observada en los inmunoprecipitados se tratara de una banda inespecífica o simplemente el mismo anticuerpo sin ser reducido ya que correspondería al peso del anticuerpo completo, y/o para identificar con mayor certeza esta proteína de 160 kDa, se decidió analizarla por espectrometría de masas.

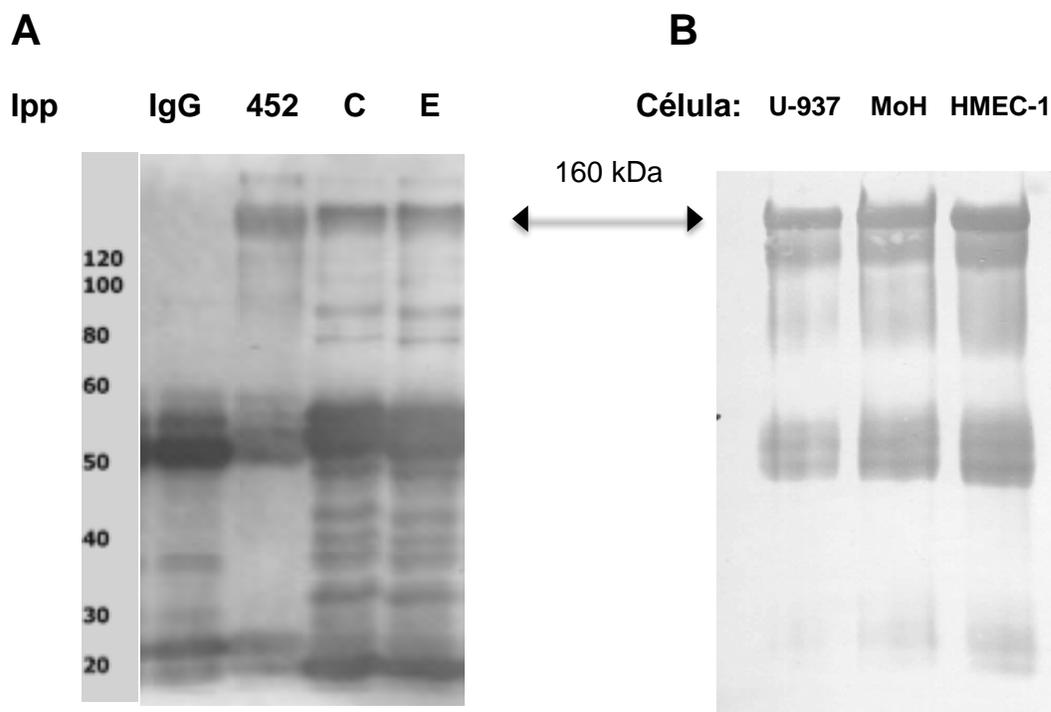


Figura 5. Los anticuerpos inhibidores reconocen una proteína de 160 kDa en distintas células. **A)** Western blot de lisados de U-937 inmunoprecipitados con los distintos anticuerpos monoclonales: anti-CD13 (clona 452) o anticuerpos inhibidores C o E, y como control IgG, se reveló la presencia de las proteínas reconocidas por el sobrenadante de cultivo del hibridoma C por quimioluminiscencia, se observan la cadena pesada y ligera de los anticuerpos de la inmunoprecipitación, algunas proteínas de bajo peso molecular, también presentes en el control de IgG y una banda de 160 kDa presente en el inmunoprecipitado del anti-CD13 (clona 452). **B)** Lisados de células U-937, MoH (Monocitos humanos aislados de concentrados leucocitarios) o células endoteliales de la línea HMEC-1 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo 452 y reveladas con el anticuerpo C purificado, se observan la cadena pesada del anticuerpo 452 y una proteína de 160 kDa en las distintas líneas celulares.

En un principio se trató de hacer la identificación directamente del blot, pero no fue posible extraer la proteína del papel de nitrocelulosa por lo que tuvimos que extraer la proteína del gel. La proteína fue digerida con tripsina y los péptidos obtenidos fueron analizados por espectrometría de masas MALDI TOF/TOF. Los péptidos identificados fueron introducidos al programa MASCOT, donde los algoritmos utilizados nos indican que se obtiene una identificación confiable con un score mayor a 35, para estos inmunoprecipitados las puntuaciones se indican en

la tabla 3 y dado el valor obtenido, la proteína reconocida tanto por los anticuerpos inhibidores como por el anticuerpo que induce la agregación homotípica, es CD13.

Existen reportes de que CD13 puede presentarse en distintas isoformas²⁰, en la misma célula. Las diferencias parecen deberse al grado de glicosilación de CD13 y esto puede dificultar el reconocimiento de los anticuerpos, por lo que se decidió estudiar si los diferentes anticuerpos 452, C y E eran capaces de reconocer a CD13 en distintos tipos celulares: a) monocitos de la línea celular U-937, b) monocitos aislados de sangre periférica de donadores sanos y c) células endoteliales de la línea celular HMEC-1 (figura 5 B).

En la figura 5B, al inmunoprecipitar lisados de las distintas células con el anticuerpo 452 y revelar el blot con el anticuerpo C, se puede observar el mismo patrón de bandas, lo que nos indica que este anticuerpo inhibidor es capaz de reconocer la proteína desnaturalizada presente en distintos tipos celulares.

Anticuerpo	Score	ID	Proteína
452	175	P15144	Aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) CD13
C	274	P15144	Aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) CD13
E	504	P15144	Aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) CD13

Tabla 3. Los anticuerpos inhibidores C y E reconocen a CD13. Las proteínas correspondientes al peso de 160 kDa inmunoprecipitadas con los anticuerpo 452, C o E fueron extraídas del gel, digeridas con tripsina y analizadas por espectrometría de masas MALDI TOF/TOF; con los péptidos obtenidos se hizo una búsqueda en el programa MASCOT, en la tabla se indica el score obtenido en la identificación de la proteína, score > 35 valor confiable

5.4 Los anticuerpos inhibidores no compiten por el mismo epítotope reconocido por el anticuerpo 452 en la superficie de los monocitos.

No esperábamos que los anticuerpos inhibidores reconocieran a CD13, ya que los anticuerpos tienen efectos diametralmente opuestos en la agregación homotípica. Sin embargo, el score obtenido en el análisis de espectrometría de masas indica de manera confiable que los anticuerpos analizados se unían a la misma proteína, por lo cual teníamos que descartar que los anticuerpos inhibidores al unirse a CD13 ocuparan el mismo epítotope y evitaran la unión del anticuerpo anti-CD13 activador (clona 452).

Otra manera de comprobar que los anticuerpos C y E reconocen a CD13 en la superficie de monocitos fue utilizar monocitos de la línea celular U-937, monocitos de otra línea celular de monocitos humanos THP-1, y por último células THP-1 transfectadas con siRNA para disminuir la expresión de CD13 (células L2). En la figura 6 se observa la unión de los tres anticuerpos anti-CD13: 452, C y E revelada con el anticuerpo secundario goat anti-mouse FITC y analizada por citometría de flujo. En esta figura se observa que la unión de los anticuerpos a las células U-937 es similar y ligeramente mayor que la unión a las células THP-1; en el caso de las células L2, como se esperaba, se observa una menor unión de los anticuerpos, ya que estas células expresan bajos niveles de CD13 porque el silenciamiento no abate por completo la expresión de CD13.

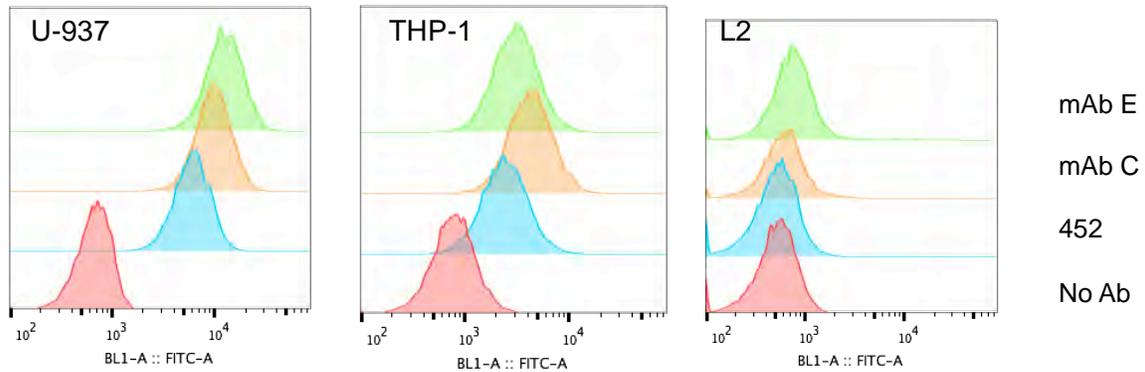


Figura 6. Los anticuerpos inhibidores C y E se unen a la superficie de monocitos humanos. Células monocíticas humanas de las líneas celulares U-937, THP-1 y L2 (THP-1 transfectadas con siRNAs para CD13) fueron incubadas con anticuerpos anti-CD13: 452, C y E, y posteriormente usar un anticuerpo secundario acoplado a FITC, la unión fue revelada por citometría de flujo.

Para comprobar que los anticuerpos inhibidores no estuvieran ocupando el mismo sitio sobre CD13 que el anticuerpo activador 452, primero se determinó la unión de los distintos anticuerpos anti-CD13: C, E, 452 o WM15 (una clona anti-CD13 que se ha reportado se une al sitio catalítico de la proteína) a las células U-937. Las células se incubaron con los distintos anticuerpos y después de lavar el exceso de anticuerpo, se incubó con un anticuerpo secundario (goat anti-mouse FITC) y se reveló la unión por citometría de flujo (figura 7A).

Conociendo la concentración saturante de cada anticuerpo, se incubaron los anticuerpos anti-CD13 o anticuerpos controles con células U-937 a 4° C, para permitir la unión del anticuerpo a la célula; posteriormente se adicionó el anticuerpo 452 o los anticuerpos C o E conjugados con FITC y se determinó por citometría de flujo si disminuía la unión del anticuerpo marcado en presencia de los otros anticuerpos (figura 7 B-D).

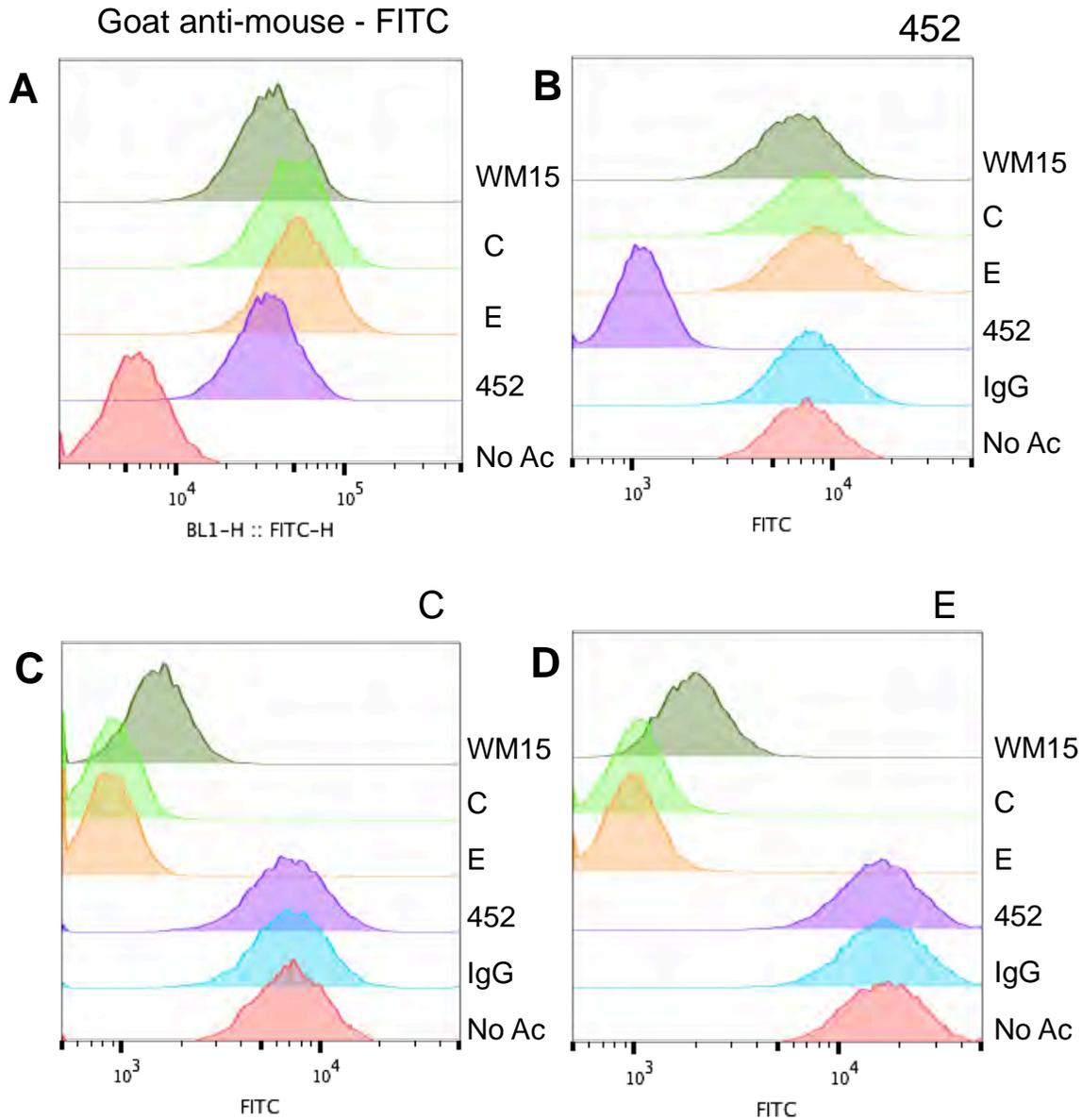


Figura 7. Los anticuerpos inhibidores reconocen un epítoto diferente al reconocido por el anticuerpo 452 en la superficie de monocitos humanos. Células U-937 fueron preincubadas con concentraciones saturantes de los anticuerpos anti-CD13 452, C, E y WM15; como control negativo utilizamos IgG o células sin anticuerpo. Se permitió la unión de los anticuerpos a 4° C y después de eliminar el exceso se adicionaron anticuerpos acoplados directamente a FITC según se detalla: A) goat anti-mouse FITC, B) Anticuerpo 452-FITC, C) Anticuerpo C-FITC, D) Anticuerpo E-FITC. La unión de los anticuerpos conjugados fue determinada por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos n=6

Como se puede observar en la figura 7A, la unión de los anticuerpos anti-CD13 a los monocitos U-937 es equivalente, siendo ligeramente superior para los anticuerpos inhibidores. En el caso de la unión de los anticuerpos directamente acoplados al fluorocromo FITC se puede observar para el anticuerpo 452 que la unión del anticuerpo marcado solo disminuyó en presencia del mismo anticuerpo 452 sin marca (figura 7B) y no por la presencia de los anticuerpos C y E, lo que nos indica que los anticuerpos inhibidores al unirse a la superficie de CD13 no ocupan el mismo sitio que el anticuerpo activador 452.

Lo que nos sorprendió fue encontrar que la unión del anticuerpo C marcado se inhibe no solo por la preincubación de las células con el mismo anticuerpo C sin marca, sino también por el anticuerpo E; lo mismo ocurre con la unión del anticuerpo E marcado, pero no se modifica la unión en presencia del anticuerpo 452. Esto nos indica que el epítoto que reconoce el anticuerpo 452 es distinto al reconocido por C o E y por lo tanto el efecto de inhibición no se debe a la competencia por el mismo sitio en CD13. Por otro lado, este experimento también nos indica que los anticuerpos C y E se unen al mismo epítoto sobre CD13 o a sitios probablemente cercanos.

5.5 El efecto de inhibición requiere el entrecruzamiento de CD13.

Una vez que comprobamos que los anticuerpos inhibidores no competían con el anticuerpo 452 por el mismo sitio sobre CD13, quisimos comprobar si para la inhibición de la agregación homotípica era suficiente la unión del anticuerpo o se requería del entrecruzamiento de CD13. Con este propósito preparamos fragmentos de los anticuerpos inhibidores y los preincubamos a distintas

concentraciones con los monocitos. Después de retirar el exceso de anticuerpo, a la mitad de las células se les agregaron fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo secundario goat anti-mouse para entrecruzar al receptor, y posteriormente se adicionó el anticuerpo 452 para inducir la agregación homotípica.

En la figura 8 se muestra el porcentaje de agregación inducido por el anticuerpo 452 en células incubadas con los fragmentos del anticuerpo C solos o adicionando además fragmentos entrecruzantes ($F(ab')_2$ del anticuerpo secundario goat anti-mouse) (panel superior) o el mismo sistema para los fragmentos del anticuerpo E (panel inferior). Aquí se puede observar que los fragmentos de los anticuerpos C o E no son capaces de inducir la inhibición por si solos y requieren ser entrecruzados por los fragmentos $F(ab')_2$ para provocar la inhibición de la agregación homotípica.

5.6 La unión de los anticuerpos inhibidores no provoca cambios en la expresión de CD13 en superficie.

Para descartar que los anticuerpos inhibidores indujeran la internalización de CD13, por lo que ya no estaría accesible para el anticuerpo activador de la agregación homotípica, decidimos incubar los monocitos el mismo tiempo que requieren para la agregación o inhibición a 4° o a 37° C, posteriormente determinamos si cambiaba la expresión en membrana de la proteína. En la figura 9 se observa que no se encontró diferencia en la detección de CD13 a las distintas temperaturas probadas, por lo que podemos decir que la inhibición no se debe a que los anticuerpos C o E induzcan la desaparición de CD13 de la superficie de la célula. La unión del anticuerpo 452 marcado (figura 9A) a 4° C presentó un ligero

aumento en presencia de los anticuerpos inhibidores pero este aumento no fue estadísticamente significativo; al simular las condiciones de inhibición (figura 9B), incubamos 3 horas a 37° C y la unión del anticuerpo 452 marcado fue similar en todas las condiciones.

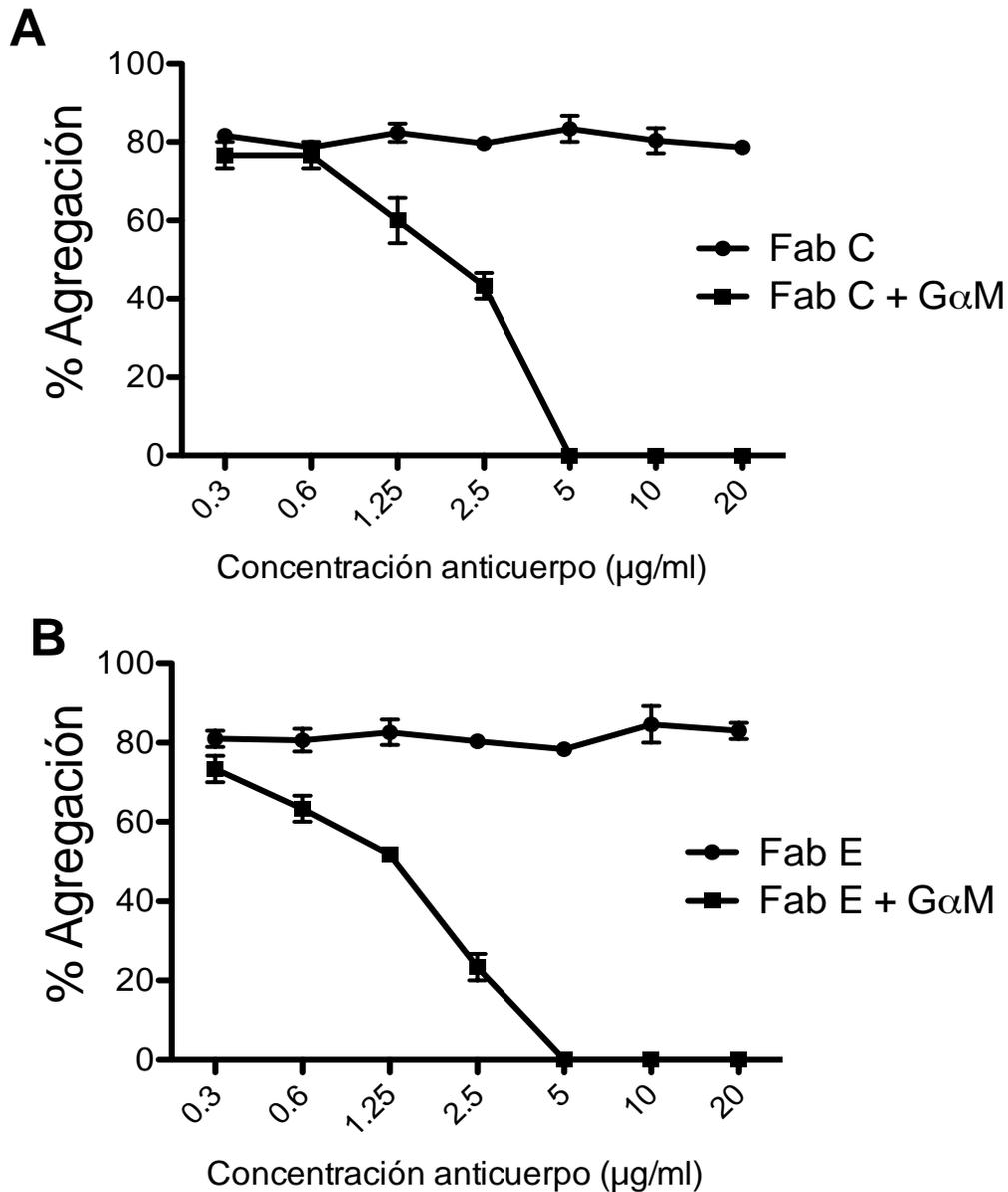


Figura 8. Los anticuerpos C y E requieren entrecruzar CD13 para inhibir la agregación homotípica. Monocitos U-937 fueron incubados con las concentraciones indicadas de fragmentos Fab' de los anticuerpos C o E en presencia o ausencia de fragmentos entrecruzantes (F(ab')₂ del anticuerpo secundario goat anti-mouse), posteriormente se incubó el anticuerpo activador 452. Se determinó el porcentaje de agregación en el microscopio como el número de células en agregados/número total de células x 100 n=3

Cuando hicimos el experimento contrario, es decir, incubamos las células primero con el anticuerpo 452 y D) y posteriormente determinamos la unión del anticuerpo C marcado no encontramos cambios en la expresión de CD13 a 4° C (figura 9C), cuando analizamos la expresión a 37° C encontramos una disminución del 26% en promedio en la expresión de CD13, sin embargo, debido a las variaciones entre experimentos, esta diferencia no fue estadísticamente significativa n=3.

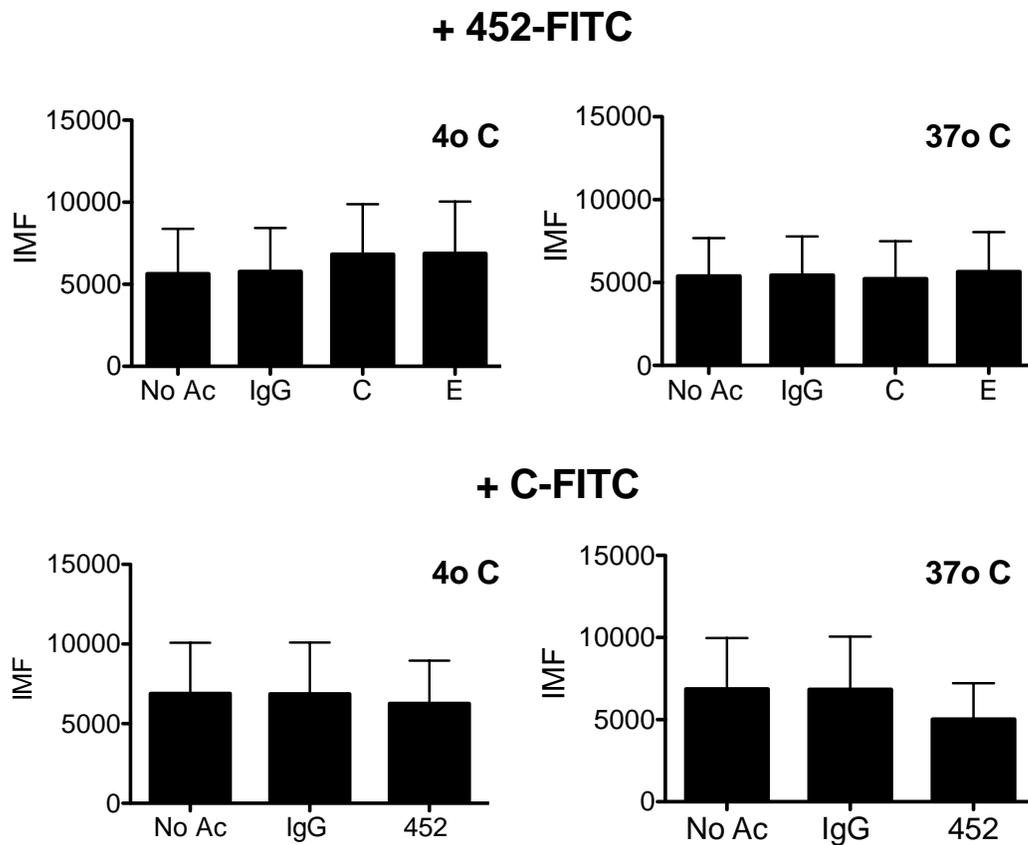


Figura 9. La unión de los anticuerpos inhibidores no afecta la expresión en membrana de CD13. Monocitos de la línea celular U-937 fueron incubados con concentraciones de los anticuerpos que inhiben o inducen el 100% de la agregación homotípica por 3 h a 4 ó 37° C según se indica, después las células se fijaron con PFA al 1% a 4° C. Posteriormente, en el panel superior se adicionó el anticuerpo 452 directamente acoplado a FITC; en el panel inferior se adicionó el anticuerpo C acoplado directamente a FITC. Se determinó la expresión de CD13 en membrana por citometría de flujo, n=3.

