



# **ADAMTS1 i TFPI-2: Estudi de la seva interacció funcional i les implicacions en la plasticitat tumoral.**

Memòria presentada per **Antoni Xavier Torres Collado** per optar al grau de Doctor en Biologia.

Aquest treball ha estat realitzat en el laboratori d'Angiogènesi de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Vall d'Hebron.

El director

El tutor

L'interessat

Dr. Juan Carlos  
Rodríguez-Manzaneque

Dr. Lleonard Barrios

Antoni Xavier  
Torres Collado

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia Animal i Immunologia.  
Facultat de Biologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Decembre del  
2007.

**A mon Pare i a ma Mare.**

## **Agraïments.**

El camí ha estat llarg, hem rigut i hem plorat, ens hem cansat i ens hem parat. Donar les gràcies el primer de tot a la amistat, per que sense ella res no s'hagués pogut fer. Tampoc oblidaré a l'amor, que te pot arrossegar, que te dona i te lleva, que en definitiva et fa sentir viu. Al coneixement per que ens il·lumina, i també ens cega. Al silenci, per que d'ell s'aprèn la veritat. A la música que emplena els sentits, l'anima i les estones que no són per al silenci. A la bogeria, que ens diu que res és el que sembla. A la veritat, més que res com a utopia irrealitzable. Al mar al qual sempre tornam. A la terra que ens alimenta. Al dia, ple d'energia. A la coherència, per que dóna seguretat. A l'humor, que permet relativitzar. A la mort, per que encara relativitza més. A l'estiu, temps de dies clars i poca feina. A l'hivern, dies de quedar-se al llit ben tapat.

També agrair especialment al meu mentor en aquest treball, Dr. Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque, per que m'ha ensenyat a ser crític, a fer feina i a gaudir de la ciència (sense notar gaire pressió), a més de fer tot el possible per crear bon ambient a la poïata. A la Dra. Carme Gelpí per que va ser la primera en donar-me la oportunitat de barallar-me amb els westers. Als meus incontables companys de laboratori, que m'han ajudat (de vegades a caure) i m'han suportat. A la meva família, per que sempre ha confiat que aquest moment arribaria. Als meus amics de sempre (vultros ja sabeu qui sou pardals!!!!).

Com diria aquell cantant de bigoti, "the show must go on"...

# Sumari.

AGRAÏMENTS .....	E
SUMARI .....	I
FIGURES .....	III
TAULES .....	IV
LLISTAT D'ABREVIATURES .....	V
INTRODUCCIÓ .....	1
1. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR .....	1
2. EL MICROENTORN TUMORAL .....	2
2.1 <i>Que és?</i> .....	2
3. LES PROTEASES I LA RECERCA DELS SEUS SUBSTRATS .....	4
3.1. <i>Aproximacions bioquímiques</i> .....	6
3.1.1. Identificació del lloc de tall .....	6
3.1.2. Cribatge de llocs externs i captura amb dominis catalíticament inactius .....	7
3.2. <i>Aproximacions en sistemes cel·lulars</i> .....	8
3.2.1. Perfil d'activació i d'inhibició .....	8
3.2.2. Estudis de pèrdua de funció .....	9
3.2.3. Estudis de guany de funció .....	10
3.3. <i>Ús de la proteòmica</i> .....	10
3.3.1. Identificació de substrats amb proteòmica basada en gels de dues dimensions (2D) .....	11
3.3.2. Aproximacions proteòmiques mitjançant cromatografia líquida .....	11
3.3.3. Marcatge amb isòtops de massa .....	12
3.3.4. Peptidòmica .....	12
3.4. <i>Models animals</i> .....	13
3.4.1. Anàlisi d'expressió .....	13
3.4.2. Validació de parells enzim-substrat .....	13
3.4.3. Ratolí genomodificat (knock-in) i KO condicional .....	14
4. LES ADAMTS .....	14
4.1. <i>Que són?</i> .....	14
4.2. <i>L'estructura en dominis de les ADAMTS</i> .....	15
4.3. <i>El processament C-terminal afecta l'especificitat de substrat i la unió a la ECM</i> .....	17
4.4. <i>ADAMTS1</i> .....	19
4.4.1. La regulació d'ADAMTS1 .....	20
4.4.1.1. A nivell gènic .....	21
4.4.1.2. Activació del zimògen i inhibició .....	22
4.4.2. Propietats moleculars d'ADAMTS1 .....	22
4.4.3. Paper fisiològic i patològic d'ADAMTS1 .....	22
4.4.3.1. Basats en la seva activitat proteolítica .....	22
4.4.3.2. Altres efectes .....	24
4.4.3.3. ADAMTS1 i progressió tumoral .....	26
5. ELS INHIBIDORS DE METAL·LOPROTEASES .....	26
5.1. <i>Els inhibidors tissulars de MMPs (TIMPS)</i> .....	27
5.2. <i>L'<math>\alpha_2</math>-macroglobulina</i> .....	28
5.3. <i>RECK: proteïna rica en cisteïnes inductora de reversió amb motius Kazal</i> .....	28
5.4. <i>El TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2)</i> .....	29
5.4.1. La regulació del gen tfpi-2 .....	30
5.4.2. Propietats moleculars del TFPI-2 humà .....	32
5.4.3. Paper fisiològic del TFPI-2 .....	34
5.4.4. El TFPI-2 en els processos patològics .....	38
5.4.5. El TFPI-2 en la progressió tumoral .....	39
6. ANGIOGÈNESI I LA VASCULARITZACIÓ TUMORAL .....	41
6.1. <i>Ramificació endotelial</i> .....	43
6.2. <i>Co-opció de vasos</i> .....	45
6.3. <i>Creixement microvascular per inclusió (IMG)</i> .....	46
6.4. <i>Angiogènesi glomerulosa</i> .....	46
6.5. <i>Reclutament de cèl·lules endotelials progenitores (EPC)</i> .....	47

6.6. <i>Mimetisme vasculogènic</i> .....	47
6.6.1. El fenotip del mimetisme vasculogènic en càncer .....	48
6.6.2. Implicacions terapèutiques del mimetisme vasculogènic .....	50
<b>OBJECTIVES</b> .....	<b>53</b>
<b>RESULTS</b> .....	<b>55</b>
ADAMTS1 INTERACTS WITH, CLEAVES AND MODIFIES THE EXTRACELLULAR LOCATION OF THE MATRIX INHIBITOR TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR-2 (TFPI-2) .....	55
<i>Identification of TFPI-2 as an interacting protein of ADAMTS1</i> .....	55
<i>Interaction of TFPI-2 and ADAMTS1 in a cell culture model</i> .....	56
<i>TFPI-2 is a substrate of ADAMTS1</i> .....	57
<i>Protease-sensitivity of TFPI-2 C-terminal region</i> .....	60
<i>Requirements for the cleavage of TFPI-2</i> .....	62
<i>Effects of ADAMTS1 in the extracellular location of TFPI-2 protein in vivo</i> .....	64
INDUCTION OF TUMOR CELL PLASTICITY BY THE METALLOPROTEASE ADAMTS1: EVIDENCES FOR A ROLE OF TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR-2 .....	68
<i>Presence of TFPI-2 and ADAMTS1 in vasculogenic mimicry presenting cells</i> .....	68
<i>Basal cleavage of TFPI-2 in VM+ cells</i> .....	70
<i>Presence of TFPI-2 and ADAMTS1 in Ewing sarcoma tumor xenografts</i> .....	72
<i>Actions of TFPI-2 and ADAMTS1 in a HT-1080 fibrosarcoma model</i> .....	74
<i>Tumor plasticity and vasculogenic mimicry in HT-1080 xenografts</i> .....	76
<i>Potential role of MMP gelatinases</i> .....	81
<i>Tumor plasticity and “stemness” capacity of sarcoma cells</i> .....	82
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>83</b>
ADAMTS1 AND TFPI-2 PARTNERSHIP .....	83
TFPI-2 REPRESENTS A NEW SUBSTRATE OF ADAMTS1: RELEVANCE OF ITS C-TERMINAL CLEAVAGE .....	84
TFPI-2 MEETS ADAMTS1 IN HIGHLY AGGRESSIVE MELANOMA AND SARCOMA TUMOR CELLS .....	87
ADAMTS1 MEETS TFPI-2 IN A NON-EXPECTED PLACE.....	89
ACTIONS OF ADAMTS1 AND TFPI-2 IN VASCULOGENIC MIMICRY: ROLE OF MMP-2 .....	90
TUMOR PLASTICITY IN HT-1080 FIBROSARCOMA MODEL.....	91
FINAL REMARKS .....	93
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>95</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>97</b>
1.1. YEAST TWO HYBRID SCREENING .....	97
1.2. EXPRESSION VECTORS.....	97
1.3. CELL CULTURE, TRANSFECTION AND TREATMENTS .....	98
1.4. TUMOR XENOGRAFT ASSAYS .....	99
1.5. N-GLYCOSIDASE F TREATMENT.....	99
1.6. <i>IN VITRO</i> DIGESTION OF TFPI-2 .....	99
1.7. CO-IMMUNOPRECIPITATION STUDIES .....	100
1.8. IMMUNOBLOT ANALYSIS .....	100
1.9. IMMUNOCHEMISTRY.....	100
1.9.1. <i>Paraffin sections</i> .....	100
1.9.2. <i>Frozen sections</i> .....	101
1.10. CHALKLEY MORPHOMETRY ANALYSIS .....	102
1.11. HEPARIN PURIFICATION .....	102
1.12. ZYMOGRAPHY .....	102
1.13. RNA ISOLATION AND REVERSE TRANSCRIPTION-PCR ANALYSIS .....	103
<b>BIBLIOGRAPHY</b> .....	<b>105</b>

## Figures.

FIGURA 1. REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DE LA ECM AMB ELS COMPONENTS MÉS REPRESENTATIUS.....	2
FIGURA 2. REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL MICROENTORN TUMORAL.....	3
FIGURA 3. REPRESENTACIÓ DE LES DIFERENTS APROXIMACIONS QUE PODEM PORTAR A TERME PER DESCOBRIR PARELLS PROTEASA-SUBSTRAT .....	5
FIGURA 4. ESTRUCTURA MODULAR DE LES ADAMTS, ADAM I DE LES MMPs.....	16
FIGURA 5. DIVERSOS PAPERS DEL TFPI-2 EN LA REMODELACIÓ TISSULAR.....	38
FIGURA 6. REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DELS TIPUS MÉS REPRESENTATIUS DE VASCULARITZACIÓ TUMORAL .....	43
FIGURA 7. RAMIFICACIÓ ENDOTELIAL.....	44
FIGURA 8. ANGIOGÈNESI PER INCLUSIÓ.....	46
FIGURA 9. REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DE FENOMEN DEL MIMETISME VASCULOGÈNIC.....	48
FIGURE 10. SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE ADAMTS1 AND TFPI-2 PROTEINS.....	55
FIGURE 11. INTERACTION OF ADAMTS1 AND TFPI-2 IN A CELL-BASED SYSTEM.....	57
FIGURE 12. IDENTIFICATION OF TFPI-2 AS A SUBSTRATE OF ADAMTS1 (I).....	58
FIGURE 13. IDENTIFICATION OF TFPI-2 AS A SUBSTRATE OF ADAMTS1 (II).....	59
FIGURE 14. ADAMTS1 CLEAVES TFPI-2 AT ITS C-TERMINAL DOMAIN.....	60
FIGURE 15. PROTEASE-SENSITIVITY OF TFPI-2 C-TERMINAL REGION (I).....	61
FIGURE 16. PROTEASE-SENSITIVITY OF TFPI-2 C-TERMINAL REGION (II).....	62
FIGURE 17. PROTEASE-SENSITIVITY OF TFPI-2 C-TERMINAL REGION (III).....	62
FIGURE 18. REQUIREMENTS FOR THE CLEAVAGE OF TFPI-2 (I).....	63
FIGURE 19. REQUIREMENTS FOR THE CLEAVAGE OF TFPI-2 (II).....	64
FIGURE 20. ADAMTS1 AFFECTS THE LOCATION OF TFPI-2 PROTEIN <i>IN VIVO</i> .....	67
FIGURE 22. DEMONSTRATION OF TFPI-2 AND ADAMTS1 PRESENCE IN VM POSITIVE CELL LINES (I).....	69
FIGURE 23. DEMONSTRATION OF TFPI-2 AND ADAMTS1 PRESENCE IN VM POSITIVE CELL LINES (II).....	69
FIGURE 24. DEMONSTRATION OF TFPI-2 AND ADAMTS1 PRESENCE IN VM POSITIVE CELL LINES (III).....	70
FIGURE 25. DEMONSTRATION OF TFPI-2 CLEAVAGE IN AGGRESSIVE CELL LINES (I).....	71
FIGURE 26. DEMONSTRATION OF TFPI-2 CLEAVAGE IN AGGRESSIVE CELL LINES (II).....	72
FIGURE 27. RNA LEVELS IN EW7 XENOGRAPTS.....	73
FIGURE 28. ADAMTS1 AND TFPI-2 PROTEIN LEVELS IN EW7 DERIVED XENOGRAPTS.....	74
FIGURE 30. TFPI-2 AND ADAMTS1 PROTEIN LEVELS AND TFPI-2 CLEAVAGE IN HT-1080 TRANSFECTANTS.....	75
FIGURE 31. GROWTH OF HT-1080 FIBROSARCOMA TUMOR XENOGRAPTS.....	76
FIGURE 32. EVIDENCES OF VASCULOGENIC MIMICRY IN HT-1080 XENOGRAPTS OVEREXPRESSING ADAMTS1.....	77
FIGURE 33. CHARACTERIZATION OF THE PRESENCE OF ENDOGLIN IN HT-1080 XENOGRAPTS.....	78
FIGURE 34. GENE SIGNATURE OF HT-1080 XENOGRAPTS.....	80
FIGURE 35. MMP LEVELS IN HT-1080 CLONES.....	81
FIGURE 36. TUMOR CELL PLASTICITY.....	82
FIGURE 37. MODEL REPRESENTATION.....	94
FIGURE 38. A REPRESENTATION OF THE MYC CONSTRUCT GENERATED AND USED FOR THIS WORK.....	98

## Taules.

TAULA 1. LES PROTEASES. ....	4
TAULA 2. REPRESENTACIÓ DE LES ADAMTSs HUMANES I DE RATOLÍ. ....	15
TAULA 3. ALGUNES DADES I NÚMEROS D'ACCÉS BÀSICS D'ADAMTS1 HUMANA. ....	19
TAULA 4. DESCRIPCIÓ, TANT PER CENT D'HOMOLOGIA ((N) EN NUCLEÒTIDS I (A) EN AMINOÀCIDS) I NÚMEROS D'ACCÉS DE LES ADAMTS1 DE DIFERENTS ESPÈCIES ANIMALS. ....	20
TAULA 5. ALGUNES DADES I NÚMEROS D'ACCÉS BÀSICS DEL TFPI-2. ....	30
TAULA 6. DESCRIPCIÓ, TANT PER CENT D'HOMOLOGIA ((N) EN NUCLEÒTIDS I (A) EN AMINOÀCIDS) I NÚMEROS D'ACCÉS DEL TFPI-2 DE DIFERENTS ESPÈCIES ANIMALS. ....	36
TABLE 7. LIST OF ANTIBODIES USED IN THIS WORK. ....	101
TABLE 8. A DETAILED LIST OF THE PRIMERS USED IN THIS WORK FOR RT-PCR AND QRT-PCR. ....	104

## Llistat d'abreviatures.

2D: dues dimensions  
3D: tres dimensions  
A: adenina  
aa: aminoàcid  
ADAM: desintegrina metal·loproteasa  
ADAMTS: desintegrina i metal·loproteasa amb motius trombospondina  
Arg: Arginina  
Asn: Asparagina  
bp: parell de bases  
BSA: albúmina sèrica bovina  
C/EBP $\beta$ : proteïna  $\beta$  coadjuvant d'unió a CAAT  
C: citosina  
cAMP: AMP cíclic  
cDNA: DNA complementari  
CL: llisat cel·lular  
CM: medi condicionat  
COC: complex cumulus-oòcit  
CTGF: factor de creixement del teixit connectiu  
DIGE: electroforesis en gel de 2D amb fluorescència  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
EC: cèl·lula endotelial  
EC<sub>50</sub>: concentració mitja efectiva  
ECM: matriu extracel·lular  
EGF : factor de creixement epitelial  
ErbB-2: oncogen viral de la leucèmia eritroblàstica homòleg 2  
FCS: sèrum fetal boví  
FGF: factor de creixement de fibroblasts  
g: gram  
G: guanina  
GAG: glicosaminoglicans  
GF: factors de creixement  
Gln: glutamina  
Glu: Àcid glutàmic  
GPI: glicosil fosfatidilinositol  
GST: glutatió S-transferasa  
HB-EGF: factor de creixement epitelial unit a heparina  
HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució  
HRP: peroxidasa del rave picant  
HUVEC: cèl·lules endotelials de vena cordó umbilical  
IL-8: interleucina-8  
IMG: creixement microvascular per inclusió  
iTRAQ: marcatge isotòpic per quantificació relativa i absoluta  
JNK: proteïna cinasa c-jun N-terminal, janus cinasa  
Kb: kilobase  
*k<sub>cat</sub>*: número de recanvi  
KD: domini Kunitz  
kDa: kilodalton  
KI: genomodificat  
*k<sub>m</sub>*: constant de Michaelis -Menten  
KO: genoanul·lat  
l: litre  
LDL: lipoproteïna de densitat baixa  
LH: hormona luteïnitzant  
LPS: lipopolisacàrid  
mAb: anticòs monoclonal  
MAPK: proteïna cinasa associada a mitogen  
mg: miligram



MITF: factor de transcripció associat a la microftalmia  
 MKK7: proteïna cinasa cinasa activada per mitogen amb especificitat dual  
 ml: mililitre  
 MMP: metal·loproteasa de matriu extracel·lular  
 MR: receptor de mineralocorticoides  
 MS: espectrometria de masses  
 MT1-MMP : metal·loproteasa de membrana tipus 1  
 MuDIPT : cromatografia líquida multidimensional  
 NF1-like factor: factor similar al factor nuclear 1  
 Nonidet P40: 4-Nonylfenolpolietilenglicol  
 NSCLC: tumor de pulmó de cèl·lula no petita  
 o/n: durant la nit  
 p/v: pes/ volum  
 PA: activador del plasminogen  
 PAI-1 inhibidor del activador del plasminogen 1  
 pAb: anticòs policlonal  
 PAGE: electroforesi en gel de poliacrilamida  
 PAPP-A : proteasa A associada a embaràs  
 PAR: receptor activat per proteases  
 PAS: àcid per-iòdic shift  
 PBS: tampó fosfat salí  
 PCR: reacció en cadena de la polimerasa  
 PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes  
 pH: antilogaritme de la concentració de protons d'una solució  
 PKC: proteïna cinasa C  
 PLGF: factor de creixement placentari  
 PMSF: fluorur de sulfonilmetilfenil  
 PP5: proteïna placentària n<sup>o</sup>5  
 Rb: proteïna retinoblastoma  
 RECK: proteïna rica en cisteïnes inductora de reversió amb motius Kazal  
 RT-PCR: transcripció inversa- reacció en cadena de la polimerasa  
 SCID: immunodeficiència combinada severa  
 SDS: dodecil sulfat sòdic  
 Ser: Serina  
 siRNA: àcid ribonucleic petit d'interferència  
 Sp1/3: proteïna d'especificitat 1 ó 3  
 SPC: proproteïna convertasa similar a la subtilisina  
 Syn-4: sindecà-4  
 T: timina  
 TF: factor tissular  
 TFPI: inhibidor de la via del factor tissular  
 TFPI-2: inhibidor de la via del factor tissular 2  
 TGF: factor de creixement tumoral  
 TIS: inici de transcripció  
 TNF: factor necrosant tumoral  
 tPA: activador del plasminogen tipus teixit/tissular  
 TSC: codó de terminació de traducció  
 TSP: trombospondina  
 TSR: repeticions trombospondina  
 TTS: lloc de final de transcripció  
 Tween-20: monolaurat polietilenglicol sorbitan  
 U: unitat  
 uPA: activador del plasminogen del tipus urocinasa  
 v/v: volum/ volum  
 V: volum  
 VEGF: factor de creixement d'endoteli vascular  
 VEGFR: receptor del factor de creixement d'endoteli vascular  
 WISP2: a la proteïna de la cascada de senyalització WNT1 tipus 2

## **Introducció.**

### **1. La matriu extracel·lular.**

La idea d'una matriu extracel·lular (ECM) dinàmica és relativament nova. Fa un quart de segle es pensava que era inanimada, no reactiva i purament estructural, un lloc passiu i estàtic que les cèl·lules creen només per fer servir com a bastida. Una sèrie de descobriments varen canviar aquesta visió :

i) Es formen interaccions complexes cèl·lula-matriu durant l'embriogènesi.

ii) Existeixen llocs d'unió a les proteïnes de la matriu extracel·lular (com, per exemple, els motius RGD).

iii) L'existència de les integrines i d'altres receptors de superfície per a components de la ECM.

iv) La ECM representa un reservori per factors autocrins i paracrins.

v) experiments de pèrdua de funció de components de la ECM que expliquen la seva funció.

vi) Etc (revisat per (Piez 1997)).

La matriu extracel·lular està composta per proteïnes de caràcter fibrós dintre d'un polisacàrid gelatinós. A més, hi ha components que uneixen les distintes proteïnes de caràcter fibrós entre elles o amb les cèl·lules. Cada teixit té unes característiques molt determinades i diferenciades, el que es tradueix en que els components de la ECM són també diferents.

El component proteic de caràcter estructural majoritari de la matriu extracel·lular és el col·lagen. Destacar que hi ha 19 tipus de col·lagen, i que el més abundant és el col·lagen I. En el cas de les membranes basals el tipus predominant és el col·lagen IV. Els teixits connectius contenen fibres de caràcter elàstic compostes fonamentalment per elastina.

El component gelatinós de la ECM està fonamentalment compost de glicosaminoglicans, que estan carregats de manera negativa, proveint suport a la hidratació i a la unió amb molècules carregades negativament. Els proteoglicans uneixen en la seva estructura proteica els glicosaminoglicans, essent un altre dels components estructurals de la ECM. Dintre d'aquests proteoglicans trobem l'agrecà, el brevicà, el versicà, el neurocà.

Un altre grup de components de la ECM són les proteïnes d'adhesió encarregades de la unió entre distintes components de la ECM entre ells o amb la superfície cel·lular. La proteïna més representativa d'aquest tipus seria la fibronectina, proteïna dimèrica que conté llocs d'unió a glicosaminoglicans i a col·lagen. Altres components importants són la laminina i el nidogen encarregat d'unir el col·lagen de tipus IV amb la laminina en les membranes basals.

La cèl·lula interacciona amb la ECM mitjançant molècules transmembranals com les integrines o alguns proteoglicans que s'uneixen a la vegada a proteïnes citosòliques enviant el senyal a la cèl·lula (Cooper 2000). La figura 1 ens dona una visió dels components més importants i la seva disposició en la ECM.

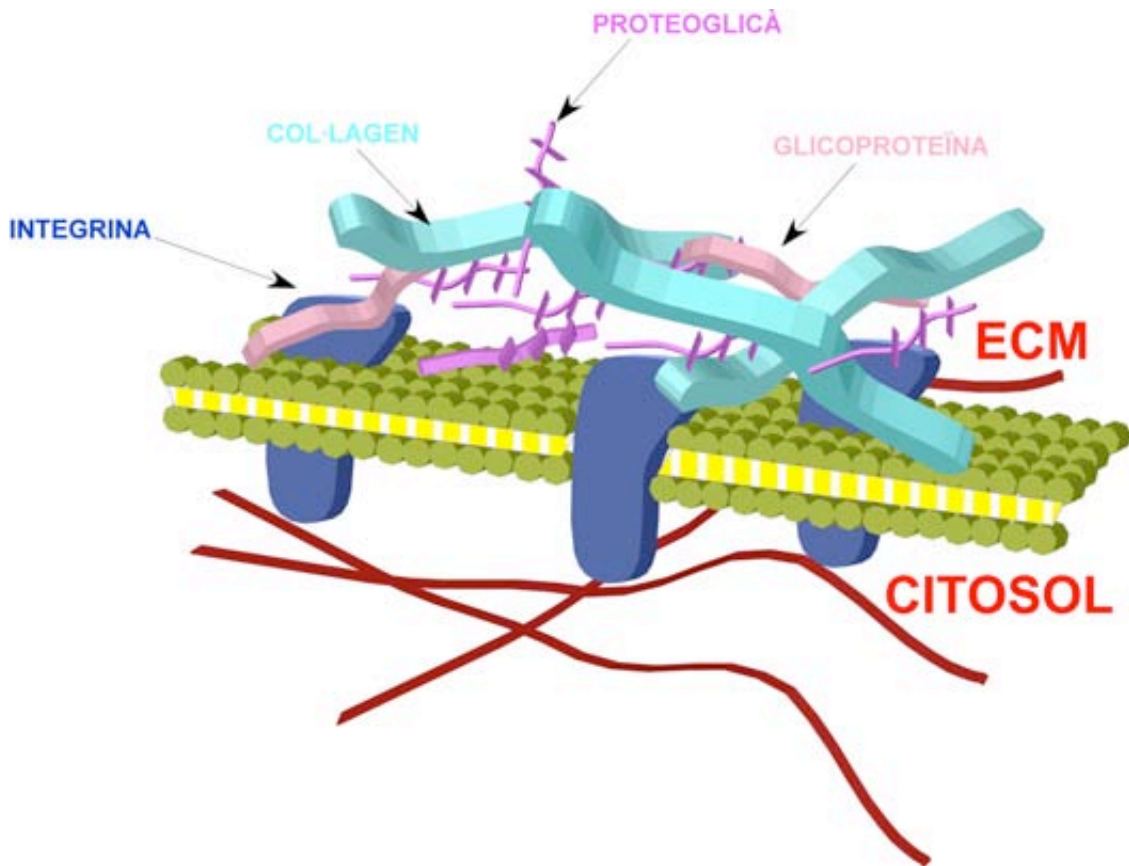


Figura 1. Representació esquemàtica de la ECM amb els components més representatius.

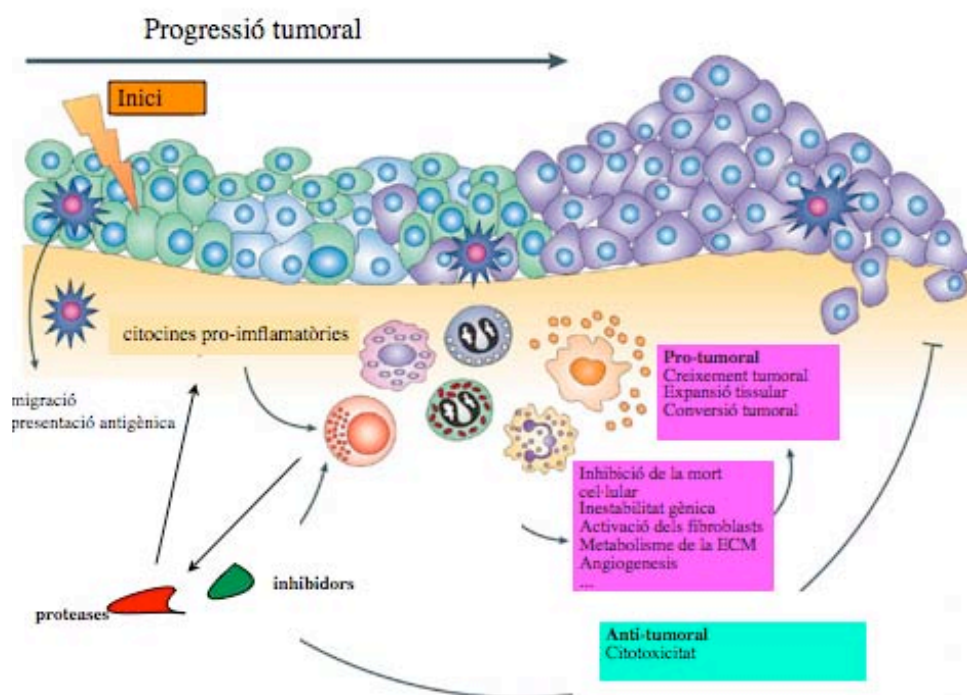
## 2. El microentorn tumoral.

### 2.1 Que és?

El microentorn a on el tumor s'origina té un paper fonamental al principi i durant la progressió tumoral, i podria ser un factor important pel desenvolupament de teràpies. El microentorn tumoral o estroma tumoral consisteix en distints components de caràcter cel·lular i la matriu extracel·lular. De les cèl·lules, s'han identificat fibroblasts, cèl·lules gials, cèl·lules epitelials, adipòcits, cèl·lules inflamatòries i immunològiques i cèl·lules vasculars, com representa la figura 2. Però encara es coneix poc la natura precisa d'aquestes cèl·lules que formen l'estroma, i com aquestes o les noves que són reclutades s'alteren durant la progressió tumoral i com s'influencien recíprocament. També

pot limitar l'accessibilitat de la teràpia al tumor, variar el metabolisme dels fàrmacs i afavorir l'aparició de resistències farmacològiques. Degut a la implicació d'elements estromals en tot el desenvolupament tumoral, aquests presenten un especial atractiu per a la teràpia. La manipulació de les interaccions entre tumor i hoste podria ser important a l'hora de revertir o prevenir la conversió tumoral i per restablir els mecanismes de control naturals.

Malgrat la importància de les interaccions entre tumor i estroma, el coneixement de la composició i de la complexitat de les relacions entre les cèl·lules tumoral i el seu voltant és molt limitada. Se sap que tant les cèl·lules tumorals com les estromals co-evolucionen durant la tumorigènesi i la seva progressió ulterior. La matriu extracel·lular també evoluciona durant la progressió tumoral, però com en el cas anterior, el coneixement d'aquests canvis és molt limitat <sup>1</sup>. Dintre d'aquests canvis podem situar als promoguts per l'activitat proteolítica sobre la ECM.



**Figura 2. Representació esquemàtica del microentorn tumoral.** Durant la progressió tumoral, apareixen múltiples tipus cel·lulars que interaccionen entre ells per donar una resposta complexa. Dintre d'aquestes, es poden diferenciar aquelles que tenen un efecte negatiu sobre el creixement (citotoxicitat mediada pel sistema immunitari) o aquelles que afavoreixen la progressió tumoral (la supervivència tumoral, l'expansió tissular). En definitiva, el microentorn tumoral és un lloc dinàmic i complex (imatge modificada de (de Visser *et al.* 2006))

<sup>1</sup> [http://deb.nci.nih.gov/thinktank/Executive\\_Summary\\_of\\_the\\_Tumor\\_Microenvironment\\_Think\\_Tank.cfm](http://deb.nci.nih.gov/thinktank/Executive_Summary_of_the_Tumor_Microenvironment_Think_Tank.cfm)

### 3. Les proteases i la recerca dels seus substrats.

Sense proteòlisis, la superfície cel·lular i la matriu extracel·lular serien un habitat bastant estàtic. Dintre dels dinamitzadors d'aquest entorn trobem les proteases, que tenen l'habilitat d'hidrolitzar les unions peptídiques, modificant irreversiblement la funció de la proteïna substrat. Mitjançant un processament específic dels substrats, les proteases modifiquen circuits de senyalització i la funció cel·lular.

Entre ells destaquen l'especificitat de la cascada de coagulació (Davie and Ratnoff 1964; Macfarlane 1964) i l'activació del tripsinogen (Davie and Neurath 1955) que representen paradigmes de l'activitat proteolítica i han estat motiu d'ampli i detallat estudi. Recentment el processament proteolític dels ectodominis per "shedding" ha evidenciat un paper clau en la regulació de factors de creixement cel·lular (GF) i citocines com són el factor de creixement transformant alfa ( $TGF\alpha$ ) o el factor necrosant tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) (Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997; Peschon *et al.* 1998), i mitjançant el processament de quimiocines les proteases regulen la resposta inflamatòria i el tràfic de leucòcits (McQuibban *et al.* 2000; Parks *et al.* 2004). També és important la proteòlisis que deixa al descobert epitops críptics, tal com la laminina processada per les metal·loproteases que afavoreix la migració cel·lular (Hintermann and Quaranta 2004). També el processament proteolític produeix nous pèptids críptics com són l'angiostatina i l'endostatina, que són alliberats del plasminogen i del col·lagen XVIII respectivament per l'acció de MMP's (O'Reilly *et al.* 1996; Bergers *et al.* 1999). Mitjançant un control precís del processament, les proteases són molt importants en les rutes de senyalització cel·lular, i fins i tot moltes d'elles són considerades molècules senyalitzadores (Overall 2004).

Prop del 2% dels gens humans codifiquen per proteases (representades en la taula 1) i representen del 5%-10% de les dianes terapèutiques dels fàrmacs actuals (Overall and Kleifeld 2006; Turk 2006), donant una visió de la importància de les seves funcions. Tot això dona una idea de la necessitat que té el coneixement de la regulació de l'activitat de les proteases sobre els seus substrats, per poder dissenyar estratègies per bloquejar aquesta activitat en el cas d'una desregulació, o d'augmentar l'activitat si aquesta afavoreix la cura d'una patologia.

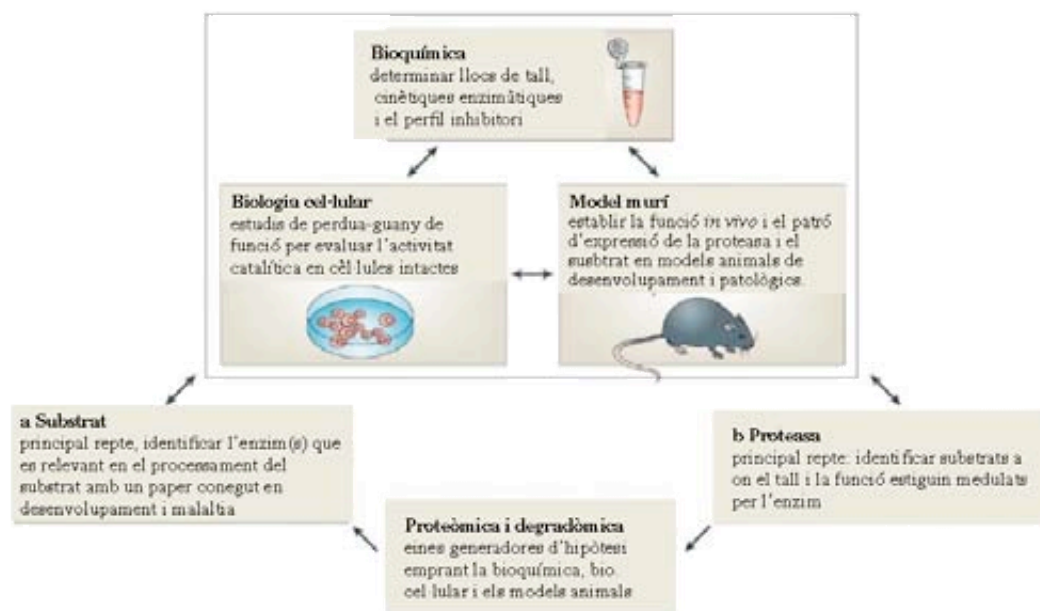
	TIPUS CATALÍTIC					
	total	aspàrtic	cisteín	Metal·lo	serín	treonín
<b>Proteases humana</b>	561	21	148	186	178	28
<b>Proteases ratolí</b>	641	27	163	198	227	26
<b>Proteases rata</b>	626	24	160	192	221	29

**Taula 1. Les proteases.** Una representació dels diferents tipus i del número de proteases segons els seu catabolisme que estan presents en humana, ratolí i rata.

Per entendre el paper biològic d'una proteasa, és necessari descobrir quin són els seus substrats, o degradoma. Però ens trobem que més d'una proteasa pot

processar un únic substrat de manera *in vitro*. Aquí s'obre la qüestió de quines són les proteases que tenen rellevància *in vivo*: “ja que pugui no vol dir que ho faci” (Bergers *et al.* 1999). Per donar un exemple, moltes proteases poden processar el TNF $\alpha$  (Rosendahl *et al.* 1997; Haro *et al.* 2000; Tam *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2004), una citocina proinflamatòria amb un paper fonamental en l'artritis reumatoide, i la quimiocina amb motiu CXC ligand-12 (CXCL12) o factor derivat de cèl·lula estromal 1 $\alpha$ , que té un paper neurotòxic en la demència (Zhang *et al.* 2003). En els dos casos només una proteasa, de les múltiples possibles, dóna en cas de la malaltia el perfil, donant importància al fet de descobrir el candidat correcte per poder dur a terme teràpies dirigides contra ell.

Combinant informació provinent de diferents tècniques per caracteritzar una proteasa es facilita el coneixement de l'enzim. Hi ha dues possibles aproximacions teòriques en l'estudi de les proteases que són: a) l'estudi d'un enzim implicat en el desenvolupament o en una patologia, b) l'estudi d'un enzim orfe. a) Normalment es comença per purificar l'activitat de l'enzim en un sistema cel·lular i fer l'empremta amb l'ajuda d'estimuladors i d'inhibidors. b) Si es comença amb una proteasa orfe primer és trobar el nou substrat i la funció. Els models animals ens poden ajudar a realitzar aquesta feina, i després les aproximacions bioquímiques i cel·lulars ens ajudaran a confirmar les nostres hipòtesis. Però amb l'ajut de la proteòmica podrem fer una caracterització més fina d'aquests parells. La repetició d'aquests cicles de caracterització i la millora de la proteòmica juntament amb la generació d'activadors i/o inhibidors més selectius ens donaran més informació sobre els substrats més selectius i rellevants per al nostre enzim. A continuació es donen una sèrie d'aproximacions per trobar i validar els substrats i les seves proteases (Figura 3).