5.7 Inhibición de la adhesión heterofílica de células U-937 a Fibronectina con anticuerpos anti-CD13.

Se ha demostrado plenamente que el anticuerpo 452 anti-CD13 es capaz de inducir agregación homotípica en monocitos humanos, así como la inhibición de ésta con los anticuerpos C o E. Se ha propuesto que esta adhesión inducida por el anticuerpo 452 ocurre entre moléculas de CD13 (adhesión homofílica)¹⁰. Nuestro siguiente objetivo fue determinar si los anticuerpos anti-CD13 eran capaces de mediar adhesión en sistemas heterofílicos, es decir, entre dos tipos de moléculas diferentes.

Primero decidimos observar el efecto de los anticuerpos anti-CD13 sobre distintos tipos celulares. Células U-937 y células HEK transfectadas con la proteína quimérica CD13-GFP (HEK-ANPEP) fueron incubadas con distintas concentraciones de anticuerpos anti-CD13 por 2 h a 37° C. En la figura 10 podemos observar como se esperaba que en los monocitos U-937, la presencia del anticuerpo 452 induce la agregación homotípica, mientras que los monocitos en presencia del anticuerpo C aparentemente no presentan cambios (fig. 10A y B).

En el caso de las células HEK-ANPEP, al cabo de 2 h sin anticuerpo las células se observan redondas y se adhieren ligeramente a la placa de cultivo, en presencia de los anticuerpos 452 y C desde las concentraciones de 0.1 µg/ml se observa un cambio morfológico en las células a las 2 h de incubación, que es más dramático conforme aumenta la concentración. Las células parecen estar fusionadas ya que no se alcanza a distinguir el límite entre una célula y otra; aunque es difícil distinguir, las células incubadas con el anticuerpo 452 parecen estar ligeramente agregadas en comparación con las incubadas con el anticuerpo

C. Por lo anterior, decidimos hacer los ensayos de adhesión estimulando las células con los anticuerpos por 30 minutos a 37° C con 1 µg/ml de cada anticuerpo antes del ensayo de adhesión. El mismo efecto se obtiene con el anticuerpo E (datos no mostrados).

El péptido que contiene el motivo NGR (Asn-Gly-Arg) se une a CD13 en células tumorales y ha sido ampliamente estudiado como un posible motivo capaz de dirigir moléculas activas hacia células tumorales que sobreexpresan CD13 (homing peptide). Soudy *et al*⁸⁴, describieron que los aminoácidos que flanquean este motivo de tres aminoácidos son muy importantes para su unión. Entre los péptidos con mayor afinidad por CD13, encontraron que su secuencia era similar a la secuencia de la Fibronectina humana y por eso decidimos estudiar si nuestros anticuerpos eran capaces de inhibir la posible unión de CD13 a Fibronectina.

Con este objetivo incubamos monocitos humanos de las líneas celulares THP-1 y U-937 marcados con CFSE con los distintos anticuerpos anti-CD13 por 30 minutos a 37° C. Posteriormente, las células estimuladas se agregaron a placas de 96 pozos previamente sensibilizadas con Fibronectina recombinante. Se incubó la placa por 15 minutos a 37° C para permitir la adhesión, y se determinó el número de células adheridas en un fluorómetro de placas. Estos monocitos son células que crecen en suspensión y no pudimos observar unión de las células a la fibronectina, por lo que estimulamos previamente a las células con PMA y así pudimos detectar una unión discreta de las células THP-1 que no fue estadísticamente significativa (datos no mostrados).

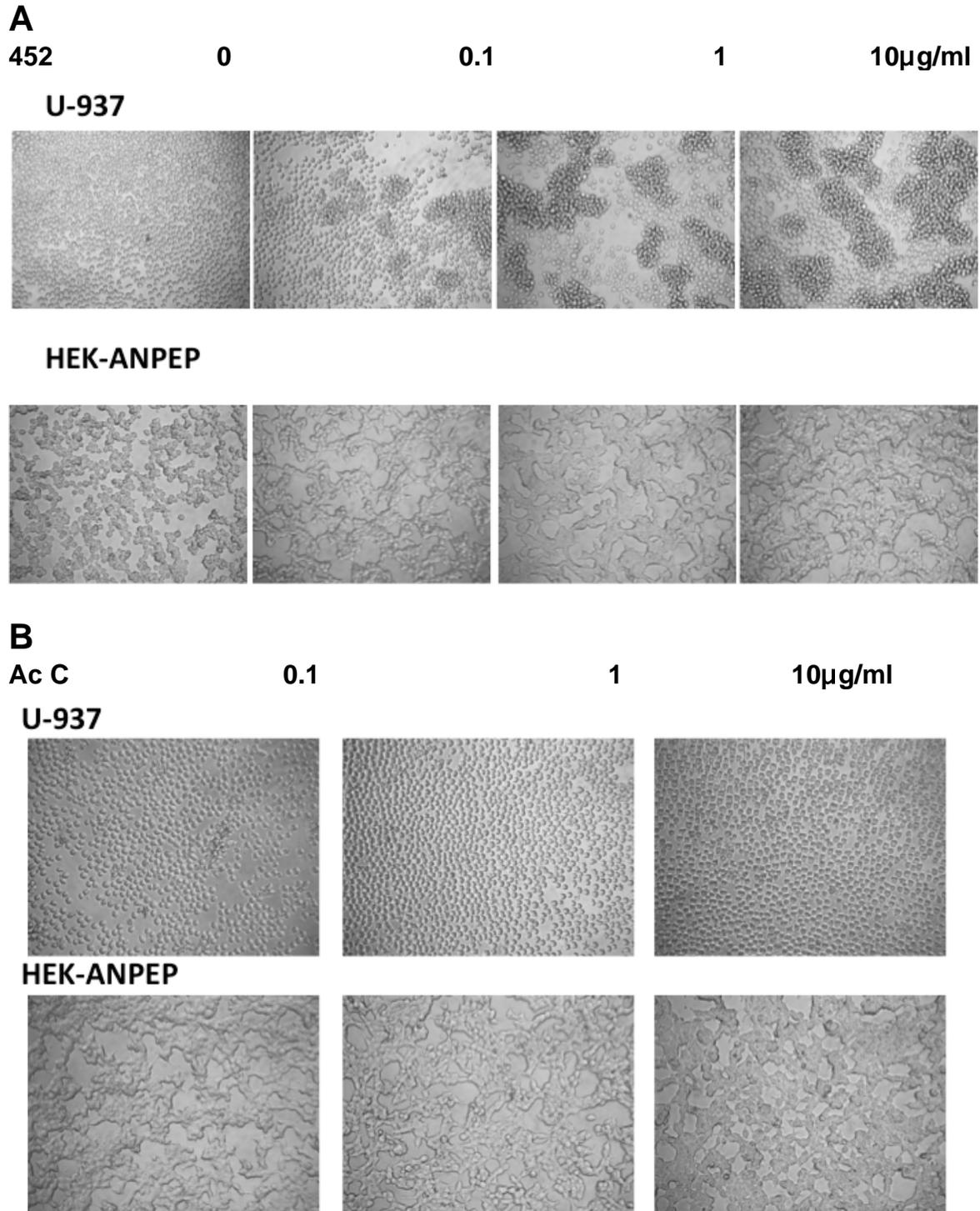


Figura 10. Los anticuerpos anti-CD13 452 y C inducen cambios en la morfología y/o agregación homotípica en monocitos humanos U-937 y células HEK-ANPEP. Células U-937 o HEK transfectadas con CD13-GFP (HEK-ANPEP) fueron incubadas con distintas concentraciones de los anticuerpos anti-CD13 452 o C por 2 h a 37° C y se observó la agregación y/o cambios morfológicos en un microscopio invertido Zeiss.

Tomando en consideración que las células tumorales presentan una sobreexpresión de CD13 y que en el laboratorio se contaba con células HEK transfectadas con una proteína quimérica de CD13-GFP, que son adherentes y tienen una mayor expresión de CD13, decidimos probar si estas células podían adherirse a la fibronectina y si podíamos interferir esa unión en presencia de nuestros anticuerpos inhibidores.

En la figura 11 se muestra la unión de las células en presencia de cada anticuerpo anti-CD13 y de una IgG inespecífica como control. La unión detectada en ausencia de anticuerpo se normalizó al 100% y se comparó con la unión en presencia de cada anticuerpo a las distintas concentraciones. Como podemos observar, la unión de las células se ve inhibida por el anticuerpo 452 solo a la mayor concentración probada (52%), se afecta parcialmente con el anticuerpo WM15 (25-59%) y se observa una importante inhibición con los anticuerpos C y E desde las concentraciones de 0.1 µg/ml (70 – 76%).

5.8 Efecto de los anticuerpos anti-CD13 sobre la adhesión heterotípica.

Una vez que demostramos que los anticuerpos inhibidores interferían con sistemas heterofílicos, decidimos probar si nuestros anticuerpos anti-CD13 eran capaces de inhibir la unión en sistemas heterotípicos, es decir la adhesión entre células de distintos linajes, que expresen CD13.

Como se demostró en la figura 5B las células endoteliales de la línea celular HMEC-1 expresan CD13 en su superficie, por lo que decidimos probar la adhesión heterotípica entre las células endoteliales y monocitos humanos de la línea U-937,

primero estimulamos a los monocitos con el anticuerpo 452 y luego los transferimos a la monocapa de HMEC-1, incubándolos por 15 minutos para permitir la adhesión. Después de retirar las células no adheridas se observaron al microscopio. En la figura 12 se muestra: (A) la monocapa de las células endoteliales HMEC-1, (B) HMEC-1 + células U-937 antes de retirar células no adheridas; después de lavar y retirar las células no adheridas: (C) HMEC-1+U-937 (sin anticuerpo) y (D) HMEC-1 + U-937 (estimuladas con anticuerpo 452).

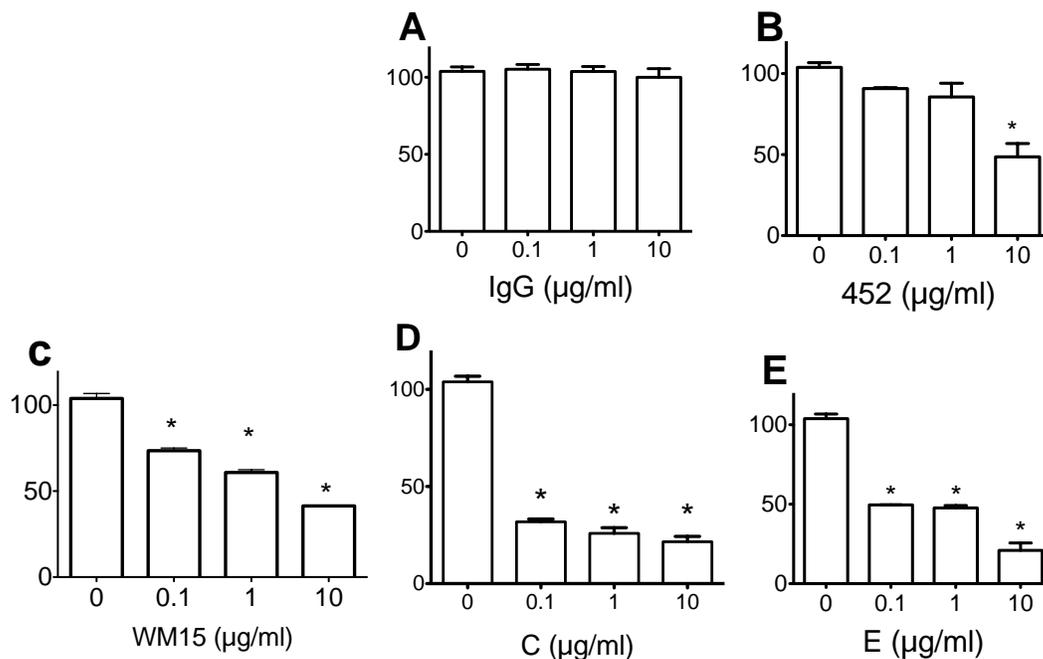


Figura 11. Los anticuerpos C y E inhiben la unión de células HEK ANPEP a Fibronectina. Células HEK transfectadas con la proteína quimérica CD13-GFP fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD13 a distintas concentraciones por 30 min a 37° C. Después de lavar, las células se dejaron adherir a placas sensibilizadas con fibronectina recombinante por 15 min a 37° C y se determinaron las células adheridas en un fluorómetro de placa modelo Cytation 3 de BioTek, normalizando a 100% las células sin estímulo, n=3 * p<0.001.

Como se puede observar en D queda un gran número de células que son difíciles de cuantificar de manera objetiva, por lo que se decidió teñir los monocitos U-937 con CFSE, antes de estimularlos con los anticuerpos 452, C o E. Se siguió el protocolo de adhesión anteriormente descrito y después de retirar las células no adheridas, se determinó en fluorómetro de placa la fluorescencia asociada a los monocitos que permanecieron adheridos a las células endoteliales. En la figura 13 (A) se muestra que el anticuerpo activador (clona 452) es capaz de inducir la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, mientras que los anticuerpos inhibidores (C y E) no ejercen efecto sobre la adhesión.

Una vez determinada las condiciones para estimular la adhesión heterotípica con el anticuerpo 452 se procedió a incubar los monocitos por 1 h a 37° C con distintas concentraciones de los anticuerpos inhibidores o sin anticuerpo. Después de lavar las células, se estimularon con el anticuerpo 452. Posteriormente los monocitos se dejaron adherir a la monocapa de células endoteliales por 15 min como se indicó anteriormente.

Como podemos observar en la figura 13B, los anticuerpos C o E inhiben parcialmente la adhesión de los monocitos a las células endoteliales desde concentraciones tan bajas como 0.03 µg/ml de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$), y la inhibición total se alcanza con 3 µg/ml para ambos anticuerpos ($p < 0.0001$). El efecto de inhibición heterotípica observado es muy importante ya que las células tumorales utilizan la adhesión a células endoteliales como uno de los primeros pasos para iniciar la metástasis a otros tejidos.

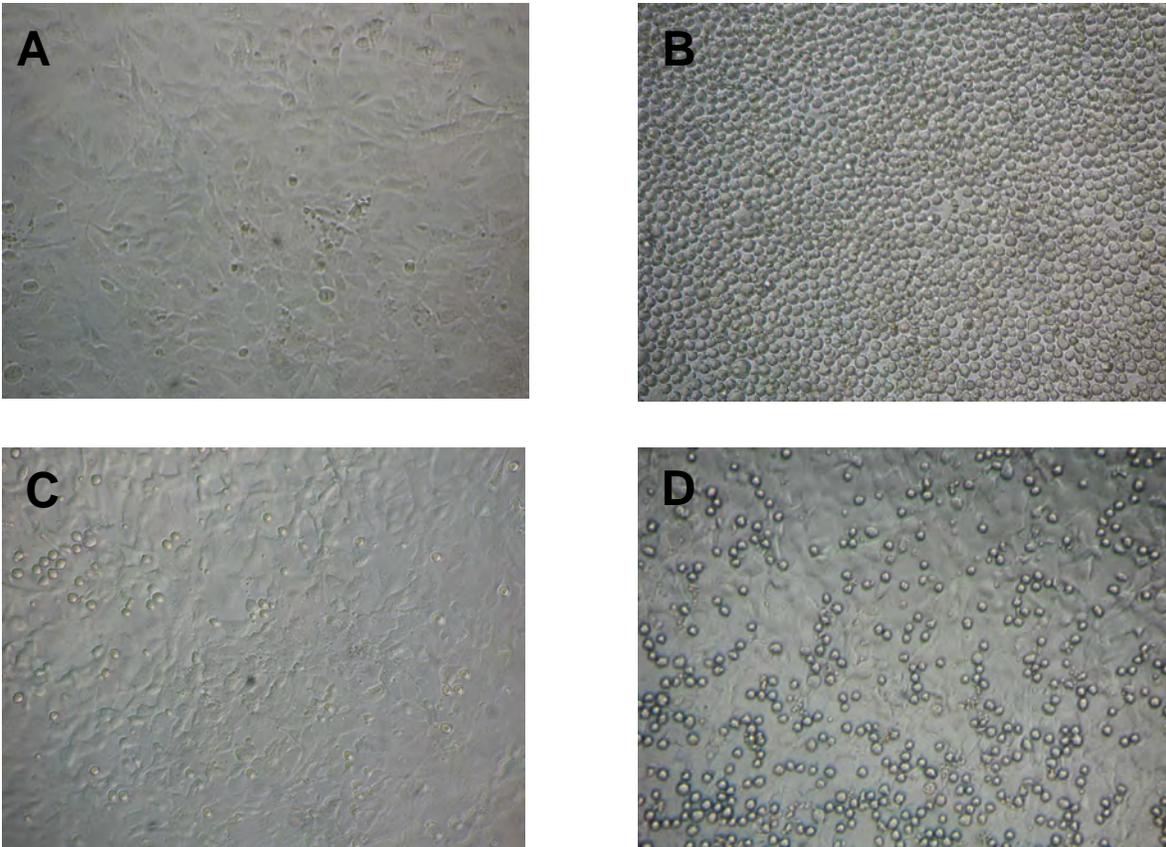


Figura 12. El anticuerpo 452 induce la adhesión heterotípica entre células endoteliales y monocitos humanos. Células endoteliales HMEC-1 se cultivaron hasta obtener una monocapa (A), se adicionaron monocitos U-937 (HMEC-1+U-937) y se dejaron incubar por 15 min a 37° C para adhesión (B); se retiraron las células no adheridas: (C) HMEC-1+U-937 (sin estímulo) o (D) HMEC-1+U-937 (estimulada con el anticuerpo 452). Se observó la adhesión en microscopio invertido Zeiss.

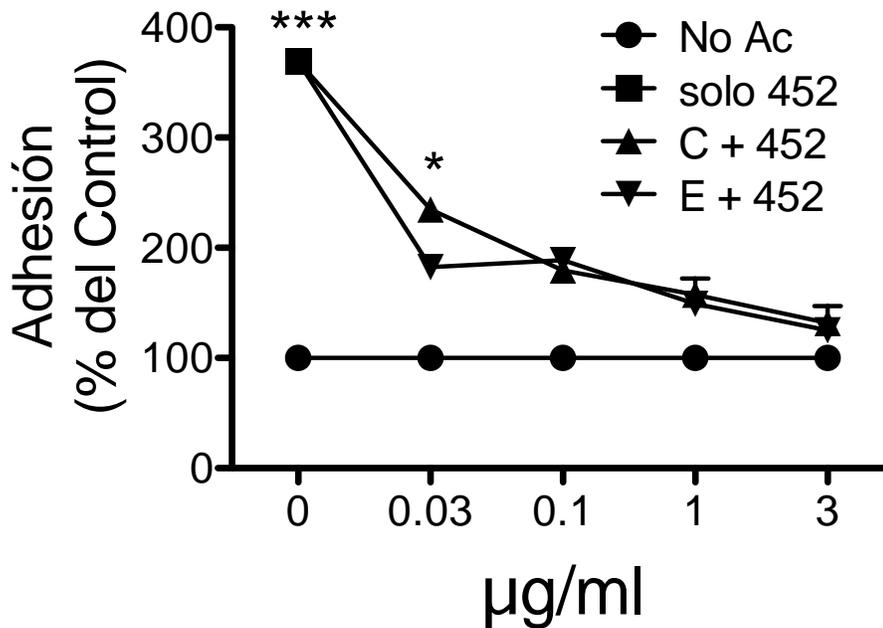
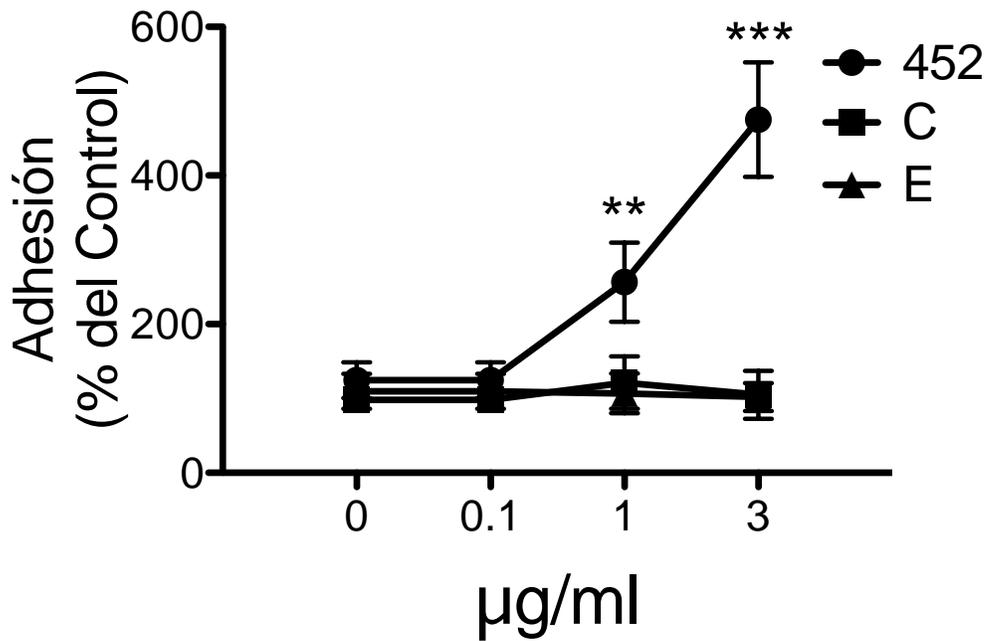


Figura 13. Los anticuerpos C y E inhiben la adhesión heterotípica.

A) Monocitos U-937 marcados con CFSE fueron estimulados con los anticuerpos anti-CD13 a distintas concentraciones, y se determinó la unión a una monocapa de células endoteliales HMEC-1 cuantificando las células adheridas en un fluorómetro de placas. B) U-937 marcadas, fueron preincubadas con distintas concentraciones de los anticuerpos C o E, posteriormente se estimularon con el anticuerpo 452; la adhesión a células endoteliales se realizó como se indica anteriormente. n=3 *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001

5.9 Los anticuerpos anti-CD13 tanto activadores como inhibidores elevan la concentración intracitoplasmática de $[Ca^{2+}]$.

En 2000 Navarrete-Santos⁸⁵ *et al* describieron que CD13 podía inducir elevación de la concentración intracitoplasmática de $[Ca^{2+}]$ al ser entrecruzado con distintos anticuerpos y que las características de esta elevación eran diferentes dependiendo del anticuerpo anti-CD13 empleado: con algunos era suficiente el anticuerpo completo, mientras que para otros anticuerpos era necesario entrecruzar con un anticuerpo secundario.

Basándonos en el hecho de que tanto la agregación homotípica como su inhibición, requieren el entrecruzamiento de CD13, decidimos estudiar el mecanismo por el cual se desencadenaba este efecto, la pregunta era si los anticuerpos inhibidores “apagaban” cualquier señal para la transducción de señales inducida por el anticuerpo activador, o si eran señales “débiles o cualitativamente diferentes”.

Como un primer acercamiento decidimos determinar los cambios en la concentración de calcio intracelular por citometría de flujo en monocitos U-937. Las células se cargaron con los compuestos Fluo-3 AM y FuraRed, posteriormente los monocitos se estimularon con los distintos anticuerpos anti-CD13. Como control positivo se determinó la activación en presencia del anticuerpo 32.2 (anti-Fc γ RI) y como control negativo se utilizó una IgG inespecífica.

En la figura 14 se muestra un experimento representativo en donde se puede observar que los anticuerpos anti-Fc γ RI no inducen el influjo de calcio por si

solos, y solo inducen el elevación de las concentraciones después de agregar el anticuerpo secundario. En contraste, cada uno de los 3 anticuerpos anti-CD13 analizados, tanto el activador (clona 452) como los dos anticuerpos inhibidores (C y E) son capaces de elevar la concentración intracitoplasmática de calcio por si mismos, aún en ausencia de un anticuerpo secundario. No encontramos diferencias notables en la capacidad de elevar la concentración de Ca^{2+} entre los tres anticuerpos anti-CD13.

5.10 El entrecruzamiento de CD13 con los anticuerpos monoclonales inducen la fosforilación de CD13 en residuos de tirosina.

Al no encontrar diferencias en la elevación de la concentración intracitoplasmática de $[Ca^{2+}]$ al estimular con los anticuerpos anti-CD13 que pudieran explicar los efectos contrarios entre activación e inhibición desencadenados, decidimos estudiar uno de los eventos iniciales de la cascada de señalización de CD13. El grupo de Subramani⁸⁶ describió que al entrecruzar a CD13 con el anticuerpo 452 observaron la fosforilación en tirosina de la pequeña cola citoplasmática de siete aminoácidos, además de la fosforilación de Src, FAK y ERK.

Nosotros iniciamos evaluando la cinética de fosforilación de CD13 tras ser entrecruzado con el anticuerpo 452 a los tiempos indicados en la figura 15A. Después de entrecruzar a CD13, las células se lisaron e inmunoprecipitaron con el anticuerpo C, las proteínas de los lisados se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a nitrocelulosa para revelarse con una mezcla de anticuerpos anti-fosfotirosina (PY20, 4G10 y AFT-8). Se puede observar una

banda de 160 kDa fosforilada que aparece al entrecruzar con 452 y no en el control sin anticuerpo. El máximo de fosforilación se encontró entre los 5 y los 30 minutos.

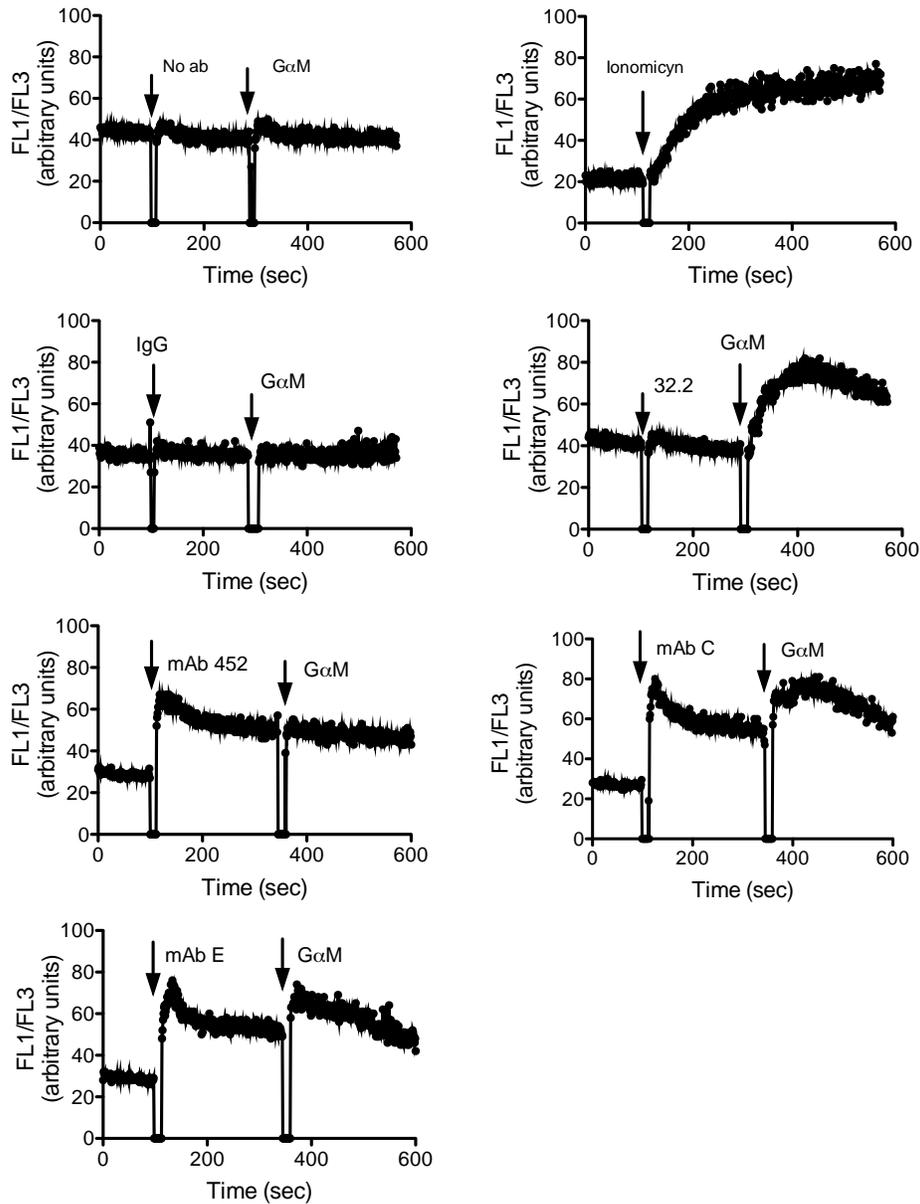


Figura 14. Los anticuerpos anti-CD13 elevan la concentración intracitoplasmática de $[Ca^{2+}]$ de manera semejante. Monocitos U-937 se cargaron con Fluo-3 AM y FuraRed y se estimularon con los anticuerpos a 37° C durante el tiempo indicado. Se determinó el aumento en la concentración intracitoplasmática de $[Ca^{2+}]$ por citometría de flujo en el citómetro BD FACSCalibur.

En la figura 15B se estimularon las células U-937 con el anticuerpo C o 452 por 5 y 30 minutos; en el último carril se probó la combinación de ambos anticuerpos. Las células se lisaron y se hizo la inmunoprecipitación y el revelado como se mencionó anteriormente. Se puede observar que el anticuerpo C es capaz de inducir la fosforilación de CD13 con una cinética similar a la inducida por el anticuerpo 452. En la figura 15C solo se reveló un blot similar con anticuerpo anti-CD13 452, para comprobar que CD13 se encontraba en la misma proporción en las muestras.

5.11 Los anticuerpos monoclonales C y E inhiben la actividad enzimática de CD13.

Una función ampliamente descrita de CD13 es su actividad enzimática. Como su nombre lo indica, se trata de una Aminopeptidasa, que al cortar algunos sustratos puede regular funciones como el dolor, la presión sanguínea, la digestión y un gran número de funciones en la homeostasis, como se describió anteriormente. La actividad enzimática de esta molécula puede ser importante en procesos patológicos como el cáncer, ya que algunas células de carcinoma, por mencionar algunas, presentan un aumento en la expresión de esta molécula y como consecuencia el paciente tiene un mal pronóstico¹. Se ha demostrado que la actividad enzimática de CD13 permite la degradación de proteínas de matriz extracelular lo que facilita el paso de las células al torrente sanguíneo, iniciando así la metástasis a otros tejidos. Debido a que éste es un paso importante para la metástasis decidimos probar si los anticuerpos inhibidores eran capaces de interferir con la actividad enzimática de CD13.

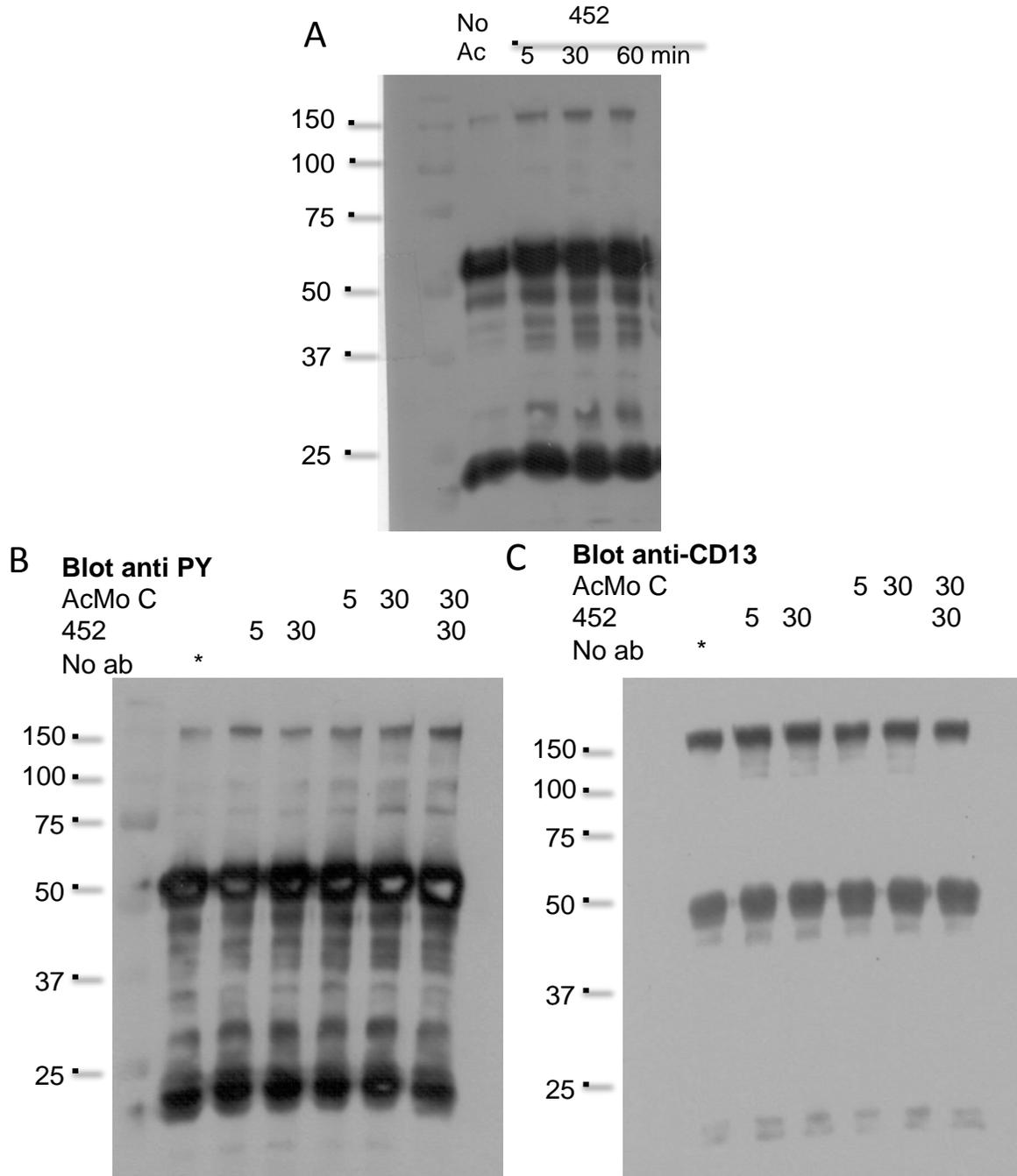


Figura 15. Los anticuerpos anti-CD13 452 y C inducen la fosforilación de CD13. (A) Monocitos U-937 fueron estimulados con anticuerpo 452 a 5, 30 y 60 minutos, las células fueron lisadas y CD13 fue inmunoprecipitado con el anticuerpo C, las proteínas fosforiladas fueron reveladas en Western blot con una mezcla de anticuerpos anti-fosfotirosina. (B) Células U-937 fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD13 452, C o la combinación de ambos por 5 y 30 minutos a 37° C, las proteínas fosforiladas fueron reveladas por Western blot como se mencionó anteriormente. (C) se comprobó que las muestras en (B) tuvieron la misma proporción de CD13 revelando con el anticuerpo 452.

El efecto de los anticuerpos anti-CD13 se probó en distintas líneas celulares: a) monocitos humanos de la línea celular U-937, b) células HEK-ANPEP (HEK transfectadas con la proteína quimérica CD13-GFP) y c) macrófagos murinos de la línea celular J774, transfectados con CD13 humano. La actividad enzimática de CD13 puede ser determinada en un ensayo colorimétrico utilizando como sustrato L-alanine-4-nitroanilide hydrochloride. Las células se incubaron con los anticuerpos o con el inhibidor Bestatina por 1 hora a 37° C, posteriormente se adicionó el sustrato y se incubó una hora más. Se determinó la actividad enzimática en un lector de placas Cytation marca Bio-Tek a 405 nm.

En la figura 16 se muestra el porcentaje de la actividad enzimática con respecto al control de las distintas líneas celulares en presencia de los anticuerpos anti-CD13 452, WM15, C y E. Como controles utilizamos IgG inespecífica y Bestatina, un inhibidor conocido de la actividad enzimática de CD13. Como podemos observar en la gráfica para las células U-937, los anticuerpos anti-CD13 C y E inhiben la actividad enzimática en más del 50%, mientras que los inhibidores conocidos como el anticuerpo WM15 o la Bestatina tienen una disminución de la actividad enzimática cerca del 40%. El anticuerpo 452 apenas disminuye en promedio un 10% de la actividad y esta inhibición no es estadísticamente significativa.

Para las células HEK ANPEP, el efecto de los anticuerpos inhibidores C y E disminuye 60% la actividad enzimática, y 40% los inhibidores WM15 y Bestatina, el anticuerpo 452 solo disminuye de 10-12% la actividad y la IgG inespecífica no muestra ningún efecto. Para poder observar un efecto con el inhibidor químico Bestatina tuvimos que adicionar 10 veces más de inhibidor, posiblemente porque

la expresión de CD13 en estas células es mayor. Para descartar un efecto citotóxico de estas altas concentraciones, verificamos que no se afectara la viabilidad de las células a esta concentración de Bestatina.

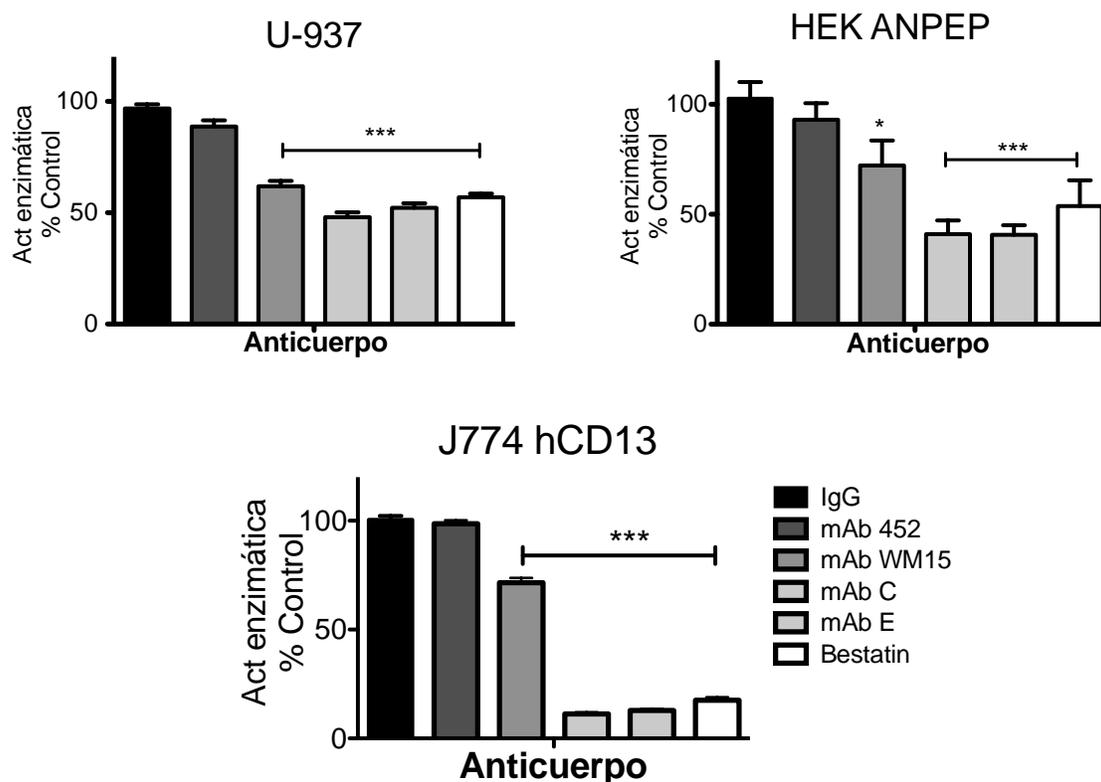


Figura 16. Los anticuerpos C y E inhiben la actividad enzimática de manera significativa. Células de las líneas celulares U-937, HEK ANPEP, J774-hCD13 fueron incubadas con distintos anticuerpos anti-CD13, inhibidor Bestatina o IgG control durante 1 hora a 37° C. Posteriormente se adicionó el sustrato L-alanine 4-nitroanilide hydrochloride y se incubaron las células una hora adicional y se determinó la actividad enzimática a 405 nm en un lector de placas Cytation. n=3 *p<0.05, ***p<0.0001

No se logra una inhibición total con los anticuerpos o la Bestatina debido a que el sustrato no es exclusivo de la Aminopeptidasa N, otras Aminopeptidasas como la Aminopeptidasa B o Leupeptidasas también son capaces de procesar el sustrato. En vista de lo anterior, utilizamos macrófagos murinos transfectados con

CD13 humana (J774-hCD13) para ver si el efecto podía ser más específico, considerando que el ratón pudieran no tener las mismas enzimas para degradar este sustrato y así solo considerar el efecto de la enzima transfectada.

Como podemos observar para las J774 hCD13, los anticuerpos inhibidores C y E disminuyen la actividad enzimática a menos del 10% de la actividad del control, de manera semejante actúa la Bestatina a concentraciones 10 veces mayor que la necesaria para inhibir la actividad de CD13 en las células U-937. Fue interesante notar que el anticuerpo WM15 no disminuyó la actividad enzimática a los mismos niveles que los otros anticuerpos C y E. Esto fue así incluso cuando se probaron concentraciones hasta 5 veces las utilizadas con los anticuerpos inhibidores y el efecto obtenido no rebasó el 40% de inhibición.

6.0 DISCUSIÓN

Por muchos años, CD13 fue considerada como una proteína cuya función era su actividad como Aminopeptidasa, o bien era solo considerada como marcador de células mieloides¹. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que CD13 es una proteína multifuncional con importantes y variadas funciones¹⁸. CD13 es una proteína ampliamente distribuida en muy distintos tejidos como epitelial, nervioso y hematopoyético, donde ejerce de manera fisiológica diversas funciones. Por ejemplo, puede cortar aminoácidos neutros en el extremo amino-terminal de péptidos con actividad biológica en el sistema nervioso (péptidos opioides, bradikininas, encefalinas, etc⁸⁷) regulando así su actividad. También participa en la digestión final de péptidos en sistema digestivo, puede cortar proteínas de matriz extracelular como Colágeno IV, puede regular la concentración local de quimiocinas en sitios de inflamación⁸⁸, es capaz de cortar algunos receptores de membrana para modular apoptosis⁸⁹, etc.

Como se mencionó anteriormente, en el sistema hematopoyético, CD13 es considerado marcador de linaje mielo-monocítico de manera fisiológica, ya que los linfocitos solo lo expresan en condiciones de inflamación o en leucemias³¹. Otras funciones en las que participa CD13 de manera independiente a su actividad enzimática son: a) en procesos endocíticos de entrada de colesterol, b) como receptor de algunos coronavirus y citomegalovirus, los cuales se unen a CD13 en un sitio distinto al sitio catalítico^{90,16}, c) en fagocitosis puede cooperar con los FcγR¹¹, o bien actuar como un receptor fagocítico primario¹², d) en invasión de

células tumorales, y e) procesos de angiogénesis en vasos sanguíneos cercanos a tumores^{91,92}.

Las funciones de CD13 independientes de su actividad enzimática, en general, requieren el entrecruzamiento de la molécula que se expresa en la membrana en forma de dímeros. La porción intracelular de CD13 es apenas de 9 aminoácidos⁸⁶, pero se ha demostrado que el entrecruzamiento de CD13 induce la fosforilación de la Tyr₆, y aunque no se conoce a detalle el mecanismo, hay numerosas evidencias de que CD13 está involucrada en transducción de señales. Se ha reportado que el entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales puede inducir el aumento de la concentración de calcio intracelular y la fosforilación de MAPK^{85,93}. También se ha reportado que la agregación homotípica de células monocíticas inducida por el anticuerpo 452 (anti-CD13), involucra una vía de señalización que incluye a Grb2/Sos/Ras/MAPK³⁴.

La adhesión celular es un proceso muy importante en el que participan moléculas cuya interacción es semejante a la unión de un receptor por su ligando y en el que generalmente se requiere una cascada de transducción de señales, que afecta o modula la adhesión intercelular y la señalización intracelular, de la célula estimulada y de las células vecinas⁹⁴. Éstas moléculas son de estructura muy variada y pueden regular procesos fisiológicos muy importantes como la embriogénesis, la angiogénesis y la respuesta inmune; también pueden regular procesos patológicos como invasión o metástasis en neoplasias, donde las moléculas de adhesión juegan un papel crucial¹⁸.

Las primeras observaciones que sugirieron que CD13 podría estar involucrado en adhesión fue su relocalización en el sitio de contacto entre

células⁷⁴, y estudios previos de nuestro grupo donde se observó que al entrecruzar CD13 con algunos anticuerpos monoclonales como el anticuerpo anti-CD13 clona 452, se induce la agregación homotípica en monocitos de manera dependiente de señalización. Estas observaciones nos llevaron a pensar que CD13 podía estar induciendo un cambio en las propiedades adhesivas de las células³⁴. Posteriormente se observó que con este anticuerpo también podía inducirse adhesión heterotípica entre monocitos y células endoteliales, proceso inicial necesario para la extravasación de leucocitos a sitios de inflamación¹⁰. Decidimos utilizar la agregación homotípica inducida con anticuerpos monoclonales como modelo para estudiar el mecanismo molecular involucrado en la adhesión celular.

Con el propósito de identificar moléculas de membrana participantes en el proceso de agregación homotípica, decidimos producir anticuerpos monoclonales capaces de inhibir la agregación inducida por el anticuerpo 452 (anti-CD13) y así identificar las moléculas involucradas. Es así como generamos dos hibridomas productores de los anticuerpos denominados C y E. Estos anticuerpos son capaces de inhibir la agregación homotípica de manera dosis-dependiente; el proceso de adhesión parece ser un proceso dinámico ya que las células agregadas pueden desagregarse en presencia de los anticuerpos inhibidores, ésta desagregación se empieza a observar a las dos horas y se completa al cabo de 16 horas y permanece así al menos 48 horas más, esto nos indica que se trata de un proceso reversible. Aunque existen reportes en el que la unión de anticuerpos anti-CD13 detienen la proliferación de células de leucemia mieloide aguda⁸³, nosotros no encontramos diferencias en la proliferación de los monocitos U-937 a las concentraciones en la que se observa la inhibición de la agregación

homotípica, estas concentraciones son 100 veces menores que las concentraciones donde se observa la inhibición de la proliferación celular.

En ensayos de western blot con lisados de monocitos U-937 se inmunoprecipitó y reveló la presencia de una banda de 160 kDa, tanto con los anticuerpos inhibidores C y E, así como con el anti-CD13 (clona 452). Nos sorprendió encontrar una proteína con peso molecular similar al de CD13 que corresponde a 160 kDa, por lo que corroboramos este hallazgo por espectrometría de masas, donde la puntuación encontrada para las bandas inmunoprecipitadas con cada anticuerpo fue notablemente significativa, indicándonos con plena certeza que la banda reconocida por los anticuerpos C y E es CD13. Otras evidencias que apoyan esta conclusión fue la observación de que los anticuerpos inhibidores se unían exclusivamente a células que expresan CD13 como monocitos humanos de línea celular (U-937 o THP-1), monocitos aislados de sangre periférica de donadores sanos o células humanas endoteliales de la línea HMEC-1 y células transfectadas con CD13 humano (HEK-ANPEP o J774-hCD13); los anticuerpos presentan una menor unión a células con expresión disminuida de CD13 (THP-1 transfectadas con siRNAs para CD13) y no se unen a células embrionarias HEK-293 que no expresan CD13 humano.

Una vez que identificamos a CD13 como la proteína a la que se unen los anticuerpos inhibidores, descartamos que la inhibición encontrada se debiera a competencia de los anticuerpos por el mismo epítotope dentro de la molécula. Así encontramos que los anticuerpos C y E reconocen un epítotope diferente al reconocido por el anticuerpo 452. Lo que nos llamó la atención es que los anticuerpos C y E, reconocen el mismo epítotope en CD13 o un sitio muy cercano,

ya que compiten entre sí para unirse a la proteína, y la inhibición de la agregación homotípica producida por ambos anticuerpos es semejante, aunque el anticuerpo E es ligeramente más eficiente para inhibir. El hecho de que los epítopes a los que se unen los anticuerpos inhibidores (C o E) sean distintos al epítipo reconocido por el anticuerpo activador (clona 452) nos dio un primer indicio de que los efectos biológicos podían estar relacionados al epítipo que se unieran los anticuerpos.

Como se mencionó anteriormente, el sitio de unión de los anticuerpos inhibidores es diferente al del anticuerpo activador (clona 452), esto también se refleja al determinar la inhibición de su actividad enzimática. La clona 452 ha mostrado un mínimo efecto sobre la actividad de aminopeptidasa, mientras que los anticuerpos C y E inhiben la actividad enzimática muy eficientemente: en el caso de los monocitos tanto de línea celular como aislados de sangre periférica, la inhibición no fue total (>40%) pero se encontró semejante a la obtenida con Bestatina, un conocido inhibidor químico de Aminopeptidasas. Posiblemente la razón por la que no se observó una inhibición total fue que éstas células expresan también otras aminopeptidasas que pueden cortar el sustrato, tal vez no tan eficientemente pero si afectar el resultado final. El efecto de inhibición de los anticuerpos fue más dramático, (casi del 90% de la actividad) en células transfectadas con CD13 humano ya que éstas células expresan mayores niveles de CD13 y posiblemente las peptidasas que contienen no pueden degradar el sustrato que utilizamos. Con estos hallazgos podemos establecer que el epítipo que reconocen los anticuerpos C y E puede estar cercano o afectar al sitio catalítico de CD13.