**Figura 3.** Representació de les diferents aproximacions que podem portar a terme per descobrir parells proteasa-substrat (modificat de (Overall and Blobel 2007)).

### 3.1. Aproximacions bioquímiques.

El primer pas en l'anàlisi d'una proteasa és donar les seves propietats bioquímiques, i aquestes proveiran de les eines per poder assolir posteriorment la caracterització *in vivo* i poder generar la seva empremta característica. És necessària la proteasa purificada i el substrat, lliures d'impureses per poder determinar el lloc de tall consens del substrat, per desenvolupar un assaig i per poder determinar les seves cinètiques enzimàtiques d'acció i d'inhibició. Moltes han estat purificades amb l'ajuda del coneixement del processament del substrat simplement purificant l'acció enzimàtica (Davie and Neurath 1955; Davie and Ratnoff 1964; Macfarlane 1964; Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997). Una vegada identificada i seqüenciada, es requereix la síntesi de la proteasa recombinant per confirmar que l'activitat proteolítica sobre el substrat no es deu a contaminacions. Malgrat tot, la contaminació es pot donar també en sistemes recombinants, llavors és aconsellable l'obtenció i purificació d'un mutant catalíticament inactiu en el mateix sistema.

#### 3.1.1. Identificació del lloc de tall.

Per trobar l'empremta molecular i la caracterització bioquímica d'una proteasa es fa necessari identificar la seqüència peptídica de tall que la proteasa processa (Schilling and Overall 2007). En el cas d'enzims orfes aquesta tasca pot ser difícil. Una de les aproximacions és incubar la proteasa orfe amb una sèrie de substrats coneguts per a altres proteases (Loechel *et al.* 1998; Roghani *et al.* 1999; Zou *et al.* 2004). També poden ser estudiades llibreries de pèptids que contenen seqüències de processament per proteases. La proteïna o substrat candidat pot ser analitzat mitjançant SDS-PAGE, per espectrometria de masses (MS) o per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) (Roghani *et al.* 1999; Zou *et al.* 2004). La determinació de la taxa d'intercanvi ( $k_{cat}/K_m$ ) dels substrats potencials ens pot donar una idea de si la proteasa pot tallar-los *in vivo* (Moss *et al.* 1997; McQuibban *et al.* 2000; Overall 2004). Els substrats que siguin identificats mitjançant tècniques bioquímiques *in vitro* poden ser candidats funcionals *in vivo*, però al no existir una relació directa han de ser validats en models cel·lulars i animals.

Es poden fer servir diferents aproximacions per poder identificar la seqüència consens de tall, com l'ús de diferents tipus de llibreries (Matthews and Wells 1993; Smith *et al.* 1995; Rosse *et al.* 2000; Turk and Cantley 2004), o la mutagènesi del lloc de tall (Cunningham *et al.* 1990). Aquestes tècniques només criben per llocs consens curts d'unió i de tall, en part per limitar el nombre de seqüències possibles (Zhu *et al.* 2003). Les llibreries posicionals, a on alguns residus estan fixats mentre que els adjacents són aleatoritzats, permeten el cribatge de seqüències més llargues. Aquestes llibreries solubles (Thornberry *et al.* 1997) han estat millorades al fixar-les a vidre (Salisbury *et al.* 2002) i en "arrays" (Turk *et al.* 2001; Barrios and Craik 2002). Una altra alternativa és combinar aquests pèptids aleatoritzats amb grups químics formant un inhibidor

de proteases sintètic. Aquests poden incorporar residus detectables com fluorocroms o biotina, formant així compostos pel seguiment basats en l'activitat que poden donar perfils específics i també generar, al mateix temps, inhibidors selectius (Greenbaum *et al.* 2002). Una precaució a tenir en compte és que els residus descoberts a través de les llibreries peptídiques són els que queden N-terminal al lloc de tall, i només unes poques tècniques poden esbrinar el residu de tall (Turk *et al.* 2001; Barrios and Craik 2002). Malgrat que la tècnica del “fag display” ens dona informació sobre la seqüència, no ens dona el residu de tall. Altres limitacions sorgeixen per que, p. ex., algunes ADAM o MMPs no tenen una seqüència consens de tall definida (Becherer and Blobel 2003; Gomis-Ruth 2003). Altres proteases, com ADAMTS4 i les MMPs col·lagenolítiques requereixen d'un lloc extern a la seqüència de tall, en aquest cas per processar l'agrecà i la triple hèlix de col·lagen (Fields 1991; Overall 2002), respectivament.

El lloc consens de tall per a una determinada proteasa es pot fer servir per cercar candidats a les bases de dades, però aquesta aproximació només ha servit per uns quants cassos concrets (Turk *et al.* 2001; Lopez-Otin and Overall 2002; Overall *et al.* 2002). S'ha de tenir en compte que el nombre de possibles llocs candidats superarà de molt el nombre de llocs reals, ja que només uns pocs seran accessibles per la proteasa (Fields 1991; Overall 2002). Una altra restricció de la bioinformàtica és que els llocs de tall que presentin una cinètica no òptima no seran identificats. Alguns processos biològics importants utilitzen aquest mecanisme de regulació. Un exemple és el tall lent del col·lagen per part de les MMPs, que és útil per mantenir la integritat tissular durant la remodelació homeostàtica. Els llocs externs de reconeixement que porten al tall del lloc catalític poc favorable (McQuibban *et al.* 2000; Overall 2002; Overall *et al.* 2002) com també a la colocalització i coexpressió de la proteasa i el seu substrat *in vivo* tampoc són reconeguts en les recerques mitjançant bases de dades. Així, predir substrats a partir de les seqüències consens no acaba de ser una eina acurada degut a les seves limitacions.

### 3.1.2. Cribatge de llocs externs i captura amb dominis catalíticament inactius.

Una millora de les múltiples tècniques bioquímiques existents és l'ús de les tècniques genètiques no esbiaixades de cribatge del doble híbrid de llevat a on els dominis de proteasa inactius són immobilitzats per capturar proteïnes d'unió que podrien ser substrats. Per proteases multidomini, els llocs externs d'unió poden validar substrats amb una baixa  $k_{cat}/K_m$  *in vitro* en substrats funcionals *in vivo*, com s'ha pogut demostrar en el tall de quimiocines (Overall *et al.* 2002), col·lagen (Fields 1991; Overall 2002), i PAPP-A (proteasa plasmàtica associada a embaràs A), de la IGFB-4 (proteïna d'unió al factor de creixement similar a la insulina 4) i la IGFBP-5 per part de les MMPs (Boldt *et al.* 2004). Aquestes interaccions poden ser descobertes mitjançant el cribatge de molècules que interaccionen amb els llocs externs d'unió, a on aquests funcionen com esquer. Les proteïnes identificades amb aquest mètode i seguint una posterior validació



bioquímica podrien ser confirmades com a substrats. En un principi va ser mitjançant l'ús del doble híbrid de llevat (McQuibban *et al.* 2000; Overall *et al.* 2002), però ara per portar a terme cribatges massius s'immobilitza el lloc extern d'unió en fase sòlida i es dur a terme un anàlisi de proteïnes que interaccionen a partir de mostres complexes mitjançant MS/MS (Lopez-Otin and Overall 2002). La captura mitjançant un mutant catalíticament inactiu fa servir el domini proteasa inactiu com esquer i capturar proteïnes que s'uneixen al centre actiu (Lopez-Otin and Overall 2002). Amb aquest mètode es va identificar WISP2 (proteïna de la cascada de senyalització WNT1 tipus 2) com a substrat de MT1-MMP (metal·loproteasa de membrana tipus 1) en un cribatge de doble híbrid de llevat (Overall *et al.* 2004). Però cal dir que no totes les proteases són susceptibles de seguir aquesta metodologia, degut a una elevada  $K_m$  o bé, per un centre actiu petit i sense característiques essencials per interaccionar. Al nostre laboratori es va portar a terme el cribatge de llocs externs per a ADAMTS1 per torbar proteïnes d'unió, essent la seva caracterització i posterior validació part d'aquest treball.

### **3.2. Aproximacions en sistemes cel·lulars.**

Aquesta aproximació no només és bona per validar els descobriments fets amb sistemes bioquímics, proteòmics, o animals, si no que és una eina imprescindible i molt valuosa que ens permetrà obtenir informació de com es comporta la proteasa nativa en un sistema cel·lular fisiològic. Per posar un parell d'exemples, la fibronectina i el TNF $\alpha$  són tallats en el tub d'assaig per la MT1-MMP (Tam *et al.* 2004) i per ADAM9 (Zheng *et al.* 2004) respectivament, però no són substrats en el medi cel·lular. A més, les modificacions postraduccionalis i la localització subcel·lular poden fer que la proteasa i el substrat no colocalitzin.

#### **3.2.1. Perfil d'activació i d'inhibició.**

Coneixem com empremta al criteri informatiu que relaciona la resposta a activadors i a inhibidors d'una proteasa amb el substrat en un sistema cel·lular. Com a exemple il·lustratiu, si assumim que una proteasa és responsable d'una activitat en un sistema cel·lular, llavors aquesta activitat tindrà la mateixa empremta que l'enzim. Si una deleció de l'activitat de l'enzim dóna lloc a una activitat compensatòria per part d'un altre enzim, definida com un augment de l'activitat o de l'expressió d'aquest altre enzim, l'empremta de l'activitat llavors haurà canviat en el genoanul·lat (KO) respecte al silvestre, i aquesta correspondrà a la de l'enzim que està compensant. En el cas de redundància funcional, que és quan dos o més enzims poden dur a terme la mateixa activitat, l'empremta de l'activitat serà la combinació de les empremtes dels enzims en proporció a la seva contribució a l'activitat total observada. Si els enzims són bloquejats i no hi ha compensació, llavors l'activitat hauria de desaparèixer. Però si l'empremta

segueix igual, llavors hi ha un altre enzim candidat que, en principi, és més rellevant.

És important saber que dintre de la xarxa de proteases existeixen cascades de diferents classes i de diferents famílies (Overall and Kleifeld 2006), així la inhibició de varies podrà bloquejar el processament d'un determinat substrat. Per exemple, substrats processats per ADAMs o MMPs activades per convertases de la família de la furina (Loechel *et al.* 1999; Roghani *et al.* 1999) tindran un processament baix si es fan servir inhibidors de la serín endopeptidasa furina o inhibidors de MMPs.

Amb l'ús curós de l'empremta d'activitat es poden planificar els experiments que ens permetran relacionar-la amb la proteasa i amb el substrat *in vivo*. Però per realitzar-ho és necessari un sistema cel·lular que ens permeti el seguiment de l'empremta d'activitat del nostre enzim, que podria ser mitjançant les diferències en el processament entre les cèl·lules silvestres i les genoanul·lades (pèrdua de funció) (Peschon *et al.* 1998; Sahin *et al.* 2004), o bé entre les sobreexpressores (guany de funció) i les sobreexpressores d'un mutant catalíticament inactiu (Zheng *et al.* 2004; Horiuchi *et al.* 2007).

### 3.2.2. Estudis de pèrdua de funció.

Aquests tipus d'estudi portats a terme comparant cèl·lules d'animals KO per la proteasa amb les d'animals silvestres són considerats el millor estàndar per relacionar una proteasa amb el seu substrat en un sistema cel·lular. A més són preferibles als estudis realitzats amb cèl·lules immortalitzades, ja que aquestes poden presentar un degradoma completament diferent a les cèl·lules normals (Hartmann *et al.* 2002; Sahin *et al.* 2004). Un control importantíssim serà llavors la reintroducció de la proteasa en les cèl·lules KO, per restablir el fenotip. Si el nivell de substrat no és suficient per poder detectar el tall, es pot afegir el substrat de manera exògena, com per exemple s'ha fet en els estudis de processament de quimiocines per part de MMPs (Zhang *et al.* 2003). En el cas de substrats ancorats a membrana s'ha fet servir la sobreexpressió de la forma silvestre o d'una forma amb una etiqueta consistent amb fosfatasa alcalina que facilita la seva detecció (Peschon *et al.* 1998; Hinkle *et al.* 2004; Sahin *et al.* 2004). L'ús d'anticossos enfront dels nous epítops apareguts al substrat després del processament representa una gran ajuda (Billinghurst *et al.* 1997; McQuibban *et al.* 2000; Overall *et al.* 2004) a l'hora de seguir el processament *in vivo*. Si el KO no estigués disponible o en el cas de l'ús de cèl·lules humanes, els siRNA (àcid ribonucleic petit d'interferència) representen també una molt bona eina per portar a terme aquest tipus d'estudis (Gschwind *et al.* 2003). Un altre tipus d'aproximació seria l'ús d'inhibidors de l'activitat proteasa per bloquejar la seva acció sobre el substrat candidat (Bech-Serra *et al.* 2006) però el fet que aquests siguin poc específics obliguen a validar els resultats obtinguts amb altres aproximacions.

### 3.2.3. *Estudis de guany de funció.*

Aquest tipus d'estudis representen una immillorable alternativa als estudis de pèrdua de funció en la recerca de substrats candidats per a una proteasa o en el cas d'enzims orfes, essent el primer pas per trobar l'empremta d'activitat d'aquests (Tam *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2004; Canals *et al.* 2006; Butler and Overall 2007; Horiuchi *et al.* 2007). Una limitació important a aquest tipus d'experiments és que mitjançant la sobreexpressió de la proteasa pot ser que es doni el processament de substrats que en condicions normals no es donaria degut a coeficients enzim-substrat massa elevats, o per que normalment no es coexpressarien en un sistema cel·lular (Overall and Kleifeld 2006). De tota manera, si la sobreexpressió d'un enzim provoca un augment en el processament d'un substrat, si a més es coexpressen fisiològicament o està desregulat en el cas d'una malaltia associada aquest enzim té moltes probabilitats de contribuir al tall.

Pot succeir que, malgrat la sobreexpressió, no observem activitat, llavors podria ser: o que l'enzim no està en la seva forma activa, o bé que necessita d'un cofactor. Per solucionar-ho pot ser necessària l'expressió en un altre sistema cel·lular. Si l'enzim en concret només té una contribució mínima al processament que és portat a terme per una altra activitat dominant, pot ser útil l'ús de cèl·lules KO per a aquesta activitat dominant (Zheng *et al.* 2004; Horiuchi *et al.* 2007). L'ús d'activadors com els esters de forbol, ionòfors de  $Ca^{2+}$  (Nagano *et al.* 2004; Horiuchi *et al.* 2007), l'estimulació de receptors acoblats a proteïna G (Prenzel *et al.* 1999), estimulació de la via de la MAPK (proteïna cinasa associada a mitogen) (Fan and Derynck 1999), poden ser necessaris en el cas d'estudis en enzims molt regulats. Com que estímuls diversos inferiran en enzims diversos, és molt important limitar quin enzim estem estimulant (Nagano *et al.* 2004; Horiuchi *et al.* 2007). Així doncs, la gran aportació dels estudis de guany de funció és la de trobar possibles candidats a substrat, que posteriorment hauran de ser validats *in vivo*.

### 3.3. *Ús de la proteòmica.*

Recentment hem pogut assistir al desenvolupament de les tècniques basades en la proteòmica que ha permès una millora substancial en el coneixement de les activitats de les proteases sobre els seus substrats.

Com que els resultats obtinguts a partir dels estudis bioquímics poden diferir dels obtinguts en sistemes *in vivo*, una de les millors maneres de trobar substrats fisiològicament rellevants és trobar els productes de tall en sistemes cel·lulars complexos (Tam *et al.* 2004). En aquest cas, les proteïnes estan en la seva forma nativa, i en el seu context cel·lular correcte, possibilitant la interacció amb altres components que modulin la seva activitat proteolítica. Aquesta complexitat pot ser analitzada holísticament amb la proteòmica.

### 3.3.1. Identificació de substrats amb proteòmica basada en gels de dues dimensions (2D).

Mitjançant la comparació per superposició dels espots que deixen en gels de dues dimensions (separats per diferencial de pes molecular i per diferencial de punt isoelèctric) dues mostres distintes marcades diferencialment amb l'ús de fluorocroms (p. ex., una d'elles amb presència de la proteasa i l'altra sense) es poden identificar els productes de degradació produïts per la proteasa, com s'ha fet amb la MT1-MMP (Hwang *et al.* 2004), o amb la caspasa 3 *in vitro* (Lee *et al.* 2004). Com que es fa necessària una quantificació fiable de la quantitat relativa dels punts entre gels, el DIGE (electroforesis en gel de 2D amb fluorescència) és una bona aproximació per controlar l'estandardització interna dels gels i s'ha empleat per identificar substrats de proteases de paràsits, gramzims A i B, ADAM10, ADAM17 i ADAMTS1 (Bredemeyer *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2004; Bech-Serra *et al.* 2006; Canals *et al.* 2006). Les mostres en presència i absència de la proteasa són marcades amb fluorocroms diferents, ajuntades i separades per electroforesi. Després de sobreposar les imatges dels distints marcatges fluorescents els substrats i els productes de tall són identificats com a punts tenyits individuals. L'espectrometria de masses o la degradació d'Edmans ens donaran informació de la seqüència d'aquests punts. Els inconvenients d'aquesta tècnica provenen de les limitacions de les dues dimensions: les proteïnes molt grans o molt petites no es separen correctament, o les que tenen un caràcter altament hidrofòbic, àcid o bàsic. L'abundància relativa també és un escull, però la simplicitat conceptual i la relativa facilitat en la infraestructura fan d'aquesta una tècnica molt bona per trobar substrats que estiguin ben representats.

### 3.3.2. Aproximacions proteòmiques mitjançant cromatografia líquida.

L'ús de la cromatografia líquida multidimensional (MuDIPT) (Washburn *et al.* 2001) en la resolució dels pèptids tripsinitzats, prèviament a la seqüenciació per MS/MS augmenta i millora l'espectre peptídic, donant millors resultats en la cobertura total peptídica. Malgrat que la cromatografia líquida no és una tècnica quantitativa i no permet diferenciar pèptids provinents d'una mostra mesclada de diferents fonts, mitjançant la biotinització de les proteïnes de membrana ha permès el descobriment de pèptids processats proteolíticament després d'estimular les cèl·lules amb esters de forbol (Ahram *et al.* 2005). El submostreig, que es defineix com la impossibilitat de poder identificar cada pèptid en una mescla complexa, dona lloc a que dues mostres no poden ser comparades de forma fiable per poder identificar la pèrdua o la generació de pèptids com a conseqüència de l'activitat proteolítica. Per solucionar aquest aspecte explicarem el marcatge isotòpic que ens permetrà diferenciar pèptids provinents de diferents mostres.

### 3.3.3. Marcatge amb isòtops de massa.

Guo *et al.* (Guo *et al.* 2002) va demostrar que podia diferenciar aquelles proteïnes transmembra tallades constitutivament d'aquelles que eren tallades de manera induïda mitjançant el marcatge de les cisteïnes (Cys) amb deuteri<sub>0</sub> o deuteri<sub>5</sub> N-etil-iodoacetamida. En la tècnica ICAT (Marcatge d'afinitat per isòtops) es marquen totes les Cys mitjançant un isòtop de carboni o deuteri lleuger o pesat, així es poden diferenciar dues mostres amb processaments diferenciats. Així els pèptids que són tallats i s'acumulen al medi presentaran un coeficient de marcatge de massa superior a 1, i els que siguin degradats en el medi extracel·lular presentaran un coeficient de marcatge de massa inferior a 1 (Tam *et al.* 2004; Butler and Overall 2007). Un exemple és el descobriment recent de molts substrats de la MT1-MMP i d'efectes indirectes per factors quimiotàctics i de senyalització (Tam *et al.* 2004). Una altra aproximació és el marcatge isotòpic per quantificació relativa i absoluta (iTRAQ) que marca les amines primàries en una mostra ja tripsinitzada. El marcatge és químicament idèntic però es fragmenten de manera diferent després de la col·lisió MS/MS, generant perfils espectromètrics diferents. Així existeixen 8 tipus de marcatges diferents per iTRAQ que ens permetran diferenciar fins a 8 proteomes diferents, a més la comparació dels pics ens permetrà una quantificació relativa. Aquesta tècnica ens permet diferenciar moltes més proteïnes que per l'ICAT ja que es marquen moltes més amines primàries per pèptid tripsinitzat. Això representa una millora substancial en la identificació dels pèptids generats per l'acció d'una proteasa. Així s'han identificat nous substrats de la MMP-2 expressant la proteïna com enzim actiu a concentracions tan baixes com les fisiològiques en cèl·lules mmp2<sup>-/-</sup> {Dean, 2007 #655}. Es poden dur a terme també estudis d'activitat proteolítica intracel·lular (Xia and Wolfe 2003).

A més, la recerca dels fragments generats per l'activitat proteolítica està limitada a les bases de dades existents. Però si es modifiquen els procediments generals, es poden modificar les amines primàries del neo-N-terminal i diferenciar-les de les amines primàries presents en els residus laterals lisina (Lys) de diferents maneres (Van Damme *et al.* 2005); (McDonald *et al.* 2005). Aquestes tècniques però tenen la limitació de només oferir un pèptid per proteïna, necessitant d'una validació posterior.

### 3.3.4. Peptidòmica.

Com que l'aproximació per proteòmica és molt complexa de dur a terme *in vivo*, es pot aproximar mitjançant l'estudi dels pèptids generats per activitat proteolítica en sèrum o cervell, prèvia eliminació dels més abundants (albúmina, anticossos, ...), i posterior resolució per MS/MS. Encara que a l'hora de relacionar proteases amb els seus substrats és molt complicat discernir quins són els efectes directes o indirectes comparant els perfils trobats en un ratolí silvestre amb el KO per a aquesta proteasa (Pan *et al.* 2006).

### 3.4. Models animals.

Aquests són essencials per validar i estudiar els efectes fisiològics i patològics dels resultats obtinguts amb les tècniques descrites anteriorment. A més poden donar noves pistes per funcions desconegudes. I creuant ratolins KO per la proteasa amb models transgènics per la generació espontània o induïda de tumors s'obté informació molt valuosa del paper de la proteasa en el desenvolupament del tumors i del seu paper com a diana o anti-diana terapèutica (Egeblad and Werb 2002; Gocheva *et al.* 2006; Overall and Kleinfeld 2006).

#### 3.4.1. Anàlisis d'expressió.

El coneixement del perfil d'expressió d'una proteasa ens dona informació d'on i per tant com pot funcionar aquesta (Joyce *et al.* 2004) i com pot ser la co-expressió amb el substrat (Lynch *et al.* 2005; Willem *et al.* 2006). Els perfils d'expressió poden ser determinats mitjançant "microarrays" d'oligonucleòtids o DNA (Overall *et al.* 2004; Lynch *et al.* 2005; Acuff *et al.* 2006), però la hibridació *in situ* i la immunohistoquímica ens dona el perfil d'expressió espaciotemporal (Lynch *et al.* 2005; Willem *et al.* 2006), i a més ens permetran observar àrees d'elevada expressió que mitjançant tècniques d'anàlisi en "xip" serien subestimades (Peduto *et al.* 2006). Els teixits dels animals KO són uns excel·lents controls per poder descartar possibles falsos positius en l'expressió (Saghatelian *et al.* 2004). Les sondes basades en activitat poden localitzar específicament la situació de la proteasa en estat actiu (Joyce *et al.* 2004) mitjançant tècniques d'imatge *in vivo* i *ex vivo* o per gels desnaturalitzats i MS (Gomis-Ruth 2003; Saghatelian *et al.* 2004).

#### 3.4.2. Validació de parells enzim-substrat.

Una de les fites en els models animals és confirmar els resultats obtinguts sobre la relació enzim-substrat trobats amb les aproximacions bioquímiques i cel·lulars. En l'animal KO per la proteasa, el substrat no hauria de ser tallat, i haurien de ser observats els efectes predits en el desenvolupament o en contra de la patologia (Glasson *et al.* 2005; Stanton *et al.* 2005). Malgrat això, no sempre els estudis de KO són directes i una conseqüència de la falta de processament del substrat és que es pot veure modificada l'activitat del substrat (Ruuls *et al.* 2001; Yamazaki *et al.* 2003). A més, com que les proteases usualment tenen més d'un substrat, que poden incloure altres proteases o inhibidors de la xarxa de proteases, els efectes seran la suma de varis defectes de processament i les proteases que són multimodulars tindran funcions que són independents de la seva acció catalítica. Indicar també que si l'alteració del processament implica

xarxes de senyalització que modulen l'expressió d'altres proteases, el tema encara es complica més (Ge and Greenspan 2006; Overall and Kleifeld 2006).

### 3.4.3. Ratolí genomodificat (*knock-in*) i KO condicional.

Per poder estudiar tot el que hem dit abans pot ser necessària la generació de varies mutacions en ratolí. Si per exemple es vol esbrinar com el processament pot afectar l'activitat del substrat es pot fer necessària la creació d'un animal que tingui mutada la zona de tall (Ruuls *et al.* 2001; Yamazaki *et al.* 2003). En l'animal genomodificat el perfil d'expressió fisiològica del substrat es manté, representant un avantatge damunt d'un animal que sobreexpressa un substrat no processable. Estudis cel·lulars ens permetran observar si aquest mutant no introdueix un nou lloc de processament, o bé implica un desplaçament del lloc de tall a un altre menys òptim (Alfalah *et al.* 2001). Si el fenotip observat en el knock-in del lloc de tall és similar al fenotip de l'animal KO (Jackson *et al.* 2003; Yamazaki *et al.* 2003), és una indicació més de la relació enzim-substrat, però tenint en compte que fenotips similars no impliquen una relació mecànica. Un fenotip similar podria ser una indicació a més, de que el substrat podria ser el dominant. En aquest cas la possibilitat de modular la funció de l'enzim és molt atractiva si a més és el substrat dominant en relació amb una patologia.

## 4. Les ADAMTS.

### 4.1. *Que són?*

Kuno *et al.* varen donar el nom d'ADAMTS1 ("a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) (Kuno *et al.* 1997) al primer membre en ratolí d'un grup de proteases secretades. A dia d'avui ja s'han descrit 19 membres tant en humans com en ratolins (veure taula 2). Les ADAMTS formen una branca de la subfamília M12B de les adamalines, gràcies a la similitud del seu domini metal·loproteasa amb el de les metal·loproteases del verí de serp (reprolisines). Les adamalines són també una part de les metzincines (proteases zinc dependents) que inclouen les matricines (metal·loproteases de matriu; MMPs), les astacines i les serralines (Kaushal and Shah 2000). Les ADAMTS estan molt emparentades amb les ADAM (a desintegrin and metalloproteinase) que estan implicades en el tall de l'ectodomini o activació de múltiples molècules de superfície que inclouen factors de creixement i molècules d'adhesió (Seals and Courtneidge 2003). Però a diferència d'aquestes que són, exceptuant formes variants de la ADAM-12 i -28, totes proteïnes transmembrana,

les ADAMTS són proteïnes secretades, algunes de les quals s'uneixen a components de la ECM (Kuno and Matsushima 1998; Tang 2001).

Codi MEROPS	Proteasa	Gen Humà	mRNA Acc.	Locus	Gen Ratolí	mRNA Acc.	Locus
M12.222	ADAMTS1	ADAMTS1	NM_006988	21q21	Adamts1	NM_009621	16C3
M12.301	ADAMTS2	ADAMTS2	NM_014244	5q35	Adamts2	NM_175643	11B1
M12.220	ADAMTS3	ADAMTS3	NM_014243	4q21	Adamts3	BAC27597	5E2
M12.221	ADAMTS4	ADAMTS4	NM_005099	1q23	Adamts4	NM_172845	1H2
M12.225	ADAMTS5/11	ADAMTS5	NM_007038	21q21	Adamts5	NM_011782	16C3
M12.230	ADAMTS6	ADAMTS6	NM_014273	5q12	Adamts6	NM_175496	13D1
M12.231	ADAMTS7	ADAMTS7	NM_014272	15q24	Adamts7	XM_135041	9E3
M12.226	ADAMTS8	ADAMTS8	NM_007037	11q24	Adamts8	NM_013906	9A5
M12.021	ADAMTS9	ADAMTS9	NM_020249	3p14	Adamts9	XM_204236	6D3
M12.235	ADAMTS10	ADAMTS10	NM_030957	19p13	Adamts10	NM_172619	17B2
M12.237	ADAMTS12	ADAMTS12	NM_030955	5p13	Adamts12	NM_175501	15A2
M12.241	ADAMTS13	ADAMTS13	NM_139025	9q34	Adamts13	XM_205053	2A3
M12.024	ADAMTS14	ADAMTS14	NM_080722	10q22	Adamts14	XM_137117	10B4
M12.025	ADAMTS15	ADAMTS15	NM_139055	11q24	Adamts15	XM_134720	9A5
M12.026	ADAMTS16	ADAMTS16	NM_139056	5p15	Adamts16	NM_172053	13C1
M12.027	ADAMTS17	ADAMTS17	NM_139057	15q26	Adamts17	BU152260	7C
M12.028	ADAMTS18	ADAMTS18	NM_139054	16q23	Adamts18	NM_172466	8E1
M12.029	ADAMTS19	ADAMTS19	NM_133638	5q23	Adamts19	NM_175506	18D2
M12.246	ADAMTS20	ADAMTS20	NM_025003	12q12	Adamts20	NM_177431	15F1

**Taula 2.** Representació de les ADAMTSs humanes i de ratolí amb els seu codi MEROPS (Rawlings *et al.* 2006), el nom de la proteasa, el número d'accés al genbank i el locus a on es troba.

#### 4.2. L'estructura en dominis de les ADAMTS.

L'estructura prototípica de les ADAM, ADAMTS, i MMP es representa en la figura 4 a on en comú tenen:

- En rosa tenim el pèptid senyal i el prodomini que permetrà la latència del enzim. És interessant que en el cas de la proteïna MIG-17 de *Caenorhabditis elegans*, una proteasa amb homologia a les ADAMTS de mamífer és el prodomini l'encarregat de la localització d'aquesta {Ihara, 2007 #656}.
- En vermell es representa el domini catalític de metal·loproteasa amb el motiu d'unió de zinc del tipus reprotolisina (HEXXHXXG/N/SXXHD), i una metionina en la seqüència V/IMA/S, o "Met-turn"/gir-Met per sota de la tercera histidina que uneix zinc.

Per a les ADAMs i les ADAMTSs:

- En verd es representa el domini semblant a desintegrina que mostra similitud en la seqüència amb les desintegrines solubles del verí de serp, família de polipèptids que poden presentar una seqüència de reconeixement d'integrines RGD (arginina, glicina, àcid aspàrtic) (Perutelli 1995). Encara que no s'ha trobat aquest motiu en cap de les ADAMTS i tampoc existeix cap evidència de que aquestes s'uneixin a integrines.



Específic per a les ADAMTSs tenim:

- En vermell es mostra el motiu similar a trombospondina de tipus I (TSR), originalment descrit en la trombospondina 1 i 2.
- En groc es mostra el motiu ric en cisteïnes amb una elevada homologia en la seqüència entre les ADAMTS, que conté 10 cisteïnes.
- Una regió espaiadora representada en gris sense característiques estructurals conegudes.
- Un número variable de repeticions TSR a la regió C-terminal que van de 14 en el cas d'ADAMTS20 o de la isoforma llarga d'ADAMTS9 (Llamazares *et al.* 2003; Somerville *et al.* 2003) a cap en el cas d'ADAMTS4 (Tortorella *et al.* 1999).

Específic per a les ADAMs:

- En violeta tenim un domini similar al factor de creixement epidèrmic (EGF) possiblement implicat en la unió a altres proteïnes
- En blau tenim la regió transmembrana.
- En lila tenim la regió citosòlica amb funcions d'interacció i senyalització.

I per últim específic per a les MMPs:

- Tenim en blau la regió frontissa i en taronja la regió hemopexina implicades en la unió a la ECM i en l'especificitat/unió al substrat (Overall 2002).

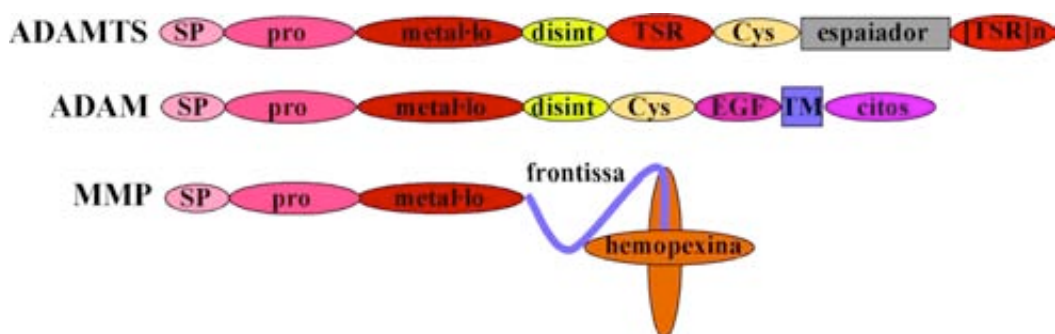


Figura 4. Estructura modular de les ADAMTS, ADAM i de les MMPs.

Una característica important de les ADAMTS és l'habilitat de varies ADAMTS d'unir-se a la ECM (Kuno and Matsushima 1998; Somerville *et al.* 2003; Kashiwagi *et al.* 2004). A partir de que aquesta característica no ha estat ben definida en cada cas, existeix evidència de la implicació de les repeticions TSR. Kuno *et al.* (Kuno and Matsushima 1998) utilitzant construccions que deleccionaven parts de l'extrem C-terminal d'ADAMTS1 demostraren la implicació de la regió espaiadora i del TSR central i els altres dos C-terminals en la interacció amb la ECM, a més de que les formes madures eren relocalitzades cap al medi de cultiu en el cas de l'addició d'heparina, implicant directament la interacció a proteoglicans heparan sulfatats. En el cas d'ADAMTS4, aquesta s'uneix a l'agrecà a través del seu únic TSR. Un pèptid que consta del lloc d'unió putatiu per glicosaminoglicans (GAG) i el CD36, del domini TSR d'ADAMTS4, bloqueja la seva unió amb l'agrecà, i els mutants de deleció d'aquest domini són

incapaços de tallar l'agrecà (Tortorella *et al.* 2000). La unió d'ADAMTS4 amb la ECM s'ha atribuït a la interacció de la regió espaiadora amb el domini C-terminal de la fibronectina (Hashimoto *et al.* 2004).

Les ADAMTS pateixen un processament N-terminal, en primer lloc, per una peptidasa de pèptid senyal durant la seva traducció i trànsit de la proteïna a través del reticle endoplàsmic, i a continuació del seu prodomini. Es considera de manera general que el prodomini actua preservant la latència de l'enzim, però és important pel plegament correcte de la proteïna i la seva secreció (Milla *et al.* 1999; Cao *et al.* 2000). Totes les ADAMTS conegudes tenen un lloc de tall per SPC (proteïna convertasa similar a la subtilisina), i amb l'excepció d'ADAMTS10 i ADAMTS12, totes tenen seqüències de reconeixement per furina (també coneguda com a SPC1 o PACE) seguides del consens RXR/KR (Bergeron *et al.* 2000). El processament del prodomini ha estat estudiat a ADAMTS1 (Rodríguez-Manzaneque *et al.* 2000), ADAMTS7 (Somerville *et al.* 2004), ADAMTS9 (Somerville *et al.* 2003) i ADAMTS12 (Cal *et al.* 2001) utilitzant cèl·lules deficientes en furina, i en tots els casos la pèrdua del prodomini es va veure completament o molt severament inhibida, restaurant el fenotip transfectant amb furina. Per a ADAMTS4 s'ha observat la seva colocalització intracel·lular amb la furina (Wang *et al.* 2004). El processament possiblement ocorre en el trans-golgi, ja que és inhibit pel tractament amb brefeldina. Malgrat tot, la furina no és l'únic enzim que el dur a terme, ja que en el cas d'ADAMTS4 el seu processament es dona en la línia cel·lular RPE40, deficient en aquest enzim, essent possible que un altre SPC o una serín proteasa amb una especificitat similar a aquestes sigui la responsable del processament (Wang *et al.* 2004).

El prodomini de les ADAMTS no té per que funcionar de la mateixa manera com ho fa en el cas de les MMPs, a on la cisteïna conservada en el motiu PR $\underline{C}$ GV $\underline{P}$ D coordinada amb l'àtom de zinc catalític manté la latència enzimàtica, el tall del prodomini dona el canvi de cisteïna (Nagase and Woessner 1999). Només sis de les ADAMTSs (ADAMTS1, 6, 7, 10, 12 i 15) tenen una cisteïna en el prodomini dintre de la seqüència XX $\underline{C}$ GV $\underline{X}$ D que s'assembla poc al canvi de cisteïna de les MMPs (Van Wart and Birkedal-Hansen 1990). A més, sembla que algunes ADAMTS, com la ADAMTS7 i la ADAMTS13 poden ser catalíticament actives amb el prodomini (Majerus *et al.* 2003; Somerville *et al.* 2004).

### **4.3. El processament C-terminal afecta l'especificitat de substrat i la unió a la ECM.**

El dominis auxiliars C-terminal de les ADAMTSs tenen un profund impacte tant en la especificitat de substrat com per la localització de l'enzim. El processament C-terminal ha estat descrit per ADAMTS1 (Vazquez *et al.* 1999; Rodríguez-Manzaneque *et al.* 2000), ADAMTS4 (Gao *et al.* 2002), ADAMTS8 (Vazquez *et al.* 1999), ADAMTS9 (Somerville *et al.* 2003), ADAMTS12 (Cal *et al.* 2001). El processament es dona a la regió espaiadora (Vazquez *et al.* 1999;

Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000; Flannery *et al.* 2002; Gao *et al.* 2002; Luque *et al.* 2003; Gao *et al.* 2004).

En el cas d'ADAMTS4, el processament C-terminal de la forma de 68 kDa dóna lloc a dues formes de 53 i 40 kDa (Flannery *et al.* 2002; Gao *et al.* 2004), i aquest resulta en un desplaçament de la ECM i un canvi en l'activitat (Gao *et al.* 2002). La forma sencera de 68 kDa és la que té l'activitat agrecanasa més potent de les tres formes (Kashiwagi *et al.* 2004). D'altra banda l'agrecan és tallat a una altra posició per les formes de 53 i 40 kDa (Gao *et al.* 2002) i per proteïnes recombinants que no tenen la regió espaiadora C-Terminal (Kashiwagi *et al.* 2004). Així, la regió espaiadora C-terminal pot inhibir part de l'activitat agrecanasa de la forma d'ADAMTS4 de 68 kDa. A més a més, la forma de 68 kDa es troba ancorada a la ECM, i la pèrdua de la regió espaiadora l'allibera (Flannery *et al.* 2002; Gao *et al.* 2002; Hashimoto *et al.* 2004; Kashiwagi *et al.* 2004). En l'associació amb la ECM està implicada la fibronectina (Hashimoto *et al.* 2004). L'addició de fibronectina exògena inhibeix l'activitat agrecanasa de la forma de 68 kDa, però no en el cas dels mutants que no tenen de la regió espaiadora (Hashimoto *et al.* 2004), indicant que la unió a la ECM pot ser l'element que ajuda a la regió espaiadora C-terminal en modular l'especificitat de substrat. Aquest fet es veu reforçat pel fet que mutants de deleció equivalents a la forma de 53 kDa poden tallar diversos substrats incloent-hi la transferrina carboximetilada, la fibromodulina i la decorina (Kashiwagi *et al.* 2004). Malgrat tot, la repetició TSR del C-terminal d'ADAMTS4 es necessita per la unió de l'enzim als GAG sulfatats units a l'agrecà (Tortorella *et al.* 2000), i l'eliminació d'aquest motiu redueix l'activitat agrecanasa un 99% (Kashiwagi *et al.* 2004), mostrant que la unió a l'agrecà i l'associació a la ECM podrien ser funcions independents de distints dominis d'ADAMTS4, encara que deuen treballar junts pel control de la funció *in vivo*.

Un altre exemple de processament C-terminal afectant la localització i la biodisponibilitat és el d'ADAMTS1, tenint efectes antiangiogènics importants. Hi ha una altra oportunitat a nivell de regulació de l'activitat cel·lular de les ADAMTS en la implicació de proteases específiques en el processament C-terminal. Utilitzant proteïnes recombinants *in vitro*, Flannery *et al.* (Flannery *et al.* 2002) observà processament autocatalític d'ADAMTS4 per generar les dues isoformes processades en C-terminal. Però, un mutant del lloc actiu d'ADAMTS4 és processat correctament quan es transfecta en cèl·lules de condrosarcoma (Gao *et al.* 2004). En aquestes circumstàncies, el processament C-terminal d'ADAMTS4 succeeix a la superfície cel·lular i implica a una proteasa sensible a TIMP-1, recentment identificada com MMP-17 (Gao *et al.* 2002; Gao *et al.* 2004). Així mateix, MMP-2, MMP-8, MMP-15 poden processar de manera C-terminal a ADAMTS1 *in vitro* (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000). El processament C-terminal d'ADAMTS12 és també dependent d'una altra metal·loproteasa ja que és inhibit pel inhibidor derivat del hidroxamat BB94 però no per la mutació del lloc catalític (Cal *et al.* 2001).

#### 4.4. ADAMTS1.

El grup de Kuno *et al.* (Kuno *et al.* 1997), realitzant un cribatge per cercar gens expressat diferencialment en adenocarcinoma de colon caquexigènic murí, va clonar i caracteritzar una proteasa que presentava homologia amb la família de les ADAMs. La va anomenar ADAM-TS1, i presenta una seqüència rica en cisteïnes, i homologia amb la trombospondina-1. Poc després Vázquez *et al.* cercant molècules humanes que tinguessin capacitats antiangiogèniques a través d'un cribatge de molècules que continguessin els motius TSR de la trombospondina varen clonar ADAMTS1 i ADAMTS8 que anomenaren METH-1 i METH-2 respectivament de Metalloprotease i Thrombospondin (Vazquez *et al.* 1999). Presenta després de la regió espaiadora dues repeticions TSR com a característica diferencial amb les altres ADAMTSs. La taula 3 dóna una sèrie de característiques i enllaços relacionats amb aquesta proteasa i la taula 4 les homologies amb algunes de les espècies a on es troba un ortòleg de la proteasa humana.

<b>DADES GENERALS</b>	
<b>Símbol aprovat</b>	ADAMTS1
<b>Nom aprovat</b>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1
<b>Identificació HGNC</b>	HGNC:217
<b>Cromosoma</b>	21q22.1-q22
<b>Noms anteriors</b>	"a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1"
<b>Àlies</b>	C3-C5, METH1, KIAA1346
<b>ENLLAÇOS</b>	
<b>Número d'accés</b>	AF060152
<b>Identificació PubMed</b>	10438512
<b>Identificació OMIM</b>	605174
<b>Identificació Ensembl</b>	ENSG00000154734
<b>RefSeq</b>	NM_006988
<b>Identificació UniProt</b>	Q9UHI8
<b>Enllaç especialitzat</b>	MEROPS:M12.222

Taula 3. Algunes dades i números d'accés bàsics d'ADAMTS1 humana (adaptat de [http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php).)

Kuno *et al.* troben una associació de la proteïna recombinant amb els heparan-sulfats (Kuno *et al.* 1997). Poc després, el mateix grup va trobar que era secretada i que l'ancoratge a la matriu extracel·lular està mediat pel motiu tipus TSR i per la regió espaiadora (Kuno and Matsushima 1998). A través de la sobreexpressió de la forma salvatge en cèl·lules COS-7 i de varis mutants de

deleció que no tenen varies de les regions dels dominis C-terminals d'ADAMTS1 són capaços de mapejar les regions implicades en aquest ancoratge a la matriu. Així troben que són els tres TSR finals i la regió espaiadora i la rica en cisteïnes les que ancoren ADAMTS1 a la matriu (Kuno and Matsushima 1998), i que aquesta unió està lligada a proteoglicans heparan sulfatats com abans ja havien previst.

Poc després es va veure que ADAMTS1 pot formar complexes amb l' $\alpha_2$ -macroglobulina (Kuno *et al.* 1999), proteïna plasmàtica que està descrit que interacciona amb múltiples proteases (Feinman 1994; Nagase *et al.* 1994; Sottrup-Jensen 1994; Loechel *et al.* 1998), implicant l'activitat proteolítica de la proteasa. Mutant el residu Glu (E386Q) del motiu d'unió a zinc (HEXXH), la forma generada és incapaç d'interaccionar amb l' $\alpha_2$ -macroglobulina (Kuno *et al.* 1999). A més per les observacions de les formes expressades en les COS-7 i utilitzant les cèl·lules de carcinoma de colon LoVo, defectives en activitat furina (Takahashi *et al.* 1993) a on aquest processament és defectiu, veuen que és aquesta endopeptidasa la responsable del processament del prodomini (Kuno *et al.* 1999).

Organisme	Gen	Descripció	Similitud amb humana (%)	Número accés NCBI
Ximpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif,	99.69(n) 99.9(a)	473934 XM_531406.2 XP_531406.2
Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Adamts1	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif,	82.29(n) 83.12(a)	79252 NM_024400.1 NP_077376.1
Ratolí ( <i>Mus musculus</i> )	Adamts1	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif,	81.77(n) 83.12(a)	115041, NM_009621.3, NP_033751.2, AA475356, AB001735
Pollastre ( <i>Gallus gallus</i> )	LOC418479	(ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif	73.45(n) 76.55(a)	418479, XM_416687.2, XP_416687.2
Peix zebra ( <i>Danio rerio</i> )	LOC569618	Hipotètic LOC569618	55.76(n) 50.96(a)	569618 XM_693015.1 XP_698107.1

Taula 4. Descripció, tant per cent d'homologia ((n) en nucleòtids i (a) en aminoàcids) i números d'accés de les ADAMTS1 de diferents espècies animals.

#### 4.4.1. La regulació d'ADAMTS1

En relació al desenvolupament embrionari murí l'expressió d'ADAMTS1 està restringida a un subgrup de cèl·lules epitelials en el pàncrees, glàndules exocrines, pulmó i fol·licles pilosos. També es detecten transcrits en la capa de

múscul llis dels vasos sanguinis grans i en una subpoblació de neurones perifèriques (Thai and Iruela-Arispe 2002).

A nivell inflamatori tenim que Kuno *et al.* varen descriure una forta inducció en l'expressió d'ADAMTS1 després d'estimular amb LPS (Kuno *et al.* 1997). El grup de Bongrazio va descriure que cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical expressen el mRNA d'ADAMTS1 quan són sotmeses a estrès de pressió longitudinal (Bongrazio *et al.* 2000) essent aquesta màxima a les 4 hores post estrès. Tots aquests resultats indiquen que ADAMTS1 s'indueix en la inflamació de tipus agut, i no en la crònica, ja que en el cas de la cirrosi hepàtica l'expressió normal d'ADAMTS1 en les cèl·lules endotelials del fetge es veu disminuïda en el cas d'un model animal en rates (Diamantis *et al.* 2000)

Com a proteïna extracel·lular la seva regulació es pot donar a distints nivells: gènic i postraduccional (activació del zimogen i inhibició).

#### 4.4.1.1. A nivell gènic.

En aquest nivell la regulació més coneguda d'ADAMTS1 és en el procés d'ovulació. Hi ha una inducció de l'expressió d'ADAMTS1 provocada per la hormona luteïnizant (LH) en les cèl·lules de la granulosa i les del cumulus en els fol·licles preovulatoris de ratolí (Robker *et al.* 2000), de rata (Espey *et al.* 2000) i d'egua (Boerboom *et al.* 2003). L'expressió d'ADAMTS1 és molt dependent de la progesterona i del seu receptor en les cèl·lules de la granulosa, i aquesta ve induïda per LH (Espey *et al.* 2000; Robker *et al.* 2000). La deficiència en el receptor de la progesterona disminueix dramàticament l'expressió d'ADAMTS1 i mostra un fenotip anovulatori, malgrat es donin normalment l'expansió del cumulus i la luteïnització prèvia (Robker *et al.* 2000). Així tot pareix indicar que ADAMTS1 té un paper important en la mediació dels efectes de la progesterona en l'ovulació. Sembla que el PR s'associa a altres reguladors de la transcripció com C/EBP $\beta$ , NF1-like factor, i Sp1/3 per regular indirectament l'expressió d'ADAMTS1 (Doyle *et al.* 2004).

Se sap que l'administració de LPS (lipopolisacàrid) a ratolins augmenta la seva expressió en fetge i cor (Kuno *et al.* 1997; Thai and Iruela-Arispe 2002), i que també augmenta amb la citocina proinflamatòria IL-1 (Kuno *et al.* 1997; Ng *et al.* 2006). Aquest fet també succeeix en un model de condrosarcoma (Kalinski *et al.* 2007). La seva expressió es veu inhibida per la citocina TGF- $\beta$ 1 en les cèl·lules de decidua del primer trimestre. Per contra, en queratinòcits l'expressió es veu induïda sota les citocines TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 3 (Krampert *et al.* 2005). En cèl·lules d'epiteli retinal pigmentari l'expressió de varies ADAMTS's, entre elles la 1, es veu fortament induïda per la citocina TNF $\alpha$  (Bevitt *et al.* 2003). A nivell de cèl·lules endotelials, recentment s'ha descrit que l'expressió de la proteasa es veu induïda per LTD4, un cistenil leucotriè, i com que el seu efecte es veu augmentat per la trombina, podria ser que actuessin de manera cooperativa en el cas del dany vascular en la inflamació, (Uzonyi *et al.* 2006). També es dona una sobreexpressió d'ADAMTS1 quan aquestes són exposades a lipoproteïnes riques en triglicèrids, un factor de risc en el dany vascular (Norata *et al.* 2006).

L'expressió de la proteasa es veu augmentada per la senyalització a través del VEGF, per un mecanisme dependent de proteïna cinasa C en cèl·lules endotelials (Xu *et al.* 2006).

#### 4.4.1.2. Activació del zimògen i inhibició.

Aquesta és imprescindible per que les proteases que són sintetitzades com a zimogen puguin ser actives. En el cas d'ADAMTS1 l'ús de cèl·lules defectives en furina donà com a resultat l'absència de processament del prodomini (Kuno *et al.* 1999). Més tard amb l'ús d'inhibidors específics per a la furina es confirmà aquest punt (Rodríguez-Manzaneque *et al.* 2000).

La regulació mitjançant la inhibició és un dels mecanismes més comuns en el cas de la regulació de les proteases extracel·lulars. Com a inhibidors s'ha descrit que l'activitat proteolítica de la proteasa sobre l'agrecà es veu inhibida per TIMP-2 i TIMP-3 (Rodríguez-Manzaneque *et al.* 2002).

#### *4.4.2. Propietats moleculars d'ADAMTS1.*

La primera caracterització d'ADAMTS1 es va donar en la seva clonació per part del grup de Kuno, a partir d'un cDNA sobreexpressat en la caquèxia associada a càncer de colon murí (Kuno *et al.* 1997). Poc després el mateix grup descriu l'estructura gènica en ratolí (Kuno *et al.* 1997). És secretada com a proteïna activa i s'associa preferentment als proteoglicans heparan sulfatats (Kuno and Matsushima 1998), i mitjançant la generació de mutants de deleció de la regió C-terminal conclouen que la responsable d'aquesta afinitat és la regió espaciadora i les repeticions TSR. També són els dominis TSR els encarregats de la seva interacció amb la proteïna angiogènica VEGF<sub>165</sub>, segrestant-la i impeding la seva interacció amb el receptor (Luque *et al.* 2003).

La forma activa presenta dues formes de 87 i 65 kDa, anomenades p87 i p65 respectivament, essent la segona forma un producte de tall de la forma p87 en el seu extrem C-terminal en la regió espaciadora (Rodríguez-Manzaneque *et al.* 2000). Un estudi posterior (Liu *et al.* 2006) conclou que en la regió espaciadora d'ADAMTS1 hi ha al menys dos llocs de tall, i que aquest tall és de natura majoritàriament autoproteolítica (Liu *et al.* 2006).

#### *4.4.3. Paper fisiològic i patològic d'ADAMTS1.*

##### 4.4.3.1. Basats en la seva activitat proteolítica.

Teòricament, el paper fisiològic més important d'ADAMTS1 és el degut a la seva activitat proteolítica. Entre els substrats que processa ADAMTS1 hi

trobem la família dels proteoglicans. Entre ells, l'agrecà i el versicà són substrats coneguts per a ADAMTS1.

El versicà va ser trobat com a substrat d'ADAMTS1 per Sandy *et al.* (Sandy *et al.* 2001). Aquest proteoglicà es pot trobar en varies isoformes (Dours-Zimmermann and Zimmermann 1994; Ito *et al.* 1995; Zako *et al.* 1995; Lemire *et al.* 1999). Es va trobar a teixits connectius blans i en cartílag fibrós, articular i elàstic. També pot ser detectat en el sistema nerviós central i perifèric, a l'epidermis i a les tres parets de venes i artèries elàstiques. En aquest treball troben que l'aorta madura humana conté un fragment de la isoforma V1 del versicà (G1-DPEAAE<sup>441</sup>, a on G1 és la regió globular 1), que pot ser generada tant per digestió d'ADAMTS1 com per ADAMTS4, malgrat és aquesta darrera a qui li donen un paper funcional *in vivo*, ja que és la forma que es detecta en els extractes. Com a proteïna, ADAMTS1 controlaria en l'ovari els nivells i la localització de varis proteoglicans. El proteoglicà condroitin sulfatat més representatiu en el fol·licle és el versicà. El versicà es sintetitza a les cèl·lules de la granulosa i es localitza a la matriu del cumulus, la làmina basal i els fluids fol·liculars, les capes de la teca (Rodgers *et al.* 2003). S'ha demostrat que ADAMTS1 secretat per les cèl·lules de la granulosa està en la matriu del complex cumulus-oòcit (COC) i que talla el versicà durant aquest procés (Russell *et al.* 2003). Aquest tall deu ser important en la reorganització de la matriu durant l'expansió de l'espai intercel·lular del complex cumulus-oòcit (Salustri *et al.* 1992; Camaioni *et al.* 1996).

En relació a això, el fenotip de l'animal KO per la proteasa presenta una sèrie de deficiències en l'ovulació de les femelles (Shindo *et al.* 2000; Mittaz *et al.* 2004), que donen una disminució de la fertilitat. El cicle estral és normal però el nombre de oòcits alliberats dels fol·licles és inferior al normal. Un examen histològic i morfològic d'aquests indica una expansió inferior de la matriu del cumulus al fol·licle. Recalcar que la deficiència en ADAMTS1 dona un fenotip similar però no idèntic al que s'observa en el ratolí deficient per PR. Mentre que alguns oòcits són alliberats eficientment, altres queden atrapats dintre del fol·licle. Aquesta observació indica que ADAMTS1 és en part mediador dels efectes de PR però no de tots, i que possiblement part de la funció de la proteasa sigui compensada per altres, com ADAMTS4 o ADAMTS5, que també són expressades per les cèl·lules de la granulosa i en part comparteixen funcions amb ADAMTS1 (Nakamura *et al.* 2000; Tortorella *et al.* 2000; Sandy *et al.* 2001; Malfait *et al.* 2002). Els animals KO per a aquestes dues proteases no presenten cap defecte en l'ovulació (Glasson *et al.* 2004; Glasson *et al.* 2005).

Un altre efecte del tall de versicà es troba en relació amb l'aterosclerosi. En lesions avançades es veu una expressió clara de la proteasa en cèl·lules musculars llises de vas (VSMC) i en cèl·lules escuma (Jonsson-Rylander *et al.* 2005). És interessant que el versicà està implicat en la migració de les VSMC i en la ruptura del cap (Sandy *et al.* 2001). En aquest treball també troben al TFPI com a substrat d'ADAMTS1 (Jonsson-Rylander *et al.* 2005), molècula relacionada amb la nostra recerca.

Un altre substrat descrit és l'agrecà, un proteoglicà condroitin sulfatat de ECM present majoritàriament en el cartílag. Aquest és processat per ADAMTS1



a la regió d'unió del condroitin sulfat. El lloc de tall de l'agrecà boví és el E<sup>1871</sup>L, equivalent al lloc E<sup>1919</sup>L humà i és necessària la presència de la regió espaiadora i les repeticions TSR per que es doni aquest (Kuno *et al.* 2000). Posteriorment Rodríguez-Manzaneque *et al.* varen descriure que la molècula d'agrecà, tant la humana com la de rata també és processada a altres 4 llocs (Rodríguez-Manzaneque *et al.* 2002), caracteritzats per la presència de una G en posició P1 i un aminoàcid no polar (A, P o G) en la posició P1', i per això també són conegudes com a glutamil endopeptidases (Sandy *et al.* 2001). A més la seva activitat proteolítica es veu afavorida per la unió a la fibulina-1 a través de les seves repeticions TSR (Lee *et al.* 2005). Com que la fibulina co-localitza *in vivo* amb l'agrecà (Aspberg *et al.* 1999) és molt possible que aquesta interacció augmenti la proteòlisis de l'agrecà *in vivo*. La possible rellevància fisiològica d'aquest tall es desconeix però els fragments d'agrecà i ADAMTS1 co-localitzen en el sistema nerviós (Lemons *et al.* 2001; Sasaki *et al.* 2001; Thai and Iruela-Arispe 2002) i en els models d'artritis (Arner *et al.* 1999; Flannery *et al.* 1999).

Recentment Lee *et al.* han descrit que les proteïnes antiangiogèniques de matriu extracel·lular trombospondina-1 i -2 són substrats d'ADAMTS1. Les implicacions funcional s'explicaran més endavant (Lee *et al.* 2006).

Uns altres substrats d'ADAMTS1 que han estat trobats mitjançant aproximacions proteòmiques són el nidogen-1 i -2, la desmocolina-3, el distroglicà-1 i la proteïna d'unió Mac2BP. Es varen validar mitjançant aproximacions immunoquímiques el Nidogen-1 i -2, (Canals *et al.* 2006). Els efectes funcionals del tall sobre aquests substrats és un dels temes actuals d'investigació en el nostre laboratori. Així també tenim evidències de que el sindecà-4 és un substrat d'ADAMTS1 i que aquest processament té implicacions en el reordenament dels citoesquelet i la adhesió cel·lular (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, dades pendents de publicació).

#### 4.4.3.2. Altres efectes.

S'ha descrit la seva capacitat antiangiogènica observada en l'assaig de butxaca en còrnia i de la membrana corioalantoidea (Vazquez *et al.* 1999). Una de les accions de la proteasa és que és capaç d'inhibir la proliferació de cèl·lules endotelials induïda per un cocktail de factors de creixement, incloent-hi el VEGF<sub>165</sub> (Vazquez *et al.* 1999), a través d'un mecanisme que implica l'activació del receptor del VEGF. Aquest efecte és degut al segrest per unió del lligand (Luque *et al.* 2003). Cal indicar també que la forma més activa en la inhibició de la proliferació de cèl·lules endotelials és la p87 degut a la presència de les dues repeticions TSR C-terminal (Rodríguez-Manzaneque *et al.* 2000). Aquesta interacció no és d'estranyar si tenim en compte que també les repeticions trombospondina són capaces d'unir el VEGF<sub>165</sub> en el context de la trombospondina i el factor de creixement del teixit connectiu (CTGF) (Gupta *et al.* 1999; Hashimoto *et al.* 2002). Així a través de l'ús de mutants que presenten deleccions a la regió C-terminal d'ADAMTS1 es pot concloure que són aquestes repeticions i la regió espaiadora i no la regió catalítica o la similar a desintegrina

les responsables de la unió a VEGF<sub>165</sub> (Luque *et al.* 2003). Un altre efecte sobre l'angiogènesi és degut a l'activitat proteolítica d'ADAMTS1 sobre la mateixa trombospondina, tant la TSP1 com la TSP2. El processament de l'inhibidor per part de la proteasa allibera una sèrie de fragments que inhibeixen la proliferació de cèl·lules endotelials *in vitro*. A més, els animals KO per la proteasa presenten a l'assaig de curació de ferida una major angiogènesi i un temps de tancament d'aquesta superior als animals salvatges (Lee *et al.* 2006).

En relació a la curació de ferides, s'ha observat que ADAMTS1 augmenta la seva expressió en animals normals. Aquesta expressió varia durant el temps i també es localitza a diferents tipus cel·lulars, essent primerenca en macròfags i tardana en queratinòcits i fibroblasts. També en relació al queratinòcits, ADAMTS1 en concentracions baixes afavoreix la migració d'aquests, però la redueix a concentracions més altes (Krampert *et al.* 2005), per un mecanisme de segrest del FGF-2, a la manera que ho fa amb el VEGF<sub>165</sub> (Luque *et al.* 2003). També és interessant que l'expressió d'ADAMTS1 en queratinòcits depèn del grau de diferenciació d'aquests (Krampert *et al.* 2005)..

La deficiència en ratolí d'*adamts1* demostra que la proteasa és necessària per un creixement normal, per l'estructura normal dels ronyons, les glàndules adrenals i els òrgans reproductors femenins (Shindo *et al.* 2000). En el cas del sistema uretourinari la deficiència d'ADAMTS1 en ratolí provoca una patologia semblant a la obstrucció de la unió uretopèlvica en humans. Micrografies electròniques mostren canvis en la fibrosi i hipervascularització entre la capa de cèl·lules epitelials urinàries i les de múscul llis (Yokoyama *et al.* 2002).

En relació al sistema cardiovascular Nakamura *et al.* fent servir un model animal d'infart de miocardi en rates troben una inducció primerenca del mRNA Adamts1, igualant-se l'expressió amb els animals controls al 28d postinfart (Nakamura *et al.* 2004). Aquesta expressió es dona tant en cèl·lules endotelials de la zona infartada com en cèl·lules miocardiàques. És interessant en aquest treball que l'expressió d'Adamts1 és anterior a la d'altres MMP's en la zona infartada, i que no correlaciona amb l'expressió del substrats putatius d'Adamts1, com és el versicà (Nakamura *et al.* 2004) obrint la porta a la possibilitat de que aquest enzim estigui actuant sobre altres substrats. Una altra dada interessant és la inducció similar que es produeix en l'expressió del mRNA del VEGF en la zona infartada, obrint la possibilitat de que ADAMTS1 segresti aquesta molècula (Luque *et al.* 2003), evitant així la inducció de l'angiogènesi en aquella zona infartada. En cardiomiocits que sobreexpressen el receptor de mineralocorticoides (MR), sota la inducció d'aldosterona (el lligand putatiu d'aquest) es dona una forta inducció de l'expressió d'ADAMTS1 que podria ser causant dels efectes fibròtics de l'aldosterona en el cor, i juntament amb altres elements regulats per l'aldosterona, a tot el dany cardiovascular (Fejes-Toth and Naray-Fejes-Toth 2007) obrint una porta per la teràpia enfront el dany cardiovascular al bloquejar el MR.

#### 4.4.3.3. ADAMTS1 i progressió tumoral.

En relació d'ADAMTS1 i el càncer hi ha varis treballs descrivint el paper d'aquesta proteasa (Masui *et al.* 2001; Kang *et al.* 2003; Kuno *et al.* 2004; Porter *et al.* 2004; Lind *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006; Rocks *et al.* 2006). En relació al càncer de pàncrees hi ha una correlació positiva entre l'expressió d'ADAMTS1 i la progressió tumoral, així com també amb la metàstasi a nòdul limfàtic i la invasió local (Masui *et al.* 2001). Com s'ha descrit anteriorment, l'estructura modular d'ADAMTS1 li confereix característiques diferencials. Així la regió C-terminal que comprèn la regió espaiadora i les dues darreres repeticions TSR té una activitat antitumoral i antimetastàtica (Kuno *et al.* 2004; Liu *et al.* 2006) i la forma completa, al menys en un model murí de càncer de pulmó i de càncer de mama, li confereix una activitat protumorigènica, proangiogènica i prometastàtica, essent l'activitat proteasa essencial per a aquesta activitat (Liu *et al.* 2006). Més enllà, com ja s'ha indicat abans, l'activitat autoproteolítica que dona els dos fragments resulta en la formació de dues formes que en aquest model són inhibidores de la progressió tumoral. L'acció d'ADAMTS1 també promou el tall del factor de creixement epitelial unit a heparina (HB-EGF) i de l'amfiredulina amb la consegüent activació dels receptors EGF i ErbB-2, mentre que la forma catalíticament inactiva ho inhibeix (Liu *et al.* 2006). En aquest sentit el grup de Massagué va trobar en un model murí d'una subpoblació de càncer de mama humà que *adamts1* era un dels gens sobreexpressats en cèl·lules altament metastàtiques (Kang *et al.* 2003). Un recent treball dona un paper important a la hipermetilació del promotor d'*ADAMTS1* en el silenciament del gen en el cas de la progressió del càncer colorectal humà (Lind *et al.* 2006). En el cas del càncer de pulmó de cèl·lula no petita (NSCLC) existeix una disminució de l'expressió d'ADAMTS1 en el teixit tumoral respecte el teixit sa (Rocks *et al.* 2006), mentre que en el cas del càncer de mama humà, el grup de Porter *et al.* troba que *ADAMTS1* juntament amb *ADAMTS3*, *5*, *8*, *9*, *10*, *11* i *18* es troben regulades a la baixa al teixit tumoral respecte al control (Porter *et al.* 2004). Aquestes divergències en el paper d'ADAMTS1 en la progressió tumoral evidencien la necessitat de l'estudi dels mecanismes implicats amb major profunditat. Aquest treball pretén endinsar-se dintre de les possibles funcions d'ADAMTS1 en el càncer.

## **5. Els inhibidors de metal·loproteases.**

La modulació de l'activitat catalítica de les metal·loproteases una vegada actives i en el seu lloc d'acció pot estar regulada per l'acció dels seus respectius inhibidors. El balanç existent entre les proteases i els inhibidors ens donaran l'activitat neta existent en un lloc concret. Els inhibidors de proteases juguen un paper clau en la regulació de molts processos biològics com la coagulació de la

sang, la fixació del complement, la fibrinòlisi, la fertilització i l'embriogènesi. A més, la desregulació de les proteases té molta importància en processos patològics que inclouen: el càncer, l'aterosclerosi i la inflamació. Molts dels inhibidors de proteases són proteïnes que exhibeixen característiques de polipèptids estructurats. A continuació exposarem alguns d'aquests inhibidors més representatius i una visió més detallada del TFPI-2, important per a aquest treball.

### **5.1. Els inhibidors tissulars de MMPs (TIMPS).**

S'han clonat, purificat, i caracteritzat 4 TIMPs en mamífers. Aquestes proteïnes secretades es pensa que regulen l'activitat de les MMPs durant la remodelació tissular. Però també s'ha descrit el seu paper en la inhibició de les ADAMs i de les ADAMTSs. S'ha identificat un gen de TIMP en *Drosophila melanogaster* i la seva deleció dona un fenotip similar als mutants d'integrines, la qual cosa indica un paper en la funcionalitat de la ECM (Godenschwege *et al.* 2000). Els 4 TIMPS de mamífers comparteixen algunes característiques però també posseeixen diferències a nivell bioquímic, d'expressió i estructurals.

Moltes de les funcions biològiques són atribuïbles a l'extrem N-term, malgrat que la interacció amb les MMPs i amb els dominis hemopexina de les MMP-2 i MMP-9 depèn de l'extrem C-term (Brew *et al.* 2000).

Totes són proteïnes secretades, malgrat que es trobin associades a la superfície cel·lular mitjançant a proteïnes de membrana com ho és la MMP-14 en el cas de TIMP-1, -2, -4. Només el TIMP-3 es troba segregat per la ECM per la unió a proteoglicans heparan sulfatats, i possiblement també als condroitin sulfatats (Yu *et al.* 2000).

Els TIMPs tenen efectes en la proliferació i la supervivència cel·lular que no poden ser només atribuïts al seu efecte inhibidor. El TIMP-1 va ser identificat com un potenciador de l'activitat eritropoietica (Gasson *et al.* 1985) i posteriorment com un agent que estimulava el creixement de certs tipus cel·lulars (Bertaux *et al.* 1991; Hayakawa *et al.* 1994). El TIMP-2 també té una activitat potenciadora de l'activitat eritropoietica (Stetler-Stevenson *et al.* 1992) i estimula el creixement de les cèl·lules de limfoma (Hayakawa *et al.* 1994) i dels fibroblasts (Corcoran and Stetler-Stevenson 1995); amb la insulina té un paper mitogènic (Nemeth *et al.* 1996). A més, recentment el grup de Sobue ha demostrat que tant el TIMP-1 i el TIMP-2 augmenten l'activitat de reabsorció de l'os per part dels osteoclast (Sobue *et al.* 2001).

Cal destacar també que alguns TIMPs estan relacionats amb l'activitat promotora del creixement tumoral (Kossakowska *et al.* 1991; Grignon *et al.* 1996; Hayashi *et al.* 1997; Jiang *et al.* 2001) mentre que d'altres la inhibeixen (Ahonen *et al.* 1998).

## 5.2. L' $\alpha_2$ -macroglobulina.

És un inhibidor de proteases plasmàtic de 772 kDa que conté 4 dominis pràcticament idèntics units per ponts disulfur. És sintetitzada majoritàriament al fetge pels hepatòcits, però s'ha descrit que altres tipus cel·lulars com els macròfags la poden produir. És un inhibidor de proteases des de les MMPs fins a les ADAMS, passant per les serín proteases però no inhibeix a les astacines. La inhibició comporta un mecanisme a on la regió esquer és tallada i aquesta provoca un canvi conformacional a la proteasa que promou que quedi covalentment unit per transacilació (Davies and Sim 1981). Aquest inhibidor és una bona eina per provar l'activitat de potencials proteases, ja que un simplement ha de mirar la formació del complex inhibidor (Nagase 1997). Malgrat que alguns TIMPs també es poden trobar en plasma, l' $\alpha_2$ -macroglobulina és l'inhibidor majoritari de les metal·loproteases en plasma. Però el seu paper en la regulació proteolítica pericel·lular no està gens clar. Complexes de serín proteases amb l' $\alpha_2$ -macroglobulina s'uneixen amb el receptor LDL i són internalitzats per a la posterior degradació (Moestrup *et al.* 1993), i així és possible que també passi amb les MMPs. Però, per exemple, la MMP-13 s'associa a aquest receptor mitjançant un lloc d'unió específic (Barmina *et al.* 1999). L' $\alpha_2$ -macroglobulina té també altres funcions com la d'unir factors de creixement i citocines (Armstrong and Quigley 1999).

## 5.3. RECK: proteïna rica en cisteïnes inductora de reversió amb motius Kazal.

Aquest gen s'expressa en les cèl·lules NIH3T3 transformades per v-Ki-Ras durant la inducció de la morfologia plana. Codifica per una glicoproteïna de 110 kDa que conté dominis amb homologia a inhibidors de serín proteases i s'associa a membrana a través d'un ancoratge per GPI (Takahashi *et al.* 1998). RECK està expressat en molts teixits però sembla que existeix una regulació a la baixa en moltes cèl·lules derivades de tumors. La sobreexpressió en aquestes provoca una disminució de l'expressió de la MMP-9 a un nivell no determinat i també disminueix el potencial invasiu. RECK també disminueix l'activació de la MMP-2, a través de l'intermediari d'activació amb la MT1-MMP en el que sembla ser una activació de tipus autocatalític (Butler *et al.* 1998). La deleció del gen en ratolí dona una mort de l'embrió a la setmana 10.5 amb una disrupció molt evident de l'organogènesi i els teixits mesenquimàtics (Oh *et al.* 2001). Cal destacar que les cèl·lules endotelials no poden formar túbuls units estretament, donant importància a la molècula en la maduració vascular. Com que la MT1-MMP i la MMP-2 també s'expressen en aquesta etapa, pot ser que la causant d'aquests efectes sigui la seva desregulació. També és cert que RECK deu tenir altres funcions ja que el ratolí RECK<sup>-/-</sup> MMP-2<sup>-/-</sup> sobreviu fins la setmana 11.5, és més gran i presenta una millora en el desenvolupament vascular. En un model tumoral a on Oh *et al.* injecten HT-1080 sobreexpressores d'aquesta molècula,

aquests presenten una angiogènesi imperfecta, amb uns vasos amples però poc dividits (Oh *et al.* 2001).

#### **5.4. El TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2).**

La primera referència que tenim d'aquesta molècula és un estudi comparatiu de proteïnes placentàries humanes amb les de simi (Bohn and Sedlacek 1975). El mateix grup a l'any següent publica una descripció bioquímica de la llavors anomenada PP5, a on ja se li presumeix un paper inhibidor de proteases (Bohn and Winckler 1977).

La família de tipus Kunitz, inhibidors de serín proteases que inclouen un o més dominis de tipus Kunitz (KD), amb més de 20 membres en total, inclouen: l'inhibidor de la tripsina pancreàtica bovina (aprotinina), l'inhibidor de la via del factor tissular (TFPI) i el seu homòleg l'inhibidor de la via del factor tissular de tipus 2 ó TFPI-2. El TFPI-2 d'origen humà va ser purificat originalment del teixit placentari com una glicoproteïna de 30-36 kDa, que va ser anomenada com proteïna placentària 5 (PP5) (la taula 5 ens dóna algunes característiques, àlies i números d'accés en les bases de dades més habituals per al TFPI-2) (Lee *et al.* 1979; Butzow *et al.* 1988). PP5 va ser descrita com a inhibidora de l'activitat aminolítica de la plasmina (Lee *et al.* 1979; Butzow *et al.* 1988), com també de l'efecte proteolític de la trombina sobre el fibrinogen (Lee *et al.* 1979; Butzow *et al.* 1988). Estudis posteriors varen ajudar a identificar més membres de la família de tipus Kunitz, i es va descriure l'aïllament d'un cDNA que semblava representar un nou membre d'aquesta família amb una organització i una seqüència d'aminoàcids molt semblant al TFPI (Sprecher *et al.* 1994). L'expressió, purificació i caracterització d'aquesta proteïna recombinant va indicar que, com el TFPI, podia inhibir el complex TF-factorVIIa, i aquesta molècula va ser referida com FPI-2. Malgrat això, donat la seva relativa elevada concentració en la placenta, una recerca bibliogràfica de les propietats moleculars de les proteïnes de la placenta varen demostrar que el TFPI-2, amb concessions d'errors en la seqüència N-terminal de la PP5 (Butzow *et al.* 1988), era en realitat idèntica a la prèviament descrita PP5 (Kisiel *et al.* 1994). Resultats similars varen donar que el transcrit del TFPI-2 estava àmpliament representat en varis teixits com fetge, múscul esquelètic, cor, ronyó i pàncrees. Des del seu redescobriment al 1994, el TFPI-2 ha estat àmpliament estudiat per descobrir el seu paper fisiològic i el seu mecanisme d'inhibició.