Tanto en procesos de extravasación, así como de invasión de células tumorales, la unión de células que expresan CD13 como monocitos a las células endoteliales es un paso clave. En los ensayos de adhesión heterotípica entre monocitos y células endoteliales HMEC-1, los anticuerpos C y E no activan a las células para su unión como lo induce el anticuerpo 452, sino que al contrario, los anticuerpos C y E pueden inhibir la adhesión al endotelio. La inhibición depende del entrecruzamiento de la molécula ya que los fragmentos Fab' de los anticuerpos no son suficientes para inhibir la agregación, y fue necesario entrecruzar a CD13 con anticuerpo secundario para observar la inhibición.

A pesar de que los tres anticuerpos anti-CD13 tienen efectos opuestos en la adhesión celular, no encontramos diferencias en su capacidad para inducir un aumento en la concentración de calcio intracelular como consecuencia del entrecruzamiento de CD13 por cada anticuerpo, los tres anticuerpos anti-CD13 452, C y E pueden inducir de manera semejante un aumento rápido y significativo en la concentración de calcio intracelular, lo que sugiere que aunque se necesita una transducción de señales para inducir la adhesión^{34,10}, no es suficiente para desencadenar toda la respuesta. Se ha demostrado que los anticuerpos C y E poseen la capacidad de mediar otras funciones donde también se requiere una señalización de las células¹², como la fagocitosis, de manera eficiente.

Existen reportes que indican que CD13 puede interaccionar con proteínas de matriz extracelular, particularmente con fibronectina y laminina^{57,95}. Específicamente se reportó que CD13 puede interaccionar con el motivo NGR en el dominio V de fibronectina, y que la unión a la fibronectina de matriz extracelular a través de este motivo podría conferir una alta capacidad migratoria a las células

tumorales que expresan CD13. Basados en la evidencia de que entrecruzar CD13 con 452 puede inducir la adhesión de células que expresan CD13, decidimos probar la unión de éstas células a las proteínas de matriz extracelular como Fibronectina y Colágena IV. No pudimos detectar unión de los monocitos U-937 o THP-1 a fibronectina ni a matrigel, incluso estimulando con el anticuerpo activador 452. Solo encontramos una unión débil si activamos previamente las células con PMA, que puede ser parcialmente inhibida en presencia de nuestros anticuerpos C o E y en menor medida con el anticuerpo 452, sin embargo estos resultados son muy discretos y no son estadísticamente significativos (datos no mostrados).

Otro modelo utilizado para poder evaluar específicamente el papel de CD13 en la unión de células a fibronectina, fue utilizar células transfectadas con CD13 y compararlas con las células parentales. Las células HEK-293 no se unen a fibronectina de manera significativa en los periodos evaluados, sin embargo, las células HEK-ANPEP (células HEK-293 transfectadas con CD13 humano) se unen a las placas cubiertas con fibronectina 10 veces más que las células no transfectadas y el efecto inhibitorio de los anticuerpos C y E es >70% comparado con el control de células sin anticuerpo o con anticuerpo irrelevante. Se observó una inhibición menor con el anticuerpo WM15, un conocido anticuerpo anti-CD13 que fue capaz de inhibir en cerca de un 60% la unión, pero utilizando concentraciones casi 100 veces más altas que la concentración utilizada con los anticuerpos inhibidores; el anticuerpo 452 también tuvo un efecto más pobre en la inhibición. Esto concuerda con los datos obtenidos para la inhibición de la actividad enzimática, donde los anticuerpos WM15 y 452 mostraron una menor inhibición de la actividad comparada con la obtenida con los anticuerpos C y E.

Esto parece sugerir que la unión de C o E a CD13, puede impedir estéricamente la interacción del motivo NGR o sustratos con el sitio catalítico, o bien que la unión de C o E induzca una conformación cerrada del sitio activo de la Aminopeptidasa N/CD13, impidiendo el acceso de sus sustratos.

Ya se discutió anteriormente cómo a pesar de que los anticuerpos anti-CD13 se unen a distintos epítopes, pueden iniciar la cascada de señalización de manera semejante, esto determinado por su capacidad de inducir un incremento de la concentración intracelular de iones Ca^{2+} . La diferencia en la respuesta tampoco parece deberse a una internalización del receptor una vez que CD13 se ha entrecruzado, ya que no se observó disminución de la molécula en membrana en presencia de los anticuerpos inhibidores lo que dejaría sin posibilidad al 452 unirse y así inducir la agregación. Aunque para demostrar esto de manera formal, podrían hacerse ensayos con inhibidores de endocitosis de receptores en membrana.

En vista de que el entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo 452 induce la agregación homotípica y la adhesión heterotípica entre monocitos y células endoteliales, mientras que el entrecruzamiento con los anticuerpos C y E, tiene el efecto contrario, es decir, inhibe dicha adhesión, nos preguntamos cuál podría ser el mecanismo para explicar este fenómeno. Dado que CD13 es una molécula con una porción extracelular grande y basados en nuestras observaciones, podemos proponer que la región de CD13 involucrada en la adhesión celular es diferente a la región involucrada en la unión del motivo NGR. Esta propuesta está apoyada con los hallazgos de Ghosh *et al*⁶, quienes demostraron que la adhesión celular estaba mediada por el extremo carboxilo de CD13 que corresponde al 50% del

dominio VI y VII de la molécula, mientras que la unión del motivo NGR es en el sitio catalítico, que se ubica en una cavidad limitada por cuatro dominios extracelulares (Dominios IV-VII).

Lo anterior nos permite proponer que el entrecruzamiento CD13 con el anticuerpo 452, cambia la conformación espacial del dominio extracelular de CD13 exponiendo los sitios con los que puede interaccionar con otras moléculas para su adhesión. Sin embargo, esta conformación no sería la “basal”, ya que solo se induce al entrecruzar la molécula con algunos anticuerpos, y posiblemente pueda alcanzarse con algún ligando natural que todavía no se ha descrito. Por otra parte, el entrecruzamiento de CD13 con los anticuerpos C y E podría inducir también un cambio conformacional pero distinto al inducido por 452, donde los sitios para mediar la adhesión no estarían expuestos. Pero no solo los sitios para mediar la adhesión estarían alterados, la conformación adoptada también sería diferente a la basal, ya que también se encontró inhibición de la actividad enzimática, lo que presumiblemente inhibiría la unión del motivo NGR. Encontramos que los anticuerpos C y E inhiben la unión a fibronectina, y aunque el anticuerpo 452 también es capaz de disminuir la unión, es mucho menos eficiente. Con todas estas evidencias creemos que al entrecruzar CD13 con los anticuerpos C y E se induce una conformación de la molécula tal que se afecta negativamente las interacciones con fibronectina, motivos NGR, o sustratos, e inclusive con otras moléculas de CD13 en adhesión celular. El hallazgo de la inhibición de la actividad enzimática por estos anticuerpos los hace ser atractivos inhibidores enzimáticos, con potencial terapéutico. El hecho que al entrecruzar receptores de membrana con distintos anticuerpos monoclonales puede resultar

en distintas conformaciones de la molécula, también está apoyado en la evidencia previamente observada para los receptores FcεRI en mastocitos⁹⁷.

Estos cambios conformacionales no explican porque no encontramos diferencias al determinar la elevación de calcio intracelular o la fosforilación de CD13 al entrecruzar con los distintos anticuerpos anti-CD13. Creemos que el entrecruzamiento de CD13 en membrana a una cierta distancia y orientación lograda con los anticuerpos independientemente de la conformación que adopte su porción extracelular, es crítica para iniciar los eventos de transducción de señales. Estudios llevados a cabo por Wong²², al analizar la estructura cristalográfica de CD13 con sustratos o inhibidores, permiten conocer en los dímeros de CD13, que cada uno de los monómeros puede existir en una conformación abierta/abierto o cerrada/cerrada. En estas estructuras la distancia entre los dominios transmembranales de los monómeros, cambiarían de 102 a 54 Å y que estas conformaciones pudieran ser el mecanismo usado por CD13 para transmitir señales a través de la membrana. Es posible pensar que al entrecruzar CD13 con cada uno de los anticuerpos (C, E o 452) la distancia y orientación de los dímeros en la membrana sea suficiente para iniciar la cascada de señalización, como sucede para varios receptores en la respuesta inmune, en los cuales los cambios de conformación en los dominios extracelulares no se reflejan en cambios conformacionales en los dominios citoplásmicos, y es solo la agregación o el acercamiento de los dominios intracelulares lo que permite el reclutamiento de enzimas necesarias para iniciar la cascada de señalización⁹⁴. Para comprobar esta hipótesis sería necesaria la resolución de la estructura de los agregados de

CD13 con los anticuerpos activadores o inhibidores. En resumen, si bien nosotros proponemos que el cambio conformacional en la porción extracelular es crítico para los eventos de adhesión celular, el entrecruzamiento de CD13 con los anticuerpos a una adecuada distancia y orientación en la porción transmembranal y citoplasmática es suficiente para iniciar la cascada de señalización.

La descripción de CD13 como una molécula multifuncional o moonlighting, parece ser muy apropiada ya que puede participar en muy variadas funciones que involucran distintas regiones dentro de la molécula, y como originalmente fueron descritas estas moléculas, se trata de distintas pequeñas modificaciones en la molécula y no la adquisición de nuevos dominios. La actividad enzimática de CD13 y su unión a proteínas de matriz extracelular a través del motivo NGR parece estar mediado en la región del sitio catalítico en los dominios II al III. La adhesión célula-célula parece estar mediada en la porción extracelular posiblemente entre el dominio III y IV, mientras que el inicio de la cascada de señalización parece estar mediada por los dominios citoplasmáticos.

La implementación de la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento en cáncer. Específicamente, el desarrollo de anticuerpos que se unen y bloquean procesos denominados “immune checkpoints”, llevan a resultados clínicos positivos en una gran variedad de tipos de cáncer⁹⁸. Además el aumento en la expresión de algunas moléculas en sangre o en fluidos corporales puede ser detectado con ensayos sensibles y específicos para el diagnóstico temprano de algunas neoplasias. Las propiedades de inhibición de los anticuerpos C y E en distintos procesos puede constituir una herramienta interesante con aplicaciones en diagnóstico y en terapia.

7.0 CONCLUSIONES

- Obtuvimos dos hibridomas productores de anticuerpos que inhiben la agregación homotípica y heterotípica de manera dosis-dependiente y reversible y fueron denominados anticuerpos C y E
- Los anticuerpos inhibidores reconocen a CD13 en un epítoto distinto al del anticuerpo activador 452.
- La inhibición requiere entrecruzamiento de la molécula y no se debe a la internalización de CD13
- Los anticuerpos inhiben la actividad enzimática y la unión a proteínas de matriz extracelular como fibronectina
- Al entrecruzar CD13 con los anticuerpos 452, C y E se induce de forma semejante la fosforilación de tirosina en la cola citoplasmática de CD13 de manera temporal y también se induce un aumento semejante en la concentración intracelular de iones Ca^{2+} .

8.0 PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas de este estudio cabe hacer notar que entre las peptidasas involucradas en procesos de neoplasia, CD13 es una de las moléculas más estudiadas ya que se ha visto involucrado en varios procesos importantes para el desarrollo del tumor como angiogénesis, motilidad, migración celular tumoral, poder invasivo, y la molécula se encuentra sobreexpresada en algunas neoplasias que le llevan a una mayor agresividad del tumor en el paciente. Por lo anterior, se ha considerado a CD13 como un blanco terapéutico viable en combinación con otros tratamientos. Se han obtenido avances y algunas moléculas como la Bestatina (Ubenimex) están siendo evaluadas en ensayos clínicos, sin embargo, las concentraciones necesarias para obtener efectos significativos solo se alcanzan con dosis cuyos efectos secundarios adversos son enormes, lo que dificulta su implementación como terapia, por lo que se continúa en la búsqueda de moléculas menos tóxicas y más específicas^{99,100,63}.

El diagnóstico de desregulación en la expresión de CD13, sería una herramienta útil para proporcionar un adecuado tratamiento al paciente. Los anticuerpos monoclonales tienen una gran ventaja para intervenir en diagnóstico y terapia: son altamente específicos y se pueden obtener en cantidades ilimitadas, y no llegan a ser tóxicos para el paciente, pueden utilizarse si su origen es de ratón y también existe la posibilidad de modificarlos genéticamente para “humanizarlos”¹⁰¹. Los anticuerpos C y E obtenidos presentan propiedades muy atractivas en este sentido, ya que inhiben de manera importante la actividad enzimática y la adhesión a concentraciones muy bajas e interfieren con la unión a

proteínas de matriz extracelular lo que los hace candidatos para estudios más profundos en diagnóstico y terapia de cáncer.

Aunque algunos anticuerpos han sido aprobados por la FDA (Food & Drug Administration, por sus siglas en inglés) como agente de tratamiento único, esta terapia suele beneficiar a un número reducido de pacientes. Los tratamientos anti-tumorales más eficientes parecen combinar tratamientos convencionales con otras inmunoterapias para proporcionar un resultado más promisorio para los pacientes. Es por eso necesaria más investigación sobre anticuerpos o epítopes de moléculas que sirvan como blanco para hacer la terapia más específica y combinar estos anticuerpos con moléculas citotóxicas y así maximizar su efecto, así podemos encontrar anticuerpos bi, tri y hasta tetra-específicos acoplados a moléculas citotóxicas que actualmente están en ensayos clínicos para su implementación⁹⁸.

9.0 MODELO DE AGREGACIÓN O INHIBICIÓN

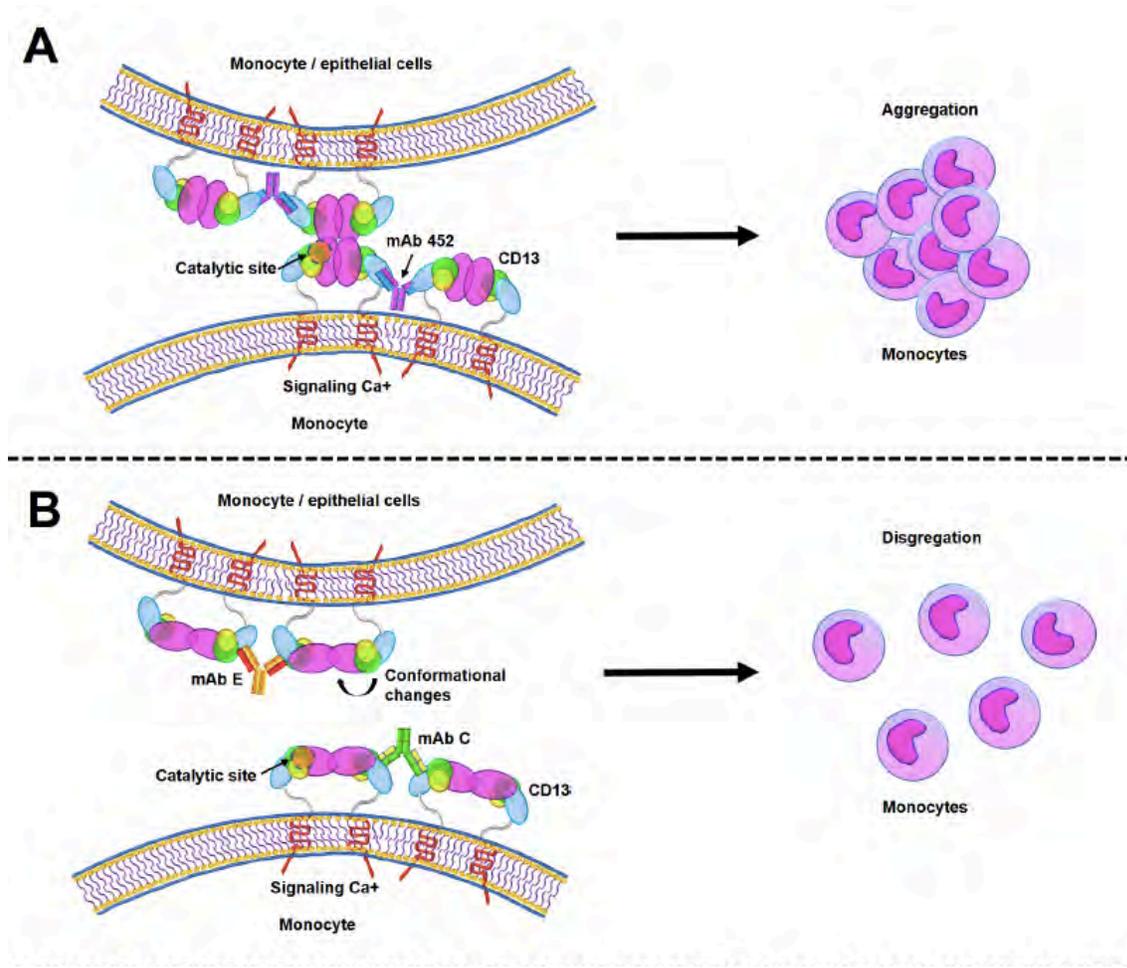


Figura 17. Modelo propuesto de agregación o inhibición mediado por anticuerpos anti-CD13. A) El CD13 de una célula se entrecruza con el anticuerpo 452 en un sitio distinto al sitio catalítico, e inicia una cascada de señalización y las células se agregan. B) El anticuerpo C o E inducen un cambio conformacional en CD13 que permite la unión de otros anticuerpos como el 452, pero inhiben la agregación homotípica

10.0 BIBLIOGRAFIA

1. Riemann, D., Kehlen, A. & Langner, J. CD13 - Not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* **20**, 83–88 (1999).
2. Piatigorsky, J. & Wistow, G. J. Enzyme/crystallins: Gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell* (1989).
3. Jeffery, C. J. Protein species and moonlighting proteins: Very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function. *Journal of Proteomics* **134**, 19–24 (2016).
4. Pfleiderer, G. & Celliers, P. [isolation of an aminopeptidase from kidney particles] *abstract available in english. Biochem Z* **339**, 186–9 (1963).
5. Look, A. T., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H. & Peiper, S. C. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* **83**, 1299–1307 (1989).
6. Ashmun, R. A. & Look, A. T. Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood* **75**, 462–469 (1990).
7. George, A. J., Thomas, W. G. & Hannan, R. D. The renin-angiotensin system and cancer: Old dog, new tricks. *Nature Reviews Cancer* (2010).
8. Roques, B. P., Fournié-Zaluski, M. C. & Wurm, M. Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nature Reviews Drug Discovery* (2012).
9. Proost, P. *et al.* Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* (2007).

10. Mina-Osorio, P. *et al.* CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 448–459 (2008).
11. Mina-Osorio, P. & Ortega, E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3 in human monocytes. *J Leukoc Biol* **77**, 1008–1017 (2005).
12. Licona-Limón, I., Garay-Canales, C. a, Muñoz-Paletta, O. & Ortega, E. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 85–98 (2015).
13. Petrovic, N. *et al.* CD13 / APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. **110**, 142–150 (2007).
14. Guzman-Rojas, L. *et al.* Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2012).
15. Yeager, C. L. *et al.* Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* (1992).
16. Kasman, L. M. CD13/aminopeptidase N and murine cytomegalovirus infection. *Virology* **334**, 1–9 (2005).
17. Söderberg, C. *et al.* CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**, 6576–6585 (1993).
18. Mina-Osorio, P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine* **14**, 361–371 (2008).
19. Olsen, J. *et al.* Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett* (1988).
20. O’Connell, P. J., Gerkis, V. & d’Apice, a J. Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N). *J. Biol. Chem.* **266**, 4593–7 (1991).

21. Sjöström H1, Norén O, O. J. Structure and function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol. N.*, **477**, 25–34 (2000).
22. Wong, A. H. M., Zhou, D. & Rini, J. M. The x-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J. Biol. Chem.* (2012).
23. Favaloro, E. J., Browning, T. & Facey, D. CD13 (GP150; aminopeptidase-N): predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell-surface associated. *Exp Hematol* **21**, 1695–1701 (1993).
24. Di Matteo, P. *et al.* Enhanced Expression of CD13 in Vessels of Inflammatory and Neoplastic Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* (2010).
25. Drexler, H. G. Classification of acute myeloid leukemias--a comparison of FAB and immunophenotyping. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* (1987).
26. Lendeckel, U. *et al.* Expression of the aminopeptidase N (CD13) gene in the human T cell lines HUT78 and H9. *Cell. Immunol.* (1994).
27. Hara, J. *et al.* In vivo and in vitro expression of myeloid antigens on B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* (1991).
28. Ryan, D. H. Phenotypic heterogeneity in acute leukemia. *Clin. Chim. Acta* (1992).
29. Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters* (1994).
30. Van Der Velden, V. H. J. & Hulsmann, A. R. Peptidases: Structure, function and modulation of peptide-mediated effects in the human lung. *Clinical and Experimental Allergy* (1999).
31. Shipp M, L. T. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-

associated enzymes: cutting is the key! *Blood* **82**, 1052–1070 (1993).

32. Larsen, S. L. T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides [published erratum appears in *J Exp Med* 1996 Nov 1;184(5):2073]. *J. Exp. Med.* (2004).
33. Miki, T. *et al.* The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J. Biol. Chem.* (2007).
34. Mina-Osorio, P., Shapiro, L. H. & Ortega, E. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 719–730 (2006).
35. Alfalah, M. *et al.* A mutation in aminopeptidase N (CD13) isolated from a patient suffering from leukemia leads to an arrest in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* (2006).
36. Dybkær, K., Kristensen, J. S. & Pedersen, F. S. Single site polymorphisms and alternative splicing of the human CD13 gene - Different splicing frequencies among patients with acute myeloid leukaemia and healthy individuals. *Br. J. Haematol.* (2001).
37. Delmas, B. *et al.* Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* (1992). doi:10.1038/357417a0
38. Santiago, C. *et al.* Allosteric inhibition of aminopeptidase N functions related to tumor growth and virus infection. *Sci. Rep.* (2017).
39. Hofmann, H. *et al.* Attachment factor and receptor engagement of SARS

- coronavirus and human coronavirus NL63. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2006).
40. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* (2011).
 41. Lauren, P. In *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets and therapeutics*. 4th edition (Oxford University Press, 2016).
 42. Dubowchik, G. M. & Walker, M. A. Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs. *Pharmacology and Therapeutics* (1999).
 43. Wickström, M., Larsson, R., Nygren, P. & Gullbo, J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Science* **102**, 501–508 (2011).
 44. Bhagwat, S. V. *et al.* CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* **97**, 652–659 (2001).
 45. Kido, A., Krueger, S., Haeckel, C. & Roessner, A. Inhibitory effect of antisense aminopeptidase N (APN/CD13) cDNA transfection on the invasive potential of osteosarcoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* (2003).
 46. Curnis, F. *et al.* Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res.* **62**, 867–874 (2002).
 47. Severini, G., Gentilini, L. & Tirelli, C. Diagnostic evaluation of alanine aminopeptidase as serum marker for detecting cancer. *Cancer Biochem. Biophys.* (1991).
 48. Pang, L. *et al.* Serum APN/CD13 as a novel diagnostic and prognostic

- biomarker of pancreatic cancer. *Oncotarget* (2016).
49. Nagano, H. *et al.* Novel therapeutic target for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* (2012).
 50. Kim, H. M. *et al.* Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial–Mesenchymal Transition-like Phenomenon. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 539–548 (2012).
 51. Wickström, M., Larsson, R., Nygren, P. & Gullbo, J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* **102**, 501–8 (2011).
 52. O’Connell, P. J., Gerkis, V. & d’Apice, A. J. Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N). *J. Biol. Chem.* **266**, 4593–4597 (1991).
 53. Norén, K. *et al.* Defectively N-glycosylated and non-O-glycosylated aminopeptidase N (CD13) is normally expressed at the cell surface and has full enzymatic activity. *Exp. Cell Res.* (1997).
 54. Schreiber, C. L. & Smith, B. D. Molecular Imaging of Aminopeptidase N in Cancer and Angiogenesis. *Contrast Media and Molecular Imaging* (2018).
 55. Dondossola, E. *et al.* CD13-positive bone marrow-derived myeloid cells promote angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013).
 56. Tokuhara, T. *et al.* Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* (2006).
 57. Chang, Y. W. *et al.* CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells. *Int. J. Cancer* **116**, 243–252 (2005).