<b>DADES</b>	
<b>Símbol aprovat</b>	TFPI2
<b>Nom aprovat</b>	tissue factor pathway inhibitor 2
<b>Identificació HGNC</b>	HGNC:11761
<b>Cromosoma</b>	7q
<b>Àies</b>	PP5, TFPI-2
<b>ENLLAÇOS</b>	
<b>Número d'accés</b>	L27624
<b>Identificació PubMed</b>	7896752 8945635
<b>Identificació OMIM</b>	600033
<b>Identificació Ensembl</b>	ENSG00000105825
<b>RefSeq</b>	NM_006528
<b>Identificació UniProt</b>	P48307
<b>Enllaç especialitzat</b>	MEROPS:LI02-003

**Taula 5.** Algunes dades i números d'accés bàsics del TFPI-2.

#### 5.4.1. La regulació del gen *tfpi-2*.

Cada un dels KD està codificat per un exó, de manera similar a lo que també passa al gen *TFPI* (Girard *et al.* 1991; Enyoji *et al.* 1993). Però en contrast al 125 kb del gen humà del TFPI, el gen del TFPI-2 no conté cap exó addicional en la part 5', o exons que codifiquin per a les regions pont entre els KD. No s'han identificat caps TATA canòniques immediatament direcció 5' de l'inici de la transcripció (TIS), malgrat que dues caps CAAT varen ser observades al voltant 3000 bp direcció 5' d'aquest lloc. En conseqüència, el gen del TFPI-2 mostra característiques de gen de manteniment que inclouen:

- Un elevat contingut de GC (>80%) en les regions al voltant del llocs d'inici de transcripció putatius (Hube *et al.* 2003),
- un promotor sense caps TATA a on l'expressió ve regulada per un grup de llocs d'unió per a SP-1 (Block *et al.* 1996; Smale 1997; Huber *et al.* 1998),
- múltiples llocs d'unió que són emprats per a l'inici de transcripció (Miyagi *et al.* 1994; Sprecher *et al.* 1994; Kamei *et al.* 2001) i,
- el gen del TFPI-2 és compacte en termes de la seva organització genòmica estructural, una característica dels gens de manteniment (Eisenberg and Levanon 2003).

La importància relativa de cada un dels factors de transcripció en l'expressió del TFPI-2 és a dia d'avui, encara desconeguda, així que, requereix una investigació molt més exhaustiva.

El 5' UTR del gen *tfpi-2*, com ja em indicat abans, és una regió rica en GC, que inclou una zona de 220 bp amb un contingut >80%, a on hi ha nombroses illes CpG (Hube *et al.* 2003). En múltiples gens implicats ja sigui en la reparació del DNA o en la integritat del mateix, supressió de metàstasi i supressió tumoral, aquestes illes CpG estan metilades per suprimir la seva transcripció (Esteller 2005).

Molts mediadors inflamatoris (esters de forbol, citocines i endotoxina) regulen l'expressió del TFPI-2 (Iino *et al.* 1998), però les senyalitzacions intracel·lulars que donen un augment o disminució de l'expressió del TFPI-2 no han estat ben definides. Estudis anteriors emprant cèl·lules embrionàries humanes varen mostrar un augment paral·lel del cAMP i de la via depenent de la proteïna cinasa C amb l'expressió del TFPI-2 (Butzow *et al.* 1988). En aquest estudi, es va observar un augment depenent de temps i concentració dels nivells tant de cAMP i del TFPI-2 després del tractament de cèl·lules humanes embrionàries estromals amb prostaglandina. Més recentment l'expressió del TFPI-2 en cèl·lules de múscul llis s'ha relacionat amb elements de la cascada de senyalització del sistema MAPK/ERK (Shinoda *et al.* 1999). Poc després es va relacionar la implicació de la cinasa MKK7 en l'expressió del TFPI-2 a partir d'uns estudis del sistema MAPK cinasa en cèl·lules de ronyó embrionàries (Wolter *et al.* 2002). MKK7 és llavors l'efector situat per dalt del gen del TFPI-2 que controla la resposta cel·lular als estímuls extracel·lulars (IL-1, TNF- $\alpha$ , sorbitol, anisomicina i llum ultraviolada), que finalment activa la JNK (Davis 2000). Els dominis d'interacció de la JNK i els seus substrats associats recluten a una sèrie d'activadors i substrats, com el factor de transcripció AP-1 (Davis 2000). Com que hi han 4 llocs d'unió per a AP-1 en el promotor del TFPI-2 (Kamei *et al.* 2001) és possible que l'augment en l'expressió del TFPI-2 depenent de AP-1 estigui mediada per la via MKK7/JNK.

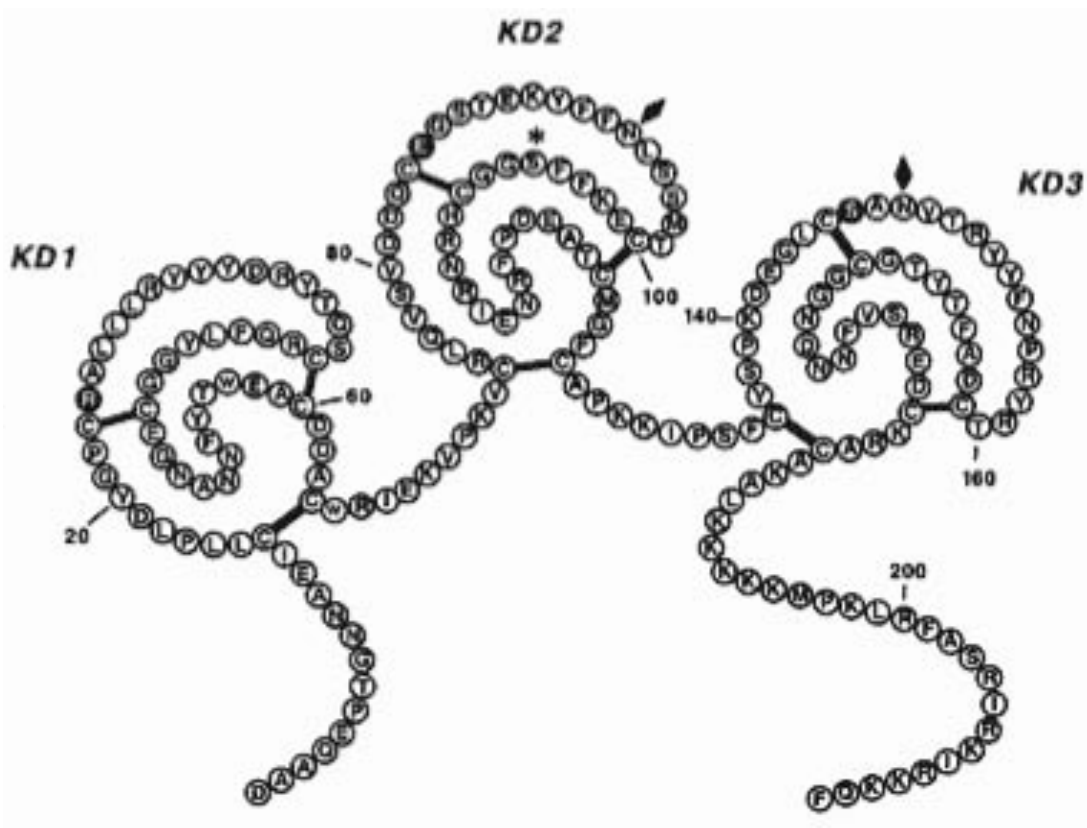
En miofibroblasts de fetge, o en cèl·lules de carcinoma de bufeta (ECV304), l'expressió del TFPI-2 està augmentada per trombina a través dels seus receptors PAR, que dona un augment en la secreció del TFPI-2 en la matriu extracel·lular (Neaud *et al.* 2004). La inducció del TFPI-2 es veu bloquejada per l'ús de l'inhibidor específic de ciclooxigenasa-2 (NS-398), o per l'ús del bloquejant específic de la via de les MAP cinases (PD98059), però no es veu afectat per l'ús de l'inhibidor de la via del receptor del EGF, negant l'existència de transactivació en aquesta inducció del TFPI-2 (Neaud *et al.* 2004). Aquest fet podria representar un sistema de regulació de l'activitat trombogènica de la tripsina, ja que el TFPI-2 és un inhibidor de la generació d'aquesta, al inhibir la formació del factor Xa per part del complex TF-FVIA, que donaria pas a la conversió de protrombina a trombina (Petersen *et al.* 1996). A més la regulació per part de la trombina de l'expressió del TFPI-2 representa una altra funció no hemostàtica d'aquest factor de coagulació en la remodelació de la matriu extracel·lular, que també inclou la seva capacitat per induir l'expressió de certes MMP (Raza and Cornelius 2000) i promoure l'activació de les proMMPs en



aquest context (Galis *et al.* 1997; Lafleur *et al.* 2001). Llavors, la generació de trombina, un fet ben conegut en la progressió tumoral, podria influenciar la invasió tumoral a través de la seva habilitat d'afectar la síntesis del TFPI-2.

#### 5.4.2. Propietats moleculars del TFPI-2 humà.

Com hem dit abans, té una organització en dominis i una seqüència aminoacídica molt similar al TFPI (Sprecher *et al.* 1994). Després d'un pèptid senyal de 22 aa, el TFPI-2 madur conté 213 aa amb 18 cisteïnes. La seqüència primària d'aa deduïda indica una curta regió amino-terminal de caràcter acídic, tres KD en tàndem i una regió carboxi-terminal amb un alt contingut en aa de caràcter bàsic (figura 5).



**Figura 5. Estructura secundària en 2 dimensions del TFPI-2 humà.** Els residus P' del domini Kunitz KD1, KD2, KD3 es mostren en cercles plens, els quals són Arg, Glu i Ser respectivament. Els ponts disulfur es mostren mitjançant línies sòlides. Els llocs de glicosilació putatius estan senyalats (♦), i un possible lloc de fosforilació (\*) està senyalat en la volta interna del KD2.

Hi ha 2 possibles llocs de glicosilació en la molècula de TFPI-2 que estan en la Asp-116 i en la Asn-170 situats respectivament en el segon i tercer domini Kunitz. La forma totalment glicosilada produïda en cèl·lules de ronyó de hámster nou nat (BHK) designada com a  $\alpha$ -TFPI-2 té una mobilitat electroforètica de 32 kDa tant en condicions reductores com no reductores. Aquestes cèl·lules també produeixen una forma menys glicosilada amb un pes molecular de 29 kDa,

designada com a  $\beta$ -TFPI-2. Amb una transfecció estable, aquestes cèl·lules produeixen ambdues formes, la  $\alpha$  i la  $\beta$ , amb una relació de 90%/10% respectivament, mentre que línies cel·lulars endotelials produeixen 3 formes: les abans nombrades i una tercera de menor pes molecular designada com a  $\gamma$ -TFPI-2 (27 kDa), amb una freqüència similar entre les tres com es pot demostrar per immunoblotting (Iino *et al.* 1998). Aquesta forma de 27 kDa sembla ser una forma no glicosilada, més que un producte de degradació, ja que el tractament de cèl·lules endotelials amb tunicamicina D dóna com a resultat un enriquiment d'aquesta (Rao *et al.* 1996). Malgrat les diferències en contingut de carbohidrats de les tres formes, sembla que totes posseeixen efectes inhibitoris comparables.

El TFPI-2 humà recombinant purificat mostra un fort efecte inhibitori sobre l'activitat amidolítica de la tripsina, la quimotripsina, plasmina, plasma cal·licreïna i el factor XIa (Petersen *et al.* 1996). El TFPI-2 humà recombinant també inhibeix lleugerament l'activitat proteolítica i amidolítica del complex factor VIIa-TF, del factor IXa-poli(lisina) i la catepsina G, però és incapaç d'inhibir de manera significant les activitats amidolítiques de la cal·licreïna glandular, de l'activador del plasminogen del tipus urocinasa (uPA), de l'activador del plasminogen tipus teixit/tissular (tPA), proteïna C activada, factor Xa i l'elastasa leucocitària (Petersen *et al.* 1996). A més, en contrast amb una dada antiga de que el TFPI-2 era un potent inhibidor de la trombina (Meisser *et al.* 1985), no pot inhibir l'activitat amidolítica o proteolítica de la trombina a elevades relacions molars d'inhibidor respecte a la proteïnasa (Lafleur *et al.* 2001). El TFPI-2 suposadament inhibeix les anteriors proteases al presentar com a esquer el residu P<sub>1</sub> en el seu domini de tipus Kunitz a la proteasa, de manera semblant a com ho fan altres membres de la mateixa família. En el TFPI-2 humà, l'arginina P<sub>1</sub> en la posició 24 en el primer KD s'assumeix que és l'esquer a partir de que un mutant a P<sub>1</sub> glutamina, R24Q TFPI-2, perd d'una manera substancial (>90%) l'activitat inhibidora sobre la tripsina, la plasmina i el complex factor VIIa- factor tissular (Kamei *et al.* 1999). El paper essencial del primer KD del TFPI-2 en la inhibició de les proteases va ser demostrat en estudis usant una preparació d'aquest domini recombinant i va tenir una activitat inhibidora superior a la proteïna sencera enfront de varies serin proteases (Chand *et al.* 2004). Fins avui, no s'ha trobat funcionalitat a l'extrem N-terminal de caràcter acídic del TFPI-2. Al contrari, l'extrem carboxi-terminal carregat positivament de caràcter bàsic possiblement es trobi implicat en la interacció amb components (proteoglicans) de la matriu extracel·lular o de membrana carregats negativament a la fi de localitzar el TFPI-2 en aquests compartiments i per també modular la seva activitat. En aquesta línia, l'activitat inhibidora enfront de plasmina, el complex factor VIIA-factor tissular del TFPI-2 es veu augmentada per l'addició d'heparina (Sprecher *et al.* 1994; Petersen *et al.* 1996; Liu *et al.* 1999), donant una suggestiva evidència de que el TFPI-2 es troba associat a la ECM mitjançant el seu extrem carboxi-terminal augmentant així la seva inhibició a certes proteases gràcies a aquest fet.

Mentre que el primer domini del TFPI-2 sembla que conté tots els elements estructurals necessaris per a la seva acció inhibidora sobre les serin proteases, el paper del segon i el tercer KD encara és incert. El lloc P<sub>1</sub> del residu

reactiu del segon i del tercer KD són glutamat i serina respectivament, i és desconegut com aquests residus reactius són responsables de la inhibició d'altres proteases. El segon KD conté un lloc de fosforilació putatiu per a la proteïna cinasa C $\alpha$  a la serina 105, però la funcionalitat també és encara desconeguda. Un treball recent dóna un paper clau al KD2 per a la interacció amb la proteïna gC1qR (proteïna d'unió-domini globular C1q), de presència ubiqua i encarregada de modular respostes com la coagulació del complement i la cascada de les quinines (Peerschke *et al.* 2004). Al contrari del que passa amb l'heparina, l'activitat no es veu augmentada en la formació del complex, i disminueix enfront de la plasmina (Peerschke *et al.* 2004). El significat funcional d'aquesta interacció no es coneix, però és possible que sigui una manera de situar el TFPI-2 en la ECM i la superfície cel·lular independentment de proteoglicans.

Com que tota l'activitat del TFPI-2 sembla estar al KD1, la informació estructural i funcional a prop de la interacció del TFPI-2 amb proteases ha estat obtinguda amb l'ajut de mutants puntuals respecte al lloc reactiu del TFPI-2 humà (Chand *et al.* 2004). La substitució sistemàtica del P<sub>1</sub> en nombrosos inhibidors de serín proteases explica molts efectes dinàmics en la seva associació amb diferents proteases (Castro and Anderson 1996; Grzesiak *et al.* 2000; Grzesiak *et al.* 2000). En el cas del TFPI-2, la substitució de Gln per Arg en el residu P<sub>1</sub> del KD1 té com a resultat una disminució de l'activitat inhibidora de la preparació KD1 per totes les proteases testades, que concorda amb els resultats obtinguts amb la forma R24Q del TFPI-2 (Kamei *et al.* 1999). És molt interessant que la substitució del residu per una lisina no només restitueix l'activitat inhibidora del KD1, sinó que a més disminueix els valors de la  $K_i$  per la tripsina i per la plasmina (Chand *et al.* 2004). La interacció del lloc reactiu es veu recolzada per interaccions hidrofòbiques i electrostàtiques per estabilitzar el complex (Chand *et al.* 2004).

La cristal·lització de l'estructura del KD1 del TFPI-2 amb la tripsina bovina ha donat informació addicional en tres dimensions de quins són els llocs importants en la interacció proteasa:inhibidor (Schmidt *et al.* 2005). El plegament del complex KD1:tripsina és similar al que es troba en els complexos BPTI (inhibidor de la tripsina pancreàtica bovina):tripsina (Helland *et al.* 1999) i APPI (precursor de la proteïna beta amiloide):tripsina (Scheidig *et al.* 1997).

Utilitzant l'estructura del complex KD1:tripsina y la de la plasmina com a motlle, es va obtenir informació de l'estructura 3D del complex KD1:plasmina fent servir estratègies de modelatge molecular (Schmidt *et al.* 2005). Els estudis de modelatge i la cristal·lografia de rajos X donen evidència definitiva que els elements estructurals per a la inhibició de nombroses proteases es troben en el KD1 del TFPI-2.

#### 5.4.3. Paper fisiològic del TFPI-2.

Mentre encara està per descobrir el paper exacte del TFPI-2, cada cop hi ha més evidències de que és segregat per multitud de cèl·lules i que es diposita a la ECM a on suposadament té un paper regulant la remodelació d'aquesta. Els

primers estudis es varen focalitzar en la distribució del TFPI-2 en diferents teixits, demostrant que es trobava en quantitats abundants en la placenta, el plasma seminal, vesícules seminals i el fluid fol·licular proovulatori (Seppala *et al.* 1985; Butzow *et al.* 1988). Estudis posteriors varen demostrar que altres tipus cel·lulars incloent cèl·lules endotelials, queratinòcits, fibroblasts dèrmics, cèl·lules musculars llises, sinciotiotrofoblasts, sinoviòcits, cèl·lules epitelials cilials, cèl·lules epitelials retinals pigmentaries i cèl·lules urogenitals sintetitzen el TFPI-2 (Rao *et al.* 1996; Ortego *et al.* 1997; Iino *et al.* 1998; Shinoda *et al.* 1999; Deng *et al.* 2001; Herman *et al.* 2001; Udagawa *et al.* 2002). La quantificació del TFPI-2 de manera específica (Iino *et al.* 1998), va demostrar que el 60-90% del TFPI-2 era secretat per les cèl·lules endotelials cap al compartiment de la ECM subendotelial i la resta es trobava repartit entre la CL i el CM (Iino *et al.* 1998). Aquests estudis varen demostrar una unió de tipus específic, saturable i de forta afinitat del TFPI-2 recombinant humà marcat radioactivament tant a les monocapes de cèl·lules endotelials com a les seves ECM (Iino *et al.* 1998). La importància del TFPI-2 mantenint la integritat de la ECM per a la unió cel·lular es va demostrar quan un anticòs anti-TFPI-2 provocava la pèrdua d'adherència de cèl·lules endotelials en cultiu (Iino *et al.* 1998). Aquests estudis varen demostrar la localització subcel·lular del TFPI-2, després confirmada mitjançant tècniques de microscòpia electrònica (Crawley *et al.* 2002). Com que la majoria del TFPI-2 està associat a la ECM, els nivells que es troben en sang són realment molt baixos (12-15 pM) (Seppala *et al.* 1985; Butzow *et al.* 1988). Aquests nivells es veuen augmentats per l'administració intravenosa d'heparina (Seppala *et al.* 1985) així com en el període d'embaràs a on els nivells plasmàtics del TFPI-2 durant el tercer trimestre arriben a 320 pM (Seppala *et al.* 1985).

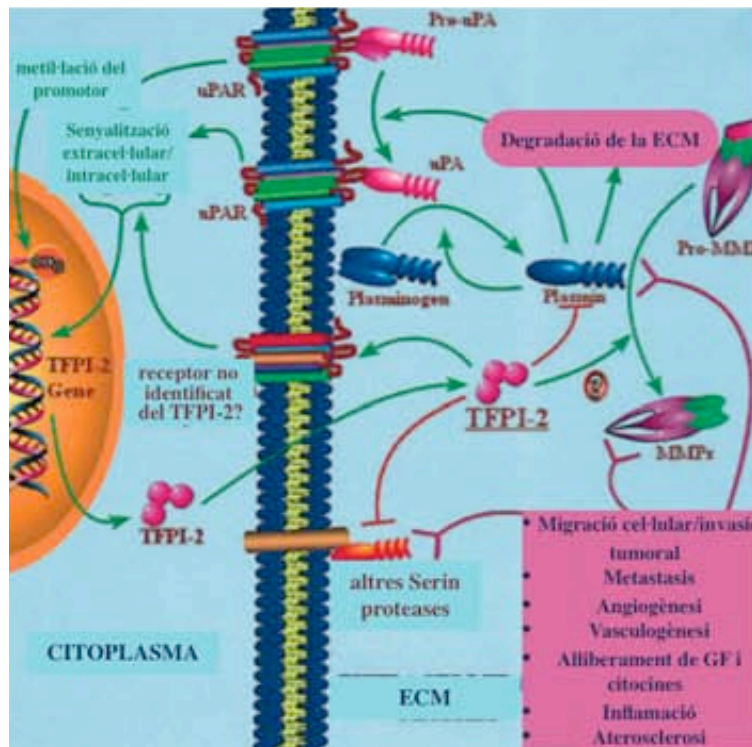
El descobriment de que el TFPI-2 es troba majoritàriament a la ECM i degut a la seva activitat inhibidora sobre proteases dona lloc a l'especulació de que té un paper molt important en la remodelació i degradació de la ECM. La remodelació de la ECM es porta a terme per una sèrie de proteases i és essencial en el creixement tumoral i la metastasi, com en altres processos no patològics com poden ser l'angiogènesi i la migració cel·lular. Relatiu a aquest darrer aspecte un treball recent de Ivanciu *et al.* demostra que les cèl·lules endotelials en migració sobreexpressen el TFPI-2 comparant-les amb cèl·lules endotelials quiescents, però que aquest presenta un efecte inhibidor de la migració mediat per la inhibició de l'activitat de plasmina. A més té un paper inhibidor en la formació de noves estructures vasculars, tant *in-vitro* com *in-vivo*, i augmenta la deposició de ECM. A més augmenta el grau d'apoptosi cel·lular. (Ivanciu *et al.* 2007). En aquest mateix sentit s'ha demostrat que cèl·lules endotelials estimulades amb VEGF<sub>165</sub> o IL-1 $\beta$  augmenten l'expressió del TFPI-2 d'una manera temps i dosis dependent. La via implicada torna a ser la via de les MAP cinases. A més el TFPI-2 bloqueja la senyalització intracel·lular del VEGF<sub>165</sub>, essent aquesta activitat independent de l'activitat inhibidora (Xu *et al.* 2006). Aquests últims treballs donen força a la teoria de que el TFPI-2 és un mantenidor de l'homeòstasi cel·lular.

Estudis en els ortòlegs del TFPI-2 han donat també certa llum sobre el seu paper fisiològic. El TFPI-2 murí mostra una elevada homologia (taula 6) (Miyagi *et al.* 1996; Kazama *et al.* 2000). Una diferència crítica en la seqüència entre les dues proteïnes implica el residu P<sub>1</sub> en el primer domini Kunitz, el TFPI-2 murí conté una glutamina en aquest residu en lloc de una arginina (Miyagi *et al.* 1996; Kazama *et al.* 2000). Per tant com s'espera que la substitució del residu per qualsevol aa que no sigui una arginina/lisina (Girard *et al.* 1989; Kamei *et al.* 1999; Grzesiak *et al.* 2000) l'activitat del TFPI-2 murí enfront de les serín proteases és un 10% inferior a la observada pel TFPI-2 humà. Aquestes dades indiquen, que malgrat la substitució en el residu P<sub>1</sub> a Gln, deu seu capaç d'inhibir proteases a la ECM gracies a la colocalització amb glicosaminoglicans que augmentarien la seva activitat. Una altra diferència substancial entre el TFPI-2 humà i el murí es basa a la seva elevada concentració en el fetge en el cas de ratolins. Es va demostrar que l'expressió del TFPI-2 en els hepatòcits del fetge murí és molt elevada, a diferència del baixos nivells que es troben en l'humà o en hepatòcits aïllats humans (Hisaka *et al.* 2004). A més, l'expressió del TFPI-2 es veu incrementada força per LPS, i aquesta es deu a cèl·lules parenquimàtiques (Hisaka *et al.* 2004). Aquest augment en l'expressió del TFPI-2 degut al LPS pot ser tallada en el ratolí KO pel receptor gp130, el que indica que existeix un mediador entre els hepatòcits i les cèl·lules no parenquimàtiques que s'encarreguen de produir el TFPI-2 (Hisaka *et al.* 2004). Mentre que el TFPI-2 de ratolí conté una Gln en el residu P<sub>1</sub> de primer domini Kunitz, en el cas de rata és una Lys i s'espera que sigui un potent inhibidor de serín-proteases com la tripsina (Hisaka *et al.* 2002). A la vaca el TFPI-2 amb la urocinasa i el tPA és activament secretat a l'orina per part de l'uroteli (Du *et al.* 2003), suggerint que el TFPI-2 pot tenir un paper funcional en el tracte urinari. Les dues formes bovines mostren una elevada capacitat inhibidora enfront de la tripsina i la plasmina, degut a la presència d'una Arg en el residu P<sub>1</sub> del KD1 (Du *et al.* 2003).

<b>Organisme</b>	<b>Gen</b>	<b>Descripció</b>	<b>Similitud amb humà (%)</b>	<b>Número accés NCBI</b>
<b>Gos (<i>Canis familiaris</i>)</b>	<i>Tfpi2</i>	tissue factor pathway inhibitor 2	81.67(n) 71.43(a)	475230 XM_532462.2 XP_532462.2
<b>Ximpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)</b>	<i>Tfpi2</i>	tissue factor pathway inhibitor 2	99.43(n) 99.57(a)	463540 XM_519205.2 XP_519205.2
<b>Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)</b>	<i>Tfpi2</i>	tissue factor pathway inhibitor 2	66.96(n) 56.58(a)	286926 NM_173141.1 NP_775164.1
<b>Ratolí (<i>Mus musculus</i>)</b>	<i>Tfpi2</i>	tissue factor pathway inhibitor	67.76(n) 57.48(a)	217891 NM_009364.2, NP_033390.1, AF180353 AK132268
<b>Pollastre (<i>Gallus gallus</i>)</b>	<i>Tfpi2</i>	tissue factor pathway inhibitor 2	60.35(n) 51.54(a)	420561 XM_418662.2 XP_418662.2

**Taula 6.** Descripció, tant per cent d'homologia ((n) en nucleòtids i (a) en aminoàcids) i números d'accés del TFPI-2 de diferents espècies animals.

La figura 5 resumeix la visió que es té avui sobre el paper fisiològic del TFPI-2. El TFPI-2 és sintetitzat per cèl·lules de la vasculatura (endotelials, cèl·lules musculars llises i fibroblasts) i es diposita en concentracions relativament elevades a la ECM d'aquestes, a on se suposa que s'ocupa de regular el remodelació basal per inhibició de varies proteases. Cada dia es té més l'evidència de que la diana principal és la plasmina que s'encarrega directament del remodelació de la matriu extracel·lular i de l'activació de varies MMPs. El TFPI-2 també presenta una activitat antiangiogènica. És possible que el TFPI-2 realitzi alguna de les seves funcions a través de un possible receptor de membrana, encara desconegut, donant una sèrie de canvis a nivell intracel·lular, que resultarien en una transducció de senyal i canvis en l'expressió gènica com s'ha vist en el cas de les cèl·lules musculars llises (Shinoda *et al.* 1999). En aquest treball mitjançant la purificació de factors amb afinitat a heparina i posterior cromatografia de medis condicionats de HUVEC's troben un factor que estimula la proliferació de cèl·lules musculars llises d'aorta bovina metabòlicament arrestades. El factor l'identifiquen com el TFPI-2 mitjançant seqüència N-terminal. L'activitat mitogènica del TFPI-2 recombinant sobre les cèl·lules de múscul llis d'aorta bovina és dosis i temps dependent, i independent d'altres factors de creixement com és el PDGF. L'estimulació amb TFPI-2 recombinant dona un increment en la fosforilació de ERK1 i ERK2, que es veu inhibida per un inhibidor específic de l'activitat de MAPK. Aquest augment de l'activitat cinasa correlaciona amb un augment de l'activació transcripcional de c-fos i la seva posterior expressió (Shinoda *et al.* 1999). Contrastant amb aquests resultats en un model de glioblastoma l'augment de la expressió del TFPI-2 dona una inhibició de la fosforilació de ERK, un augment de l'expressió de les proteïnes proapoptòtiques donant al TFPI-2 un paper negatiu en la supervivència de les cèl·lules de glioma (Tasiou *et al.* 2001), i en cèl·lules tumorals de fibrosarcoma les HT-1080 (Chand *et al.* 2004).



**Figura 5. Diversos papers del TFPI-2 en la remodelació tissular.** La seva acció més estudiada és la d'inhibidor putatiu de serín-proteases com la plasmina, implicada directament en la degradació de la ECM i en l'activació de metal·loproteases (modificada de (Chand *et al.* 2005)).

#### 5.4.4. El TFPI-2 en els processos patològics.

Altres proteases associades a la ECM, que juntament amb la plasmina ajuden al remodelament de la matriu en processos tant fisiològics com a fisiopatològics són: les MMPs, les adamalises, les cisteín proteases i les papalises (Garcia-Touchard *et al.* 2005). El TFPI-2 inhibeix la plasmina en la ECM, ja que se l'ha trobat en proximitat a la plasmina/plasminogen en macròfags, cèl·lules endotelials i zones riques de matriu de les plaques ateroscleròtiques (Crawley *et al.* 2002). Dos treballs recents demostren la inhibició directa del TFPI-2 sobre metal·loproteases de matriu (Herman *et al.* 2001; Kong *et al.* 2004), malgrat el mecanisme d'interacció i el d'inhibició encara estan per elucidar. Se va dir inicialment que el TFPI-2 recombinant era capaç d'inhibir les col·lagenases intersticials MMP-1 i MMP13 de manera estequiomètrica, i la MMP-2 i MMP-9 (gelatinases) feblement. La  $EC_{50}$  per la MMP-1 és  $57.6 \pm 19.1$  nM i per la MMP-13 és de  $31.5 \pm 9.4$  nM mentre que per les MMP-2 és de  $551 \pm 122$  nM i la  $EC_{50}$  per la MMP-9 és de  $508 \pm 173$  nM (Herman *et al.* 2001). Anàlisi per immunohistoquímica varen demostrar una disminució en el senyal del TFPI-2 en la zona susceptible a ruptura de la placa ateroscleròtica, suggerint que la disminució del TFPI-2 donava lloc a una desregulació de les MMP's en aquest lloc amb el conseqüent trencament del cap. La inhibició de l'activitat gelatinolítica de la MMP-2 i MMP-9 mitjançant una mescla del KD1 recombinant (Kong *et al.* 2004) suporta aquesta darrera

evidència de que el domini Kunitz és el responsable d'aquesta inhibició (Herman *et al.* 2001). Però l'existència d'estudis a on s'intenta esbrinar quin són els dominis estructurals que intervenen en aquesta interacció amb aquestes MMPs va revelar que no es formava complex entre el TFPI-2 silvestre i la MMP-2 i la MMP-9 (Du *et al.* 2003). A més, no es va trobar unió entre el TFPI-2 silvestre marcat radioactivament amb la MMP-2, MMP-9 i la proMMP-1 o la forma activa de la MMP-1 mitjançant immunoblot de lligació/autoradiografia, mentre que el lligand marcat radioactivament si que s'unia pel mateix mètode a la plasmina i a la tripsina (Du *et al.* 2003). Finalment, elevades concentracions del TFPI-2 resultaren incapaces d'inhibir la digestió del col·lagen de triple hèlix per part de la MMP-1 activa, i l'activitat de la MMP-1 tampoc presentava efectes sobre el TFPI-2 negant la possibilitat de que el TFPI-2 pogués funcionar com a substrat de la MMP-1 inhibint-la (Du *et al.* 2003). Per tant, és possible que el TFPI-2 pugui no ser un substrat/inhibidor de la MMP-1 ni de que formi estructures estables amb la MMP-2 i la MMP-9. Però és possible de que el TFPI-2 pugui inhibir de manera indirecta l'activació de certes proMMPs mitjançant la inhibició de serín proteases com la tripsina (Rao *et al.* 1999).

El TFPI-2 associat a la ECM ha mostrat certes activitats antiangiogèniques. Com s'ha dit anteriorment el tractament de cultius endotelials mitjançant un anticòs front el TFPI-2 va donar un desenganxament de les cèl·lules endotelials de manera dosi dependent, i les restants al substrat disminuïen l'arquitectura típica endotelial (Iino *et al.* 1998). A més la secreció del TFPI-2 per part de la línia altament invasiva de fibrosarcoma (HT-1080) va resultar en una disminució de l'expressió de cert gens típicament angiogènics com el VEGF-C, VEGF-R1 i la IL-8 (Chand *et al.* 2004).

#### 5.4.5. El TFPI-2 en la progressió tumoral.

El gen del TFPI-2 està expressat amb molta ubiqüitat entre els diversos teixits, però els tumors provinents d'ells solen tenir una expressió reduïda, sinó és nul·la (Miyagi *et al.* 1994). L'expressió reduïda del TFPI-2 en tumors s'ha associat a una hipermetilació en el promotor com s'ha vist en coriocarcinomes, carcinomes de pròstata, carcinomes de pit, gliomes, fibrosarcomes i malalties toràciques (Hube *et al.* 2003; Konduri *et al.* 2003; Rao *et al.* 2003; Steiner *et al.* 2005). A més, una sèrie de tumors molt agressius delecionen el locus de la regió 7q on es troba el gen del TFPI-2 (Dong 2001; Saito *et al.* 2005; Sell *et al.* 2005). Recentment s'ha relacionat l'estat de metilació del gen del TFPI-2 amb la progressió primària del NSCLC (Rollin *et al.* 2005), com també en el comportament invasiu en els carcinomes ductals pancreàtics (Sato *et al.* 2005). Així, el gen del TFPI-2 sembla estar transcripcionalment regulat al menys a nivell de metilació, i la regulació a la baixa durant la progressió tumoral del TFPI-2 podria jugar un paper molt important en la intravasació i extravasació de les cèl·lules tumorals durant els processos metastàtics. Un altre mecanisme sembla ser el "splicing" incorrecte del TFPI-2 trobat recentment en una bateria



de cèl·lules tumorals. Aquestes expressen un transcrit amb una longitud de 289 pb que no serà traduït posteriorment (Kempaiyah *et al.* 2007).

El primer treball a on es va mostrar que el TFPI-2 podia actuar en la invasió tumoral va venir d'estudis a on l'administració exògena de TFPI-2 inhibia la plasmina associada a la ECM d'una línia provinent de fibrosarcoma d'una manera dosis dependent (Rao *et al.* 1998). A més la degradació de la ECM per part de la plasmina i la invasió *in vitro* d'aquestes cèl·lules tumorals en una matriu sintètica era inhibida d'una manera també dosis dependent a través del TFPI-2 recombinant (Rao *et al.* 1998). Estudis posteriors investigant el paper *in vivo* del TFPI-2 s'han focalitzat en l'estudi de línies tumorals de diversa procedència (Konduri *et al.* 2000; Lakka *et al.* 2000; Konduri *et al.* 2001; Konduri *et al.* 2001; Rao *et al.* 2001; Chand *et al.* 2004; Yanamandra *et al.* 2005). En aquest respecte, cal notar que la secreció d'aquesta molècula per part d'un tumor molt agressiu va inhibir de manera molt significativa el creixement en un model murí atímic (Chand *et al.* 2004). En comparació a tumors que secretaven una forma inactiva, la taxa de creixement dels tumors que secretaven la forma activa del TFPI-2 es va reduir en 2-3 cops (Chand *et al.* 2004). A més, l'anàlisi comparatiu d'expressió de varis gens implicats en oncogènesi, invasió, metàstasi, apoptosi i angiogènesi tenien alterada el patró d'expressió en tumors que secretaven el TFPI-2 (Chand *et al.* 2004). En un altre estudi comparatiu per mitja d'immunohistologia, correlacionaven l'expressió del TFPI-2 amb la progressió tumoral (Wojtukiewicz *et al.* 2003). L'anàlisi de tumors de mama, gàstrics, de colon, pancreàtics, de laringe, renals, endometrials i glicals mostra que l'expressió del TFPI-2 disminueix amb l'augment de malignitat (Wojtukiewicz *et al.* 2003). Així, la disminució de l'expressió del TFPI-2 per varis mecanismes de tipus epigenètic sembla correlacionar amb l'augment de la invasió i metàstasi, i s'estan desenvolupant noves teràpies gèniques incloent l'expressió del TFPI-2 per mitja d'adenovirus (Yanamandra *et al.* 2005). A més l'ús de fàrmacs demetiladors del DNA (5-aza 2'-deoxitidina) i inhibidors de l'acetil·lació d'histones (depsipeptina FK228) han mostrat com indueixen l'expressió del TFPI-2 en tumors agressius (Steiner *et al.* 2005), i així aquests fàrmacs podrien trobar una utilitat terapèutica. Per contra, l'administració exògena de TFPI-2 en un cariocarcinoma hepàtic humà incrementava les propietats invasives d'aquest de manera paradoxal, en contra de les dades anteriorment citades (Neaud *et al.* 2000). L'efecte proinvasiu en aquest sistema es va veure bloquejat amb un anticòs contra el factor VII, suggerint que el complex ternari TFPI-2-factor tissular-factor VIIa format en aquestes cèl·lules afavoreix les propietats adhesives, de migració i invasivitat d'aquestes cèl·lules de manera similar al que passa amb el complex TFPI-VIIa-TF en les cèl·lules de carcinoma de bufeta. A més, com s'ha dit anteriorment, la trombina incrementa la síntesi del TFPI-2 en miofibroblasts de fetge (Neaud *et al.* 2004), que promou la invasió *in vitro* de cèl·lules d'hepatocarcinoma a través d'un mecanisme dependent de HGF/SF-urocinasa-plasmina. D'acord amb això, els miofibroblasts, molts cops associats amb cèl·lules tumorals hepàtiques, podrien proveir el TFPI-2 *in vivo* augmentant la invasivitat del carcinoma hepatocel·lular.

Mentre la regulació a la baixa del TFPI-2 ha estat observada en nombrosos tumors, recentment s'ha demostrat en el cas de la línia cel·lular MUM-2B provinent d'un melanoma uveal molt agressiu que expressa unes 100 vegades més TFPI-2 que la poc agressiva MUM-2C (Ruf *et al.* 2003). A més, el TFPI-2 juga un paper molt important en la formació de rets pseudovasculars en matrius de 3 dimensions per part de la línia MUM-2B (mimetisme vasculogènic), i és independentment de la capacitat d'inhibir la plasmina en aquest sistema (Ruf *et al.* 2003). És molt interessant que mitjançant la inhibició del TFPI-2 amb un anticòs específic s'aconsegueixi una disminució de 2 cops l'activitat de la MMP-2, suggerint un possible paper positiu del TFPI-2 en l'activació de la MMP-2 en aquesta línia tumoral agressiva. El sistema pel qual això succeeix és desconegut però podria ser que necessités la unió del TFPI-2 a les cèl·lules tumorals amb una possible senyalització cel·lular i posterior increment en l'expressió de la proMMP2 (Ruf *et al.* 2003).

Part del nostre treball tracta d'esbrinar els mecanismes del TFPI-2 en la progressió tumoral fent us d'algunes de les línies cel·lulars anteriorment indicades i de xenografts.

## 6. Angiogènesi i la vascularització tumoral.

Coneixem com angiogènesi al procés pel qual les cèl·lules endotelials, per mecanismes que poden o no implicar la ramificació, formen nous capil·lars a partir de vasos preexistents (revisat a (Rundhaug 2005)). L'angiogènesi per ramificació implica la degradació de la membrana que envolta les cèl·lules endotelials, seguida de la migració i la proliferació d'aquestes en l'estroma adjacent. La diferenciació, maduració, formació del lumen, reclutament dels perícits i la coalescència dels túbuls completen el procés de la formació d'un nou vas. Aquesta angiogènesi succeeix en el sac vitel·lí i en l'embrió durant l'embriogènesi tardana, especialment en el cervell (Risau 1997). En l'adult la vasculatura està normalment en quiescència, exceptuant alguns processos molt regulats com són el cicle reproductiu femení, la reparació de ferides i algunes situacions patològiques com malalties oftàlmiques i reumàtiques i en l'angiogènesi tumoral (Hanahan and Folkman 1996; Risau 1997).

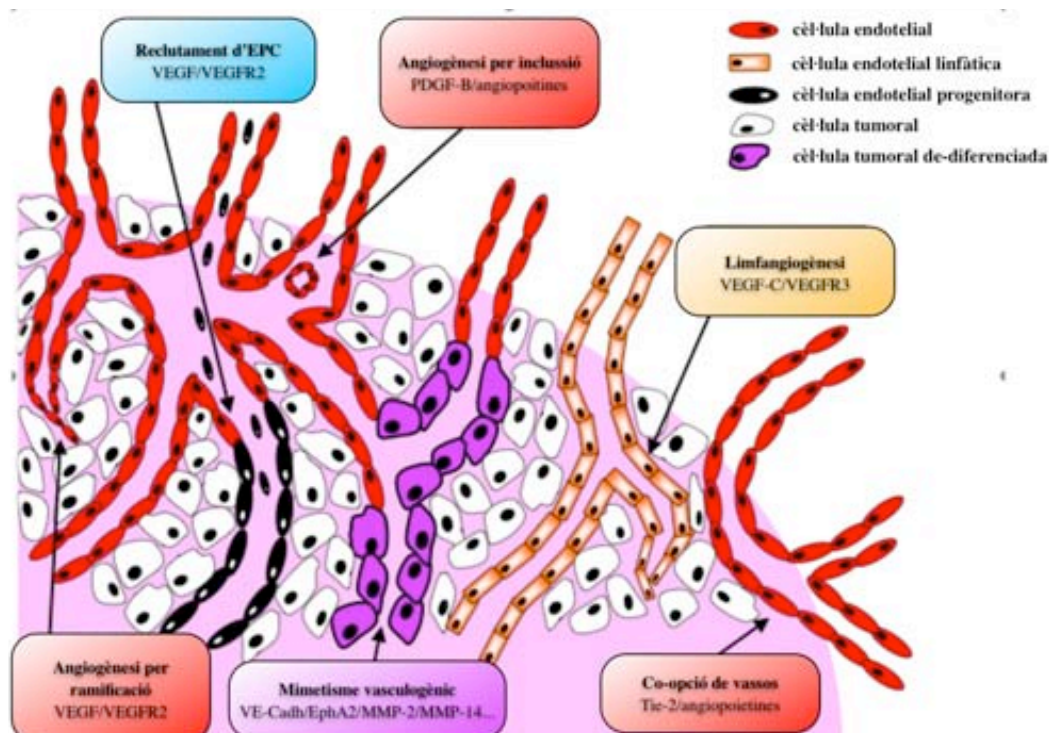
Els vasos tumorals són diferents dels normals (Carmeliet and Jain 2000; Ruoslahti 2002), on els tumorals tenen una distribució caòtica, amb pèrdues, estan dilatats o tenen un diàmetre anormal, amb un número de perícits baix o amb la funció alterada en part degut a l'expressió alterada del VEGF i d'altres factors (Carmeliet and Jain 2000; Ruoslahti 2002). El VEGF va ser descrit en un primer moment com un factor de supervivència en EC retinals i ara se sap que ho és en diversos models de EC. Aquestes funcions antiapoptòtiques i de supervivència sembla que estan mediades per la interacció amb el VEGF-R2 (receptor del factor de creixement de cèl·lula endotelial 2),  $\beta$ -catenina i la VEGFR-1 (Ferrara *et al.* 2003). Malgrat això la teràpia contra el VEGF ha mostrat

que només hi ha regressió en els capil·lars tumorals nous o en la vasculatura en formació del ratolí nou-nat però no té efecte sobre la vasculatura tumoral quiescent o en el ratolí adult (Benjamin *et al.* 1999).

El creixement tumoral es troba limitat per la rapidesa en que pot créixer la vasculatura per donar a la creixent massa tumoral nodriment i eliminar les desfetes metabòliques (Carmeliet and Jain 2000). El canvi angiogènic pel qual la vasculatura normal quiescent es ramifica separa la fase avascular (prevascular) del creixement tumoral caracteritzada per la latència tumoral, de la fase vascular amb un creixement exponencial del tumor. En la fase prevascular, les cè·l·lules tumorals proliferen (de vegades amb unes taxes similars a les dels tumors vasculars) però l'apoptosis compensa aquesta multiplicació mantenint la massa tumoral en un estat estacionari. En autopsies d'individus morts per diverses causes diferents del càncer s'han descobert tumors latents (Kirsch *et al.* 2004).

L'activació del canvi ha estat atribuïda al la síntesis o alliberament de factor angiogènics. La hipòtesis del balanç (Bouck *et al.* 1996; Hanahan and Folkman 1996) assumeix que els nivells de inductors i inhibidors regula l'estat de quiescència o angiogènesi. Aquest balanç serà alterat per la producció/biodisponibilitat d'inductors o mitjançant la disminució dels inhibidors per processament, biodisponibilitat o per canvis transcripcionals.

L'angiogènesi és un esdeveniment primerenc en la tumorogènesi per poder donar cobertura a aquests requeriments, però quan el tumor creix i arriba a la fase exponencial de creixement, l'angiogènesi clàssica pot ser que no sigui suficient (Carmeliet and Jain 2000). Els tumors poden llavors crear noves estratègies per millorar el desenvolupament d'una vasculatura que abasti els seus requeriments nutricionals com pot ser la secreció de factors que afavoreixen la proliferació i migració endotelial, o de proteases que puguin ajudar a la degradació de la ECM (Carmeliet and Jain 2000). La figura 6 aporta una visió global dels mecanismes que els tumors segueixen per aconseguir l'aportació nutricional necessari per la seva progressió. Passarem a donar una breu visió d'algun d'ells.



**Figura 6.** Representació esquemàtica dels tipus més representatius de vascularització tumoral i de les principals proteïnes implicades en cada una d'elles. Cal dir que cap d'ells és exclouent, i que un mateix tumor pot presentar diversos tipus al mateix temps (modificada de (Hillen and Griffioen 2007))

### 6.1. Ramificació endotelial.

És el mecanisme més conegut pel qual els tumors indueixen noves ramificacions endotelial a partir de vasos ja preformats de l'hoste. La primera descripció d'aquest fenomen es remunta als 70, quan Ausprunk i Folkman (Ausprunk and Folkman 1977) van descriure la següent seqüència per a la ramificació endotelial induïda pel tumor:

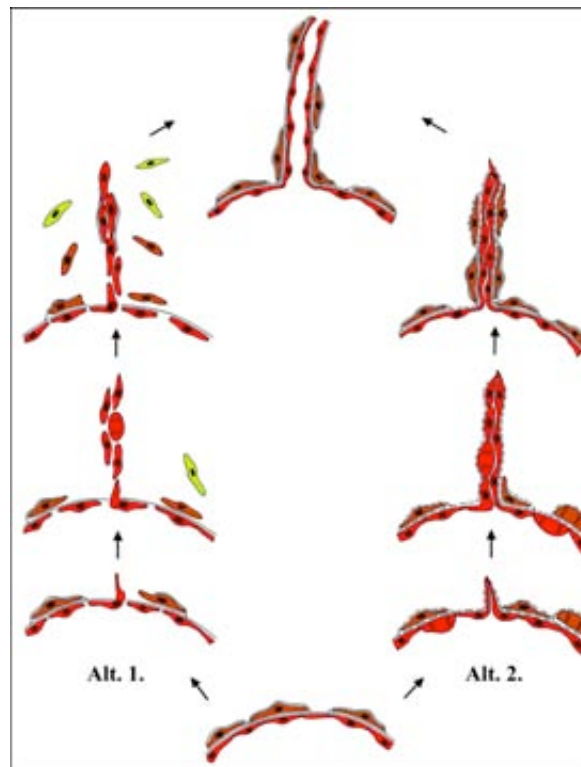
1. en primer lloc la làmina basal més proximal al tumor i a la senyal angiogènica és degradada i els contactes interendotelials disminueixen amb una posterior migració endotelial cap a l'estímul.
2. Es forma un cordó sòlid de cèl·lules endotelials de manera bipolar
3. La curvatura de una cèl·lula endotelial o la participació de més d'una d'elles forma el lumen del vas, amb la creació de la nova làmina basal i el reclutament de les cèl·lules accessòries.

Els grans inconvenients d'aquest model són: que no explica quin és l'estímul que provoca la formació del nou lumen, i que la desdiferenciació i rediferenciació endotelials passen al mateix moment.

Al començament dels anys 90 un altre model superava aquests inconvenients (Paku and Paweletz 1991):

1. Existeix una alteració estructural a la làmina basal que es caracteritza per la pèrdua de densitat electrònica en tota la circumferència del “vas mare”. La degradació és parcial i puntual a on apareixen processos cel·lulars que envaeixen el teixit connectiu.
2. Succeeix una migració de les cèl·lules endotelials disposades en paral·lel, mantenint la seva polaritat lumen-làmina basal, formant un semilumen de manera continuada amb el lumen del “vas mare” i segellat per unions intactes inter-endotelials. Una làmina basal de baixa densitat electrònica és dipositada de manera constant per les cèl·lules endotelials polaritzades deixant només una petita porció de l'apex lliure.
3. Perícits proliferadors del “vas mare” migren al llarg de la làmina basal de la nova ramificació donant un recobriment complet. Al mateix temps es va depositant una nova làmina basal electro-densa.

La figura 7 ens dona una visió de les dues teories.



**Figura 7. Ramificació endotelial.** Representació esquemàtica de la ramificació endotelial segons el model de Ausprunk i Folkman (Alt. 1.) i el de Paku i Paweletz (Alt. 2.) . En vermell es representen les EC, en marró els perícits i en verd les altres cèl·lules murals d'altre origen.

Dintre de les molècules implicades es troben varis factors de creixement com és el bFGF, implicat en la proliferació, migració i modulació de les molècules implicades en la unió intercel·lular de les cèl·lules endotelials. La seva activitat és a més sinèrgica amb altres factors implicats en l'angiogènesi (Itoh and Ornitz 2004). Un altre factor molt important és el VEGF que actua com a activador general de la proliferació de les EC, i com a factor quimiotàctic. És el

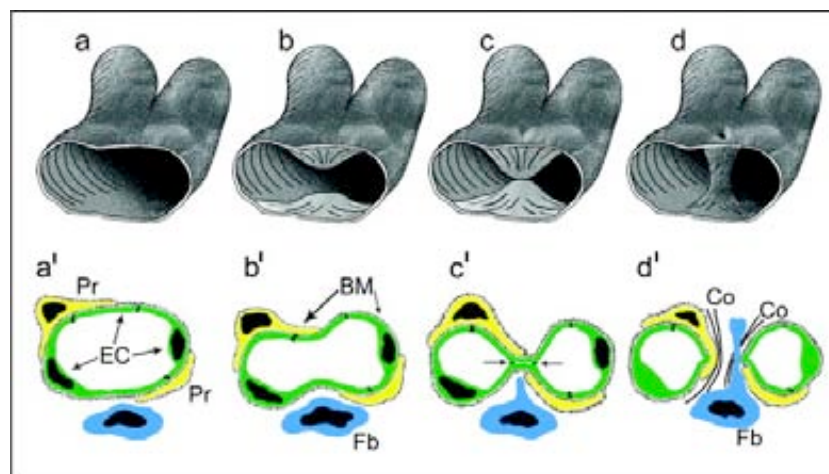
vasodilatador més important dels vasos existent i també augmenta la seva permeabilitat (Ferrara *et al.* 2003). També és el responsable de l'augment de l'expressió de MMPs i del uPA, responsables de la degradació de la ECM i de la posterior migració de les EC (Bergers *et al.* 2000). Dintre de la família dels VEGF i del seus receptors, l'eix més important és el del VEGF-A/VEGF-R2 en l'angiogènesi per ramificació (Ferrara *et al.* 2003). Un altre factor important és el PLGF que està produït per múltiples tipus cel·lulars com poden ser les EC, les SMC, cèl·lules inflamatòries, i les pròpies cèl·lules tumorals . (Carmeliet *et al.* 2001; Iyer and Acharya 2002). Altres factors importants són les angiopoietines (Davis *et al.* 1996; Maisonpierre *et al.* 1997), el TGF- $\beta$  (Elliott and Blobbe 2005), el factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) (Armulik *et al.* 2005), el EGF (Petit *et al.* 1997) i la IL-8 (Li *et al.* 2003).

## 6.2. Co-opció de vasos.

El creixement tumoral al llarg del que és una xarxa vascular definida se l'anomena co-opció de vasos. El primer model va ser descrit per Holash *et al.* (Holash *et al.* 1999) en el que situen a la co-opció de vasos en els primers passos de la tumorigènesi. Però les evidències indiquen que no només actua en una fase primerenca. Es troba que en cas de melanomes cutanis no existeix un creixement de la vasculatura cap al tumor si no que és el tumor que creix aprofitant el plexe peritumoral vascular preexistent en el teixit connectiu (Dome *et al.* 2002). El mateix passa en el cas del NSCLC (Pezzella *et al.* 1997). En aquest creixement alveolar les cèl·lules tumorals emplen l'alvèol, atrapant sense destruir els capil·lars alveolars co-optats. Malgrat que el capil·lars dividint-se són més sensibles a l'apoptosi que no els quiescents (Brooks *et al.* 1994) la seva supervivència també depèn de la incorporació de microvasos madurs. La supervivència dels vasos co-optats està lligada al microentorn, en particular a la presència de citocines pro-supervivència provinents dels perícits i de les proteïnes que es trobin en la ECM. Així el repertori molecular que faran servir les cèl·lules endotelials per sobreviure en un tipus de tumor o en condicions normals serà distint. Les molècules més importants descrites fins al moment són les angiopoietines i el VEGF (Holash *et al.* 1999). Segons el model de Holash l'Ang-1 activa el Tie-2 i indueix la supervivència de les EC, la seva quiescència i el manteniment dels vasos tumorals. De manera contrària Ang-2 es pensa que actua com a lligand no senyalitzador de Tie-2, antagonitzant la senyal Ang-1/Tie-2. En els vasos co-optats l'expressió de Ang-2 evita la unió de Ang-1/Tie-2, causant la desestabilització de les parets dels capil·lars. Un cop les EC s'han separat dels perícits, aquestes es tornen especialment vulnerables. En presència de VEGF, es promou la supervivència de les EC i la seva ramificació, però l'absència de factors estimuladors provoca la regressió dels vasos desestabilitzats (Benjamin *et al.* 1999).

### 6.3. Creixement microvascular per inclusió (IMG).

Es refereix a la formació d'una nova xarxa vascular a través de la inserció de columnes de teixit connectiu, anomenades pilars tissulars, en el lumen del vas, resultant en la divisió d'aquest. Aquest tipus d'angiogènesi es dona en un gran nombre de teixits normals i patològics, és més ràpida i més econòmica que la ramificació endotelial, passa en hores o minuts i no depèn de la proliferació endotelial, la degradació de la làmina basal o la invasió del teixit connectiu (Kurz *et al.* 2003). La seqüència d'aconteixements es representa en la figura 8. a,b,a',b': comença amb la invaginació de les parets oposades dels capil·lars cap al lumen del vas. Després de que contactin (c,c'), la bicapa endotelial (EC) i la làmina basal (BM) es crea una perforació central i el nou pilar augmenta en grandària després de que sigui envaït per fibroblasts (Fb) i perícits (Pr), que produiran fibres de col·lagen (Co) (d,d'). La principal funció de la IMG és la possibilitat d'incrementar la complexitat i la densitat de la xarxa microvascular ja existent creada per ramificació, independentment de la proliferació de les EC. A més, pot donar més superfície per a subseqüents ramificacions. Però el mecanisme molecular que hi ha al darrera d'aquest mecanisme és molt poc conegut. Els possibles candidats són citocines que serien mediadores d'informació entre les EC i les cèl·lules murals com el PDGF-BB, les angiopoietines, els seus receptors Tie, TGF- $\beta$ , la proteïna quimiotàctica de monòcits 1 i els receptors Eph-B (Kurz *et al.* 2003).



**Figura 8. Angiogènesi per inclusió.** Representació en 3-D (a-d) i en 2-D (a'-d') dels mecanismes que generen l'angiogènesi per inclusió. Imatge reproduïda de (Kurz *et al.* 2003)

### 6.4. Angiogènesi glomerulosa.

Aquesta és ben coneguda en els gliomes de grau elevat, on és una de les característiques histopatològiques del glioblastoma multiforme. Però aquests agregats vasculars (GB) també s'han descrit en altres models (Brat and Van Meir 2001). Estan formats per diversos microvasos agregats amb una làmina basal debilitada a on es troben un nombre limitat de perícits. En estudis recents s'ha

associat la presència de marcadors de tumors agressius i una baixa supervivència en pacients de càncer (Straume *et al.* 2002). En el primer model animal de GB (Sundberg *et al.* 2001), en una primera instància les EC i els pericits proliferen gràcies al VEGF en absència de cèl·lules tumorals. Contrastant amb aquest model en un altre model de GB la formació d'aquests es dona immediatament després de l'extravasació de cèl·lules tumorals i molt abans de que aparegui la necrosi (Dome *et al.* 2003), a on les cèl·lules tumorals són capaces d'empènyer els capil·lars i les ramificacions adjacents cap als nius de cèl·lules tumorals. Així en absència de ramificació endotelial la necrosi és pràcticament inexistent, suggerint la suficiència d'aquestes estructures a l'hora de cobrir els requeriments metabòlics tumorals.

### **6.5. Reclutament de cèl·lules endotelials progenitores (EPC).**

Les EPC poden ser reclutades dels seus nínxols a partir de citocines secretades per tumors com ha descrit recentment Asahara *et al.* (Asahara and Kawamoto 2004). El factor de creixement més caracteritzat és el VEGF. En la progressió tumors els nivells circulants de VEGF augmenten, així com el nombre d'EPC circulants. Després de l'arribada, és a dir després de que la EPC s'hagi inserit en una monocapa de EC madures, estímuls locals promouran la formació de molècules d'adhesió que reclutaran més EPC. Les EPC VEGF-R2, juntament amb les VEGF-R1 proliferen i són mobilitzades a la sang circulant, inserint-se en el teixit connectiu perivascular estabilitzant la vasculatura tumoral (Lyden *et al.* 2001). La importància de les cèl·lules endotelials en la creació del nínxol necessari per a la supervivència de la cèl·lula tumoral queda demostrada quan les EPC arriben primer que les cèl·lules tumorals metastàtiques facilitant la implantació i proliferació d'aquestes (Kaplan *et al.* 2005).

### **6.6. Mimetisme vasculogènic.**

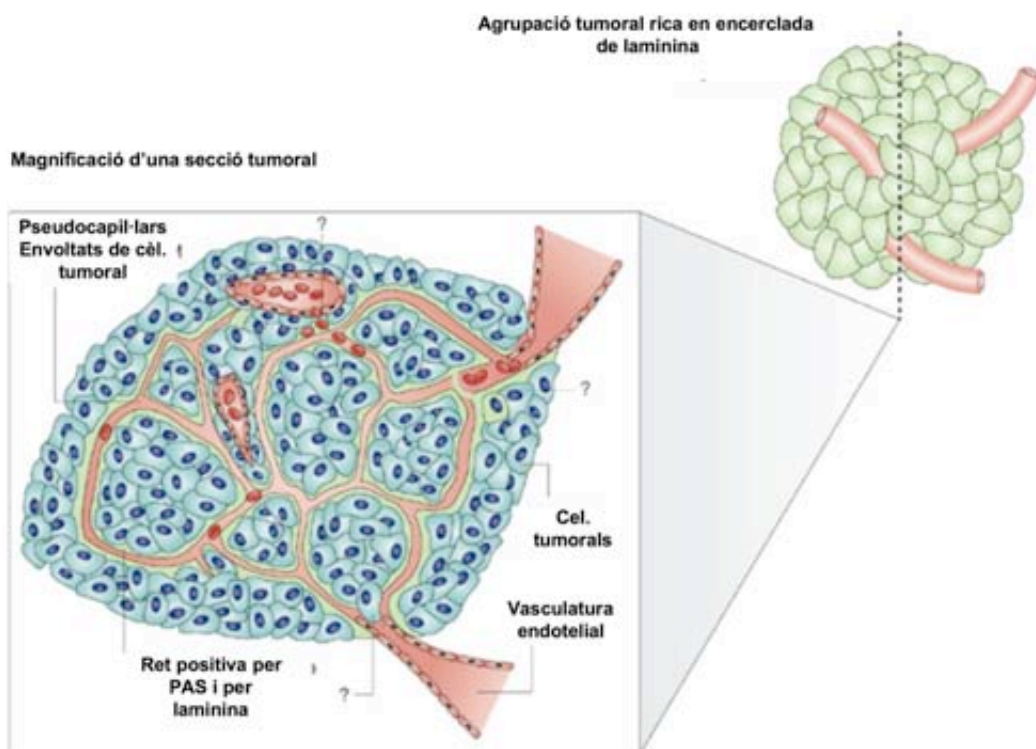
Sota el concepte de mimetisme vasculogènic es va definir l'habilitat de cèl·lules tumorals agressives de melanoma per expressar marcadors endotelials i formar estructures similars a vasculatura, riques en ECM en cultius tridimensionals que es tenyeixen per PAS (periodic acid shift). Aquestes estructures es correlacionen amb les que es troben en pacients amb tumors agressius (Folberg *et al.* 1993; Maniotis *et al.* 1999; Folberg *et al.* 2000; Seftor *et al.* 2002). Aquest fenomen també s'ha trobat en altres tipus tumorals i s'associa a un mal pronòstic (Liu *et al.* 2002; van der Schaft *et al.* 2005; Sun *et al.* 2006).

Al principi els investigadors varen observar estructures i arcs que encerclaven grups de cèl·lules tumorals, tant en xenografts com en biòpsies de pacients amb melanoma. Aquestes estructures circulars eren riques en laminina i estaven encerclades de cèl·lules tumorals. Aquests grups de cèl·lules tumorals a



més presentaven canals entre elles i s'hi trobava plasma i eritròcits, per lo que al principi se'ls va anomenar vasos vasculars. Es va pensar llavors que podien representar una nova manera de perfundir el tumor independentment de l'angiogènesi. Tenim una representació d'aquest fenomen a la figura 9.

El mimetisme vascular sembla que implica una desregulació de certs mecanismes cel·lulars ja que comporta una desdiferenciació cap un altre fenotip i pot ser detectada mitjançant diversos marcadors. I sumem-l'hi que sembla que aquest fenomen no pot ser inhibit mitjançant la teràpia antiangiogènica clàssica (van der Schaft *et al.* 2004). Així aquest mecanisme pot ser important a l'hora de dissenyar teràpies antiangiogèniques.



**Figura 9.** Representació esquemàtica de fenomen del mimetisme vasculogènic. (Modificada de (Hendrix *et al.* 2003)).

### 6.6.1. El fenotip del mimetisme vasculogènic en càncer.

Estudis anteriors en pacients amb melanoma mostraven una forta correlació entre un mal pronòstic i la presència d'estructures riques en ECM positives per tinció PAS (Hasegawa *et al.* 1996; Sakamoto *et al.* 1996; Rummelt *et al.* 1998; Seregard *et al.* 1998; Makitie *et al.* 1999; Thies *et al.* 2001; Warso *et al.* 2001). En algunes zones a on la vasculatura és pràcticament inexistent i no es presenta necrosi, aquestes estructures podien representar un nou tipus de microvasculatura. Però aquesta interpretació va portar molta controvèrsia dintre dels especialistes (McDonald *et al.* 2000).

La recerca posterior intentant aclarir el fenomen va portar descobriments significatius, sobretot gràcies a la comparació de línies de melanoma agressives envers les poc agressives. Quan sembrem cèl·lules de melanoma agressives en matrius de tres dimensions formen patrons de ECM envoltant a les cèl·lules agrupades, que es pareixen al que es pot observar en pacients (Maniotis *et al.* 1999; Hess *et al.* 2001). En les mateixes condicions de cultiu les cèl·lules no agressives de melanoma no són capaces de formar aquestes estructures (Maniotis *et al.* 1999; Hess *et al.* 2001; Seftor *et al.* 2002).

El perfil d'expressió gènica de 45 melanomes cutanis i uveals ha donat noves pistes sobre el fenotip d'aquestes cèl·lules (Bittner *et al.* 2000; Seftor *et al.* 2002; Seftor *et al.* 2002). L'espectre de gens regulats a l'alça ens diu que són molts els fenotips que poden adquirir aquestes cèl·lules agressives. Alguns d'aquests gens s'han associat amb un fenotip embrionari i requereixen més investigació (Ramalho-Santos *et al.* 2002).

Però l'expressió dels típics marcadors de melanoma es troba reduïda en aquestes cèl·lules agressives, per exemple l'expressió del factor de transcripció associat a la microftalmia (MITF) està inhibit en un factor de 34 envers de la línia poc agressiva (Bittner *et al.* 2000). Aquest factor de transcripció activa l'expressió de la tirosinasa, un enzim relacionat amb la diferenciació del melanòcit (Tachibana *et al.* 1996) també desregulat. Així sembla que les cèl·lules de melanoma per adquirir un fenotip agressiu el que fan és desdiferenciar-se, fent encara més complicada la seva identificació mitjançant tècniques histopatològiques clàssiques.

Molts dels gens que es troben regulats a l'alça en melanoma agressiu estan vinculats amb angiogènesi o vasculogènesi, com el gen que codifica per la VE-cadherina, EphA2, i la cadena gamma de la laminina (Hendrix *et al.* 2001; Hess *et al.* 2001; Seftor *et al.* 2001). Aquestes proteïnes són necessàries per la formació i manteniment de la vasculatura (Risau 1997; Hynes *et al.* 1999; Carmeliet 2000).

La VE-cadherina és una molècula d'adhesió específica d'endoteli que promou interaccions homotípiques cèl·lula-cèl·lula (Hynes 1992; Lampugnani *et al.* 1992). EphA2 és un receptor que forma part de la família dels receptors d'efrina (Pasquale 1997). La unió del seu lligand ephrin-A1 provoca la seva fosforilació i la senyalització (Rosenberg *et al.* 1997), i aquesta via s'ha relacionat amb la proliferació de les cèl·lules tumorals (Straume and Akslen 2002). Nivells elevats d'expressió s'han relacionat amb el creixement de melanomes i una pitjor taxa de supervivència (Easty *et al.* 1999).

Les laminines són components molt importants de les membranes basals, i regulen múltiples processos entre ells l'angiogènesi (Malinda and Kleinman 1996). El tall proteolític de les laminines, especialment la cadena 5 $\gamma$ 2 pot alterar el comportament migratori de certs tipus cel·lulars (Giannelli *et al.* 1997; Malinda *et al.* 1999; Koshikawa *et al.* 2000; Straume and Akslen 2002), així la laminina podria ser un inductor en el microentorn al facilitar la progressió tumoral.

En relació al fenomen del mimetisme vasculogènic a nivell proteic, tant la VE-cadherina, com la EphA2 i la cadena 5 $\gamma$ 2 de la laminina només s'expressen

en línies agressives i no en las no agressives o en les que ho són poc (Hendrix *et al.* 2001; Hess *et al.* 2001; Seftor *et al.* 2001). Modificant els nivells d'aquestes proteïnes i portant assaigs de formació de túbuls *in vitro* s'ha pogut comprovar que la inhibició completa d'aquestes proteïnes implica la disrupció de la formació d'aquestes estructures (Hendrix *et al.* 2001; Hess *et al.* 2001; Seftor *et al.* 2001).

Una altra aproximació ha permès determinar que les matrius precondicionades per línies agressives són capaces d'induir un fenotip de mimetisme vascular en aquelles que no ho són (Seftor *et al.* 2001). Aquest estudi indica la necessitat de cooperació entre la cadena 5 $\gamma$ 2 de la laminina, la MMP-2 i la MT1-MMP en el mimetisme vascular de melanoma. La laminina co-localitza a més amb les estructures positives per a tinció de PAS, tant *in vivo* com *in vitro*. Aquestes dades indiquen que les cèl·lules de melanoma agressives dipositen senyals al microentorn tumoral. Aquests senyals són els fragments de tall de la cadena 5 $\gamma$ 2 de la laminina produïts per la MMP-2 i la MT1-MMP i la inducció del mimetisme en les cèl·lules poc agressives implica l'expressió de marcadors com la VE-cadherina, la EphA2 i la cadena 5 $\gamma$ 2 de la laminina. Si s'inhibeix l'acció de les MMP's mitjançant tetraciclins modificades aquesta inducció de fenotip se neutralitza (Seftor *et al.* 2002). Si a més el que fem és posar melanòcits normals en matrius precondicionades per melanomes agressius aquestes a més de presentar un fenotip vasculogènic el que fan és sobreexpressar marcadors relacionats amb aquest fenomen (Seftor *et al.* 2005). Aquestes aproximacions ens donen més indicacions sobre la importància del microentorn en el destí cel·lular. Un altre inductor d'aquest tipus de plasticitat tumoral és la hipòxia com s'ha descrit en el cas del sarcoma d'Ewing (van der Schaft *et al.* 2005). Aquest tipus de sarcoma que es presenta sobre tot en l'adolescència va ser descrit primerament com un endotelioma (Ewing 1921) degut al elevat contingut de glòbuls vermells en aquests tumors. Aquest recent treball de van der Schaft *et al.* descriu com a factor inductor del fenotip vasculogènic a la hipòxia elevant els nivells de les proteïnes implicades en aquest procés (van der Schaft *et al.* 2005). Cal afegir que el la densitat vasculars en aquests tumors és molt baixa, i que la presència de estructures positives per PAS té un 95% de prevalença en la seva cohort a més de que la presència de metàstasi en el diagnòstic és del 25%.

### 6.6.2. Implicacions terapèutiques del mimetisme vasculogènic.

Tot i això malgrat ser cèl·lules tumorals amb característiques endotelials les teràpies antiangiogèniques clàssiques no funcionen. Dintre de totes les molècules, les clàssiques angiogèniques com el VEGF, bEGF o el PDGF no han obtingut resultats a l'hora d'induir el mimetisme vasculogènic en cèl·lules poc agressives de melanoma (Maniotis *et al.* 1999). Això és un indicatiu de que els senyals que activen les vies angiogèniques clàssiques no són les mateixes que activen el mimetisme vasculogènic. A més les teràpies antiangiogèniques clàssiques no inhibeixen la formació de les estructures pseudovasculars (van der Schaft *et al.* 2004). Fins al moment només les tetraciclins modificades químicament, que tenen una activitat inhibidora enfront de les MMP, han donat

resultats a l'hora d'inhibir la formació de les estructures pseudovasculars (Seftor *et al.* 2002) però la seva administració ha donat efectes secundaris prou importants (Ghate *et al.* 2001).

## Objectives.

Working hypothesis:

ADAMTS1 has a multimodular structure that is potentially involved in the interaction with ECM components. These interactions could explain the controversial roles given to ADAMTS1 in cancer progression. The knowledge of possible partners/substrates could unravel the mechanisms that underlies ADAMTS1 actions and consequences.

Accordingly, our main objectives were:

- (i) Look for ADAMTS1 partners and potential substrates by different biochemical approaches.
- (ii) Unravel the molecular and functional implications of such interaction.
- (iii) Ascertain the consequences of the interaction in tumor progression.



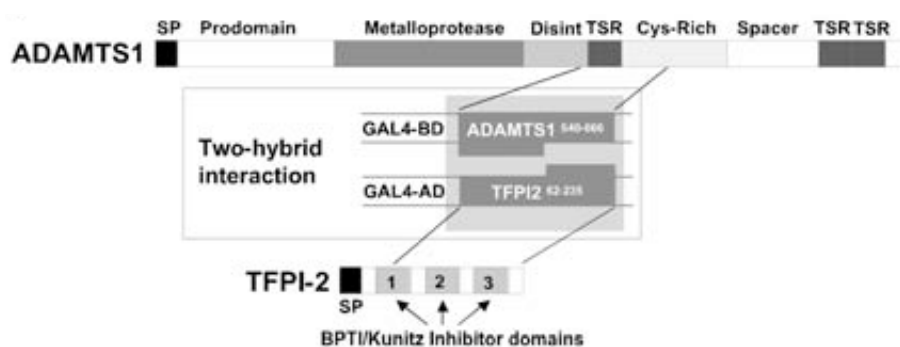
## Results.

### **ADAMTS1 interacts with, cleaves and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2).**

(Work published in *Journal of Biological Chemistry*, Jun 30;281(26):17827-37)

#### ***Identification of TFPI-2 as an interacting protein of ADAMTS1.***

A yeast two-hybrid screen of a human placenta cDNA library was performed to identify ADAMTS1 interacting proteins. Given the multi-domain structure of ADAMTS1 and the high probability of false positive clones, we decided to perform the screen using discrete modular domains of the coding region. A fragment of human ADAMTS1 containing the first thrombospondin type I repeat (TSR) and part of the Cysteine-Rich region (encoding aa residues 540 to 666) was used as bait (Figure 10). Among several positive clones identified, the sequencing of the clone F2,3.3 included an insert that corresponded to the complete 3'-end (from nucleotide 258) of the human tissue factor pathway inhibitor-2 cDNA (accession number NM\_006528). This sequence encoded for the entire C-terminal TFPI-2 protein (from aa residue 62) that included the last two Kunitz inhibitory domains (Figure 10).



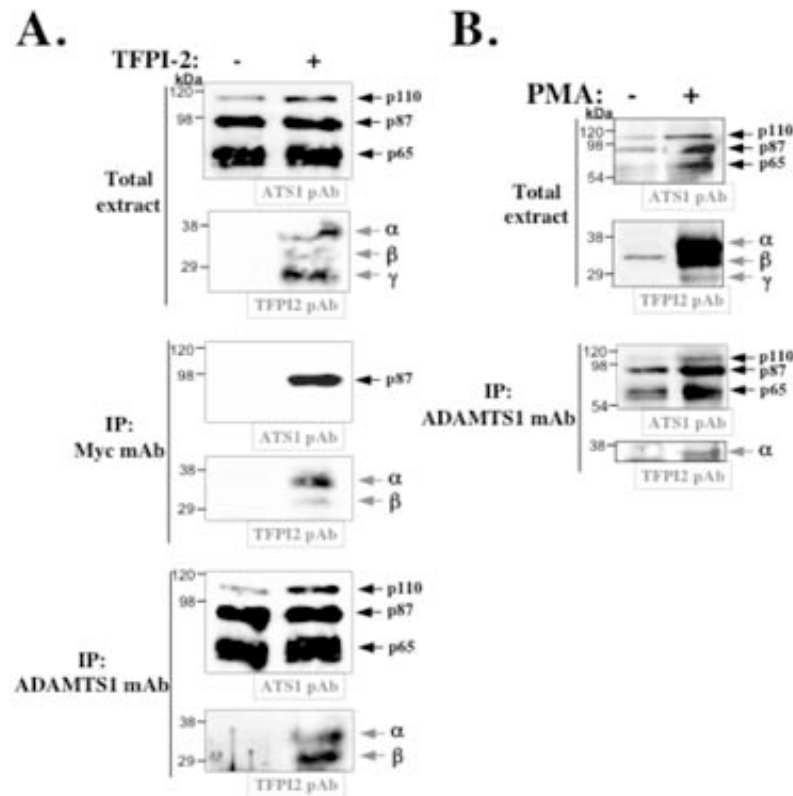
**Figure 10. Schematic representation of the ADAMTS1 and TFPI-2 proteins.** The inset shows the ADAMTS1 domain used as bait and the TFPI-2 interacting region as revealed by the yeast two-hybrid screen. SP, signal peptide; Cys-Rich, cysteine-rich domain; TSR, thrombospondin type I repeat; GAL4, yeast transcription activator; BD, binding domain; AD, activating domain.