58. Patatanian, E. & Thompson, D. F. Retinoic acid syndrome: A review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (2008).
59. Löf, L. *et al.* Detecting individual extracellular vesicles using a multicolor in situ proximity ligation assay with flow cytometric readout. *Sci. Rep.* (2016).
60. Glinsky, V. V, Huflejt, M. E., Glinsky, G. V, Deutscher, S. L. & Quinn, T. P. Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **60**, 2584–8 (2000).
61. Glinskii, O. V, Sud, S., Mossine, V. V, Mawhinney, T. P. & Anthony, D. C. Inhibition of Prostate Cancer Bone Metastasis by Synthetic TF Antigen Mimic / Galectin-3. *Neoplasia* **14**, 65–73 (2012).
62. Haraguchi, N. *et al.* CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest.* **120**, 3326–39 (2010).
63. Piedfer, M. *et al.* Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells. *FASEB J.* **25**, 2831–42 (2011).
64. Saxena, A., Rai, A., Raina, V., Seth, T. & Mitra, D. K. Expression of CD13/aminopeptidase N in precursor B-cell leukemia: Role in growth regulation of B cells. *Cancer Immunol. Immunother.* (2010).
65. Corti, A., Curnis, F., Arap, W. & Pasqualini, R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. *Blood* **112**, 2628–35 (2008).
66. Rangel, R. *et al.* Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007).
67. Wallingford, M. C., Gammill, H. S. & Giachelli, C. M. Slc20a2 deficiency

results in fetal growth restriction and placental calcification associated with thickened basement membranes and novel CD13 and laminin α 1 expressing cells. *Reprod. Biol.* (2016).

68. Bhagwat, S. V *et al.* CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* **97**, 652–9 (2001).
69. Saiki, I. *et al.* Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int. J. Cancer* **54**, 137–143 (1993).
70. Müller Ulrich. Cell Adhesion Molecules and Human Disorders. in *Encyclopedia of Life Sciences* (2005).
71. Sundar Rajan, V., Laurent, V. M., Verdier, C. & Duperray, A. Unraveling the Receptor-Ligand Interactions between Bladder Cancer Cells and the Endothelium Using AFM. *Biophys. J.* **112**, 1246–1257 (2017).
72. Kim, M. Y. & Cho, J. Y. Molecular association of CD98, CD29, and CD147 critically mediates monocytic U937 cell adhesion. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* (2016).
73. Choi, J.-W., Lee, H.-W., Roh, G.-S., Kim, H.-H. & Kwack, K. CD137 induces adhesion and cytokine production in human monocytic THP-1 cells. *Exp. Mol. Med.* **37**, 78–85 (2005).
74. Menrad, A., Speicher, D., Wacker, J. & Herlyn, M. Biochemical and Functional Characterization Human Melanoma Cells of Aminopeptidase N Expressed by. *Cancer Res.* **53**, 1450–1455 (1993).
75. Riemann, D., Kehlen, A., Thiele, K., Lohn, M. & Langner, J. Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and

- monocytes/macrophages. *J Immunol* (1997).
76. Goding, J. W. In *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. First edition Academic Press Inc, (1983).
 77. Oldham, R. K. & Dillman, R. O. *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy: 25 Years of Progress. J. Clin. Oncol.* (2008).
 78. Williams, B. A. *et al.* Antibody Therapies for Acute Myeloid Leukemia: Unconjugated, Toxin-Conjugated, Radio-Conjugated and Multivalent Formats. *J. Clin. Med.* (2019).
 79. Zhang, J. *et al.* CD13 inhibition enhances cytotoxic effect of chemotherapy agents. *Front. Pharmacol.* (2018).
 80. Zelig, E. *Monoclonal Antibodies Strategy and Techniques*. Academic Press Inc (1985).
 81. Ashmun, R. A., Shapiro, L. H. & Look, A. T. Deletion of the zinc-binding motif of CD13/aminopeptidase N molecules results in loss of epitopes that mediate binding of inhibitory antibodies. *Blood* (1992).
 82. Fukasawa, K. *et al.* Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett.* **243**, 135–43 (2006).
 83. Bouchet, S., Tang, R., Fava, F., Legrand, O. & Bauvois, B. Targeting CD13 (aminopeptidase-N) in turn downregulates ADAM17 by internalization in acute myeloid leukaemia cells. *Oncotarget* **5**, 8211–8222 (2014).
 84. Soudy, R., Ahmed, S. & Kaur, K. NGR peptide ligands for targeting CD13/APN identified through peptide array screening resemble fibronectin sequences. *ACS Comb. Sci.* (2012).

85. Santos, A. N., Langner, J., Herrmann, M. & Riemann, D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell. Immunol.* (2000).
86. Subramani, J. *et al.* Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking. *J. Immunol.* **191**, 3905–12 (2013).
87. Potolicchio, I. *et al.* Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J Immunol* **175**, 2237–2243 (2005).
88. Drag, M., Bogyo, M., Ellman, J. a & Salvesen, G. S. Aminopeptidase fingerprints, an integrated approach for identification of good substrates and optimal inhibitors. *J. Biol. Chem.* **285**, 3310–8 (2010).
89. Cowburn, A. S. *et al.* Aminopeptidase N (CD13) regulates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* (2006).
90. Wevers, B. A. & Van Der Hoek, L. Renin-angiotensin system in human coronavirus pathogenesis. *Future Virology* (2010).
91. Gregorc, V. *et al.* Defining the optimal biological dose of NGR-hTNF, a selective vascular targeting agent, in advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer* **46**, 198–206 (2010).
92. Feng, J. *et al.* A novel aminopeptidase N inhibitor developed by virtual screening approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5863–9 (2012).
93. Navarrete Santos, A., Roentsch, J., Danielsen, E. M., Langner, J. & Riemann, D. Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 143–

- 148 (2000).
94. Montoya, M. C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M. & Sánchez-Madrid, F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunological Reviews* (2002).
 95. Liu, C., Yang, Y., Chen, L., Lin, Y. L. & Li, F. A unified mechanism for aminopeptidase N-based tumor cell motility and tumor-homing therapy. *J. Biol. Chem.* (2014).
 96. Ghosh, M. *et al.* Molecular mechanisms regulating CD13-mediated adhesion. *Immunology* **142**, 636–647 (2014).
 97. Ortega, E., Schweitzer-Stenner, R. & Pecht, I. Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J.* (1988).
 98. Zahavi, D. J. & Weiner, L. M. Targeting multiple receptors to increase checkpoint blockade efficacy. *International Journal of Molecular Sciences* (2019).
 99. Ichinose, Y. *et al.* Randomized double-blind placebo-controlled trial of bestatin in patients with resected stage I squamous-cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 605–10 (2003).
 100. Bauvois, B. & Dauzonne, D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: Chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Medicinal Research Reviews* **26**, 88–130 (2006).
 101. An, Z. *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*. First edition. Wiley & Sons Inc (2009).

Research Article

Distinct Epitopes on CD13 Mediate Opposite Consequences for Cell Adhesion

Claudia A. Garay-Canales, Ileana Licona-Limón, and Enrique Ortega 

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Enrique Ortega; ortsoto@biomedicas.unam.mx

Received 15 September 2017; Revised 3 February 2018; Accepted 8 February 2018; Published 29 March 2018

Academic Editor: Benoît Stijlemans

Copyright © 2018 Claudia A. Garay-Canales et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CD13 is a membrane glycoprotein with aminopeptidase activity, expressed on several cell types, including myeloid cells (dendritic cells, monocytes, macrophages, neutrophils, etc.). CD13 participates in several functions such as proteolytic regulation of bioactive peptides, viral receptor, angiogenesis, and tumor metastasis. CD13 has also been proposed to participate in cell adhesion, as crosslinking of CD13 by certain CD13-specific antibodies induces homotypic aggregation of monocytes and heterotypic adhesion of monocytes to endothelial cells. We generated two monoclonal antibodies (mAbs C and E) that block homotypic aggregation of U-937 monocytic cells induced by CD13-specific mAb 452. Moreover, the mAbs cause detachment of cells whose aggregation was induced by CD13 crosslinking. Both mAbs also inhibit heterotypic adhesion of U-937 monocytes to endothelial cells. mAbs C and E recognize membrane CD13 but bind to epitopes different from that recognized by mAb 452. Crosslinking of CD13 by mAb C or E is required to inhibit adhesion, as monovalent Fab fragments are not sufficient. Thus, C and E antibodies recognize a distinct epitope on CD13, and binding to this epitope interferes with both CD13-mediated cell adhesion and enzymatic activity. These antibodies may represent important tools to study cell-cell interactions mediated by CD13 in physiological and pathological conditions.

1. Introduction

Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2, APN) is an integral membrane protein with zinc-dependent peptidase activity, first isolated in 1963 by Pflieger and Celliers [1, 2]. APN preferentially removes N-terminal neutral amino acids from unsubstituted oligopeptides, amides, or arylamides. Through its peptidase activity, it is known to participate in regulation of the activity of various neuropeptides, as well as vasoactive and chemotactic peptides. APN has been also shown to participate in several other processes, like differentiation, proliferation, apoptosis, motility, chemotaxis, antigen presentation, and tumor cell invasion, among others [3]. Participation of APN in these processes not always depends on its peptidase activity. In 1989, Look et al. established the identity of APN with the myeloid marker CD13 [4].

Structurally, APN/CD13 is a membrane protein of 967 amino acids which has a large extracellular portion containing the enzymatic active site, a transmembrane domain, and a short cytoplasmic tail. Crystallographic structure of the

large extracellular portion of CD13/APN reveals that it has a seahorse shape, with four distinct domains: head, side, body, and tail [5, 6]. CD13 is expressed on the cell membrane as a highly glycosylated dimer of two noncovalently associated subunits of 160 kDa. A soluble form of CD13 is also detectable in plasma/serum and urine [7, 8].

In homeostasis, CD13 is expressed in epithelial, endothelial, and fibroblast cell types; within the hematopoietic compartment it is expressed on stem cells and on cells of the granulocytic and monocytic lineages at distinct stages of differentiation and has thus been considered a differentiation marker [9]. Aberrant expression of CD13 is observed in many diseases, and a high expression of CD13 in melanoma, renal, pancreas, colon, prostate, gastric, and thyroid cancer cells has been associated with a poor prognosis [10]. Overexpression of CD13 has been also observed in inflammatory diseases, such as in alveolar macrophages from collagen vascular disease patients with interstitial lung disease [11] and in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients [12].

CD13 is considered a moonlighting protein, because it has multiple functions that are apparently not related mechanistically. Along with its enzymatic activity, CD13 also participates in angiogenesis [13, 14], as a receptor for some group 1 coronaviruses [15], and in cholesterol uptake [16]. Also, we have previously reported that CD13 is involved in adhesion of monocytes [17] and that CD13 is a phagocytic receptor [18]. Participation of CD13 in adhesion processes of monocytes was demonstrated by showing that crosslinking of CD13 with a monoclonal antibody (mAb) (clone 452) resulted in the homotypic aggregation (HA) of U-937 human monocytic cells through a signal transduction dependent process, which required metabolic energy [17]. Later, it was shown that CD13 crosslinking by mAb 452 also induces monocyte adhesion to endothelial cells [19]. In the later study, it was suggested that CD13 directly mediates cell-cell interactions, as adhesion can be blocked by soluble CD13, and activated monocytes can adhere to immobilized purified recombinant CD13 [19]. Demonstration of the involvement of CD13 in mediating monocyte adhesion *in vivo* was given by Ghosh et al. [20], who reported that peritoneal monocytes, macrophages, and dendritic cells were significantly decreased in inflammatory exudates from CD13-KO mice compared to wild-type mice. They also showed, using a model of adoptive transfer of myeloid cells from wild-type and CD13-KO mice into either wild-type or CD13-deficient mice, that thioglycollate-induced migration to the peritoneal cavity was significantly reduced in the absence of CD13 expression in either monocytes or endothelial cells. Subramani et al. [21] found that, in U-937 monocytic cells, CD13 clustering induces adhesion through a mechanism that involves activation of focal adhesion kinase (FAK), Src, and ERK protein kinases and phosphorylation of a tyrosine in the short cytoplasmic tail of CD13. Mutation of this tyrosine, or the use of chemical inhibitors of tyrosine kinases, abrogates cell adhesion to endothelial cells *in vitro* and impairs monocyte trafficking to the inflamed peritoneum *in vivo* [21].

Only certain anti-CD13 mAbs are able to induce monocyte adhesion, suggesting that the epitope recognized by each mAb is important in determining its ability to initiate signal transduction events leading to adhesion [17]. We report here the characterization of the adhesion-related properties of two new monoclonal anti-human CD13 antibodies. These mAbs inhibit CD13 enzymatic activity and are able to inhibit HA of monocytes, as well as the heterotypic aggregation of monocytes to endothelial cells, induced by the activating mAb 452. These antibodies may represent important tools to study cell-cell interactions mediated by CD13 in physiological and pathological conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Antibodies

2.1.1. Cell Lines. The human promonocytic cell lines U-937 and THP-1, the murine myeloma Ag8 cells (obtained from the American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA), and THP-1 L2 cells (THP-1 cells with low expression of CD13 [18]) were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco

by Life Technologies, NY, USA). HMEC-1 microvasculature endothelial cells (originally from ATCC, obtained from Dra. Dolores Correa, Instituto Nacional de Pediatría, México) were cultured in MCDB-131 medium supplemented according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). HEK-293 cells (ATCC CRL-1573™) or HEK-ANPEP cells (HEK-293 cells expressing human CD13-GFP, obtained as previously described [18]) were cultured in DMEM-high glucose (Invitrogen, CA, USA). J744-hCD13 mouse macrophages expressing human CD13 [18] were cultured in DMEM-high glucose (Gibco by Life Technologies, USA). All media were supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), 1 mM sodium pyruvate solution, and 1% MEM nonessential amino acids solution (100x) (Gibco by Life Technologies, NY, USA). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 6% CO₂.

2.1.2. Antibodies. Hybridoma cells producing monoclonal antibodies C (mAb C) (IgG1) or E (mAb E) (IgG2b) were obtained by fusion with PEG 1550 (SERVA, Heidelberg, Germany) of Ag8 myeloma cells with splenocytes from a 4-week-old female BALB/c mouse immunized intraperitoneally with U-937 cells aggregated after stimulation with anti-CD13 mAb 452 (1 µg/ml for two hours). Immunizations were given every two weeks during 2 months. Two additional intraperitoneal immunizations with aggregated cells were applied 3 and 4 days before the fusion. Animal handling and sacrifice were conducted under the guidelines established by the Committee on the Care and Use of Experimental Animals of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Hybridomas were selected based on the ability of the secreted mAb to inhibit homotypic aggregation (HA) of U-937 cells induced by mAb 452 [17]. For these assays, U-937 cells (1×10^5 cells in 50 µl RPMI 1640) were placed in flat-bottom wells of a 96-well culture plate, an equal volume of medium or supernatant from the hybridomas was added to each well, and cells were incubated for 1 h at 37°C. Activating mAb 452 was then added (at a final concentration of 1 µg/ml) and cells were incubated for two additional hours. Inhibition of aggregation by supernatants was detected visually in an Axiovert 25 inverted microscope (Zeiss, Germany). Hybridomas secreting antibodies able to inhibit HA were selected for cloning by limiting dilution, expanded, and characterized. Isotype of the monoclonal antibodies was determined using the mouse immunoglobulin isotyping kit (Invitrogen, CA, USA). MAb C is an IgG1 and mAb E an IgG2b. Monoclonal antibodies were purified by affinity chromatography on protein G- or protein A-agarose columns.

Murine monoclonal anti-human CD13 (clone 452, IgG1) was purified from culture supernatants of the hybridoma, kindly donated by Dr. Meenhard Herlyn (The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA). Fab fragments of antibodies were prepared with immobilized Ficin (IgG1) or papain (IgG2b) (Pierce, Rockford, IL). APC-labeled mAb anti-human CD13 (Clone WM-15) was obtained from Biologend (USA).

F(ab)₂ fragments of goat anti-mouse IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Goat anti-mouse-FITC, used as secondary antibody for immunostaining, was from Zymed (ThermoFisher, Rockford, IL, USA). Purified anti-CD13 mAbs C, E, or 452 were directly labeled with FITC (Sigma, St Louis, MO, USA) in our laboratory.

2.2. Inhibition of Homotypic Aggregation and Detachment Assays. Monocytic U-937 cells (1×10^5 in $50 \mu\text{L}$ RPMI 1640) were placed in flat-bottom wells of 96-well culture plates (Corning, NY, USA) and were incubated with the indicated concentrations of mAbs for 60 min at 37°C in a humidified atmosphere with 6% CO_2 . Activating anti-CD13 mAb 452 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) was added to each well, and cells were incubated at 37°C for two additional hours. Cell aggregation was evaluated by light microscopy. Images of each well were captured with a digital camera attached to a Zeiss Axiovert 25 inverted microscope, and cells in aggregates were quantified using the colony-counting function of Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA). Data are presented as aggregation indexes (AI) = [number of cells detected by software as blue colonies in each image (aggregated cells)/total number of cells detected \times 100], as previously described [17]. The effect of inhibitor antibodies is expressed as percentage of control AI. We adjusted the software to detect as blue colonies all cells in aggregates formed by more than three to four cells with optical densities (OD) high enough to avoid erroneous detection of two close cells as aggregates. AI obtained by quantification with the software is lower than, but comparable with, percentage of aggregation obtained by visual counting.

To evaluate the ability of mAbs C and E to produce detachment of homotypic aggregates, U-937 cells were incubated with HA-inducing mAb 452 for 2 hours, to induce aggregation. The mAbs C ($0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$), E ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$), or control IgG ($0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$) were added, and AIs at different times were determined as described above.

2.3. Immunoprecipitation and Immunoblotting. To identify the protein(s) recognized by HA-inhibiting mAbs, U-937 cells were lysed in 1% Nonidet P-40 (NP-40) lysis buffer with protease and phosphatase inhibitors. Lysates were incubated 15 min on ice and were cleared by centrifugation at 14,000 rpm for 15 min at 4°C . Supernatants were incubated for 3 hours with protein A/G agarose beads coated with mAbs C, E, and 452 or IgG control. After washing, immunoprecipitates or total cell lysates were boiled in reducing Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE (7.5% acrylamide) and electroblotted onto nitrocellulose membranes, followed by probing with the relevant primary antibody C, E, or 452 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) and the HRP-conjugated secondary antibody (goat anti-mouse IgG-HRP, Zymed-ThermoFisher, Rockford, IL, USA) diluted 1:5000 and detected using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford IL, USA). Human monocytes isolated from healthy donors and HMEC-1 endothelial cells were similarly lysed, immunoprecipitated with mAb C, resolved in SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose membranes, and probed

with mAb 452 and HRP-conjugated secondary antibody, as described above.

2.4. Mass Spectrometry and Identification by MALDI TOF/TOF. After separation by SDS-PAGE electrophoresis, sections of gel containing the bands of interest were excised, washed, and in-gel digested for 6 hrs at 37°C using modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI). The resulting peptides were extracted in two steps, partially dried, and dissolved in 0.1% TFA (Aldrich, Milwaukee, WI). Salts were removed using C18-ZipTip® (Millipore, Bedford, MA) solid phase extractions into $10 \mu\text{L}$ of 1:1 TFA:acetonitrile, and peptides were analyzed by MALDI TOF/TOF spectrometry in the laboratory of Dr. Jose Luis Gallegos at INMEGEN, México. Database searching and protein identification were performed with the MALDI TOF/TOF spectra datasets using the MASCOT search algorithm against the taxonomy of *Homo sapiens* (human) in the nonredundant NCBI (NCBIInr) database (version 1.6b9; MatrixScience, London, UK, available at <http://www.matrixscience.com/>).

2.5. Binding and Internalization Assays. Binding of anti-CD13 mAbs to different cells was evaluated by flow cytometry. Cells were incubated with the indicated concentration of anti-CD13 antibody for 30 min at 4°C . The cells were washed twice and secondary antibody (goat anti-mouse Ig-FITC) was added for 30 min at 4°C . After washing, cells were fixed with 1% PFA in PBS for 20 min and analyzed in an Applied Biosystems® Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Carlsbad, CA USA). Internalization of CD13 induced by anti-CD13 mAbs was evaluated by incubating the cells with the indicated concentrations of anti-CD13 mAb for 2 h at 37°C or 4°C . Cells were washed and fixed with 1% PFA in PBS for 20 min. After washing, binding of a noncompeting anti-CD13 mAb labeled with FITC was evaluated by flow cytometry.

2.6. Determination of Aminopeptidase N Enzymatic Activity. APN enzymatic activity was determined by colorimetric measurement of the hydrolysis of the substrate L-alanine 4-nitroanilide hydrochloride (Sigma, USA), as described previously [17]. Briefly, 1×10^5 cells (in $50 \mu\text{L}$ PBS with 10% FBS) were placed in flat-bottom wells of 96-well culture plates and were preincubated with the indicated mAb or bestatin for 1 h at 37°C . Bestatin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA), a well-known CD13 inhibitor, was added at the maximal inhibitory doses of $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ for U-937 cells and $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ for HEK-ANPEP. After incubation of the cells with the mAbs or with bestatin, substrate was added to a final concentration of 6 mM and the plates were incubated for 1 h at 37°C . Cells were pelleted, and the absorbance of the supernatants at 405 nm was determined immediately. Determinations were performed in triplicate wells. Data are presented as percentage of the activity of control cells, which were not incubated with mAbs or bestatin before addition of the substrate.

2.7. Competitive Binding Assays. U-937 cells (2×10^5) were incubated in FACS buffer (PBS with 5% FBS, 0.1% sodium

azide) with saturating concentrations of the indicated competing unlabeled anti-CD13 antibody, for 30 min at 4°C. Cells were washed and saturating amounts of the fluorescently labeled antibody were added and incubation continued for another 30 min at 4°C. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry (Applied Biosystems Attune Acoustic Focusing Cytometer, Carlsbad, CA USA).

2.8. Tyrosine Phosphorylation of CD13. U-937 cells were incubated in serum-free RPMI-1640 medium for 2 hours at 37°C. Cells were adjusted to 2×10^7 per sample and were treated with activating or inhibitory anti-CD13 monoclonal antibodies 452 or mAb C or E for the indicated time intervals at 37°C, in culture medium with 3.5% FBS. After stimulation, the reaction was stopped by adding an equal volume of ice-cold TBS, and cells were washed once. Monocytes were lysed with 1% lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH = 7.4 and 1% NP-40) with protease and phosphatase inhibitors for 15 min at 4°C. Lysates were cleared by centrifugation at 20,817g for 15 min. Lysates were precleared with Sepharose for 60 minutes at 4°C, followed by overnight incubation at 4°C with protein G agarose beads that were previously incubated with a subsaturating concentration of mAb C (20 µg/20 µl beads). After washing, beads were resuspended in Laemmli sample buffer and incubated for 5 min in a boiling water bath. Samples were resolved in 7.5% SDS-PAGE, electrotransferred onto nitrocellulose membranes, and blocked overnight at 4°C (3% BSA in TBS-tween 0.1%, pH = 7.4).

Phosphorylation was detected in blots probed with a mixture of anti-phosphotyrosine murine antibodies (PY-20 Santa Cruz, 4G10 Upstate Biotechnology, and AFT-8 kindly donated by Dr. Carlos Rosales, IIBiomédicas, UNAM). To detect CD13, blots were probed with mAb 452 (2 µg/ml). After incubation with the relevant primary antibody and HRP-conjugated secondary goat anti-mouse Ig antibody (1:10,000), proteins were visualized using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Blots were digitalized using Gel Doc 2000 by Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA).

2.9. Determination of Intracellular $[Ca^{2+}]$ by Flow Cytometry. Monocytic U-937 cells were washed once with RPMI-1640 with 2% FCS. The cells were then resuspended in RPMI-1640 (5×10^6 cells/ml) and incubated with 2.5 µM Fluo-3-AM and 4.6 µM Fura Red (Invitrogen, Molecular Probes), with gentle constant stirring for 45 min at 37°C in darkness. Cells were washed twice with RPMI without serum. Cells were then incubated for additional 45 minutes in RPMI without serum, at room temperature with gentle constant stirring in darkness. After washing, the cells were resuspended in RPMI without serum and maintained at 4°C until measurements. Flow cytometric analysis of intracellular $[Ca^{2+}]$ was carried out in a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) with a laser excitation wavelength of 488 nm. Fluorescence emissions were collected through band-pass filters (FL1 for Fluo-3, 530/30 nm; FL3 for Fura Red, 670 LP). At the indicated times after obtaining a stable baseline, anti-CD13 mAbs C, E, or 452, anti-FcγRI mAb

32.2, or a control IgG were added at final concentrations of 2 µg/ml. After data collection for 3 min, F(ab)₂ fragments of goat anti-mouse Ig were added at a final concentration of 12 µg/ml. These concentrations of primary and secondary antibodies produced the maximal amplitudes of calcium signals. Fluorescence intensity data are depicted as the ratio of the fluorescence intensities (FL1/FL3) versus time. Maximum fluorescence was obtained after addition of Ionomycin (100 nM) as control.

2.10. Cell Adhesion Assays. Adhesion of HEK-ANPEP-GFP to fibronectin-coated wells was evaluated as described previously [19]. In brief, HEK-ANPEP-GFP cells were treated or not with different doses of anti-CD13 mAbs 452, WM-15, C, or E, for 30 min at 37°C. Cells were washed and allowed to adhere to fibronectin-sensitized (Calbiochem, San Diego CA, USA) and BSA-blocked microwell plates for 15 min at 37°C. After gentle washing, fluorescence was determined at 485/530 nm in a Cytation 3 microplate spectrofluorometer (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

For heterotypic adhesion assays, human microvasculature endothelial cells HMEC-1 (kindly obtained from Dra. Dolores Correa, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico) were cultured in flat-bottom 48-well plates (25,000 cells/well) for 48 hrs at 37°C. CFSE-labeled U-937 monocytic cells were treated or not with anti-CD13 mAbs 452, C, or E (10 µg/ml) for 3 h at 37°C, washed, and added to the wells containing the monolayers of HMEC-1 cells. After incubation for 15 min at 37°C, plates were gently washed with warm RPMI without phenol red and 50 µl of the same medium was added to each well. Fluorescence (from the CFSE-labeled U-937 cells that remained adhered to HMEC-1 cells) was determined at 485/530 nm in a Modulus™ II Microplate Multimode Reader (Turner BioSystems, Inc, USA).

3. Results

We have previously reported that crosslinking of CD13 by certain CD13-specific mAbs induces homotypic aggregation (HA) of U-937 human monocytic cells [17]. The HA is an active phenomenon and not a simple aggregation induced by binding of bivalent mAb 452 molecules to CD13 on different cells, as it does not take place at 4°C, and is inhibited by pharmacological inhibitors of tyrosine- and mitogen-activated protein kinases and by the glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose. This phenomenon seems to depend on the epitope recognized by the specific mAb and reflects a change in the adhesive properties of the cell. To study the key players of this process, we generated monoclonal antibodies able to inhibit HA of U-937 cells.

We immunized BALB/c mice with U-937 cells previously treated with the HA-inducing anti-CD13 mAb 452. Spleen cells from these mice were fused with Ag-8 myeloma cells, and the resulting hybridomas were selected on the basis of the ability of the secreted mAbs to inhibit HA induced by mAb 452. For the screening, the supernatants of the hybridomas were incubated with U-937 cells in 96-well plates (10^5 cells/well), for 60 min before addition of the HA-inducing mAb 452. After 2 h of incubation at 37°C, the degree

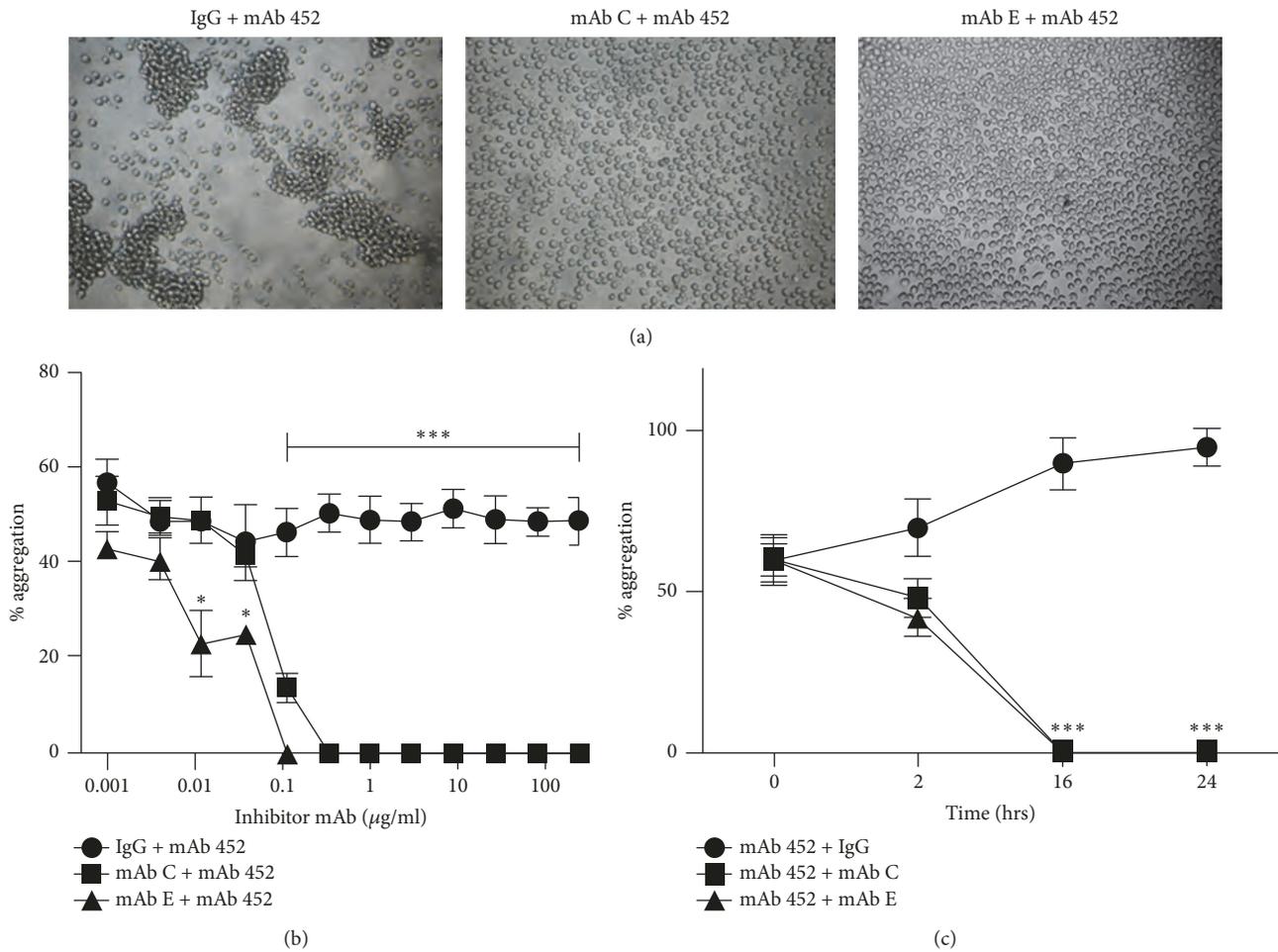


FIGURE 1: MAbs C and E inhibit homotypic aggregation of monocytic cells induced by anti-CD13 mAb 452. (a) U-937 cells in 96-well plates were incubated for 1 h at 37°C with a control IgG, or the monoclonal antibodies C or E, before addition of HA-inducing activating anti-CD13 mAb 452 (1 $\mu\text{g/ml}$). Representative images of HA were obtained two hours after addition of mAb 452. (b) U-937 cells in 96-well plates were incubated with indicated concentrations of a control IgG, mAb C, or mAb E, for 1 h at 37°C, before addition of HA-inducing mAb 452 (1 $\mu\text{g/ml}$). Percent of aggregated cells was determined 2 h after addition of mAb 452. Percent aggregation (aggregation index, AI) = [number of cells detected by the software as blue colonies in each image (aggregated cells)/total number of cells detected \times 100]. (c) Detachment of homotypic aggregates of U-937 cells. U-937 cells were incubated for 2 hrs at 37°C with anti-CD13 mAb 452 to induce aggregation. Then, inhibitory mAbs C or E or control IgG were added (time = 0), and incubation was continued for 24 h at 37°C. Percent aggregation was determined after 2, 16, and 24 h, as described above. The graphs represent the arithmetic mean \pm SD of five (b) or three (c) independent experiments. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$.

of aggregation in each individual well was assessed under the microscope. We selected two hybridomas, which produce the antibodies named mAb C (IgG1) and mAb E (IgG2b) that are able to inhibit HA induced by mAb 452 (Figure 1(a)), for characterization of the effects of the monoclonal antibodies produced.

3.1. mAb C and mAb E Inhibit HA of U-937 Cells in a Time- and Dose-Dependent Manner. To determine the dose-response for inhibition of HA, we incubated U-937 cells in 96-well plates (10^5 cells/well) with increasing concentrations of purified mAbs C and E or a control mouse IgG1, for 1 h at 37°C before adding an optimal concentration of HA-inducing mAb 452. Percentage of aggregation was determined after 2 h of incubation at 37°C. As shown in Figure 1(b), the inhibition of HA by mAbs C and E was dose-dependent. mAb E was

slightly more efficient, being able to completely inhibit HA at a concentration of 0.1 $\mu\text{g/ml}$, compared to 0.3 $\mu\text{g/ml}$ for mAb C (Figure 1(b)).

Then, we evaluated whether mAbs C and E would have an effect once the homotypic aggregation of U-937 cells induced by mAb 452 was initiated. Thus, we incubated U-937 cells with HA-inducing mAb 452 for two hours, to induce HA. Then, we added mAb C or mAb E (or a control IgG) at final concentrations at which we observed total inhibition of HA, and incubation was continued. We evaluated the degree of cell aggregation at 2, 16, and 24 h after addition of mAbs C and E or the control IgG. As shown in Figure 1(c), at the time that mAbs C or E were added, around 60% of cells were already in aggregates. This fraction of aggregated cells increased over time in the presence of a nonspecific IgG, reaching almost 100% of cells in aggregates at 24 hours. However, in the

presence of mAb C or mAb E, not only did the percentage of aggregated cells not increase further, but in fact it decreased. The decrease was already evident after 2 h, and at 16 h of incubation complete separation of the cells was observed, and the cells remained nonaggregated at the 24 h time point (Figure 1(c)). These results suggest that these antibodies are able both to prevent and to revert HA induced by mAb 452.

3.2. Inhibitory mAbs C and E Recognize CD13 in Monocytes and Endothelial Cells. To identify the antigen recognized by the inhibitory mAbs C and E, we conducted immunoprecipitation experiments. Lysates of U-937 cells were immunoprecipitated with mAbs C, E, and 452, or a control IgG. Immunoprecipitates were resolved in SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes. Each blot was probed with the corresponding mAb and a secondary antibody. The most prominent of the specific bands in the immunoprecipitates of mAbs C, E, and 452 was a band of 160 kDa. These 160 kDa bands immunoprecipitated by each of the three mAbs (C, E, and 452) were recognized by mAb 452 and also by mAbs C and E (Figure 2(a) shows recognition by mAb C of 160 kDa bands immunoprecipitated by the each of three mAbs). This suggested that mAbs C and E recognize the same protein as mAb 452, that is, APN/CD13. To corroborate the identity of the 160 kDa band precipitated by the three mAbs, we extracted the 160 kDa protein immunoprecipitated by mAbs C, E, or 452, directly from slices of the polyacrylamide gel. The extracted proteins were digested with trypsin and analyzed by MALDI TOF/TOF spectrometry. The results were analyzed with the MASCOT software. This analysis identified APN/CD13 as the immunoprecipitated protein, with scores of 175 for the band precipitated by mAb 452, 274 for the band precipitated by mAb C, and 504 for the one precipitated by mAb E. The minimal score for a positive identification using this strategy is a score of 35.

We evaluated whether mAbs C and E would recognize CD13 on monocytes isolated from healthy donors and on human endothelial cells of the cell line HMEC-1. mAb C (Figure 2(b)) and mAb E (not shown) immunoprecipitated similar bands of about 160 kDa from U-937, human monocytes, and HMEC-1 cells, and these bands are recognized by mAb 452. Together, these data support the conclusion that mAbs C and E recognize APN/CD13.

Further data that support that mAbs C and E recognize APN/CD13 was obtained from experiments comparing binding of mAbs C and E with the binding of mAb 452 to the human monocytic cell lines U-937, THP-1, and a subline of THP-1 cell line with reduced expression of CD13 (cells L2, [18]). As shown in Figure 2(c), mAbs C and E showed binding patterns that are similar to mAb 452: they bind efficiently to U-937 and the parental THP-1 cells, and the three antibodies showed decreased binding to the THP-1 cells modified to express low CD13.

We also evaluated the ability of mAbs C and E to inhibit the enzymatic activity of APN on different cell lines and compared it to the effect of the APN/CD13-specific mAbs 452 and WM-15. As a control, we included bestatin, an inhibitor of APN enzymatic activity. As previously reported, mAb WM-15 significantly inhibited APN enzymatic activity, while mAb

452 had a very small (<10%) effect on the enzymatic activity [17, 22]. mAbs C and E significantly inhibited APN activity in U-937 cells, HEK-293 cells transfected with ANPEP-GFP (HEK-ANPEP), and J774 mouse macrophages transfected with human ANPEP-RFP (J774-hCD13) (Figure 2(d)). In the three cell lines, inhibition of APN enzymatic activity by mAbs C and E was more efficient than inhibition by mAb WM-15, and comparable to the inhibition by bestatin.

3.3. MAb C and mAb E Bind to an Epitope on CD13 Different from That Recognized by Activating mAb 452, and Inhibition of HA Is Not due to Changes in CD13 Membrane Expression. The finding that, in contrast to mAb 452 which has a very small effect on APN enzymatic activity, both mAbs C and E inhibited the enzymatic activity considerably might suggest that mAbs C and E bind to a different epitope than 452. In order to determine if the different mAbs bind to different epitopes, we performed competition experiments. First, we verified that purified unlabeled mAbs C and E bind to U-937 cells at similar levels as mAbs 452 and WM15 (Figure 3(a)). Then, we tested the ability of unlabeled mAbs WM-15, C, E, and 452 or a control IgG to inhibit the binding of FITC-labeled mAbs 452, C, and E (Figures 3(b), 3(c), and 3(d)). As expected, binding of mAb 452-FITC was inhibited by mAb 452. However, none of the mAbs WM-15, C, or E, or a control IgG, modified the binding of mAb 452 to the cells (Figure 3(b)). Correspondingly, mAb 452 did not affect binding of FITC-labeled mAb C (Figure 3(c)) or FITC-labeled mAb E (Figure 3(d)) to the cells. These results demonstrate that mAb C and mAb E bind to epitopes on CD13 that are different from the epitope recognized by mAb 452. Interestingly, mAb C and mAb E inhibit each other's binding as efficiently as the corresponding unlabeled mAb, suggesting that these two antibodies bind to the same or to very closely located epitopes on CD13.

To determine if binding of the mAbs C or E would produce changes in surface expression of CD13, which could be related to their inhibition of HA induced by mAb 452, we incubated U-937 cells with the inhibitory mAbs at 4 or at 37°C, immediately fixed the cells and evaluated binding of anti-CD13 mAb 452-FITC. As shown in Figures 4(a) and 4(b) (and supplementary Figure 1), binding of mAbs C or E to CD13 did not induce changes in CD13 expression on the cell membrane. We conducted the opposite experiments, incubating the cells with mAb 452 at 4 or at 37°C, fixing immediately, and evaluating binding of anti-CD13 mAb C-FITC. When cells were incubated with mAb 452 at 37°C, we found a decrease of 25% in the binding of mAb C-FITC (Figure 4(d) and supplementary Figure 1) or E-FITC (not shown). This decrease, however, is not statistically significant. Since the decrease is not evident when incubation with mAb 452 is carried out at 4°C (Figure 4(c)), it is possible that it reflects a certain amount of CD13 internalization induced by CD13 crosslinking by mAb 452. However, further experiments are required to clarify this issue.

3.4. Crosslinking of CD13 by mAbs C and E Is Required to Inhibit HA of Monocytes. It has been previously reported that the HA induced by mAb 452 requires the crosslinking of

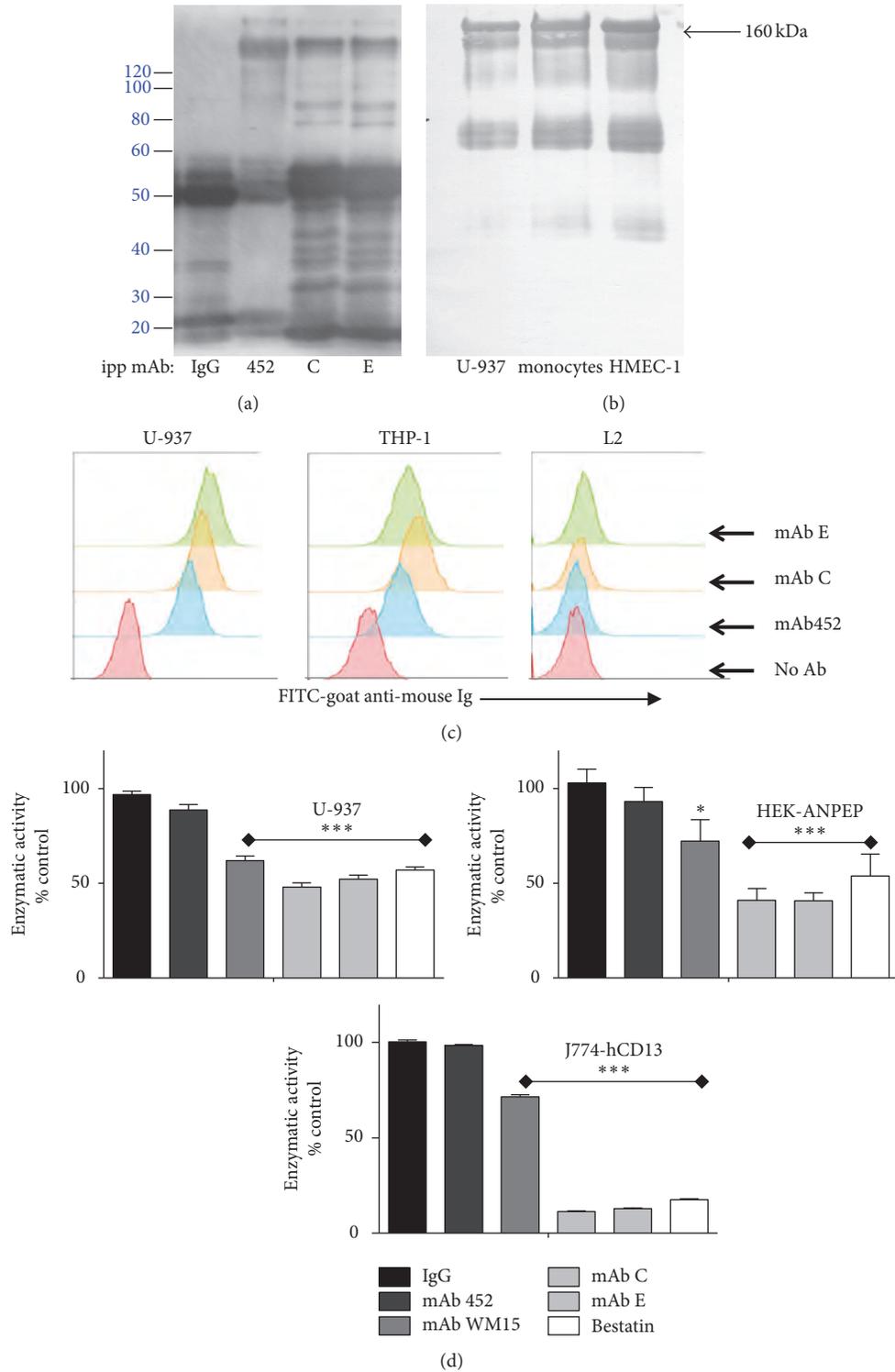


FIGURE 2: *Inhibitory mAbs C and E recognize CD13 in monocytes and endothelial cells.* (a) Lysates of U-937 cells were immunoprecipitated with mAbs 452, C, E or a control IgG, bound to protein A/G agarose beads. Immunoprecipitates were eluted from beads and resolved in 10% SDS-PAGE, electrotransferred to a nitrocellulose membrane, and probed with mAb C (2 μ g/ml) and HRP-conjugated secondary antibody. (b) U-937 cells, human peripheral blood monocytes, or endothelial HMEC-1 cells were lysed, immunoprecipitated with mAb C, electrotransferred to nitrocellulose membranes, and probed with mAb 452 and HRP-conjugated secondary antibody, as described in Materials and Methods. (c) Deficient binding of anti-CD13 antibodies to THP-1 cells transfected with siRNA for CD13 (L2 cells). U937 (left panel), THP-1 (center panel), or L2 cells (right panel) were incubated with the indicated mAb, washed, and incubated with a secondary FITC-labeled goat anti-mouse Ig antibody. (d) Inhibition of Aminopeptidase N enzymatic activity by anti-CD13 mAbs 452, WM-15, C, and E and a control IgG, and by the chemical inhibitor bestatin, in cell lines expressing human APN: U-937 cells, HEK cells transfected with human APN/CD13, and J774 murine cells expressing human APN/CD13. The graphs represent the arithmetic mean \pm SD of three independent experiments in each cell line. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

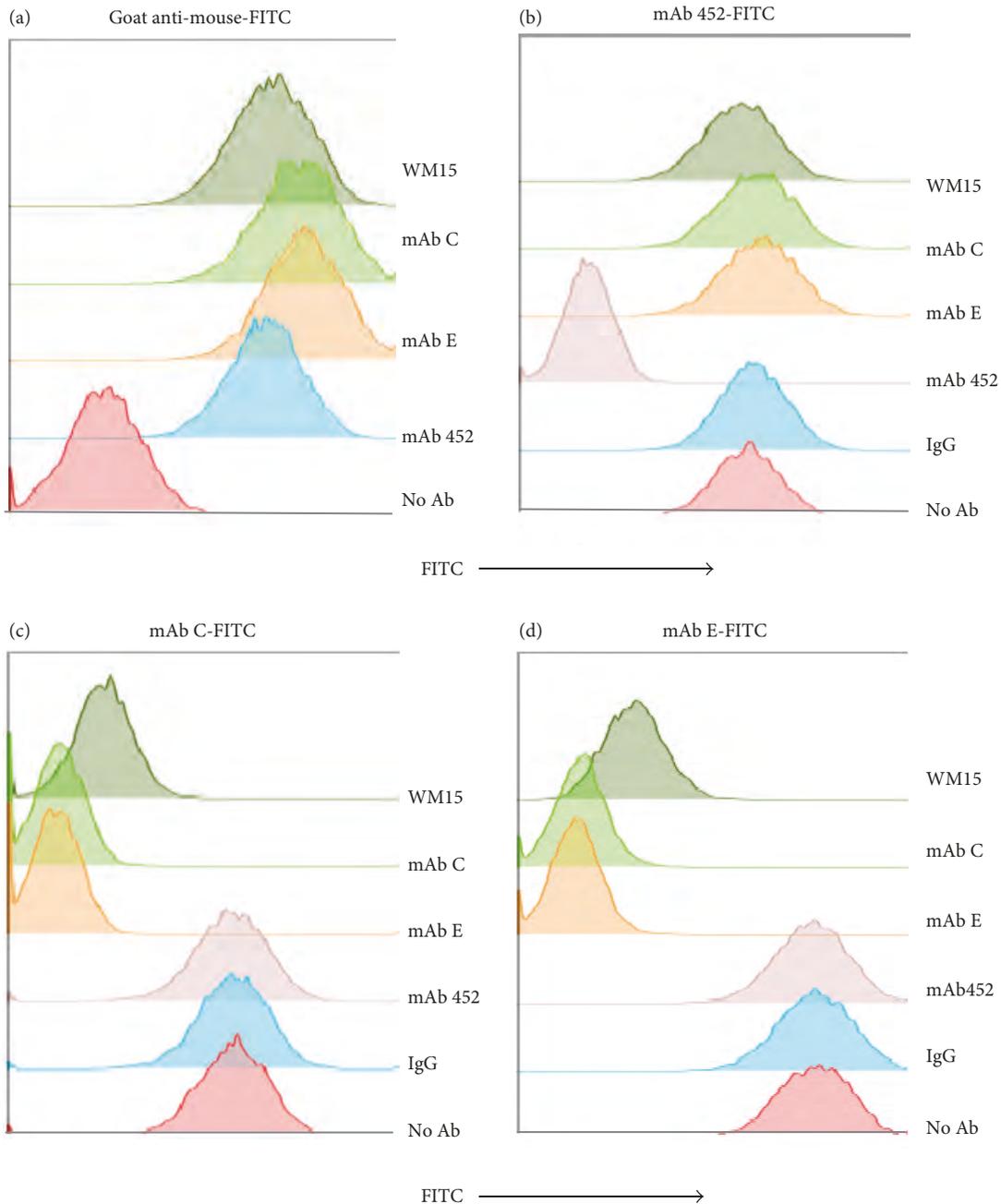


FIGURE 3: *Inhibitory mAbs C and E recognize an epitope on CD13 that is different from the epitope recognized by mAb 452.* U-937 were incubated with saturating concentrations of unlabeled mAbs WM-15, C, E, and 452, a control IgG, or no antibody, at 4°C. After washing, cells were incubated with (a) goat anti-mouse Ig-FITC, (b) mAb 452-FITC, (c) mAb C-FITC, and (d) mAb E-FITC. Binding of the FITC-labeled antibody was determined by flow cytometry. Representative histograms of 6 different experiments.

CD13 [17]. Therefore, we sought to determine if binding of mAb C or mAb E to their specific epitope on CD13 is sufficient for inhibition of HA, or if crosslinking of CD13 by these mAbs is required. We performed experiments to evaluate the inhibition of HA by Fab fragments of the inhibitory mAbs, alone or after crosslinking with F(ab)₂ fragments of goat anti-mouse Ig (Figure 5). The results indicated that incubation of U-937 monocytes with Fab fragments of mAbs C and E clustered with F(ab)₂ fragments of goat anti-mouse

Ig is able to inhibit HA as efficiently as the intact mAbs (Figure 1), but monovalent Fab fragments do not inhibit HA at any of the concentrations tested (Figure 5).