### ***Interaction of TFPI-2 and ADAMTS1 in a cell culture model.***

To confirm the ADAMTS1/TFPI-2 interaction, we performed co-immunoprecipitation studies in a mammalian cell-based system. 293T cells that constitutively over-expressed ADAMTS1 were transiently transfected with a TFPI-2-Myc chimera construct (scheme in Figure 38, Material and Methods) or a control vector. Conditioned medium from these cells was independently subjected to immuno-precipitation with Myc and ADAMTS1 monoclonal antibodies (Figure 11A). Both  $\alpha$  and  $\beta$  TFPI-2 isoforms were pulled-down with the Myc antibody; the  $\gamma$  TFPI-2 isoform, however, was not adequately resolved. In addition, p87-ADAMTS1 was observed to co-immunoprecipitate with the Myc antibody in the presence of TFPI-2, suggesting a specific interaction between these two proteins. To avoid antibody cross-reactivity, Western-blot analyses were done with rabbit and guinea pig polyclonal antibodies to detect TFPI-2 and ADAMTS1 proteins, respectively. When the ADAMTS1 monoclonal antibody that recognizes all the forms of the protease was used in immunoprecipitation experiments, we observed the co-precipitation of both  $\alpha$  and  $\beta$  TFPI-2 isoforms; again the  $\gamma$  TFPI-2 isoform was not identified (Figure 11A). Also, in this experiment, the antibodies used for the final detection were different than the ones used to pull-down the complexes.

Further validation of the interaction was achieved on 293T parental cells previously treated with phorbol esters (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA). This stimulus is known to induce the expression of TFPI-2 (Iochmann *et al.* 2002) and here we demonstrate that it also induces ADAMTS1 expression (Figure 11). For these assays, conditioned medium from 293T cells that were either treated or not treated with PMA for 48 h was harvested and immunoprecipitated with the ADAMTS1 monoclonal antibody. As expected, the analysis of these complexes revealed the presence of both ADAMTS1 and TFPI-2 only when the cells were stimulated with PMA (Figure 11B).





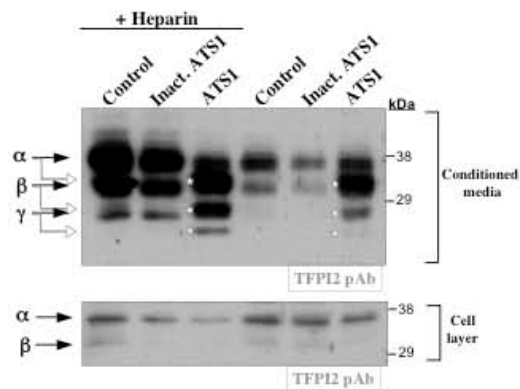
**Figure 11. Interaction of ADAMTS1 and TFPI-2 in a cell-based system.** *A*, 293T cells that over-express ADAMTS1 were transiently transfected with the TFPI-2-Myc or control expression vector. 3 ml of conditioned medium were collected, pre-absorbed and subjected to co-immunoprecipitation with either a Myc or ADAMTS1 monoclonal antibody as described in Material and Methods. Total extracts are the result of concentrating 0.5 ml of the same conditioned medium subjected to immunoprecipitation. *B*, After parental 293T cells were treated with PMA for 48 h, 8 ml of conditioned medium were pre-absorbed and subjected to co-immunoprecipitation with an ADAMTS1 monoclonal antibody as described in experimental procedures. To visualize the total amounts of both proteins 2 ml of the same conditioned medium were concentrated. Western blots were performed with polyclonal antibodies for ADAMTS1 and TFPI-2.

α, β and γ represent different glycosylated TFPI-2 forms; p110, p87 and p65 represent different ADAMTS1 forms.

### ***TFPI-2 is a substrate of ADAMTS1.***

TFPI-2 is a broad-spectrum protease inhibitor that targets both serine proteases and matrix metalloproteases. Thus, we first speculated that TFPI-2 could function as an endogenous inhibitor of ADAMTS1. To test this hypothesis, we evaluated the effect of TFPI-2 on aggrecan and syndecan-4 proteolytic assays, as these proteoglycans are known substrates for ADAMTS1 [(Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002) and J.C. Rodriguez-Manzaneque, D. Carpizo, M. C. Plaza-Calonge, A.X. Torres-Collado, S. N-M Thai, M. Simons, A. Horowitz and M. L. Iruela-Arispe, submitted for publication]. However, the presence of TFPI-2 did not alter the proteolytic activity of ADAMTS1 on these substrates (data not

shown). We then considered the potential effect of ADAMTS1 on TFPI-2. Cells over-expressing the inhibitor were transfected with either wild-type ADAMTS1 or the catalytically inactive form [zinc-binding site mutant (E<sup>385</sup>>A)-ADAMTS1 (Rodriguez-Manzanque *et al.* 2002)]. As seen in Figure 12A (last three lanes), the presence of ADAMTS1 resulted in increased levels of TFPI-2 in the conditioned media together with an apparent shift in the pattern of secreted isoforms. In contrast, this effect was not observed on cells transfected with the catalytically inactive ADAMTS1. To better understand this process, we used two types of arrows to indicate the different states of TFPI-2 isoforms, where the black arrow indicates the primary TFPI-2 products and the white arrow corresponds to the forms originated in the presence of ADAMTS1. Stars next to the bands also denote the new forms. We evaluated TFPI-2 levels in the presence of heparin, known to release ECM-bound and cell surface-anchored TFPI-2 (Liu *et al.* 1999). Although the overall quantities of soluble TFPI-2 were equivalent under these conditions, the mentioned changes in the pattern of TFPI-2 secreted isoforms persisted in the presence of ADAMTS1 (Figure 12). When the cell layer compartment was analyzed, the  $\alpha$ -isoform of TFPI-2 was found to be predominant (Figure 12). A slight decrease of this form was observed in the presence of ADAMTS1 but no evidence of additional products appeared, which is indicative of the extracellular nature of this event. According to these data, we further explored the possibility that these changes in TFPI-2 are due to proteolysis by ADAMTS1.

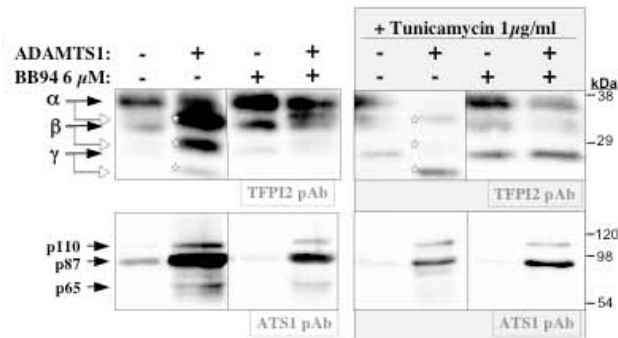


**Figure 12. Identification of TFPI-2 as a substrate of ADAMTS1 (I).** 293T cells that over-express TFPI-2 were transiently transfected with the full-length ADAMTS1 (AT51), the catalytic inactive mutant (E<sup>385</sup>>A)-ADAMTS1 (Inact. AT51) or a control expression vector (Control). 24 h after transfection, cells were serum-deprived and, when indicated, treated with heparin. 0.5 ml of conditioned media and 100  $\mu$ g of cell layer were concentrated and subjected to analysis by Western blot with the TFPI-2 polyclonal antibody.

Black arrows indicate the primary TFPI-2 isoforms and white arrows indicate the modified isoforms in the presence of ADAMTS1. Stars point to the modified isoforms in the presence of the protease.

It has been previously reported that differences between TFPI-2 isoforms are due to post-translational glycosylation events (Rao *et al.* 1996). To facilitate our evaluation, the glycosylation inhibitor tunicamycin was included in this analysis. Tunicamycin treatment resulted in the appearance of two main bands of TFPI-2 (Figure 13): the highly glycosylated  $\alpha$  isoform that appears more abundantly in normal conditions and the under-glycosylated  $\gamma$  TFPI-2 isoform.

Treatment with tunicamycin did not fully prevent the synthesis of the  $\alpha$  isoform but increased the level of the  $\gamma$  isoform. Interestingly, the differences in the pattern of secreted isoforms imposed by ADAMTS1 persisted and the treatment with tunicamycin made the shift more apparent (Figure 13). In addition, treatment with the metalloprotease inhibitor BB94 caused the normalization of the TFPI-2 pattern in the presence of ADAMTS1. This effect was clearly noted in the presence of tunicamycin (Figure 13). ADAMTS1 was also evaluated to verify that tunicamycin and BB94 treatments did not alter its relative levels in the conditioned medium.

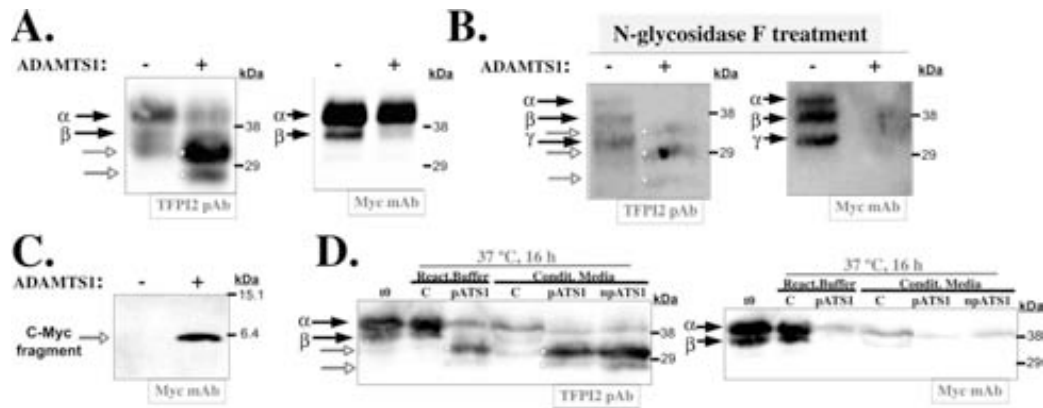


**Figure 13. Identification of TFPI-2 as a substrate of ADAMTS1 (II).** 293T cells that over-express TFPI-2 were transiently transfected with full-length ADAMTS1 or a control expression vector. 24 h after transfection, cells were serum-deprived and treated with BB94 and Tunicamycin as indicated. Conditioned medium was harvested 48 h after treatment and the presence of TFPI-2 and ADAMTS1 was determined by Western blot analysis with the detailed antibodies.

Black arrows indicate the primary TFPI-2 isoforms and white arrows indicate the modified isoforms in the presence of ADAMTS1. Stars point to the modified isoforms in the presence of the protease.

To gain information as to the approximate location of the cleavage site, we used the TFPI-2 construct that possessed a Myc-tag flag in the carboxyl-terminal region (TFPI-2-Myc) (Scheme in Figure 38, Material and Methods). Analysis of conditioned medium of cells transfected with this construct revealed that the TFPI-2 forms that appeared shifted in the presence of ADAMTS1 (white arrows and stars in Figure 14A), were not recognized by the Myc antibody, although the amounts of protein were substantial. This observation indicated that the processing of TFPI-2-Myc occurred at the C-terminal fragment that provokes the release of the Myc-tag. We also performed de-glycosylation treatments with N-glycosylase F of this conditioned medium containing secreted TFPI-2-Myc in the absence and presence of ADAMTS1. Although not fully efficient, such treatment provoked an enrichment of under-glycosylated forms and the mentioned changes in motility persisted, supporting the existence of a catalytic process. Again, re-probing of this membrane with the Myc-antibody confirmed the deletion of the C-terminal fragment in all forms by the action of ADAMTS1 (Figure 14B). Importantly, we were able to visualize the released C-terminal fragment with an apparent molecular weight of approximately 6 kDa, by concentration of high amounts of conditioned media and further resolution in Tricine gels (Figure 14C).

To prove that this cleavage is performed by ADAMTS1, we took advantage of the His-tag present in the TFPI-2-Myc chimera. We purified this recombinant form under denaturing conditions using Ni-NTA agarose and treated it at 37 °C for 16 h with purified recombinant ADAMTS1 (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000) (pATS1 in Fig. 14D) and compared with conditioned media containing non-purified ADAMTS1 (npATS1 in Fig. 14D). This digestion raised the same pattern of bands and the deletion of the C-terminal end of TFPI-2-Myc was confirmed by Western blot analysis with the Myc antibody (Fig. 14D).

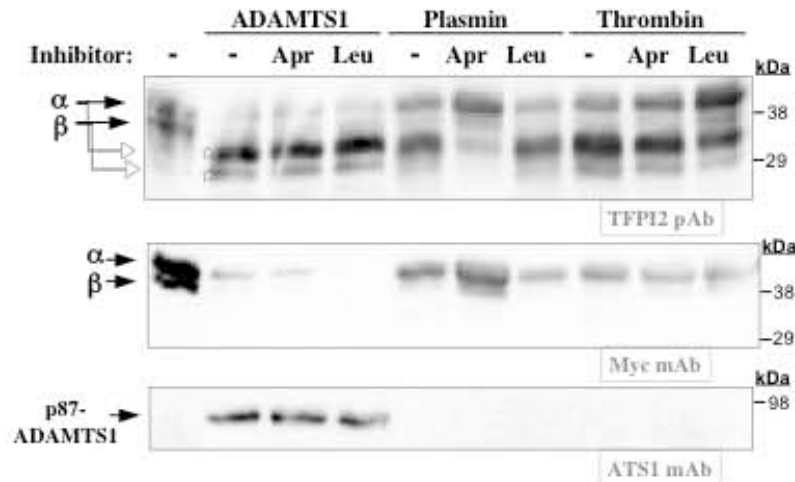


**Figure 14. ADAMTS1 cleaves TFPI-2 at its C-terminal domain.** *A*, 293T cells that over-express TFPI-2-Myc were transiently transfected with full-length ADAMTS1 or a mock expression vector. 24 h after transfection, cells were serum-deprived. After 48 h, 0.5 ml of conditioned media were concentrated and subjected to analysis by Western blot with a TFPI-2 polyclonal antibody. Same western was stripped and re-probed with a Myc monoclonal antibody. *B*, From cells as *A*, 0.5 ml of conditioned media were methanol-precipitated and incubated in the presence of N-glycosidase F. Samples were finally analyzed by Western blot with TFPI-2 and Myc antibodies. *C*, From cells as *A*, 8 ml of conditioned media were concentrated, resolved in 18% Tricine gels and analyzed by Western blot with a Myc monoclonal antibody. *D*, Purified TFPI-2-Myc protein was incubated with reaction buffer and 293T conditioned media in the absence and presence of purified (pATS1) and non-purified ADAMTS1 (npATS1). These samples and the starting material were resolved and analyzed by Western blot. Black arrows indicate the primary TFPI-2 isoforms and white arrows indicate the modified isoforms in the presence of ADAMTS1. Stars point to the modified isoforms in the presence of the protease.

### ***Protease-sensitivity of TFPI-2 C-terminal region.***

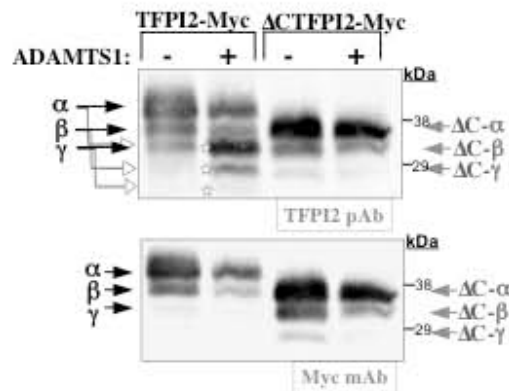
A close analysis of this sequence reveals an enrichment of basic residues (R and K) that suggested its sensitivity to plasmin and thrombin proteases. In addition, the equivalent region in TFPI is sensitive to the action of such enzymes (Ohkura *et al.* 1997; Li and Wun 1998). Accordingly, the addition of plasmin and thrombin to 293T cells over-expressing TFPI-2-Myc construct caused a similar cleavage pattern observed with ADAMTS1 (Figure 15). The release of the C-terminal fragment was demonstrated by analysis with a Myc antibody. To confirm the specificity of these catalytic events and the independence of the ADAMTS1 action, we used specific serine-protease inhibitors for plasmin and thrombin, such as aprotinin and leupeptin, respectively. As expected, the

presence of these inhibitors blocked the action of plasmin and thrombin but it did not have any effect on ADAMTS1 activity.



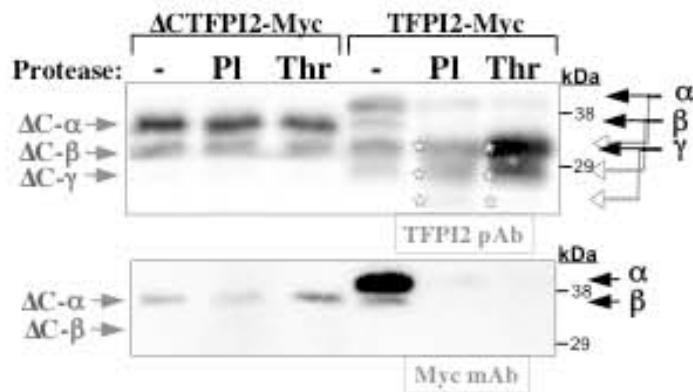
**Figure 15. Protease-sensitivity of TFPI-2 C-terminal region (I).** 293T cells that over-express TFPI-2-Myc were transfected with ADAMTS1 or control vector. 24 h after transfection, cells were serum-deprived and treated with plasmin, thrombin, aprotinin and/or leupeptin as indicated. After 24 h, 0.5 ml of conditioned media were concentrated and subjected to analysis by Western blot with TFPI-2, Myc, and ADAMTS1 antibodies.

The observed shifts in the sizes of TFPI-2 isoforms indicated that the cleavage sequence for ADAMTS1 and serine-proteases is located in the final 2-2.5 kDa portion of TFPI-2. To test this further, we generated a truncated TFPI-2 form ( $\Delta$ TFPI-2-Myc) designed to lack the cleaved region (from aa 215) but it still retained the last Kunitz-type domain, that finishes at aa 208. A Myc tag was also added at the C-terminal end of this truncated version (scheme in Figure 38, Material and Methods). Transfection experiments with this TFPI-2 form in the absence and presence of ADAMTS1 showed no changes in the pattern of secreted isoforms in contrast with the full-length TFPI-2-Myc construct (Figure 16, top panel). Re-probing the same membrane with a Myc antibody showed an identical profile to that given by the TFPI-2 antibody (Figure 16, bottom panel). These results demonstrated that the cleavage site is located at the deleted region and it does not affect the Kunitz inhibitory domains.



**Figure 16. Protease-sensitivity of TFPI-2 C-terminal region (II).** 293T cells were transiently co-transfected with full-length ADAMTS1, TFPI-2-Myc, and  $\Delta$ CTFPI2-Myc expression vectors as indicated. 24 h after transfection, cells were serum-deprived. After 48 h, 0.5 ml of conditioned media were concentrated and subjected to analysis by Western blot with TFPI-2 and Myc antibodies.

In addition, to confirm that the tested serine-proteases acted at the same region as ADAMTS1, we performed similar assays with the truncated  $\Delta$ CTFPI-2-Myc construct resistant to ADAMTS1 activity. Both plasmin and thrombin did not exert any catalytic action on this TFPI-2 construct that lacked the C-terminal region (Figure 17), confirming the sensitivity of this region to proteases of diverse nature.

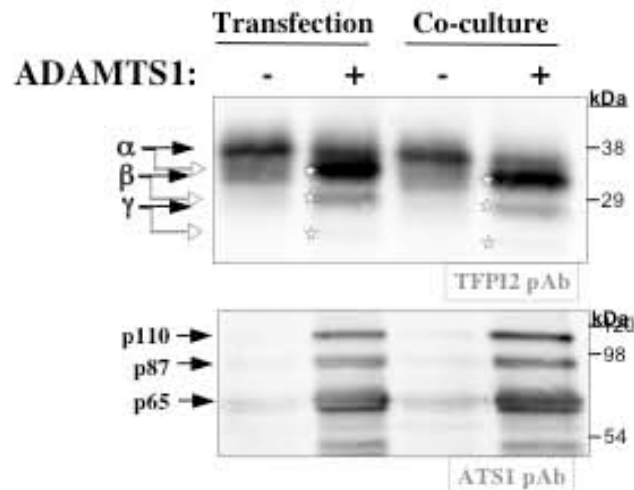


**Figure 17. Protease-sensitivity of TFPI-2 C-terminal region (III).** 293T cells were transiently transfected with TFPI-2-Myc or  $\Delta$ CTFPI2-Myc vectors as indicated. 24 h after transfection, cells were serum-deprived and treated with plasmin or thrombin as indicated. After 24 h, 0.5 ml of conditioned media were concentrated and subjected to analysis by Western blot with TFPI-2 and Myc antibodies

### ***Requirements for the cleavage of TFPI-2.***

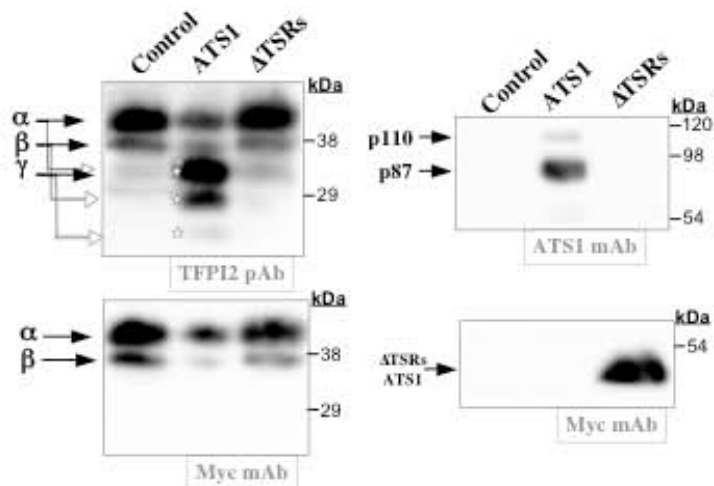
Because ADAMTS1 and TFPI-2 are secreted molecules that associate with the ECM and the cell surface, we explored the requirements of proximity and/or co-location between these two factors for the cleavage of TFPI-2 to occur. First, in addition to the co-transfection assays that illustrated a potential *cis*

cleavage and autocrine mode of action, we performed co-culture experiments with two cell populations that over-expressed ADAMTS1 and TFPI-2 independently. Under both experimental conditions we observed the same shift in TFPI-2 pattern in the presence of ADAMTS1 (Figure 18). These results demonstrated that ADAMTS1 activity on TFPI-2 could take place in a juxtacrine, paracrine and/or autocrine manner.



**Figure 18. Requirements for the cleavage of TFPI-2 (I).** 293T cells that over-express TFPI-2 were seeded at  $2 \times 10^5$  cell/ml in a 6-well plate. As indicated, these cells were transfected with ADAMTS1 or mock expression vector, or co-cultured with 293T control or 293T over-expressing ADAMTS1 cells. 24 h after transfection or co-culture, cells were serum-deprived. After 72 h, 0.5 ml of conditioned medium was collected and the presence of TFPI-2 and ADAMTS1 was determined by Western blot analysis with ADAMTS1 and TFPI-2 antibodies.

As shown above, the interaction between ADAMTS1 and TFPI-2 is mediated by the ADAMTS1 domain containing the thrombospondin-repeats (TSRs). However, such experiments did not determine if the interaction is required for the cleavage of TFPI-2. Now, 293T cells over-expressing TFPI-2 were transiently transfected with either full length ADAMTS1 or a truncated ADAMTS1 construct that lacked all TSRs but still contained an intact catalytic domain (Luque *et al.* 2003). Although high levels of the truncated ADAMTS1 form were observed by Western blot analysis with a Myc antibody (Figure 19, right panels), cleaved forms of the TFPI-2 molecule were not detected (Figure 19, left panels). In contrast, the full length protease released the expected isoforms of TFPI-2.



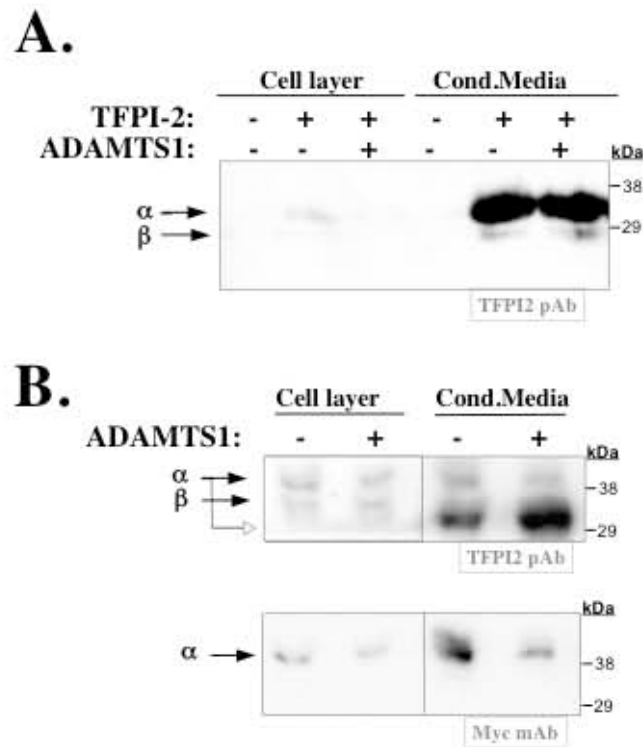
**Figure 19. Requirements for the cleavage of TFPI-2 (II).** 293T cells that over-express TFPI-2-Myc were transiently transfected with full-length ADAMTS1 and  $\Delta$ TSRs-ADAMTS1 vectors as indicated. 24 h after transfection, cells were serum-deprived. After 24 h, 0.5 ml of conditioned media were concentrated and subjected to analysis by Western blot with TFPI-2, Myc and ADAMTS1 antibodies. The Myc antibody recognizes both TFPI-2-Myc and  $\Delta$ TSRs-ADAMTS1 proteins.

### ***Effects of ADAMTS1 in the extracellular location of TFPI-2 protein in vivo.***

To test the significance of the described cleavage of TFPI-2 at its C-terminal domain, we performed several experiments with potential functional consequences. As a first approach, we used an endothelial cell model as a recognized cellular target for the action of both molecules. We added exogenous ADAMTS1 and TFPI-2 purified proteins on endothelial cell monolayers. In this assay we confirmed the affinity of TFPI-2 for the ECM compartment (Figure 19A). In addition, we evaluated the levels of TFPI-2 anchored to the cellular compartment in the presence of p87-ADAMTS1 purified protein. TFPI-2 levels in the cell layer were significantly diminished when p87 was added (Figure 20A). This is likely the result of the direct cleavage of the C-terminal domain of TFPI-2 that provides affinity to matrix components. Although this assay confirmed the displacement of TFPI-2 by ADAMTS1, the experiment cannot rule out the possibility that ADAMTS1 is targeting additional proteins in the cell layer that are directly responsible for TFPI-2 anchorage. As a second approach, we used total conditioned media from TFPI-2-Myc over-expressing 293T cells that were previously transfected with ADAMTS1 or control vector. The presence of TFPI-2 in these conditioned media was demonstrated earlier (Figure 13). After endothelial cultures were treated with these conditioned media for 24 h, we analyzed both cell layer and conditioned media. According to our previous observations, most TFPI-2 remained soluble and the isoforms that anchored to the cellular compartment appeared to be highly glycosylated and un-cleaved (Figure 20B). A slight but consistent decrease of TFPI-2 bound to the cell layer



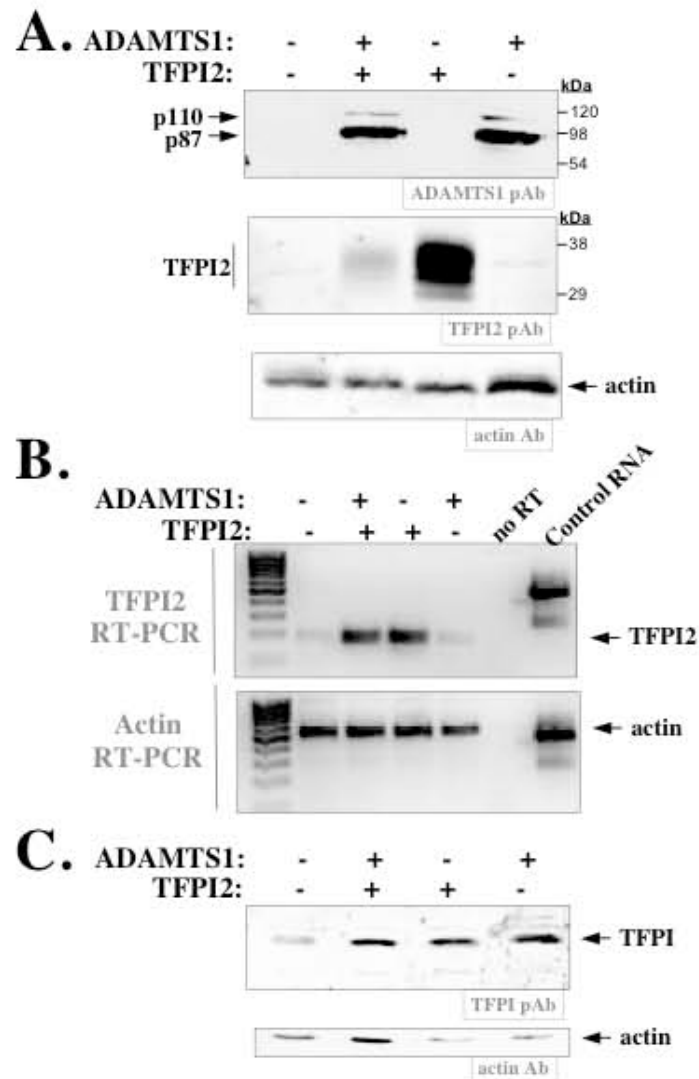
was observed in the presence of ADAMTS1. This observation is consistent with the cleavage of TFPI-2. Conversely, analysis of the conditioned media showed an increase of cleaved TFPI-2 that lacked the Myc-containing C-terminal end in the presence of ADAMTS1. We also observed important levels of the cleaved TFPI-2 form even in the absence of ADAMTS1 (third lane, Figure 20B); this is probably due to the activity of additional proteases, in agreement with our previous results.



**Figure 20. ADAMTS1 affects the location of TFPI-2 protein *in vivo*.** *A*, Lung endothelial cells (LE) were treated with purified TFPI-2 (3.2  $\mu$ g) and p87-ADAMTS1 (4  $\mu$ g). After 36 hours of treatment, cell layer and conditioned media were collected and analyzed by Western blot with a TFPI-2 antibody. *B*, LE cultures were treated with conditioned media from TFPI-2-Myc over-expressing 293T cells transiently transfected with ADAMTS1 or control vector. After 24 h of treatment, cell layer and conditioned media were collected and analyzed by Western blot with TFPI-2 and Myc antibodies.

In order to assess the magnitude of a functional *in vivo* interaction between ADAMTS1 and TFPI-2, we performed tumor xenograft assays in mice with cell lines over-expressing these molecules. Given the results presented above showing that ADAMTS1 could act in a juxtacrine and/or paracrine manner, we approached these assays by co-injecting equal amount of ADAMTS1 and TFPI-2 over-expressing cells, alone (with control cells) or in combination. The presence of ADAMTS1 was confirmed in those tumors extracts that were originated from ADAMTS1-expressing cells. No changes in ADAMTS1 levels were noted by the presence or absence of TFPI-2-expressing cells. However, we did observe markedly reduced protein levels of TFPI-2 in those tumors originated by the co-injection of TFPI-2 and ADAMTS1-expressing cells (Figure 21A). These results, though more dramatic, are in agreement with our previous

observations in a cell-based system where ADAMTS1 promoted TFPI-2 removal/solubilization from the ECM and cell-surface to the culture medium. To assess if changes in TFPI-2 protein levels might be originated by alterations in mRNA expression in the xenograft or by the predominant growth of ADAMTS1-expressing cell population *versus* the co-injected TFPI-2-expressing cells, we extracted total RNA from tumor samples and performed reverse-transcription followed by primer-specific PCR. As shown in Figure 21B, TFPI-2 mRNA levels were consistently similar in the absence or presence of ADAMTS1. Once we ruled out the possibility of changes in RNA expression, we attempted to evaluate TFPI-2 levels in the plasma. Unfortunately, our experimental approach was not sensitive enough to detect TFPI-2 levels (data not shown). We concluded that TFPI-2 protein levels were decreased in tumor xenografts in a manner that is dependent on the presence of ADAMTS1 and is likely the result of TFPI-2 processing by ADAMTS1. Regarding the final destination of the released TFPI-2, it is not clear if it was rapidly degraded or was re-directed to an unknown location. To ascertain that this effect is specific for TFPI-2, we analyzed the endogenous presence of the closely related TFPI protein. We first verified the basal levels of this protein as a single 31-kDa band. Further determinations of TFPI in the different tumor extracts did not show any evidence of mobilization or proteolytic cleavage in the presence or absence of ADAMTS1 (Figure 21C) confirming the specificity of the findings for TFPI-2.

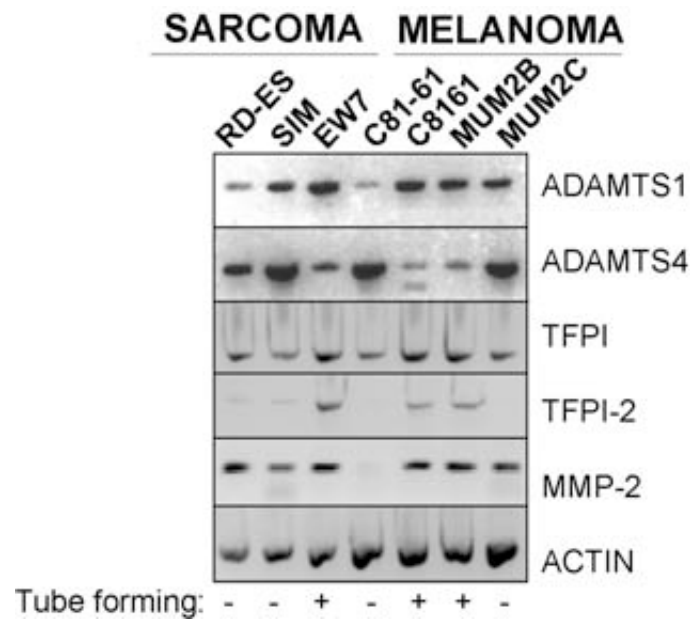


**Figure 21. ADAMTS1 affects the location of TFPI-2 in tumor xenografts.** *A*, Tumor lysates (500  $\mu$ g of total protein) from different xenografts in the absence or presence of ADAMTS1 and TFPI-2 were heparin-purified and analyzed by Western blot for the presence of these molecules with the respective polyclonal antibodies. The determination of actin levels was used to assess loading levels. *B*, Total RNA (0.5  $\mu$ g) from tumor samples was subjected to RT-PCR with specific oligos for TFPI-2 and actin (upper and lower panels respectively) according to Material and Methods. *C*, Tumor lysates (100  $\mu$ g of total protein) from different xenografts were directly analyzed by Western blot for the presence and state of the inhibitor TFPI. Actin was used to assess loading levels.

## **Induction of tumor cell plasticity by the metalloprotease ADAMTS1: Evidences for a role of Tissue Factor Pathway Inhibitor-2.**

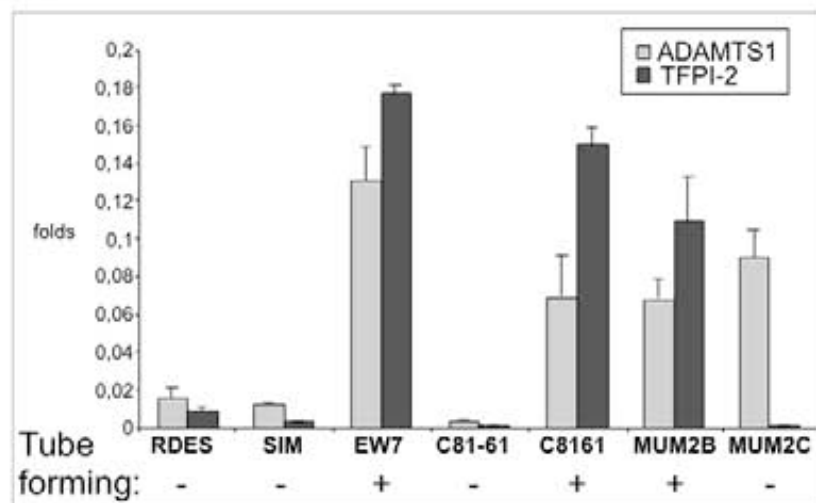
### ***Presence of TFPI-2 and ADAMTS1 in vasculogenic mimicry presenting cells.***

The presence of TFPI-2 has been previously reported as a relevant molecule in melanoma vasculogenic mimicry (VM) (Ruf *et al.* 2003). According to the functional interaction of TFPI-2 with the metalloprotease ADAMTS1, showed in previous section, we decided to explore the presence of both molecules in various melanoma and Ewing sarcoma cell lines that have been already outlined as positive (EW7, C8161, MUM2B) or negative (RD-ES, SIM, C81-61, MUM2C) VM cells (Maniotis *et al.* 1999; van der Schaft *et al.* 2005). The expression of both ADAMTS1 and TFPI-2 molecules was assessed at RNA and protein levels. For RNA analysis, we performed end point PCR with specific primers for a set of relevant genes that included: ADAMTS1, ADAMTS4, TFPI, TFPI-2, MMP-2, and actin as a loading control (Figure 22). The most remarkable finding was the unique presence of TFPI-2 in VM+ cells, that extends to sarcoma this previously reported finding in melanoma. Importantly, the expression of ADAMTS1, although detected in all cell lines, it appears increased in VM+ cells (EW7, C8161 and MUM2B). Conversely, the expression pattern of the related ADAMTS4 is associated to VM- cells, in all sarcoma and melanoma cells tested. Moreover, MMP-2 RNA levels appeared more significant in VM+ cells, according to the proposed role of this protease in VM mechanism (Seftor *et al.* 2001).



**Figure 22. Demonstration of TFPI-2 and ADAMTS1 presence in VM positive cell lines (I).** Total RNA (0.5  $\mu$ g) from tumor samples was subjected to RT-PCR with specific oligos for ADAMTS1, ADAMTS4, TFPI, TFPI-2, MMP-2 and actin of RD-ES (-), SIM/EW27 (-), EW7 (+), C81-61 (-), C8161 (+), MUM2B (+), MUM2C (-), according to Material and Methods procedures. Tube forming + and – refers to the ability of these cells to form or not to form pseudo-capillary structures in vitro.

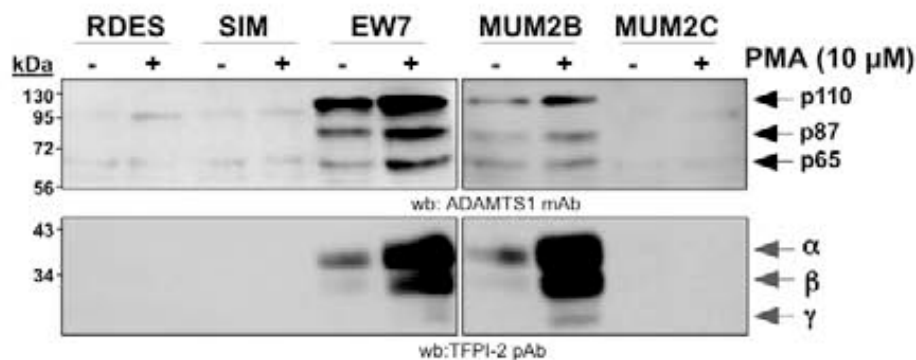
RNA levels of both ADAMTS1 and TFPI-2 were also confirmed by quantitative RT-PCR (Figure 23).



**Figure 23. Demonstration of TFPI-2 and ADAMTS1 presence in VM positive cell lines (II).** Total RNA (0.5  $\mu$ g) from cells was subjected to quantitative RT-PCR with specific oligos for ADAMTS1 and TFPI-2. Every experiment was performed at least 2 times. Tube forming + and – refers to the ability of these cells to form or not to form pseudo-capillary structures in vitro.

The presence of the respective proteins was determined by western blot analysis of the conditioned media (Figure 24). According to previous reports and

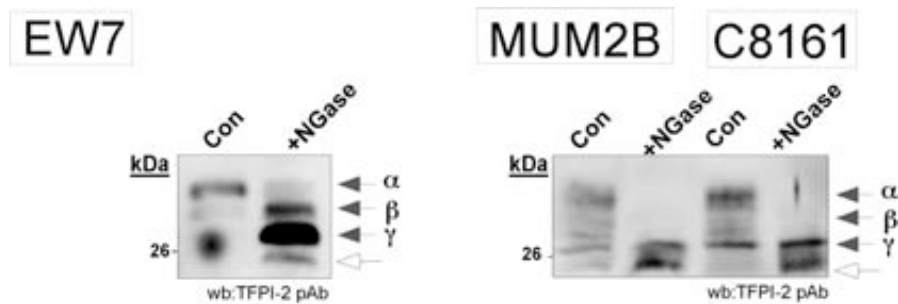
our own findings that showed that phorbol esters upregulate the expression of both ADAMTS1 (previously in this work) and TFPI-2 (Iochmann *et al.* 2002), we decided to include PMA treatments in these analyses. As showed, we clearly detected both proteins in the conditioned medium of VM+ cell lines, and absent or very low detectable amounts were observed in the non-aggressive cells. The detected pattern of ADAMTS1 and TFPI-2 proteins corresponded with the described processed forms of ADAMTS1 (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000) and the different glycosylated variants of TFPI-2 (Rao *et al.* 1996). Note that PMA treatment provokes a clear up-regulation just in those cell lines with significant basal levels (Figure 24). Finally, the expression of ADAMTS1 in MUM2C cells, observed at the RNA level, it was not confirmed by western blot analysis.



**Figure 24. Demonstration of TFPI-2 and ADAMTS1 presence in VM positive cell lines (III).** Melanoma and Ewing sarcoma cell lines were seeded on T-75 flasks. When reached 80% confluency, cells were rinsed, serum deprived and treated with or without PMA. After 48 h, 10 ml of conditioned medium was collected and the presence of TFPI-2 and ADAMTS1 was determined by Western blot analysis with ADAMTS1 and TFPI-2 antibodies.

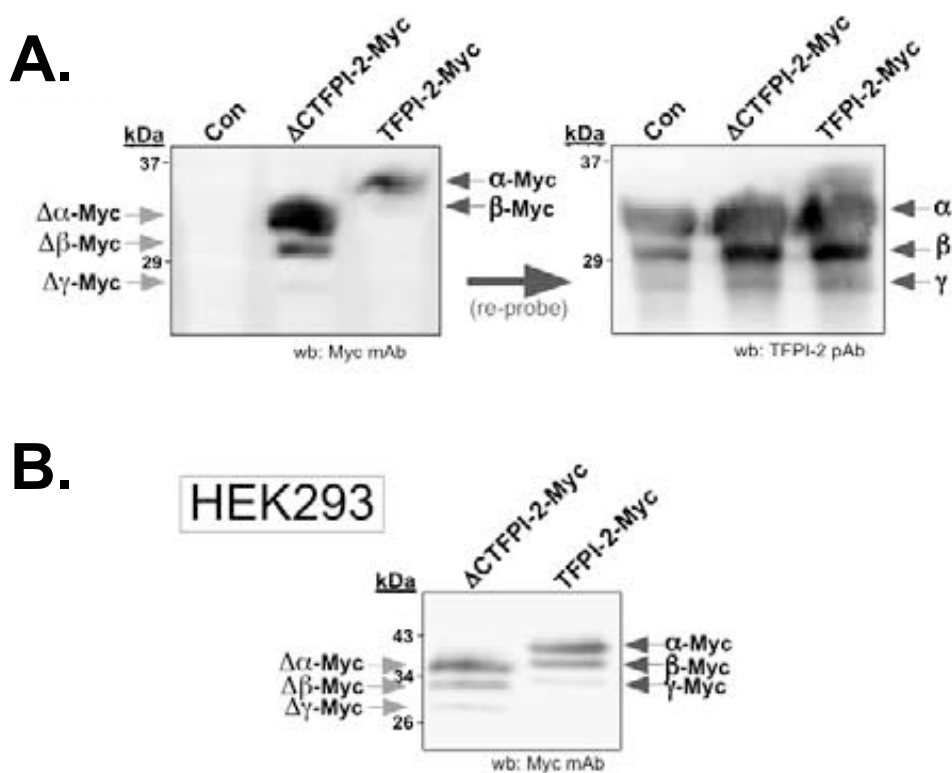
### ***Basal cleavage of TFPI-2 in VM+ cells.***

In line with our previous observations, that demonstrated the cleavage of TFPI-2 by ADAMTS1 at its C-terminal end, we analyzed the status of TFPI-2 in those cell lines where its expression concurs with the endogenous presence of ADAMTS1. Given the complexity of TFPI-2 isoforms, we performed deglycosylation treatments with N-glycosydase F, of EW7 conditioned media or ECM from MUM2B and C8161 (Figure 25). This treatment provoked an enrichment of the under-glycosylated form ( $\gamma$  TFPI-2) and it allowed the detection of an additional band with lower motility (white arrow), supporting the existence of a catalytic fragment.



**Figure 25. Demonstration of TFPI-2 cleavage in aggressive cell lines (I).** Conditioned media (EW7) or ECM (MUM2B and C8161) were methanol-precipitated and incubated in the presence of N-glycosidase F. Samples were finally analyzed by Western blot with TFPI-2 antibody.

Further demonstration of this proteolytic event was approached by parallel transient transfections of a TFPI-2-Myc and a C-terminal truncated  $\Delta$ CTFPI-2-Myc chimeras, both containing a Myc tag at its C-terminal end; this truncated version was shown to be resistant to the action of ADAMTS1 as is showed in our previous results (Figure 16). In EW7 cells, the detected levels of Myc-positive bands were significantly decreased for the full length TFPI-2-Myc construct, outcome of a proteolytic process, in comparison with the catalytically-resistant  $\Delta$ CTFPI-2-Myc (Figure 26A). Given the existence of important levels of the endogenous TFPI-2 protein, western blot analysis with a TFPI-2 antibody did not show significant differences. Same transfection efficiency of each construct was confirmed in 293T cells, that lacked both ADAMTS1 and TFPI-2. Using this cell line, the levels of Myc-positive bands was not altered among the two used constructs (Figure 26B).

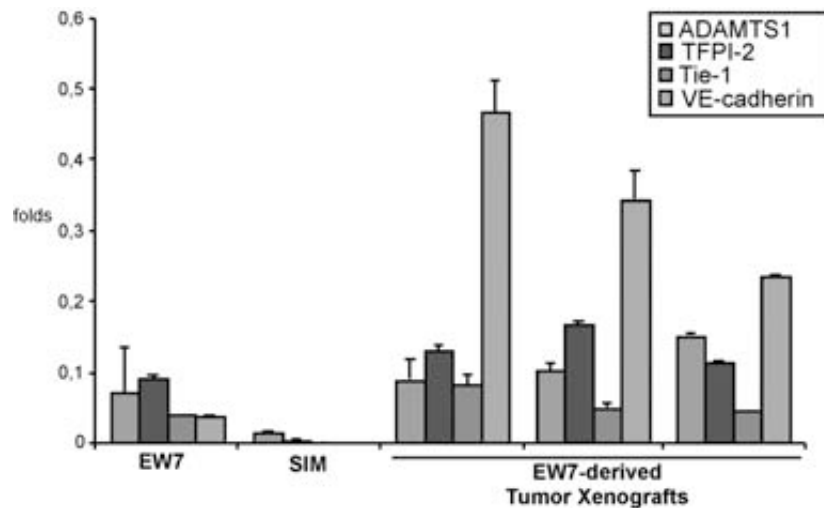


**Figure 26. Demonstration of TFPI-2 cleavage in aggressive cell lines (II).** EW7(A) and HEK293(B) cells were transiently transfected with TFPI-2-Myc, and  $\Delta$ CTFPI2-Myc expression vectors as indicated. 24 h after transfection, cells were serum-deprived. After 48 h, conditioned media were concentrated and subjected to analysis by Western blot with TFPI-2 and Myc antibodies.

***Presence of TFPI-2 and ADAMTS1 in Ewing sarcoma tumor xenografts.***

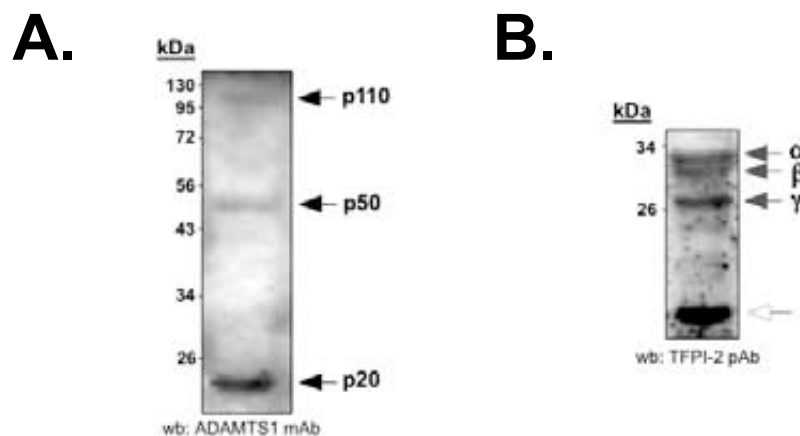
Although the presence of both proteins was confirmed in aggressive-VM+ cells, an additional proof included the analysis of tumor xenografts derived from these cell lines. Here we used material from EW7-derived xenografts, already reported as a VM+ tumor type (van der Schaft *et al.* 2005). First, quantitative real-time PCR was performed with total RNA obtained from EW7-derived xenografts and compared with EW7 and SIM cell lines. In addition to the presence of TFPI-2 and ADAMTS1, the vasculogenic mimicry markers Tie-1 and VE-cadherin were evaluated as a measure of the progression of this phenomenon. These analyses confirmed the presence of both TFPI-2 and ADAMTS1 at comparable levels with its basal expression in cell culture (Figure 27). It is apparent that these genes did not suffer a significant regulation driven by the tumor microenvironment, as occurred in the case of VE-cadherin expression.





**Figure 27. RNA levels in EW7 xenografts.** Total RNA (0.2  $\mu$ g) from cells and tumor samples was subjected to quantitative RT-PCR with specific oligos for ADAMTS1, TFPI-2, Tie-1 and VE-cadherin. Every experiment was performed at least 2 times.

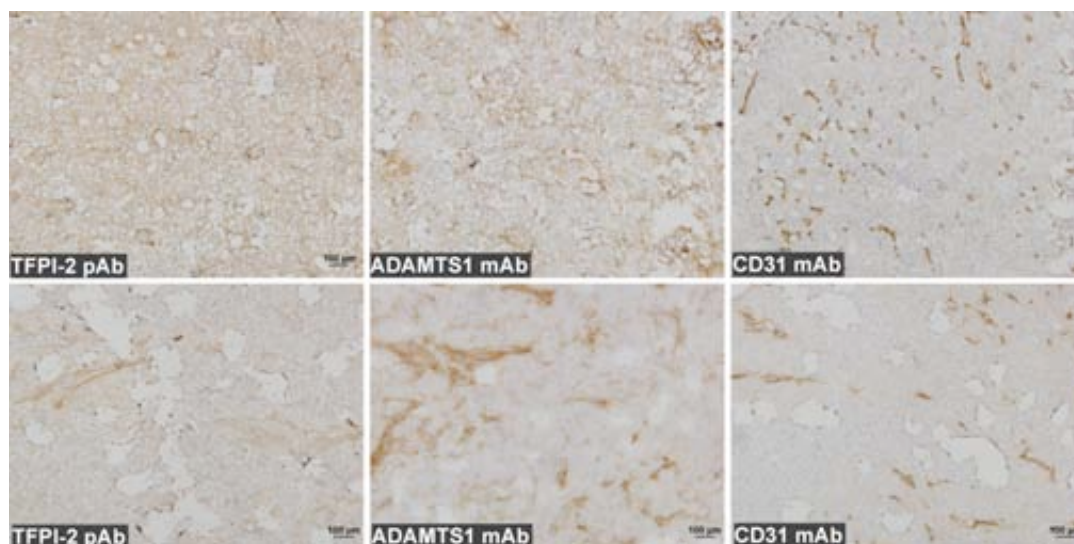
In addition, protein levels were determined after heparin-sepharose concentration from xenograft crude extracts. Regarding ADAMTS1 (Figure 28A), the detected forms included the full-length p110 and two processed forms (p50 and p20), previously characterized (Liu *et al.* 2006). For TFPI-2 (Figure 28B), we detected all known isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and a faster migrating band that, to date, has not been characterized (white arrow, Figure 28B). The hypothesis that this form is a cleavage product is considered but it will require further studies to be confirmed.



**Figure 28. ADAMTS1 and TFPI-2 protein levels in EW7 derived xenografts.** Tumor lysates (1,5 mg) from xenografts were heparin-purified and analyzed by Western blot for the presence of these molecules with the respective polyclonal antibodies.

Finally, we performed immunohistochemical assays to evaluate the presence of these proteins in tumor sections. Given the extracellular features of both ADAMTS1 and TFPI-2, its localization in situ does not display well defined patterns. A detailed study of tumor sections allowed the recognition of distinct areas with various degrees of expression. In one side, we found areas with high density of vessels (determined by CD31 staining) that presented a homogeneous

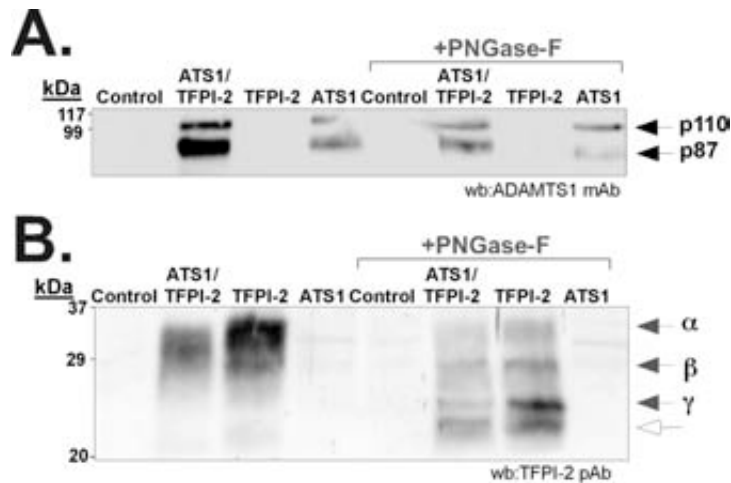
positive signal for both ADAMTS1 and TFPI-2 (Figure 29, top panel). Conversely, we observed relevant zones, with an apparent decreased density of CD31+ vessels, which staining for ADAMTS1 and TFPI-2 revealed a more restricted pattern, probably associated with extracellular reservoirs (Figure 29, bottom panel).



**Figure 29. Immunolocalization of ADAMTS1, TFPI-2 and CD31 in EW7 derived xenografts.** Frozen tissue were cryosectioned (5 $\mu$ m) and stained with the specified antibodies. After the addition of the biotinilated secondary antibody and avidin-biotin complex HRP conjugated the colorimetric reaction was performed with DAB (3,3'-Diaminobenzidine). Note the difference of ADAMTS1 and TFPI-2 pattern between areas with higher vascular density (upper panel) and those with low vessel density (lower panel).

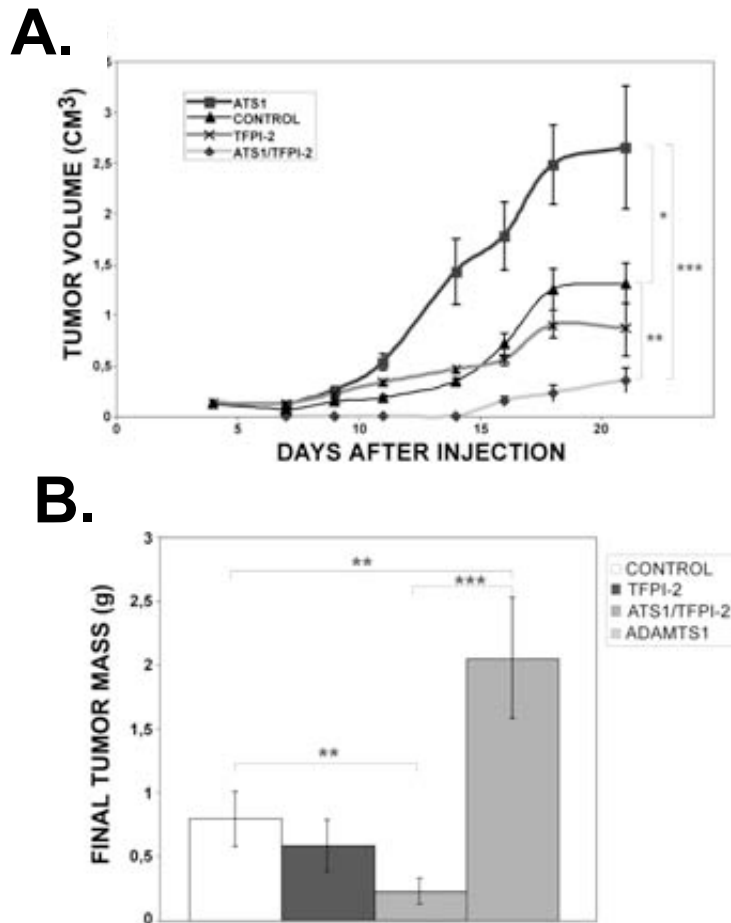
### ***Actions of TFPI-2 and ADAMTS1 in a HT-1080 fibrosarcoma model.***

To study the effects of these two genes in tumor behaviour, we decided to modify HT-1080 cells, derived from a human sarcoma, that did not present detectable endogenous levels of both TFPI-2 and ADAMTS1. We established various stable cell lines that over-expressed each of these proteins, alone and in combination. The presence and status of TFPI-2 and ADAMTS1 were evaluated by western blot analysis. As showed, ADAMTS1 displayed a standard expression pattern with high levels of both p110 and p87 forms (Figure 30A). The presence of TFPI-2 was also confirmed, although its properties as a glycosylated protein provoked its appearance as an undefined broad band (Figure 30B). To reveal the existence of a cleavage product, it was required to perform deglycosylation treatments of the conditioned media. The presence of a well-defined faster migrating band appeared clearly in those cells that overexpressed TFPI-2 in conjunction with ADAMTS1 (white arrow); however, cells that did not overexpress this protease also showed important levels of this lower form, probably attributed to the high sensitivity of the C-terminal region of TFPI-2 to the activity of different proteases as we demonstrated before (Figure 15).



**Figure 30. TFPI-2 and ADAMTS1 protein levels and TFPI-2 cleavage in HT-1080 transfectants.** Cells were seeded on 6 multiwell plates and when reached 80% confluency, were rinsed and serum starved. After 48 h, conditioned medium was collected. Same amount of conditioned media were methanol-precipitated and incubated in the presence of N-glycosidase F. Samples were finally analyzed by Western blot analysis with ADAMTS1 and TFPI-2 antibodies.

Using these cell lines, we approached the role of both TFPI-2 and ADAMTS1 during tumor progression. We performed subcutaneous injection of  $5 \times 10^6$  modified HT-1080 cells in the right flank of athymic male Balb/c nude mice. Tumor volume was measured since a tumor mass appeared in the flank of the animal. The most significant observation was the remarkable opposite tumor growth rates among those cells that overexpressed ADAMTS1 in the absence or in the presence of TFPI-2 (Figure 31A). While the unique overexpression of ADAMTS1 provoked the generation of significantly larger tumors (f.v. (final volume) =  $2,65 \pm 1,36 \text{ cm}^3$ ) in comparison with control HT-1080 cells (f.v. =  $1,31 \pm 0,44 \text{ cm}^3$ ), we observed that its joint expression with the inhibitor TFPI-2 triggered a completely opposite effect, yielding tumors significantly smaller (f.v. =  $0,35 \pm 0,27 \text{ cm}^3$ ). The growth rate of this group of animals also presented a distinct pattern, with no detectable tumor mass until day 16, while all the others groups showed a measurable mass between days 4 to 9. The single overexpression of TFPI-2 also provoked a minor reduction in tumor size (f.v. =  $0,87 \pm 0,61 \text{ cm}^3$ ) in comparison with unmodified HT-1080 cells, in agreement with reported findings (Chand *et al.* 2004). The evaluation of tumor weight at the time of sacrifice (21 days) corroborated the observed differences in volume (Figure 31B). According to these differences in tumor progression, the specific actions of both TFPI-2 and ADAMTS1 needed a profound analysis, beginning with a detailed histological and immunohistochemical evaluation of these tumor specimens.



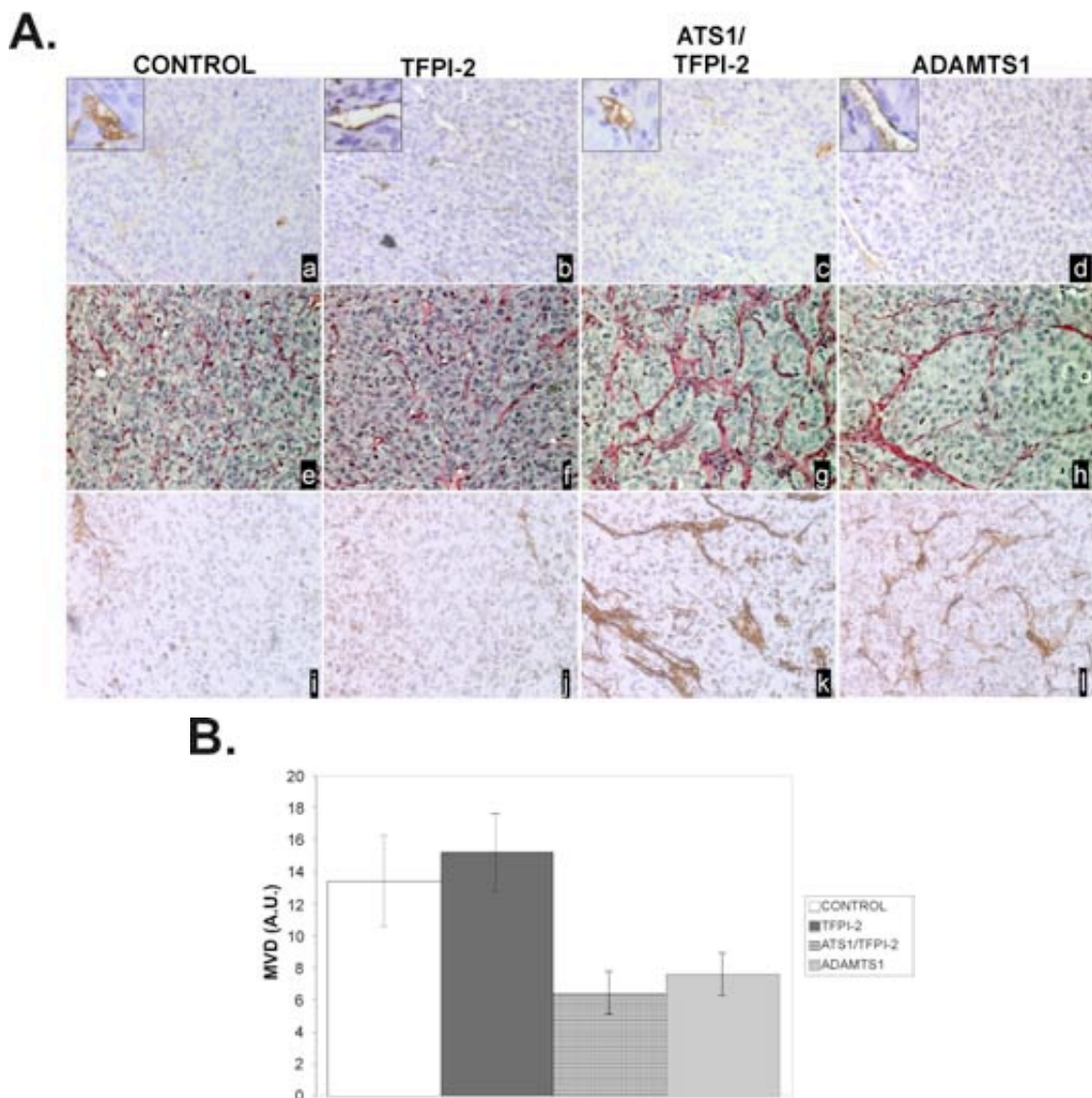
**Figure 31. Growth of HT-1080 fibrosarcoma tumor xenografts.** *A*, representing final tumor volume in HT-1080 xenografts. Panel *B*, representing final tumor weight of tumor xenografts. Asterisks represents significance between groups by two-tail t-student test as follows (\*:  $p < 0,1$ ; \*\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,006$ ).

### ***Tumor plasticity and vasculogenic mimicry in HT-1080 xenografts.***

An initial determination included the detection of mouse vessels in paraffin tumor sections, to detect the occurrence of a relevant angiogenic response to the actions of TFPI-2 and ADAMTS1. These analyses, approached by staining with the endothelial-specific marker anti-FVIII related antigen, showed relevant changes among the different groups (Figure 32A, panels a-d). The density of mouse vessels decreased with the presence of ADAMTS1 (Figure 32B), compared with CONTROL or TFPI-2 transfected xenografts. Indeed, this pattern did not correlate with final tumor mass, so it provokes a clear conflict between tumor growth and a hypothetical angiogenesis-dependency.

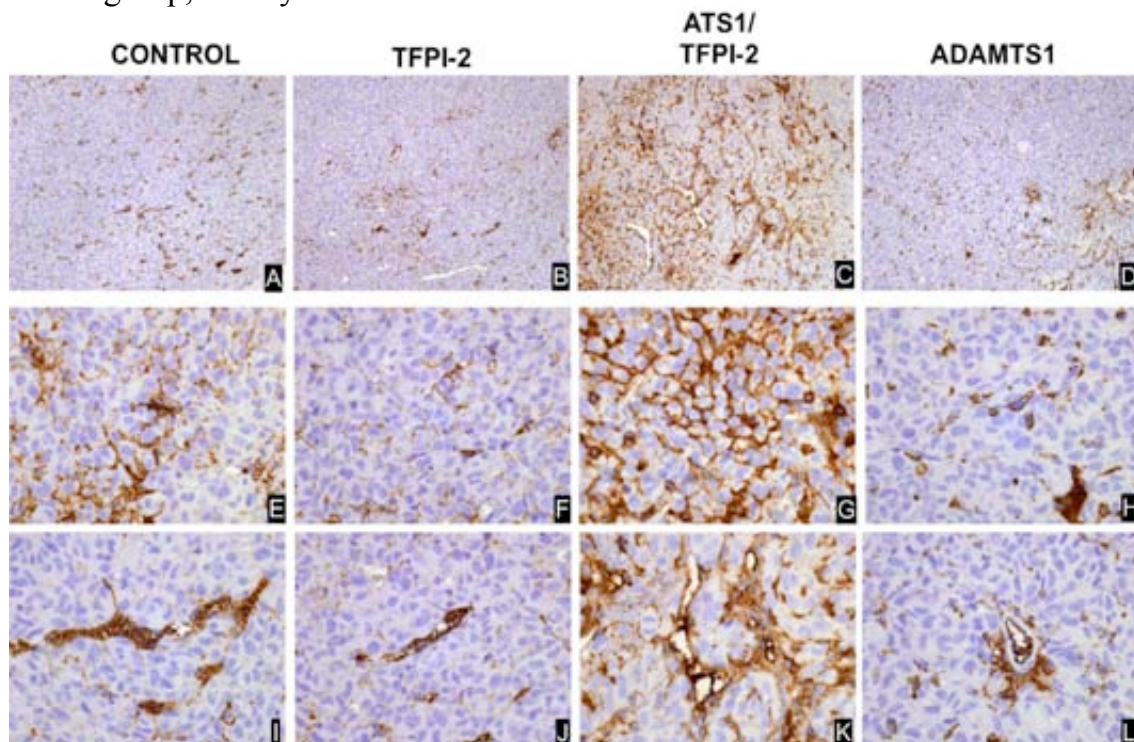
Given the potential relationship of these molecules with the phenomena of vasculogenic mimicry, we performed PAS staining, previously recognized as a tool to identify pseudo-vascular networks in various tumor models. Importantly, these analyses showed major differences between the different series of tumors. Although positive PAS staining was visualized in all the cases, evident connected networks that resembled the described vasculogenic mimicry phenotype were

clearly detected in those tumors generated by ADAMTS1 overexpressing HT-1080 cells (Figure 32A, panels e-h) in the absence and in the presence of TFPI-2. However, the continuity and consistency of these networks appeared more relevant in the double transfectant xenografts. The features of this staining does not provide a specific molecular signature, so we managed an additional evaluation by laminin immunostaining, which subunit laminin 5  $\gamma$ 2 has been found to be overexpressed and colocalized in these structures (Sood *et al.* 2001). These analyses were performed with an antibody that recognized laminin of human origin; they showed a similar pattern to the one visualized by PAS staining, presenting well-defined positive structures (Figure 32A, panels i-l). Although the presence of TFPI-2 provokes relevant changes in the quality of these PAS/laminin positive loops, its generation appears induced in all the tumors that were generated with ADAMTS1-overexpressing cells.



**Figure 32. Evidences of vasculogenic mimicry in HT-1080 xenografts overexpressing ADAMTS1.** A, a, b, c, d immunolocalization of mouse blood vessels using anti anti-FVIII related antigen antibody in CONTROL, TFPI-2, ADAMTS1/TFPI-2 and ADAMTS1 transfected HT-1080 xenografts respectively. Inset shows a magnification representing single vascular structure. e, f, g and h panels representing PAS staining and i, j, k, l represent human laminin staining for the same xenograft groups. B, Microvessel density quantification of anti-FVIII related antigen stainings, assayed by the Chalkley method.

Another interesting finding was provided by the evaluation of endoglin expression in these xenograft sections (Figure 33). As the antibody crossreacts with both human and mouse antigens, the positive staining could correspond to endoglin that is provided by human tumor and/or mouse endothelial cells. Top panels (Figure 33, A-D) shows a low magnification view of representative images, and lower panels corresponded to detailed views of endoglin signal associated to human tumor cells (Figure 33, E-H) or to mouse endothelium (Figure 33, I-L). Interestingly, the most remarkable differences are appreciated in xenografts derived from HT-1080 cells that overexpressed both ADAMTS1 and TFPI-2 (Figure 33, panels C, G and K). The higher levels of endoglin are evident in this group, mostly associated to tumor cells.

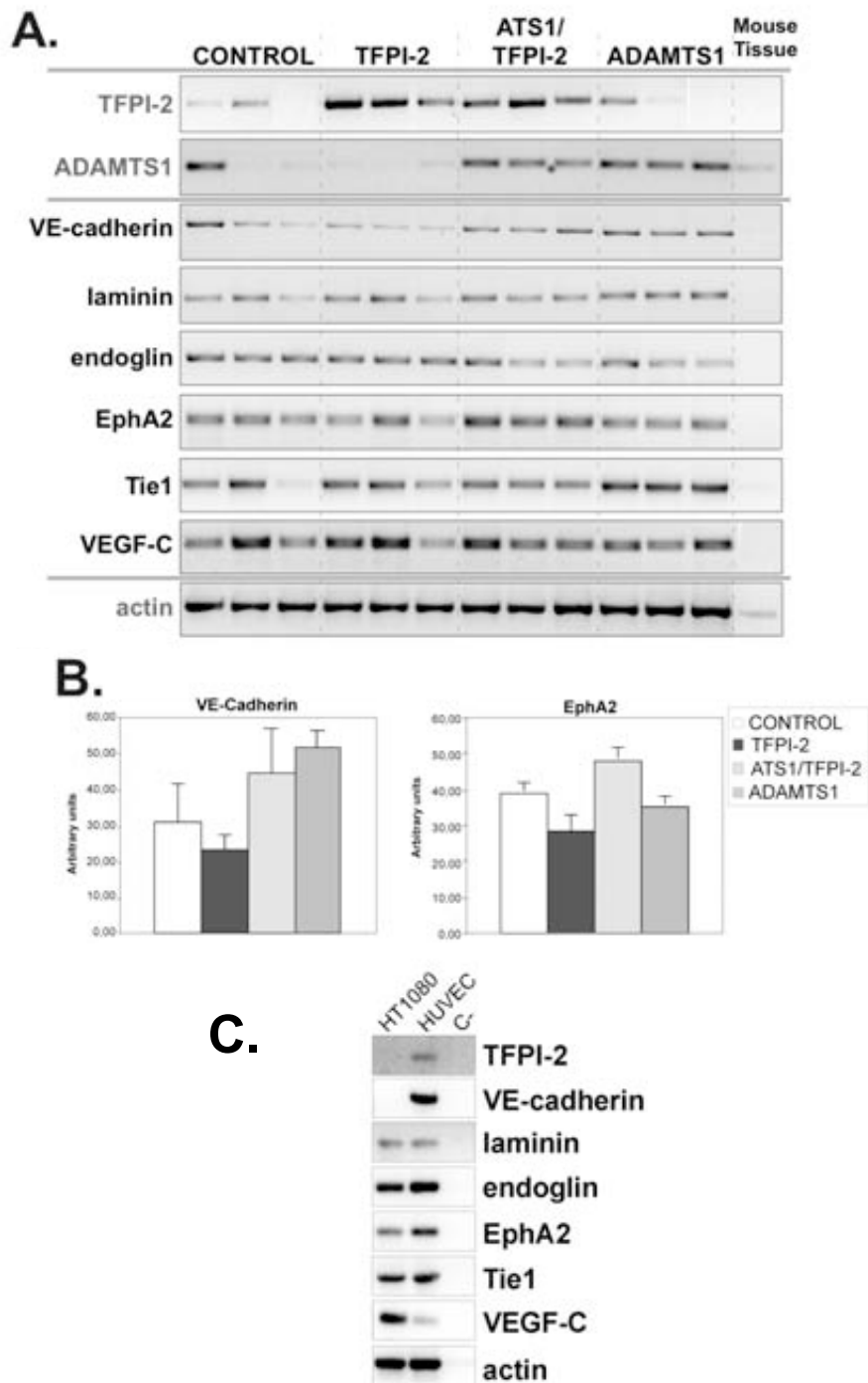


**Figure 33. Characterization of the presence of endoglin in HT-1080 xenografts.** Upper panel shows an overall view, middle panels focus on tumor cell staining and lower panels on mouse vessel staining.

Further studies were developed to support these findings. Using RT-PCR, we evaluated the gene expression of various molecules that have been implicated in the VM phenomenon. This set of genes included: laminin 5  $\gamma$ 2, VE-cadherin, EphA2, Tie1, VEGF-C and endoglin, mostly involved in angiogenesis and vasculogenesis. The designed oligos for all these genes were specific of the human sequence, so the detected levels would be originated from the implanted human tumor cells. In parallel we also evaluated both TFPI-2 and ADAMTS1, and actin as a control (Figure 34A). The detection of TFPI-2 and ADAMTS1 levels were consistent with the primary implanted cells, although some unrelated tumors also showed varied levels of RNA from these genes, demonstrating the heterogeneity and complexity of these *in vivo* assays. Regarding all VM-related genes that were tested, no significant differences were observed between the different groups of tumors, excepting the endothelial-related gene VE-cadherin, that appeared upregulated in ADAMTS1 overexpressing tumors, and the receptor

EphA2, upregulated in tumors that harboured both ADAMTS1 and TFPI-2 (Figure 34B). Importantly, the variability of VE-cadherin correlated with the presence of ADAMTS1, as clearly showed in the first lane (Figure 34A) that represented a control tumor which endogenous levels of ADAMTS1 appeared induced by unknown mechanisms.