3.5. Crosslinking of CD13 by mAbs C, E, and 452 Induces a Rise in Intracellular Ca²⁺ and Tyrosine Phosphorylation of CD13. CD13 crosslinking by specific monoclonal antibodies is able to induce signal transduction events, including a rise in intracellular Ca²⁺ ions and tyrosine phosphorylation of

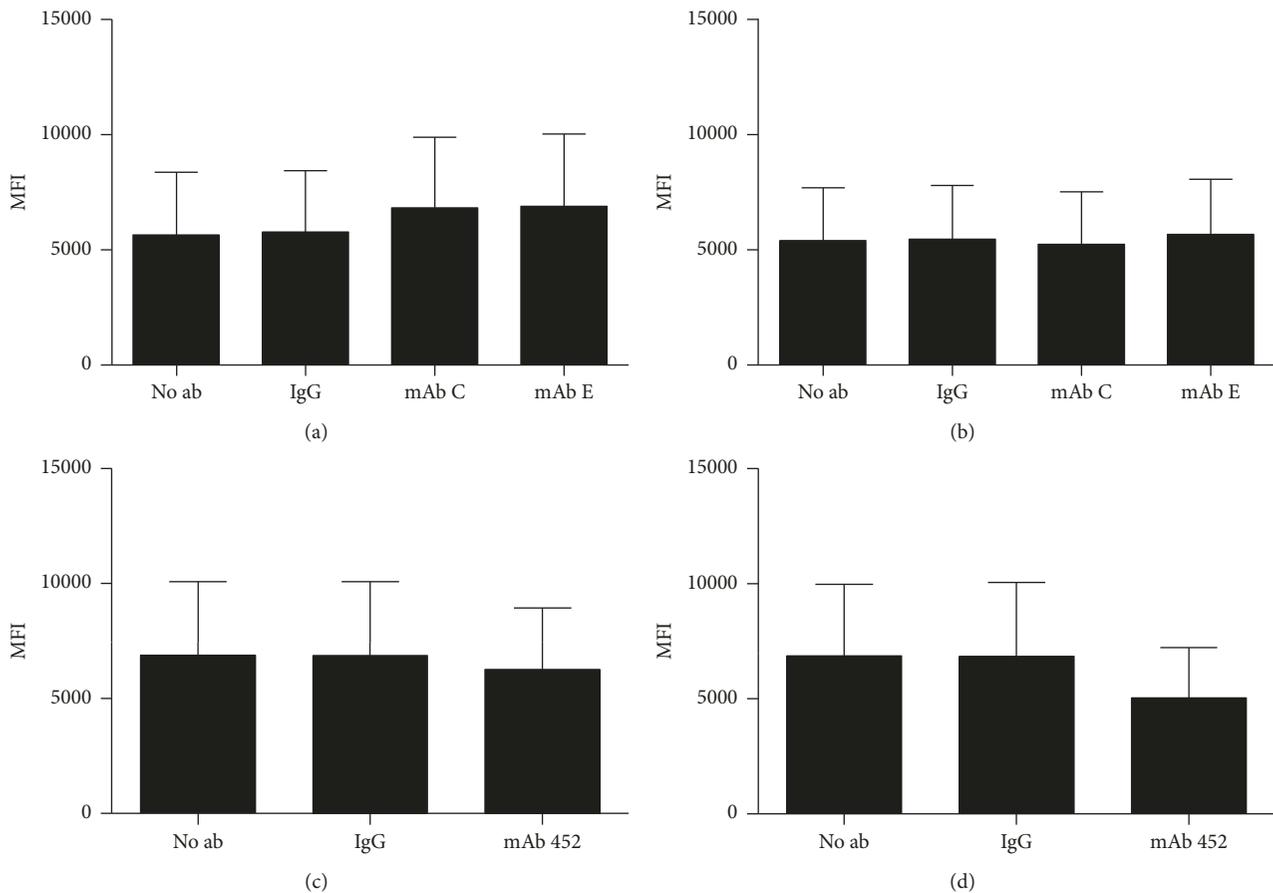


FIGURE 4: Binding of mAbs C and E to CD13 do not induce changes in membrane expression of CD13. (a, b) Human U-937 monocytic cells were incubated for 3 h at 4°C (a) or at 37°C (b), with mAbs C and E or a control IgG, at concentrations at which C and E cause total inhibition of HA. Later, cells were transferred to 4°C and fixed. After fixation, CD13 expression was assessed by the binding of mAb 452-FITC, evaluated by flow cytometry. Data is presented as the average Mean Fluorescence Intensity + SD ($n = 3$). (c, d) U-937 cells were incubated for 3 h at 4°C (c) or at 37°C (d), with mAb 452 (at the optimal concentration for inducing HA), or a control IgG. Later, cells were transferred to 4°C and fixed. After fixation, CD13 expression was assessed by the binding of mAb C-FITC, which was evaluated by flow cytometry. Data is presented as the average Mean Fluorescence Intensity \pm SD ($n = 3$). No significant differences were found by ANOVA.

several proteins [21, 23]. In order to compare the ability to induce signal transduction of HA-inhibitory mAbs C and E with that of HA-inducing mAb 452, we evaluated changes in intracellular Ca^{2+} ions induced by each of the mAbs. We loaded U-937 cells with the Ca^{2+} -sensitive dyes Fluo-3 and Fura Red and monitored changes in intracellular Ca^{2+} after stimulation with intact anti-CD13 mAb 452, mAb C, or mAb E (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) followed by crosslinking of the bound mAbs by addition of $\text{F}(\text{ab})'_2$ fragments of goat anti-mouse Ig (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$), to induce further crosslinking of CD13 (Figure 6). Bivalent mAb 452 induces a very rapid increase in intracellular Ca^{2+} (reaching a maximum in less than 15 sec followed by a gradual decrease) even without further crosslinking by a secondary goat anti-mouse Ig. Addition of a secondary antibody does not affect the gradual decline of intracellular Ca^{2+} . Both mAb C and mAb E are also able to induce a fast rise in the intracellular concentration of Ca^{2+} , which after an initial peak declines to a plateau higher than the basal levels. Addition of goat anti-mouse Ig secondary

antibodies induced a further increase in the concentration of Ca^{2+} ions. As positive control we determined the effect of the anti-Fc γ RI mAb 32.2, which by itself was not able to induce a significant increase in intracellular Ca^{2+} , but efficiently induced an increase after crosslinking with secondary $\text{F}(\text{ab})'_2$ fragments of goat anti-mouse Ig, as has been previously reported [24]. Treatment of U-937 with secondary antibody only, or with a control IgG and secondary antibody, did not result in a calcium signal.

Since CD13 crosslinking by mAb 452 has also been shown to induce tyrosine phosphorylation of CD13 [21], we also compared the ability of the anti-CD13 mAbs to promote phosphorylation of CD13. U-937 cells were incubated with intact mAbs 452, C, or E, for 5 and 30 minutes at 37°C, cells were washed with ice-cold buffer and lysed, and CD13 was immunoprecipitated with agarose-protein G beads that have been incubated with subsaturating amounts of mAb C. These beads precipitate unligated CD13 (by the mAb C bound to the beads), CD13 bound by mAb 452 (because

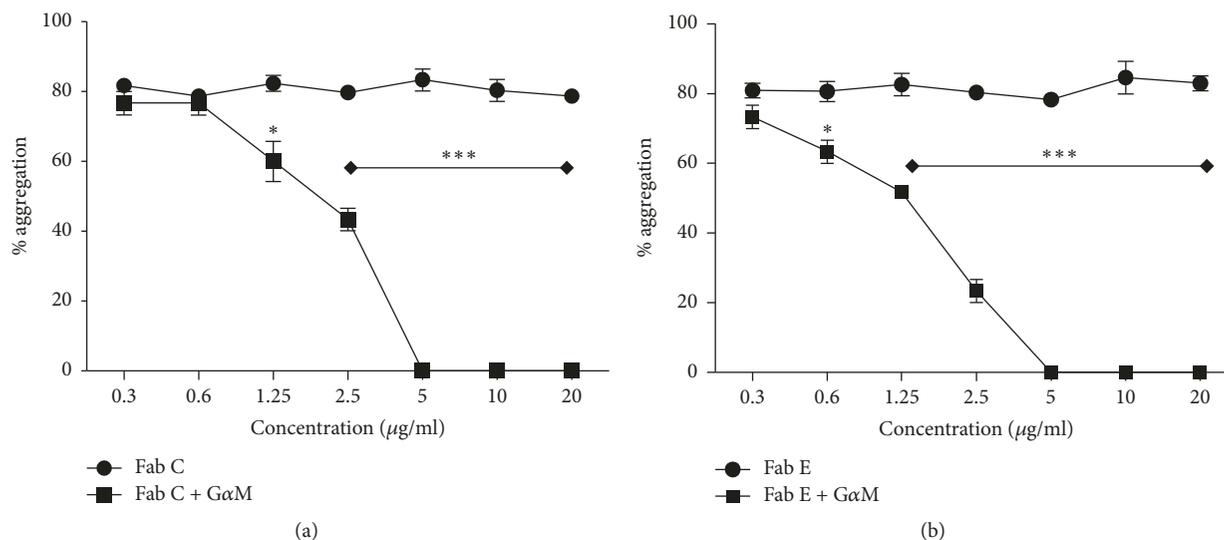


FIGURE 5: *Inhibition of homotypic aggregation by mAbs C and E requires crosslinking of CD13.* U-937 cells in 96-well plates were incubated with the indicated doses of Fab fragments of inhibitory mAbs C (a) or E (b). Cells were washed, resuspended, and divided into two, a half was incubated with F(ab')₂ fragments of goat anti-mouse Ig (GαM) and the other half in medium alone. After incubation for 1 h at 37°C, HA-inducing anti-CD13 mAb 452 was added and cells were incubated for 2 additional hours. Percentage of aggregation was determined under light microscopy as described in Materials and Methods. The graphs represent the arithmetic mean ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

mAb C on the beads will bind to CD13-mAb 452 complexes), and CD13 bound to mAb C (by binding of CD13-mAb C complexes to free protein G sites on the agarose beads). The immunoprecipitates were resolved in SDS-PAGE gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. The blots were probed with anti-phosphotyrosine antibodies and with anti-CD13 mAb 452. The results showed that both mAb C (Figure 7(b)) and mAb E (not shown) are able to induce tyrosine phosphorylation of CD13 as efficiently as mAb 452. Importantly, when cells were first incubated for 30 min with mAb C followed by stimulation with mAb 452, phosphorylation of CD13 was slightly higher than that induced by mAb 452 alone (Figure 7(b), last lane).

These results show that crosslinking of CD13 by any the anti-CD13 mAbs 452, C, and E is able to stimulate signal transduction events of similar magnitude, suggesting that their different effects on HA of U-937 cells are not related to differences in their ability to stimulate CD13-mediated signal transduction.

3.6. MAb C and E Inhibit CD13-Induced Adhesion of Monocytes to Endothelial Cells In Vitro. Besides inducing homotypic aggregation of monocytic cells, CD13 crosslinking by mAb 452 has been shown to induce adhesion of monocytes to endothelial cells [19], which is the first step during transendothelial migration of monocytes from blood to inflamed tissues. Thus, we investigated the effect of mAbs C and E on the heterotypic adhesion of U-937 cells to HMEC-1 human endothelial cells. We stimulated human U-937 monocytes with the different anti-CD13 monoclonal antibodies or control IgG and allowed them to adhere to a monolayer of HMEC-1 endothelial cells. Stimulation of

U-937 cells with mAb 452 induced a fivefold increase in the attachment of monocytes to endothelial cells, whereas treatment with mAbs C and E did not induce monocyte adhesion (Figure 8(a)). However, when we first incubated the monocytes with the inhibitory mAbs C and E, and then added the mAb 452, we observed a dose-dependent inhibition of the adhesion induced by mAb 452 (Figure 8(b)). Thus, mAbs C and E are able to inhibit the mAb 452-induced heterotypic adhesion of monocytes to endothelial cells.

3.7. Anti-CD13 mAbs 452, C, and E Inhibit the Adhesion of Cells Expressing CD13 to Fibronectin. It has been shown that APN/CD13 is the target of tumor homing peptides harboring the NGR sequence motif [14], and that CD13 can bind to fibronectin, which contains four NGR motifs [25]. We were interested in evaluating if the different anti-CD13 mAbs have an effect on CD13-mediated binding of monocytes to fibronectin. However, neither U-937 nor THP-1 monocytic cell lines showed significant binding to fibronectin-coated plastic wells (not shown). Also, CD13 crosslinking by mAb 452 on these cells did not induce binding to fibronectin-coated wells (not shown). This suggests that homotypic and heterotypic cell-cell adhesion induced by mAb 452 is mediated by a mechanism different from that involved in CD13 binding to fibronectin.

In order to examine the effect of anti-CD13 mAbs on the binding of cells expressing CD13 to fibronectin, we used HEK cells expressing high levels of human CD13 fused to GFP (HEK-ANPEP) on the membrane [18]. Thus, we incubated HEK or HEK-ANPEP cells with the anti-CD13 mAbs 452, WM-15, C, or E, or with a control IgG and, after washing the excess of antibody, transferred the cells to fibronectin-coated

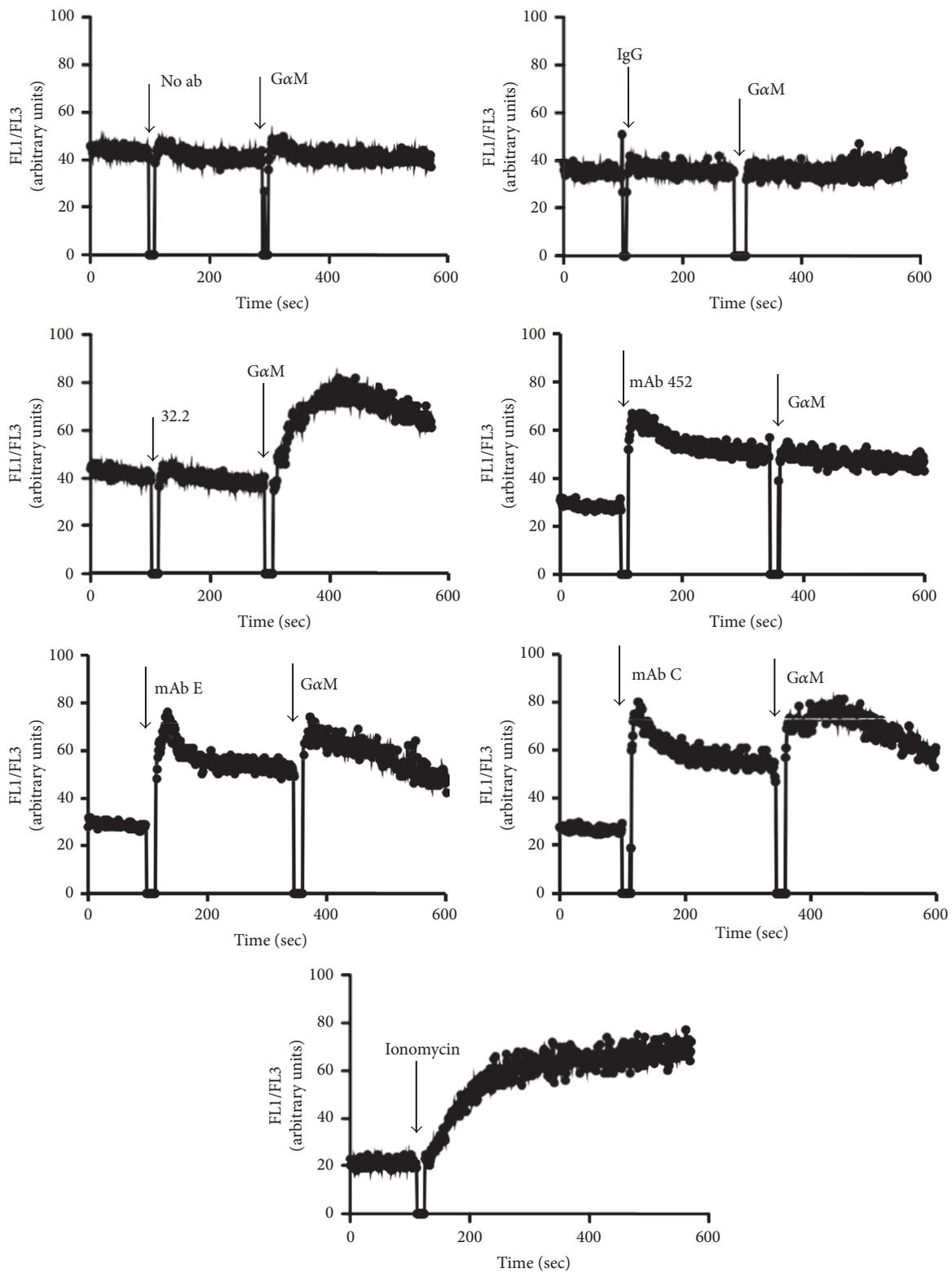


FIGURE 6: Changes in intracellular Ca^{2+} ions induced by CD13-specific mAbs. U-937 cells were loaded with Fluo-3 AM and Fura Red. After washing, fluorescence of both indicators was continuously monitored by flow cytometry at 37°C. At the indicated times, cells were stimulated with the indicated antibodies (32.2, 452, C, or E) or a control IgG, and with $F(ab')_2$ fragments of goat anti-mouse Ig ($G\alpha M$). As control, cells were stimulated with secondary antibody alone. Traces shown are representative of 3 independent experiments.

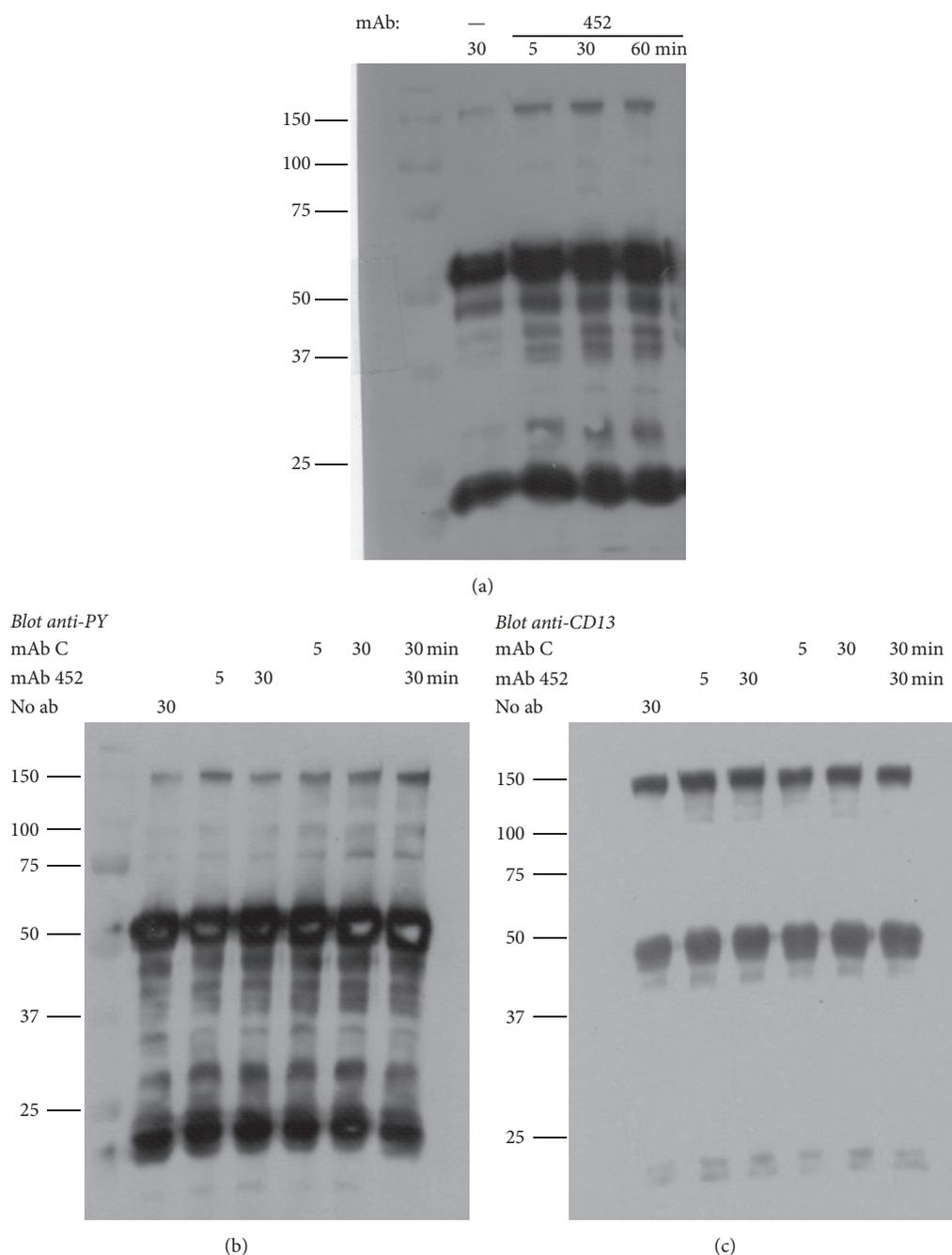


FIGURE 7: *Effect of anti-CD13 mAbs on CD13 phosphorylation.* (a) Time course of CD13 phosphorylation in U-937 cells stimulated with mAb 452 (1 microgram/ml). After stimulation for 5, 30, and 60 min, cells were lysed and immunoprecipitated with mAb C-protein G agarose. Tyrosine phosphorylation was determined as described in Materials and Methods. (b, c) CD13 phosphorylation induced by anti-CD13 mAbs 452 and C. U-937 cells were stimulated with mAb 452 or mAb C for 5 or 30 min, or with mAb C for 30 min followed by mAb 452 for 30 additional min (last lane). Phosphotyrosine (b) and CD13 (c) were detected as described in Materials and Methods.

plastic wells. While parental HEK cells showed insignificant binding to fibronectin, CD13 expression by HEK-ANPEP cells resulted in a significant increase in the number of cells that adhere to fibronectin-coated wells in our assay conditions (>20,000 cells/well). The different CD13-specific mAbs had different effects on the binding of HEK-ANPEP cells to fibronectin-coated wells (Figure 9). CD13 crosslinking

by mAb 452 did not induce an increase in cell binding, but it inhibited cell attachment by about 50% at the highest concentration tested (10 $\mu\text{g/ml}$). In contrast, mAbs C and E markedly inhibited cell binding at all concentrations tested (0.1, 1.0, and 10.0 $\mu\text{g/ml}$). MAb WM-15 showed significant inhibition at all concentrations tested, although the degree of inhibition was lower than that induced by mAbs C and E.

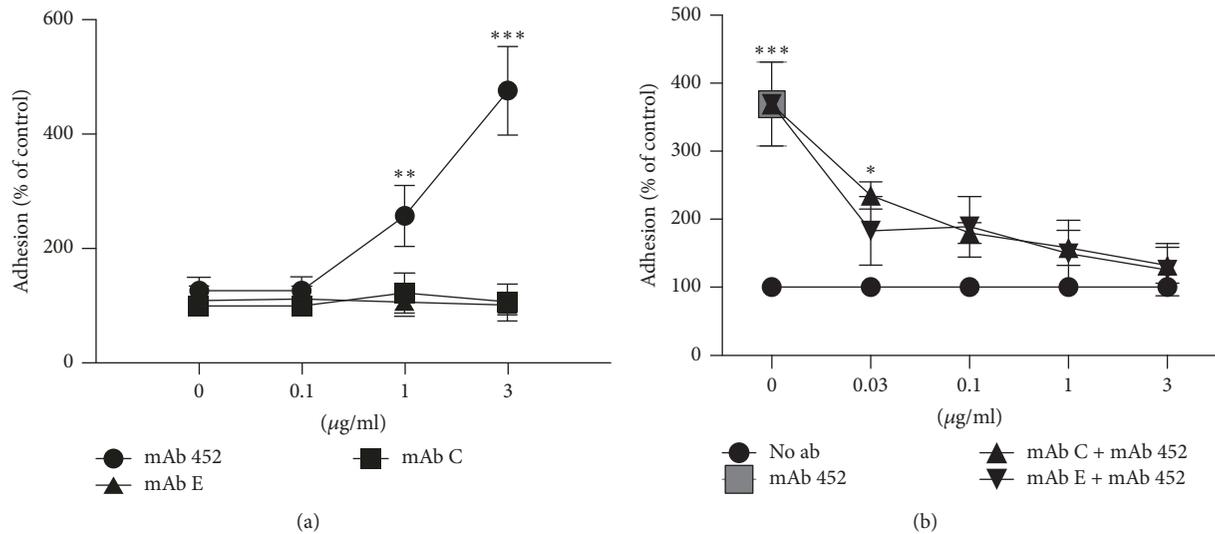


FIGURE 8: Effect of anti-CD13 monoclonal antibodies on heterotypic aggregation of human monocytes to HMEC-1 endothelial cells. (a) CFSE-labeled U-937 cells were incubated with anti-CD13 monoclonal antibodies 452, C, or E for 3 hrs at 37°C. After washing, stimulated monocytes were transferred to monolayers of HMEC-1 cells in 48-well plates and incubated for 15 min at 37°C. Cells were gently washed with warm media and adhered monocytes were quantified with the plate fluorimeter Modulus II. (b) CFSE-labeled monocytes were incubated with different concentrations of anti-CD13 C or E, or with no antibody, for 1 hr at 37°C, and, after washing, mAb 452 (at 3 µg/ml) was added and incubation continued for 3 hours. After washing, stimulated monocytes were transferred to monolayers of HMEC-1 cells in 48-well plates and incubated for 15 min at 37°C. Plates were gently washed with warm media and adhered monocytes were quantified with the plate fluorimeter Modulus II. Data is presented as percentage of antibodies-treated cells attached to HMEC-1 monolayers, compared to the attachment of cells not treated with mAbs. Mean ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.0001$.

These results show that although CD13 binding to fibronectin is not induced by mAb 452, mAbs C and E are able to significantly inhibit this interaction.

4. Discussion

Aminopeptidase N/CD13 is considered a moonlighting enzyme [3] because in addition to the enzymatic removal of N-terminal amino acids from unsubstituted bioactive peptides, it has an active participation in several functions that are seemingly independent of its enzymatic activity, since they are not affected by chemical inhibitors of the aminopeptidase activity. These later functions include endocytic processes such as cholesterol uptake and entry of certain group 1 coronavirus into cells, as well as participation in cell adhesion and transendothelial migration of monocytes [14, 19, 20]. The ability of CD13 to mediate phagocytosis is also independent of its peptidase activity [18]. The mechanisms by which CD13 participates in processes that are independent of its enzymatic activity are not clearly defined. However, it is known that crosslinking of CD13 by specific monoclonal antibodies initiates signal transduction events, such as a rise in the intracytoplasmic concentration of Ca^{2+} ions, activation of intracellular protein kinases, and phosphorylation of Tyr⁶ in the cytoplasmic portion of CD13 [21, 26]. Thus, it is likely that at least some of these functions depend on CD13 mediating transmembrane signals, as has been shown for CD13-mediated cell adhesion and phagocytosis, which are inhibited by pharmacological inhibitors of tyrosine kinases [17, 18, 21].

We have previously reported that crosslinking of CD13 on the membrane of human monocytic cells by certain monoclonal antibodies (such as mAb 452) induces a signal transduction-dependent change in the adhesion properties of these cells, resulting in homotypic aggregation (HA) of monocytes [17]. Crosslinking of CD13 with the same mAb 452 also induces adhesion of monocytes to HUVEC endothelial cells *in vitro* [19]. Thus, the phenomenon of HA induced by CD13 crosslinking represents a model system in which the molecular mechanisms involved in regulation of cell-cell adhesion by CD13 could be studied. In order to identify membrane molecules involved in cell adhesion processes mediated by CD13, we sought to generate monoclonal antibodies with the ability to modulate the CD13-induced HA of monocytic cells.

We generated two hybridomas that produce the monoclonal antibodies C and E, which bind to monocytic cells and are able to inhibit HA induced by mAb 452. The inhibition was dose-dependent, and mAbs C and E are able to induce the separation of homotypic cell aggregates induced by mAb 452. MAbs C and E recognize a 160 kDa protein that was identified as Aminopeptidase N/CD13 by mass spectrometry. The conclusion that both mAbs bind to CD13 is supported by the observations that both C and E immunoprecipitate the same protein as mAb 452, and their pattern of binding to cells is similar to that of mAb 452: they bind specifically to cells expressing CD13 (U-937, THP-1, HMEC-1, human monocytes from healthy donors) but showed a reduced binding to THP-1 L2 cells (THP-1 cells with reduced expression of

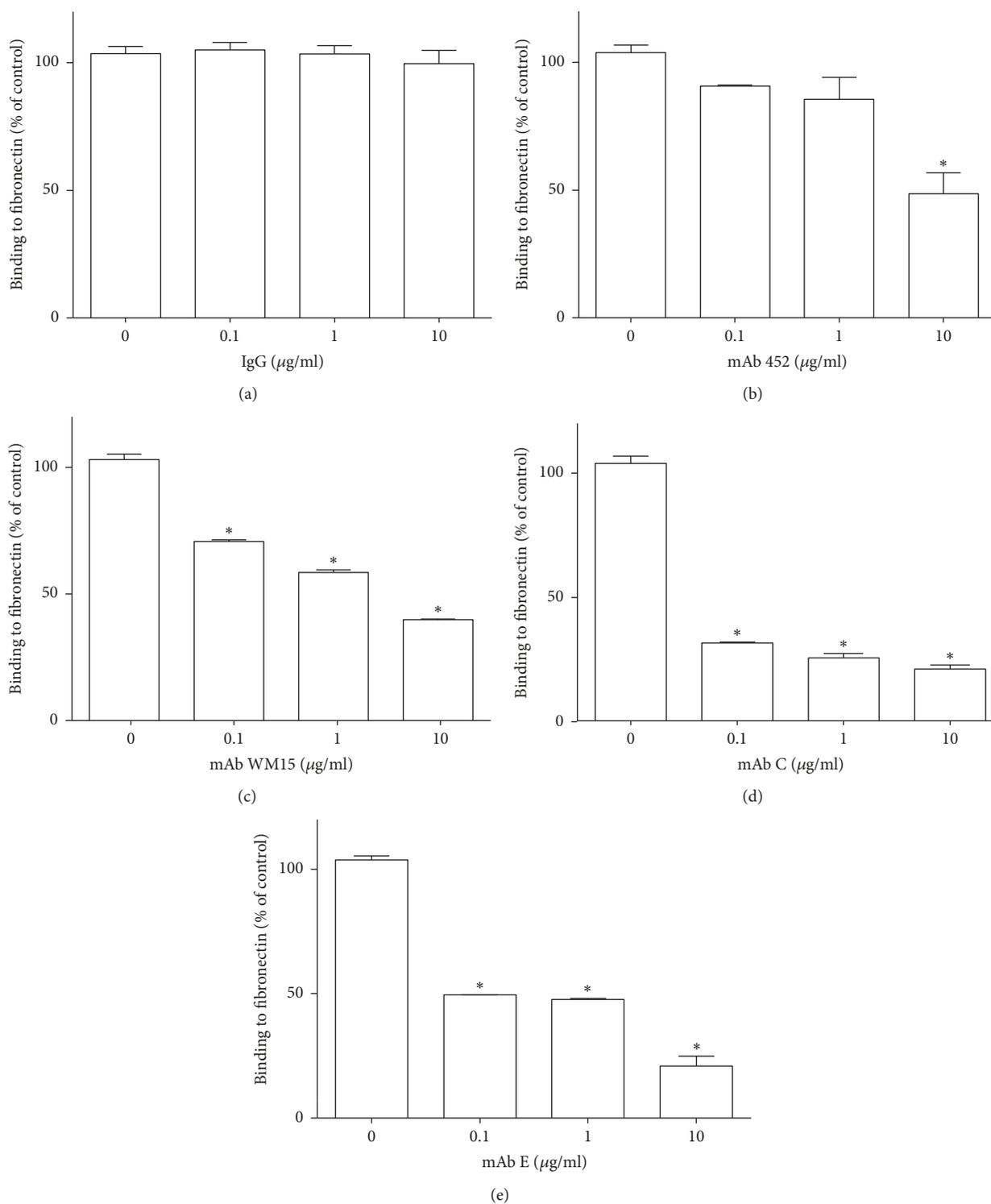


FIGURE 9: *Monoclonal anti-CD13 antibodies distinctively inhibit binding of HEK-ANPEP cells to fibronectin.* HEK-ANPEP-GFP cells (HEK cells expressing a recombinant CD13 fused to GFP) were incubated with the indicated antibodies (or a control IgG) for 30 minutes at 37°C and transferred to fibronectin-sensitized plates to allow adherence for 15 min at 37°C. Cells were washed very gently and cells attached to the plate were quantitated by measuring the fluorescence in each well with the Cytation 3 plate reader. Data is shown as percentages compared to the number of control cells (without antibody added) attached to similar wells. Average \pm SD of three experiments with each condition assayed in triplicate. * $P \leq 0.01$.

CD13). Neither mAb 452 nor mAbs C and E bind to HEK-293 cells, but the three of them bind very efficiently to HEK-293 cells transfected to express human CD13 (HEK-ANPEP cells). Competition experiments showed that the epitope recognized by mAbs C and E on CD13 is different than the one recognized by mAb 452. Interestingly, mAbs C and E seem to bind to the same or to very closely located epitopes, as they inhibit each other's binding, and this could be related to their almost identical biological effects. Likewise, the fact that the epitope recognized by mAb 452 is different from the epitope recognized by mAbs C and E could be related to the distinct effects that they have on CD13 functions.

While mAb 452 has a limited effect on the enzymatic activity of CD13, both mAbs C and E inhibit the aminopeptidase activity of CD13 as efficiently as bestatin, a well-known inhibitor of APN. This inhibition is more easily observed in cells transfected to express high levels of human CD13 on the membrane (Figure 2(d)). Regarding induction of HA of monocytic cells, or induction of heterotypic adhesion of monocytes to endothelial HMEC-1 cells, responses that are efficiently induced by CD13 crosslinking by mAb 452, not only are mAbs C and E unable to induce cell adhesion, but they inhibit homotypic and heterotypic cell adhesion induced by mAb 452 (Figures 1 and 8). Interestingly, despite their different effects on cell adhesion, CD13 crosslinking induced by the three anti-CD13 antibodies 452, C, and E is equally able to induce a fast and significant increase in intracellular Ca^{2+} and tyrosine phosphorylation of CD13, suggesting that although signal transduction is necessary to induce cell adhesion [17, 19], it is clearly not sufficient. The ability of mAb C to initiate signal transduction is in accordance with its previously observed ability to mediate phagocytosis as efficiently as mAb 452 [18].

CD13 is known to interact with the extracellular matrix proteins fibronectin and laminin [25]. Specifically, it was reported that APN/CD13 interacts with a NGR motif in domain V of fibronectin, and binding to extracellular matrix fibronectin through this motif was proposed to be involved in the high migratory competence of tumor cells expressing CD13. Since crosslinking of CD13 by mAb 452 induces monocyte adhesion to CD13-expressing cells very efficiently, we evaluated if it could also promote cell binding to fibronectin. However, in our assay conditions, neither U-937 nor THP-1 monocytic cells showed significant binding to fibronectin-coated wells, and crosslinking of CD13 by mAb 452 was unable to induce adhesion of these cells to fibronectin (not shown). In order to evaluate the effects of the mAbs on cell binding to fibronectin in a system in which this binding was more dependent on CD13, we used HEK-ANPEP cells. In our assays, parental HEK-293 cells showed insignificant binding to fibronectin-coated plates, but transfection of HEK-293 cells for expression of human CD13/APN resulted in a significant increase in binding. In this system, crosslinking of CD13 by mAb 452 did not result in increased cell binding. In contrast, both mAbs C and E, and to a lesser extent mAbs 452 and WM-15, were able to significantly inhibit cell binding to fibronectin. These results suggest that CD13 mediated cell-cell adhesion (which is induced by mAb 452) involves a different

mechanism than the one responsible for CD13 binding to fibronectin (which can be inhibited by mAb 452).

Since tumor cell motility has been proposed to involve CD13 binding to NGR motifs on fibronectin [25], and mAbs C and E are able to inhibit CD13-mediated cell binding to fibronectin, one possibility is that mAbs C and E in some way affect the region of CD13 involved in NGR binding, which is the catalytic site [25]. This would be in line with the significant inhibition of CD13 enzymatic activity by mAbs C and E. Moreover, the limited and medium effects of mAb 452 and mAb WM-15, respectively, on cell binding to fibronectin, correlate with their relative efficiency for inhibition of CD13 enzymatic activity. Thus, it could be suggested that binding of mAbs C or E to CD13 either sterically impede the interaction of NGR motifs and substrates with the enzymatic active site, or favor a conformation of the enzyme in which the enzymatic active site is closed.

Although mAbs C and E bind to CD13 at epitopes different from that recognized by mAb 452, CD13 crosslinking by all three mAbs induces signal transduction, as demonstrated by the sharp and significant increase in the intracellular concentration of Ca^{2+} ions and the induction of CD13 phosphorylation induced by the three mAbs. Since mAbs C and E do not induce CD13 internalization, and they do not impede binding of mAb 452, this opens the question of the mechanism by which crosslinking of CD13 by mAb 452 induces HA of monocytes and heterotypic adhesion of monocytes to endothelial cells, whereas crosslinking by mAbs C and E does not induce but, on the contrary, inhibit these adhesion phenomena. We suggest that all our observations could be explained by proposing that the region of CD13 involved in cell adhesion is different from the one involved in binding to NGR motifs. This is consistent with the finding of Ghosh et al. [20], who demonstrated that cell-cell adhesion is mediated by the C terminus of the CD13 molecule (corresponding to 50% of domain VI and domain VII), while the NGR motif binds at the catalytically active site, which is known to be located in a cavity limited by the four extracellular domains (domains IV–VII). We further propose that crosslinking of CD13 by mAb 452 induces a conformation in which the sites on the C terminal half of the molecule that are involved in cell-cell adhesion are exposed and able to mediate interaction with other CD13 molecules on a neighboring cell. Of note, this conformation of CD13 is not the basal one, as cell adhesion is only induced after CD13 crosslinking by certain mAbs (and presumably by a putative CD13 ligand *in vivo*). On the other hand, CD13 crosslinking by mAbs C and E induces dimers with a conformation in which the sites involved in cell-cell adhesion are not exposed. Further support for the hypothesis that the sites involved in cell-cell adhesion are not the same as those involved in binding to fibronectin and NGR motifs comes from the fact that binding of CD13 to fibronectin and NGR motifs is not favored, but rather slightly inhibited, after crosslinking by mAb 452. The conformation imposed by mAbs C and E more strongly inhibits interactions of CD13 with fibronectin, NGR motifs, or substrates, and thus these mAbs are good inhibitors of the enzymatic activity. Distinct conformations of membrane receptors aggregates imposed by different monoclonal antibodies that result in distinct cellular

responses have been observed for monoclonal antibodies specific for the FcεRI on mast cells [27].

The observation that all three mAbs are equally able to induce signal transduction after crosslinking CD13 suggests that aggregation of CD13, and not a specific conformational change, is the critical event necessary to initiate signal transduction. Resolution of the crystallographic structure of CD13/APN [5] revealed that CD13 monomers could exist in either an open or a closed conformation. It was proposed that changes in the distance between the intracellular portions of CD13 when dimers are formed by monomers in an open/open or in a closed/closed conformation (102 versus 54 Å) could be a mechanism used by CD13 to transmit signals across the membrane. Although it is possible that, in aggregates formed by the three mAbs, the intracellular portions of different CD13 molecules are at distances suitable for signal initiation, it is also possible that formation of stable CD13 aggregates is a sufficient signal for initiating transmembrane signaling, as is the case for several receptors of the immune system, in which conformational changes in the extracellular domains of the receptor are not reflected in conformational changes in the cytoplasmic domains, and it is just the aggregation of the intracellular portions which initiates signaling. Resolution of the structure of signaling-competent CD13 aggregates would be necessary to resolve this issue. In summary, although we propose that the conformation of the large extracellular portion of CD13 is different depending on the specific epitope recognized by the different mAbs, aggregation of transmembrane and cytoplasmic segments of CD13 is sufficient to initiate signal transduction.

The moonlighting properties of CD13 might be assumed to involve different parts of its structure. Enzymatic activity and binding to extracellular matrix proteins through NGR motifs is mediated through the catalytic site involving domains IV to VII. Cell-cell adhesion is mediated by the C terminal part (involving half of domain VI and domain VII) while signal transduction depends on the transmembrane and cytoplasmic domains (I and II).

Finally, CD13 is considered a viable target for cancer therapy [10, 28] in view of its participation in processes such as angiogenesis, tumor cell migration, and invasiveness, and the fact that expression of CD13 is dysregulated in several types of cancer cells, contributing in several ways to the malignancy. Several drugs interfering with CD13 functions are being tested for the development of anticancer drugs [1, 29–32]. In this respect, some properties of mAbs C and E, such as the strong inhibition of enzymatic activity and the ability to inhibit cell attachment to extracellular matrix proteins, deserve further study because of their potential to be exploited in cancer therapy.

Disclosure

Claudia A. Garay-Canales is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This paper constitutes a partial fulfillment for her degree in this Program.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from CONACYT (252428) and DGAPA-UNAM (IN205617) to Enrique Ortega. The authors thank Dr. Dolores Correa and Belinda Ortiz-Alegría, Instituto Nacional de Pediatría, for donation of HMEC-1 cells and for their help in culturing them; Dr. Carlos Rosales and Nancy Mora, Inst. Inv. Biomédicas, UNAM, for donation of anti-phosphotyrosine antibody AFT-8; and Dr. Claudia González, CINVESTAV, for mAb 4G10. They thank Carlos Castellanos (LabNal Cit, Inst. Inv. Biomédicas-UNAM-CONACYT) for help and advice with flow cytometry and MVZ Georgina Diaz Herrera (UMB, Inst. Inv. Biomédicas) for help with handling of the mice. They thank Dr. Israel Mares and Dr. Claudia Hallal-Calleros for critically reviewing the manuscript.

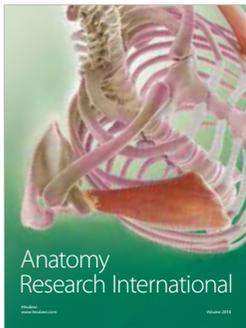
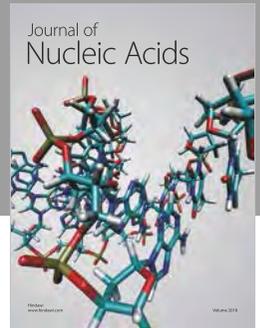
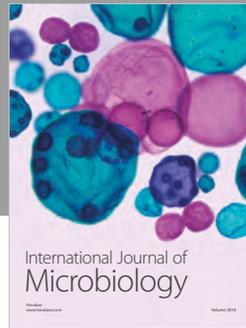
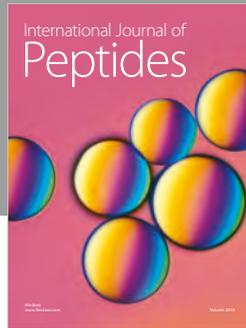
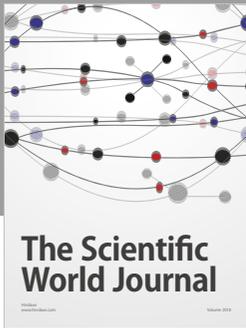
Supplementary Materials

Figure 1S: binding of mAbs C and E to CD13 does not induce changes in membrane expression of CD13. (A, B) Human U-937 monocytic cells were incubated for 3 h at 4°C (A) or at 37°C (B), with mAbs C and E, a control IgG, or no antibody, at concentrations at which C and E cause total inhibition of HA. Later, cells were transferred to 4°C and fixed. After fixation, CD13 expression was assessed by the binding of mAb 452-FITC, evaluated by flow cytometry. (C, D) U-937 cells were incubated for 3 h at 4°C (C) or at 37°C (D), with mAb 452 (at the optimal concentration for inducing HA), with a control IgG, or with no antibody. Later, cells were transferred to 4°C and fixed. After fixation, CD13 expression was assessed by the binding of mAb C-FITC, which was evaluated by flow cytometry. Histograms of a single representative experiment. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] B. Bauvois and D. Dauzonne, "Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: Chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects," *Medicinal Research Reviews*, vol. 26, no. 1, pp. 88–130, 2006.
- [2] G. Pfeleiderer and P. G. Celliers, "Isolation of an aminopeptidase from kidney particles," *Biochemische Zeitschrift*, vol. 339, pp. 186–189, 1963.
- [3] P. Mina-Osorio, "The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 14, no. 8, pp. 361–371, 2008.
- [4] A. T. Look, R. A. Ashmun, L. H. Shapiro, and S. C. Peiper, "Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 83, no. 4, pp. 1299–1307, 1989.
- [5] A. H. M. Wong, D. Zhou, and J. M. Rini, "The x-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 44, pp. 36804–36813, 2012.

- [6] L. Chen, Y.-L. Lin, G. Peng, and F. Li, "Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 44, pp. 17966–17971, 2012.
- [7] E. J. Favaloro, T. Browning, and D. Facey, "CD13 (GP150; aminopeptidase-N): Predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell-surface associated," *Experimental Hematology*, vol. 21, no. 13, pp. 1695–1701, 1993.
- [8] Y. Van Hensbergen, H. J. Broxterman, R. Hanemaaijer et al., "Soluble aminopeptidase N/CD13 in malignant and nonmalignant effusions and intratumoral fluid," *Clinical Cancer Research*, vol. 8, no. 12, pp. 3747–3754, 2002.
- [9] K. Razak and A. C. Newland, "The significance of aminopeptidases and haematopoietic cell differentiation," *Blood Reviews*, vol. 6, no. 4, pp. 243–250, 1992.
- [10] M. Wickström, R. Larsson, P. Nygren, and J. Gullbo, "Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy," *Cancer Science*, vol. 102, no. 3, pp. 501–508, 2011.
- [11] H. Dan, K. Tani, K. Hase et al., "CD13/aminopeptidase N in collagen vascular diseases," *Rheumatology International*, vol. 23, no. 6, pp. 271–276, 2003.
- [12] T. Shimizu, K. Tani, K. Hase et al., "CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis," *Arthritis & Rheumatology*, vol. 46, no. 9, pp. 2330–2338, 2002.
- [13] S. V. Bhagwat, J. Lahdenranta, R. Giordano, W. Arap, R. Pasqualini, and L. H. Shapiro, "CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation," *Blood*, vol. 97, no. 3, pp. 652–659, 2001.
- [14] R. Pasqualini, E. Koivunen, R. Kain et al., "Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis," *Cancer Research*, vol. 60, no. 3, pp. 722–727, 2000.
- [15] A. F. Kolb, A. Hegyi, J. Maile, A. Heister, M. Hagemann, and S. G. Siddell, "Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 440, pp. 61–67, 2012.
- [16] W. Kramer, F. Girbig, D. Corsiero et al., "Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor Ezetimibe in the enterocyte brush border membrane," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 2, pp. 1306–1320, 2005.
- [17] P. Mina-Osorio, L. H. Shapiro, and E. Ortega, "CD13 in cell adhesion: Aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 79, no. 4, pp. 719–730, 2006.
- [18] I. Licona-Limón, C. A. Garay-Canales, O. Muñoz-Paleta, and E. Ortega, "CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 98, no. 1, pp. 85–98, 2015.
- [19] P. Mina-Osorio, B. Winnicka, C. O'Connor et al., "CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 84, no. 2, pp. 448–459, 2008.
- [20] M. Ghosh, C. Gerber, M. M. Rahman et al., "Molecular mechanisms regulating CD13-mediated adhesion," *The Journal of Immunology*, vol. 142, no. 4, pp. 636–647, 2014.
- [21] J. Subramani, M. Ghosh, M. Mamunur Rahman et al., "Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking," *The Journal of Immunology*, vol. 191, no. 7, pp. 3905–3912, 2013.
- [22] R. A. Ashmun and A. T. Look, "Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells," *Blood*, vol. 75, no. 2, pp. 462–469, 1990.
- [23] A. N. Santos, J. Langner, M. Herrmann, and D. Riemann, "Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes," *Cellular Immunology*, vol. 201, no. 1, pp. 22–32, 2000.
- [24] J. G. van de Winkel, W. J. Tax, C. W. Jacobs, T. W. Huizinga, and P. H. Willems, "Cross-linking of both types of IgG Fc receptors, Fc gamma RI and Fc gamma RII, enhances intracellular free Ca²⁺ in the monocytic cell line U937," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 31, pp. 315–325, 1990.
- [25] C. Liu, Y. Yang, L. Chen, Y.-L. Lin, and F. Li, "A unified mechanism for aminopeptidase N-based tumor cell motility and tumor-homing therapy," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 50, pp. 34520–34529, 2014.
- [26] A. Navarrete Santos, J. Langner, and D. Riemann, "Enzymatic activity is not a precondition for the intracellular calcium increase mediated by mAbs specific for aminopeptidase N/CD13," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 477, pp. 43–47, 2000.
- [27] E. Ortega, R. Schweitzer-Stenner, and I. Pecht, "Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells," *EMBO Journal*, vol. 7, no. 13, pp. 4101–4109, 1988.
- [28] S. Nohara, K. Kato, D. Fujiwara et al., "Aminopeptidase N (APN/CD13) as a target molecule for scirrhus gastric cancer," *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, vol. 40, no. 4, pp. 494–503, 2016.
- [29] M. Piedfer, D. Dauzonne, R. Tang, J. N'Guyen, C. Billard, and B. Bauvois, "Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells," *The FASEB Journal*, vol. 25, no. 8, pp. 2831–2842, 2011.
- [30] S. Joshi, L. Chen, M. B. Winter et al., "The rational design of therapeutic peptides for aminopeptidase N using a substrate-based approach," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, article no. 1424, 2017.
- [31] C. Ma, J. Cao, X. Liang et al., "Novel leucine ureido derivatives as aminopeptidase N inhibitors. Design, synthesis and activity evaluation," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 108, pp. 21–27, 2016.
- [32] E. Grieger, G. Gresch, J. Niesen et al., "Efficient targeting of CD13 on cancer cells by the immunotoxin scFv13-ETA' and the bispecific scFv [13xds16]," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 143, no. 11, pp. 2159–2170, 2017.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com