According to these results, we decided to analyze the expression of these different endothelial-related genes in the HT-1080 cells used for these assays and compare it with endothelial cells (HUVEC). Interestingly, we were able to detect RNA levels of all these markers excepting VE-cadherin (Figure 34C), with not relevant changes among the different clones (data not shown). These results suggested that this sarcoma-derived cell line already possess a relevant gene signature with the potential to be driven into an endothelial-like phenotype, which definitively acquires when cells were implanted in the animal in the presence of ADAMTS1.



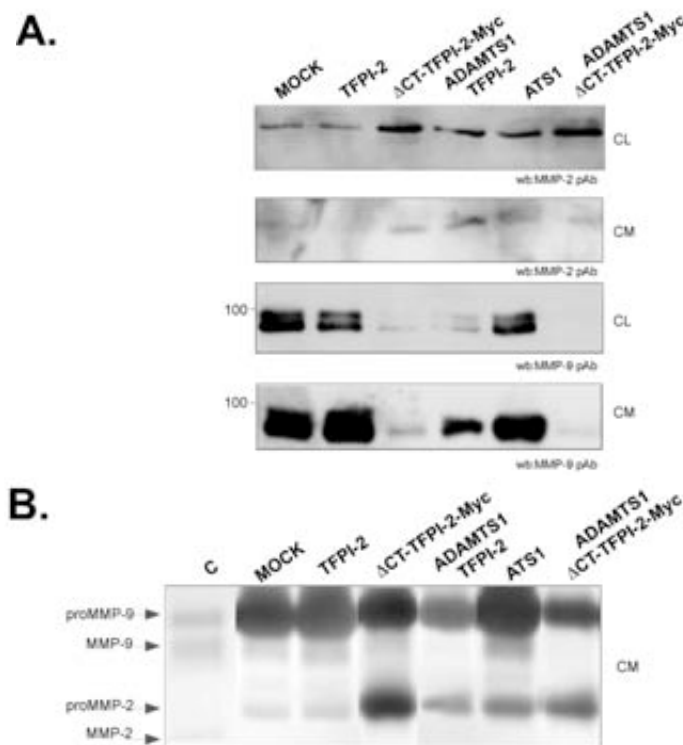
**Figure 34. Gene signature of HT-1080 xenografts . A,** Total RNA (0.5  $\mu$ g) from tumor samples was subjected to RT-PCR with specific oligos for human TFPI-2, ADAMTS1, VE-cadherin, laminin, endoglin, EphA2, Tie-1, VEGF-C and actin as loading control according to Material and Methods procedures. Mouse tissue was used as a specificity control. **B,** Densitometric quantification of VE-Cadherin and EphA2 expression xenografts normalized versus actin levels. **C,** Total RNA (0.5  $\mu$ g) of HT-1080 and HUVECS cells was subjected to RT-PCR with specific oligos for the human genes mentioned above markers.



### Potential role of MMP gelatinases.

Along with the necessity of a specific gene signature, previous reports have demonstrated a unique role to the metalloprotease MMP-2 as an inducer of the VM phenotype (Seftor *et al.* 2001). Significantly, our molecule of interest, TFPI-2, was described to be a modulator of this enzyme and, according to our research, the actions of ADAMTS1 over TFPI-2 could play a definitive role in this regulatory cascade.

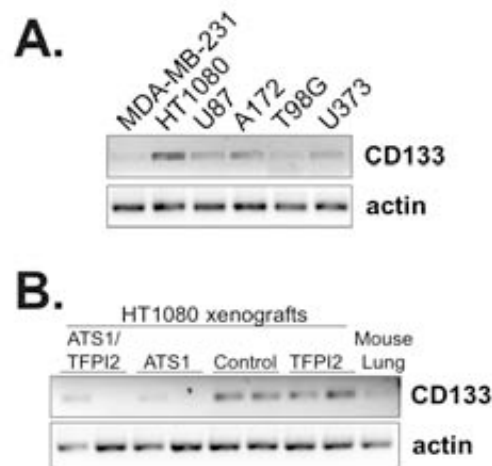
Levels of gelatinases (MMP-9 and MMP-2) were assessed by western blot and zymography in the different HT-1080 clones that were modified to overexpress ADAMTS1 and TFPI-2. Several culture conditions were tested trying to mimic different microenvironments. Pre-coated plates with collagen I, matrigel, or standard culture conditions were approached, but not relevant differences were observed among them. Although differently, both MMP-9 and MMP-2 appeared regulated among different HT-1080 modified cells. MMP-9 levels showed a noticeable reduction in double transfected cells (ADAMTS1/TFPI-2 and ADAMTS1/ $\Delta$ CT-TFPI-2-Myc) and single overexpressors of transfected TFPI-2 (Figure 35A, 35B). Regarding MMP-2, our analyses showed higher levels in those cells that overexpressed ADAMTS1, single and double transfectants and also in  $\Delta$ CT-TFPI-2-Myc overexpressors.



**Figure 35. MMP levels in HT-1080 clones.** Cells were seeded on plastic and when reached 80% confluency, cells were rinsed and serum starved. *A*, After 24 h, conditioned medium was collected, normalized against total protein content. 3,6 mg of cell layer were quantified and gelatin-Sepharose purified. The presence of MMP-9 and MMP-2 was determined by Western blot. *B*, 1 ml of conditioned media was gelatin-Sepharose purified and electrophoresed in the presence of gelatin. After gel renaturalization and over night incubation, gelatinase activity was visualized. As positive control (C) 50 ng of human gelatinases were loaded.

### ***Tumor plasticity and “stemness” capacity of sarcoma cells.***

The concept of tumor plasticity has been openly attributed to the phenomenon of VM. As previously demonstrated, a relevant number of genes, associated with the embryonic development of neovasculature, were present in those cells that presented a VM phenotype. At some extent, we showed this signature in fibrosarcoma HT-1080 cells. In line with the characterization of the plasticity of these cells, we decided to analyze the presence of CD133 that is currently used as a marker of hematopoietic lineage and for a potential cancer stem cell population. First, we compared the levels of CD133 of HT-1080 with a panel of tumor cell lines from breast cancer (MDA-MB-231), and glioblastoma (U87, A172, T98G, U373). Surprisingly we found that HT-1080 cells displayed the higher levels of CD133, in accordance with the perception of this cell line as highly plastic (Figure 36A). The evaluation of CD133 levels in all modified HT-1080 cells that were used in this work showed similar levels (data not shown). However, the fact that their implantation in mice provoked the appearance of different kind of tumors, with various degrees of VM phenotypic characteristics, motivated our analyses of CD133 in the resulting xenografts. We performed RT-PCR assays using CD133 specific oligos designed to recognize the human gene. The results showed significant decreased levels of CD133 in those xenografts derived from cells that overexpressed ADAMTS1, independently of the absence/presence of TFPI-2 (Figure 36B). This finding appears in agreement with a more differentiated endothelial-like phenotype associated with the VM phenomenon.



**Figure 36. Tumor cell plasticity.** *A*, CD133 gene expression measured by semiquantitative RT-PCR in a set of tumor cell lines. *B*, 500 ng of RNA from HT-1080 derived xenografts were retrotranscribed and assayed for the CD133 gene expression. Mouse RNA was used as tissue specificity control.

## Discussion.

It has been extensively demonstrated that the extracellular matrix represents more than a simple scaffold for cells. As mentioned in the introduction of this work, the modification of this ECM could undergo important consequences in cell behaviour. Among the modifications that the ECM is exposed to, a pivotal role is reserved for the continuous activity of extracellular proteases. A fine balance of this proteolytic activity is required to maintain the proper characteristics of a specific tissue or to provide the right signals during development. In fact, the alteration of these homeostatic mechanisms appears as a common feature of multiple heterotypic diseases, such as cancer. Accordingly, a thoughtful investigation is needed to understand the complexity of these events. An example to show the necessity of this knowledge was raised after the unsuccessful clinical trials with protease inhibitors to target tumor growth and invasion. A much better characterization of the activity and inhibition fingerprint of a protease will help to improve the current therapies to fight against tumor progression. Certainly, a protease can be involved in more than one process, and its activity is regulated spatial and temporally. As a general goal of this laboratory, we used several approaches to unravel ADAMTS1 activity. ADAMTSs represent a family of extracellular Zn<sup>2+</sup>-dependent proteinases characterized by the presence of a disintegrin domain and a varied number of thrombospondin type I repeats (TSR) (Porter *et al.* 2005). Similar to MMP and ADAM proteases, its multi-domain structure supports the idea that their functionality depends on interactions with cell surface and ECM components. Here, we first approached the finding of interacting partners of ADAMTS1. Then, we characterized the related effects of this interaction, that turned out to involve a catalytic event, and finally we studied this relationship in several cancer models.

### ADAMTS1 and TFPI-2 partnership.

Although previously questioned, recent reports have demonstrated the benefits of the yeast two-hybrid system to characterize interactions between extracellular proteins of mammalian origin (Kuo *et al.* 1997; Aho and Uitto 1998). In this work we provide additional evidences that support the contribution of this methodology. As detailed above, we observed the interaction of the protease ADAMTS1 with the Kunitz-type inhibitor TFPI-2. Such interaction was confirmed in a mammalian model by co-immunoprecipitation assays. With the rationale that a cleavage event would be preceded by a physical interaction, Overall *et al.* developed a yeast two-hybrid approach that consisted of the use of an inactive catalytic domain of a protease (Overall *et al.* 2004). According to our data, the use of domains adjacent to the catalytic region appears to be an additional approach to discover their potential substrates. The relevance of such

non-catalytic regions for the final action of metalloproteinases has already been outlined for hemopexin-containing MMPs (Murphy and Knauper 1997). In the case of ADAMTS proteases, the C-terminal region containing the TSR and the spacer region appears to mediate binding of the protease to its substrate, acting as an anchor to support the final catalytic activity and providing substrate specificity. Supporting these findings, we demonstrated in this work that the truncated ADAMTS1 form that lacked all TSR repeats, was unable to induce the cleavage of TFPI-2 (Figure 19). This result definitively confirms a relevant role of this domain in mediating substrate interaction. Similar characteristics has been shown for ADAMTS4 that, significantly to its *in vivo* regulation, is naturally processed at its C-terminal end (Tortorella *et al.* 2000; Gao *et al.* 2002; Kashiwagi *et al.* 2004). Regarding ADAMTS1, it has been reported that the C-terminal region supports anchorage to the cell surface and promotes a higher anti-angiogenic activity than a C-terminal truncated form (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000). Here, a two-hybrid screen revealed that the ADAMTS1 fragment containing the first TSR and part of the Cysteine-rich region is responsible for its interaction with TFPI-2 (Figure 10). However, our *in vivo* analysis showed exclusively the p87-ADAMTS1 species but not the p65 (Figure 11). This truncated ADAMTS1 form includes the region used in the two-hybrid approach but it is possible that its affinity is weaker and transient, so we were not able to detect it in the co-precipitation assays. In addition, the strongest binding of p87-ADAMTS1 could be enhanced by the presence of two additional TSR domains that have been extensively implicated in protein-protein interaction (Tan *et al.* 2002). Interestingly, the full glycoprotein TSP1, from which a specific domain gave name to the TSR repeats, was found to interact with the inhibitor TFPI, highly similar to TFPI-2. These authors, however, did not provide a detailed characterization of the domains implicated in the interaction indicating only the importance of the C-terminal region of TFPI in this interaction (Mast *et al.* 2000).

## **TFPI-2 represents a new substrate of ADAMTS1: relevance of its C-terminal cleavage.**

From a functional point of view, ADAMTS1 was first identified from a cachexigenic adenocarcinoma cell line associated to inflammatory processes (Kuno *et al.* 1997), and later the human protein was shown to display anti-angiogenic activity (Vazquez *et al.* 1999). *adamts1* knockout mice displayed defects during growth and in the uro-genital system (Shindo *et al.* 2000; Mittaz *et al.* 2004). Studies on an ADAMTS1 transgenic/apoE-deficient mouse model suggested a role of this protease as an atherogenesis-promoter agent (Jonsson-Rylander *et al.* 2005). Regarding the catalytic activity of this protease, the matrix proteoglycans aggrecan and versican were reported to be substrates of ADAMTS1 (Sandy *et al.* 2001; Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002). More recently, the antiangiogenic proteins thrombospondin-1 and -2 were also found to

be cleaved by ADAMTS1, with functional consequences (Lee *et al.* 2006). Our work adds a new substrate to this growing list of candidates and also provides the finding that TFPI-2 extracellular location is significantly altered by ADAMTS1. The role of this protease, and its specific catalytic action on TFPI-2, is approached in a particular tumor model, as showed in the results, and it will be discussed later.

The preferential association of TFPI-2 to the cell surface and ECM has already been stated, and several reports suggest its pivotal role in the maintenance and regulation of ECM remodelling. Initial studies on the structure of TFPI-2, which is highly similar to TFPI, attributed its homeostatic role to its serine protease inhibitory activity. These data suggested important implications to tumor cell growth and invasion (Rao *et al.* 1998; Chand *et al.* 2004). Another relevant role of TFPI-2 as an indirect inhibitor of MMP activity was supported by its capacity to regulate the activation of proMMP1 and proMMP3 by serine proteases such as plasmin and trypsin (Rao *et al.* 1999). Surprisingly, a later report proposed the direct inhibition of MMPs by TFPI-2 with relevance in atherosclerotic processes, probably preceded by the respective protease-inhibitor interaction (Herman *et al.* 2001). In accordance to its recognition as a wide spectrum metalloproteinase inhibitor, we first speculated that TFPI-2 could function as a potential inhibitor of ADAMTS1; however, our experiments did not confirm such a prediction. Although our approaches included both *in vitro* and *in vivo* systems, it is still conceivable that we are missing some requirements for the inhibition to occur.

In connection with the reported relevance of TFPI-2 as a vascular homeostatic factor that prevents atherosclerotic complications, ADAMTS1 has been found to be up-regulated in atherosclerotic plaques and to exert an opposite function to that of TFPI-2 (Jonsson-Rylander *et al.* 2005). The mobilization of TFPI-2 in our *in vivo* studies supported the hypothesis that up-regulation of ADAMTS1 could act to mobilize TFPI-2 from specific cellular microenvironments, as observed during the progression of atherosclerosis (Herman *et al.* 2001). This event consequently triggers the predominant action of MMPs and plaque instability. The xenograft-approach used in this study corroborated findings from the cell-based analysis that demonstrated the capacity of ADAMTS1 to mobilize TFPI-2 in a manner that does not require their synthesis by the same cell. The tumor xenograft model reproduces a multicellular scenario in which different cell subtypes are providing distinct extracellular factors. While the mRNA levels of TFPI-2 do not change in the presence or absence of the protease, we consistently observed a dramatic down-regulation of protein levels in the tumor extract when ADAMTS1 was over-expressed (Figure 21). Interestingly, we did not detect TFPI-2 in the circulation, thus we predict that the protein might be rapidly degraded or redirected to a site of unknown location. Although an inhibition of tumor growth by TFPI-2 has been reported in a xenograft model with HT-1080 fibrosarcoma cells (Chand *et al.* 2004), our tumor studies with 293T modified cells were inconclusive and we did not observe major changes related with the over-expression of TFPI-2 in the presence or absence of the protease ADAMTS1. Most likely, the overall

requirements of the 293T cells used in our first xenograft model are distinctive in comparison to HT-1080. Significantly, we observed that the levels of MMPs (mainly gelatinases and collagenases) in 293T cells and derived xenografts were very low in comparison to the HT-1080 fibrosarcoma model. This evidence encouraged us to study the consequences of ADAMTS1 and TFPI-2 overexpression in HT-1080 fibrosarcoma cells. In addition, the reported implication of TFPI-2 in melanoma vasculogenic mimicry (Ruf *et al.* 2003; Chand *et al.* 2004) provided a new evidence of a specific functionality for this matrix-associated molecule. The potential modulation of TFPI-2 roles by the presence/action of ADAMTS1 denoted a promising scenario to assess the consequences of this relationship.

Functional mobilization of extracellular proteins has been previously reported in a tumor context. VEGF, for example, is constitutively present in the tumor, but the association to its specific receptor is activated by the action of proteases, mainly MMP-9; this event triggers the angiogenic switch during carcinogenesis (Bergers *et al.* 2000). In our case, the presence of the inhibitor TFPI-2 appears constant and, in theory, responsible to maintain an adequate proteolytic balance. A subsequent up-regulation of ADAMTS1 causes TFPI-2 relocation and a consequent alteration of the proteolytic balance. As mentioned, TFPI-2 is secreted by various cell types and is mainly deposited in the ECM. Expression of this inhibitor appears to be required for appropriate adhesion and maintenance of endothelial cell cultures (Iino *et al.* 1998). Recently, the overexpression of TFPI-2 has been shown to display antiangiogenic actions through a mechanism that involves direct inhibition of VEGF-A signalling (Xu *et al.* 2006) and plasmin inhibition (Ivanciu *et al.* 2007). Endogenous TFPI-2 is deposited mainly in the cell surrounding ECM and its anchorage is specific and saturable (Iino *et al.* 1998). We rule out the possibility that the main part of overexpressed TFPI-2 remains soluble mimicking cleaved TFPI-2. Interestingly, ADAMTS1 was found to display anti-angiogenic activity targeting endothelial cells (Vazquez *et al.* 1999). Our data confirms the displacement of TFPI-2 anchored to endothelial cultures (Figure 20), suggesting its participation in the inhibitory properties of the protease, not just in a cell culture context but also in further *in vivo* approaches such as the chorioallantoic membrane assay and xenografts. Regarding the proteolysis of factors similar to TFPI-2, several MMPs have been found to cleave the related TFPI, causing changes in its inhibitory activity (Belaouaj *et al.* 2000; Cunningham *et al.* 2002). However, ADAMTS1-induced cleavage of TFPI-2 appears to have different consequences. The C-terminal truncation of TFPI-2 keeps intact the Kunitz domains that are responsible for the inhibitory actions, as occurs with TFPI by the action of MMPs. Processing of TFPI-2 by ADAMTS1 results in its release from the matrix. TFPI-2 C-terminal region possesses a basic charge that has been implicated in the interaction with ECM and cell surface components such as glycosaminoglycans from different proteoglycans (Liu *et al.* 1999). Therefore, its deletion is in accordance with the solubilization event that we observed. Our findings with the serine-proteases plasmin and thrombin were also quite interesting (Figure 17). The C-terminal fragment of TFPI-2 appears as a target

for the catalytic action of proteases of diverse nature, with relevant implications for the regulation of the local action of this molecule depending on the microenvironment levels of the triggering proteases. A similar phenomenon could affect the closely related TFPI, whose C-terminal fragment possesses equivalent characteristics to the one in TFPI-2. The sensitivity of this region to plasmin and thrombin has been already reported (Ohkura *et al.* 1997; Li and Wun 1998) and the relevance of this process as a mechanism of TFPI clearance from specific locations was respectively discussed. Although we did not observe any activity of ADAMTS1 in TFPI, Jonsson-Rylander and colleagues have showed preliminary results that suggested this activity (supplemental data in (Jonsson-Rylander *et al.* 2005)) so this process deserves additional attention.

The existence of highly sensitive domains to catalysis by proteases of different nature has already been reported for other extracellular components with distinct functional responses, such as collagen XVIII (Felbor *et al.* 2000), syndecans (Schmidt *et al.* 2005), VEGF (Lee *et al.* 2005) and others. Regarding other metalloproteinase inhibitors (Baker *et al.* 2002), such as TIMPs, or the related serpin RECK, there is no evidence that a similar mechanism, comparable to the ADAMTS1/TFPI-2 interaction described here, occurs.

### **TFPI-2 meets ADAMTS1 in highly aggressive melanoma and sarcoma tumor cells.**

The presence of TFPI-2 associated to endothelium (Iino *et al.* 1998), and in vasculogenic mimicry models (Ruf, Seftor *et al.* 2003), has been previously reported. In contrast, detectable protein levels of the protease ADAMTS1 are hardly found in animal and cellular models. Despite the characterization of ADAMTS1 expression during development (Thai and Iruela-Arispe 2002), very few reports have demonstrated relevant endogenous levels of this protease. For example, high levels of ADAMTS1 have been detected during wound healing, that suggest a role of this protease in keratinocyte differentiation and migration of fibroblasts and endothelial cells (Krampert *et al.* 2005). Its potential action as an inducer of atherogenesis has been related with the cleavage of the matrix proteoglycan versican, that promotes vascular smooth muscle cells migration (Jonsson-Rylander *et al.* 2005). During ovulation there is an upregulation of ADAMTS1 in granulosa cells in vivo and in vitro with PR acting as an inducible coregulator of the ADAMTS1 gene (Doyle *et al.* 2004). This observation suggests that one function of ADAMTS1 in ovulation is to cleave versican (Russell *et al.* 2003). In cardiac injury, the expression of ADAMTS1 appeared to be under the control of aldosterone (Fejes-Toth and Naray-Fejes-Toth 2007). Finally, the existence of relevant levels of ADAMTS1 in cancer models has been highlighted in cases of metastatic pancreatic cancer (Masui *et al.* 2001), in NSLC (Rocks *et al.* 2006) that showed immunohistochemical evaluations, and the induction of its gene expression was correlated with highly metastatic breast carcinoma cells (Kang *et al.* 2003).

As mentioned in the introduction, one of the limitations of gain-of-function studies is that the localization of a specific substrate or/and a protease is forced, so its physiological relevance is questionable. Further limitations related with the fact that ratios between enzyme and substrate are abnormal so the observed activity could be the product of an artefact (Overall and Kleifeld 2006).

With all these issues existing, it appeared that ADAMTS1 regulation could be mostly associated to cellular stress or trauma scenarios. We decided to explore the potential actions of the metalloprotease ADAMTS1 in a tumor model which participation of its partner, TFPI-2, could provide any relevant contribution to our goal of unravelling ADAMTS1 functions. At that time, several reports introduced the significance of the vasculogenic mimicry phenomenon and they showed some evidences that TFPI-2 was a relevant player to maintain its phenotypic properties (Ruf *et al.* 2003). Although this process was first described in melanoma, Griffioen *et al.* also demonstrated its relevance in Ewing sarcoma (van der Schaft *et al.* 2005). Our close collaboration with this laboratory allowed the development of an important part of this work, including the characterization of the presence of both, ADAMTS1 and TFPI-2, in highly aggressive-vasculogenic mimicry positive melanoma and sarcoma cellular models. It is important to note that the use of these cell lines allowed the possibility to study the interaction of both proteins without the requirement of overexpression approaches. The presence in the aggressive types of melanoma and Ewing sarcoma cell lines of TFPI-2 and ADAMTS1 was confirmed by several techniques. Although the presence of TFPI-2 has been reported in melanoma cells in the manuscript by Ruf *et al.* (Ruf *et al.* 2003) here we described that ADAMTS1 is also present in those cell lines. In addition, we demonstrated the co-existence of both TFPI-2 and ADAMTS1 in highly aggressive sarcoma cells and derived xenografts. Interestingly, our immunohistochemical evaluations showed that the localization of TFPI-2 and ADAMTS1 in xenografts was related with a more restricted pattern in areas with low capillary density, that suggested the possibility of a mechanistic implication of both proteins in the VM phenomenon. According to our previous work, discussed above, the cleavage of TFPI-2 happens at its C-terminal region, with implications in ECM anchorage and localization. In EW7, MUM2C and C8161 cells we also observed the existence of this proteolytic process (Figure 25). This important finding validated our first results that showed that the protease sensitive C-terminal region of TFPI-2 could be cleaved in certain conditions. At this point, we can not conclude that ADAMTS1 is the unique responsible of this cleavage event although its candidacy is stressed in our current work. It is also important to remark that, related with the proteolysis of TFPI-2, the protein pattern that was reported by Ruf and colleagues in highly aggressive melanoma cells (Ruf *et al.* 2003) exactly reproduced our findings with melanoma and sarcoma cells, although these authors did not discussed about the potential existence of catalytic events. Taking together these results we hypothesize that the C-terminal processing of TFPI-2 could affect its ECM location from restricted negatively charged microenvironments, but it is also possible that cleaved TFPI-2 “anchors” to alternative areas. Indeed, the reported



immunolocalization of TFPI-2 in VM positive structures (Ruf *et al.* 2003) and in EW7 derived xenografts (Figure 29) demonstrates that, even though the cleavage episode occurs, TFPI-2 positive signal does not disappear. Another evidence is the detection of cleavage products in the ECM from aggressive melanoma cell lines (Figure 25). In this direction a previous work by Peerschke *et al.* demonstrated the interaction of TFPI-2 and the complement protein gC1qR/p33. This interaction involves the second KD of TFPI-2 and could be involved in the localization of the inhibitor to the pericellular compartment (Peerschke *et al.* 2004). Further studies are needed to ascertain the exact sites where the cleaved TFPI-2 anchors, and to establish the differences in functionality between processed and unprocessed TFPI-2, if they exist. As discussed later, the relevance of TFPI-2 as a protease inhibitor, and its local modulation by proteases, like ADAMTS1, provides an attractive scenario to clear up the complex relationships among proteases and inhibitors. Particularly, we emphasize the extensive support that protease activity has received as key molecules for VM triggering (Seftor *et al.* 2001).

### **ADAMTS1 meets TFPI-2 in a non-expected place.**

The effects of the expression of TFPI-2 in the HT-1080 fibrosarcoma model had been described elsewhere (Chand *et al.* 2004). The expression of this matrix-associated inhibitor decreased tumor growth (in athymic Balb/c) and metastasis (in SCID mice). According to the author's interpretation, these actions are associated to the negative effects of TFPI-2 in the expression of VEGF. In our work, we also observe a growth inhibition in the xenografts overexpressing TFPI-2, in agreement with the findings described by Chand *et al.*, although not at the same rate. The overexpression of ADAMTS1 alone has a dramatic effect in tumour growth, increasing tumour volume significantly. These data agreed with previous assays that provided a pro-tumorigenic role to ADAMTS1 (Liu *et al.* 2006). Surprisingly, the combined presence of ADAMTS1 and TFPI-2 reduced significantly tumor volume (up to 4-fold comparing with CONTROL cells). Although we do have preliminary results that showed a significant decrease of gelatinase activity (data not shown), that correlated with low levels of MMP-9 (Figure 35), still we can not concluded with a clear picture to explain these differences in tumor progression.

However, further speculations could be supported by our experimental observations. For instance, the de-location of TFPI-2 by ADAMTS1 provokes that the inhibitor is less restricted to determined cell microenvironment, as negatively charged heparan-sulfate enriched areas. Additionally, though our evidences that ADAMTS1 promotes tumor progression are extensive, we also observed that higher levels of the protease in xenografts did not correlate with higher tumor masses (data not shown), suggesting that an excess of protease could lead to opposite effects. Likewise, it has been reported that ADAMTS1 promotes fibroblast migration at low doses while, at higher doses, inhibits

proliferation by sequestering FGF (Krampert *et al.* 2005). Obviously, further studies are required to know how ADAMTS1 affects tumorigenesis and if the apparent dose-dependence is related to the interacting partners of this protease.

Regarding the importance of its multimodular structure, ADAMTS1 has been described as a protein involved in metastasis (Kang *et al.* 2003), moreover the full length and fragments of ADAMTS1 have been described to have pro-metastatic and anti-metastatic characteristics respectively (Kang *et al.* 2003; Kuno *et al.* 2004; Liu *et al.* 2006). Hence, it is possible that ADAMTS1 could have a prominent role in the higher prevalence of metastasis in patients with vasculogenic mimicry positive malignancies (Sun *et al.* 2006).

### **Actions of ADAMTS1 and TFPI-2 in vasculogenic mimicry: Role of MMP-2.**

As highlighted in previous sections, various human melanomas and Ewing sarcoma present the phenomenon called vasculogenic mimicry, which implies the faculty of some tumor cells to acquire an endothelial cell-like phenotype allowing them the formation of pseudovascular channels (Hendrix *et al.* 2003). These channels could transport plasma and erythrocytes, representing an alternative feeding and wasting pathway for tumors (Maniotis *et al.* 1999).

The induction of vasculogenic mimicry phenotype can be enhanced by cues found in the ECM. In the work by Ruf *et al.*, they found that after the precondition of a collagen I matrix with TFPI-2 poorly aggressive melanoma cells started to form matrix rich structures in 3D culture as did the aggressive counterparts. (Ruf *et al.* 2003). Another finding in this work was that the aggressive melanoma cell lines present more MMP-2 activity than the less aggressive, and that TFPI-2 seems to be implicated in the activation of MMP-2. We did not observe an increase of the MMP-2 expression in HT-1080 clones expressing TFPI-2 alone. Although an up-regulation in MMP-2 activity was observed in aggressive melanoma cell lines and that an anti-TFPI-2 antibody decrease this activity, we have demonstrated that these cells express endogenous levels of ADAMTS1 and that TFPI-2 is being cleaved in this model. Moreover, only the expression of both proteins or the truncated form of TFPI-2 that mimicks the cleavage event in HT-1080 fibrosarcoma cells enhances MMP-2 protein levels (Figure 35). Thus, we hypothesized that for the effect on MMP-2, the cleavage of TFPI-2 by ADAMTS1 is needed. Accordingly, we have results that showed that cells overexpressing the C-terminal truncated TFPI-2 have MMP-2 levels comparable with cells that express ADAMTS1 and TFPI-2 jointly (Figure 35). Importantly, those xenografts that were generated with HT-1080 cells overexpressing the truncated TFPI-2 display matrix-rich PAS positive structures (data not shown). These xenografts are currently under investigation in our laboratory. To accent the importance of this finding, previous reports showed that a blocking antibody against TFPI-2 inhibited dramatically the formation of the pseudo-vascular networks in 3D cultures (Seftor *et al.* 2001).

## Tumor plasticity in HT-1080 fibrosarcoma model.

The phenomenon of vasculogenic mimicry appears as a paradigm of tumor plasticity. The capacity of tumor cells to “differentiate” into a specific cellular lineage – named endothelial-like – recapitulates many of the mechanisms that a stem cell undergo to finally originate an endothelial cell and, by extension, a vascular structure. Importantly, current literature has widely demonstrated that VM+ cells presented a particular gene signature related with embryonic vascular development and markers of pluripotent stem cells (Hendrix *et al.* 2007). To support this concept in our model, we show that the over-expression of ADAMTS1, in the presence and absence of TFPI-2, was accompanied by the induction of some related VM markers, mainly the cell-adhesion molecule VE-cadherin. Based on the functional properties of both ADAMTS1 and TFPI-2, involved in broad aspects of ECM remodelling we can assume that the microenvironmental modifications by these proteins, act as significant clues to modulate the plastic properties of the sarcoma cells, approached in this work. The importance of matrix stiffness in stem cell commitment has been described in a recent work by Engler *et al.* (Engler *et al.* 2006). ADAMTS1 is an ECM protease with implications in matrix metabolism thereby with the capacity to alter strength matrix properties. In addition, proteases are described to control cell adhesion, cytoskeletal organization and, more specifically, they participate in the release of soluble factors (Sternlicht and Werb 2001). About ADAMTS1, it has been described to be involved in the shedding of various growth factors, (Liu *et al.* 2006) such as amphiregulin and HB-EGF, both of them linked with promoting activities in tumorigenesis (Billings *et al.* 2003; Miyamoto *et al.* 2004). Therefore it is also possible that the action of ADAMTS1 on growth factors alters the plastic capacity of tumor cells.

Several reports have already recognized that HT-1080 fibrosarcoma cells displayed very plastic cell behaviour. For instance, the use of metalloprotease inhibitors provokes a relevant mesenchymal to amoeboid transition, associated with distinct migration patterns throughout a complex matrix. Thereby stringent, adhesive, and proteolytic cell–ECM contacts, as developed by mesenchymally moving cells, can be converted toward less well characterized, more diffuse, and non-dependent of proteolysis interactions with extracellular scaffolds, reminiscent of amoeboid single cell movement (Wolf *et al.* 2003). Related with this research, our work provides new findings that suggest that the new microenvironment produced by ADAMTS1 activity in xenografts addresses HT-1080 plasticity to an endothelial-like lineage. Indeed, we have found that this cell line presents a gene-signature very similar to cells of endothelial nature, including important levels of endoglin, laminin, Tie1, suggesting its high potential to become an endothelial-like cell. Apparently, this is the process that goes on for the generation of VM.

One of the molecules that we have found to be importantly up-regulated is the endothelial specific cell-adhesion VE-cadherin. VE-cadherin has shown a prominent role in the generation of VM pattern in vitro (Hendrix *et al.* 2001). VE-cadherin expression is restricted to the endothelium and is responsible for homotypic interactions between endothelial cells. Its gene disruption provokes early lethality in mouse because although primitive plexus is formed finally vessels regressed and collapsed. It also regulates VEGF-R2 signalling inhibiting endothelial proliferation and apoptosis (reviewed in (Cavallaro *et al.* 2006)). Moreover, the expression of VE-cadherin in VM regulates EphA2, enhancing the interaction of this last with its ligand EphrinA1, both in vivo and in vitro (Hess *et al.* 2006). The phosphorylation of this last protein has been stated as a main player in the formation of the tubular networks in vitro (Hess *et al.* 2001). The cellular functions of EphA2 in normal epithelia are not well understood, but work with tumor-based models suggests potential roles for EphA2 in the regulation of cell growth, survival, migration, and angiogenesis (reviewed in (Walker-Daniels *et al.* 2003)). Endoglin (CD105) is a TGF-beta co-receptor predominantly expressed in vascular endothelial cells (ECs) (Gougos and Letarte 1988) but not restricted to these cells. The importance of endoglin in vascular morphogenesis is illustrated by the death in utero of mice deficient in endoglin from defects in angiogenesis (Bourdeau *et al.* 1999; Li *et al.* 1999; Arthur *et al.* 2000).

The underlying mechanisms that rule the phenomenon of VM are still unclear and need more work. Every tumor has the same genetic content so it is possible that those changes in tumor behaviour are induced by epigenetic changes derived from signals received from the extracellular matrix. Supporting this, Hendrix *et al.* found reprogramming of amelanotic melanoma cells in the matrix preconditioned by human stem cells to express MLANA, a melanoma cell marker that is repressed in aggressive melanoma cells (Hendrix *et al.* 2007). Another finding relate to this issue was that melanoma cell lines placed in the ischemic hind limb of a mice can adopt an endothelial trans-differentiation with the expression of various embryonic markers, giving importance to the microenvironment in cell fate (Hendrix *et al.* 2002).

Among the gene signature of HT-1080 cells, nearly resembling an endothelial-like lineage, we also reported the presence of the molecule CD133, recently highlighted as a marker of cancer stem cells (Kondo 2007) and further reported as positively-expressed in endothelial progenitors (reviewed in (Hristov *et al.* 2003)) In addition, our results show that xenografts show a downregulation of CD133. We hypothesized that when the cell undergo a cell commitment to an endothelial-like phenotype it loses part of its plasticity, expressing the endothelial cell markers, and in contrast, down-regulating those plasticity-relate proteins (Figure 36). Accordingly, a recent work by Folberg *et al.* demonstrates that melanoma cells showing a VM positive phenotype when form the capillary networks in 3D culture change their genetic expression. Among the changes they emphasized the down regulation of metastatic/invasive genes as some transcription factors, but interestingly there is a down regulation of CD44, another gene recently associated with a stemness phenotype in tumor cells (Ponti

*et al.* 2006). Importantly, we found significant expression of this molecule in our tumor cell populations (data not shown). Another interesting finding in this work is that cells that undergo differentiation to a vasculogenic positive pattern change their morphology from spindle B or epitheloid to a callender spindle A (Folberg *et al.* 2006). Accordingly, detailed analysis of our PAS stained HT-1080 xenograft section shows that cells that lined loops have a more condensed and extended nucleus.

Another process that has been recently implicated in VM is hypoxia. Low O<sub>2</sub> pressure promotes an increase of vasculogenic mimicry markers in Ewing sarcoma xenografts (van der Schaft *et al.* 2005). Although hypoxia does not increase RNA levels of TFPI-2 or ADAMTS1 (data not shown) we can not discard that ADAMTS1 is supporting an hypoxic environment, thereby enhancing VM by its capacity to avoid VEGF signalling (Luque *et al.* 2003) or by its anti-angiogenic properties (Vazquez *et al.* 1999). In fact, the low microvesel density of xenografts harboring the protease (Figure 32) indicates, in agreement with previous reports, that ADAMTS1 is inhibiting angiogenesis. In this direction, is it possible that low microvesel density found in human melanoma and Ewing sarcoma is a consequence of the expression of the protease (van der Schaft *et al.* 2005).

Another interesting topic emerges from the inability of common antiangiogenic therapies to inhibit vasculogenic mimicry (van der Schaft *et al.* 2004). The fact that proteases are main players in this event opens the possibility to use them as targets for therapy. Even if the antiprotease therapy has been showed ineffective in clinical trials, perhaps the combination of common antiangiogenic approaches with therapies targeting protease-dependent VM would improve efficacy. Further options implies the modification of the microenvironment to send cues of differentiation to plastic tumor cells, promoting a less aggressive phenotype. Moreover, the antiangiogenic therapy may induce hypoxia in tumor mass. As hypoxia acts as an inducer of VM (van der Schaft *et al.* 2005) the classical treatment would enhance the appearance of VM in tumors that present some plastic behaviour worsening the overall patient prognosis.

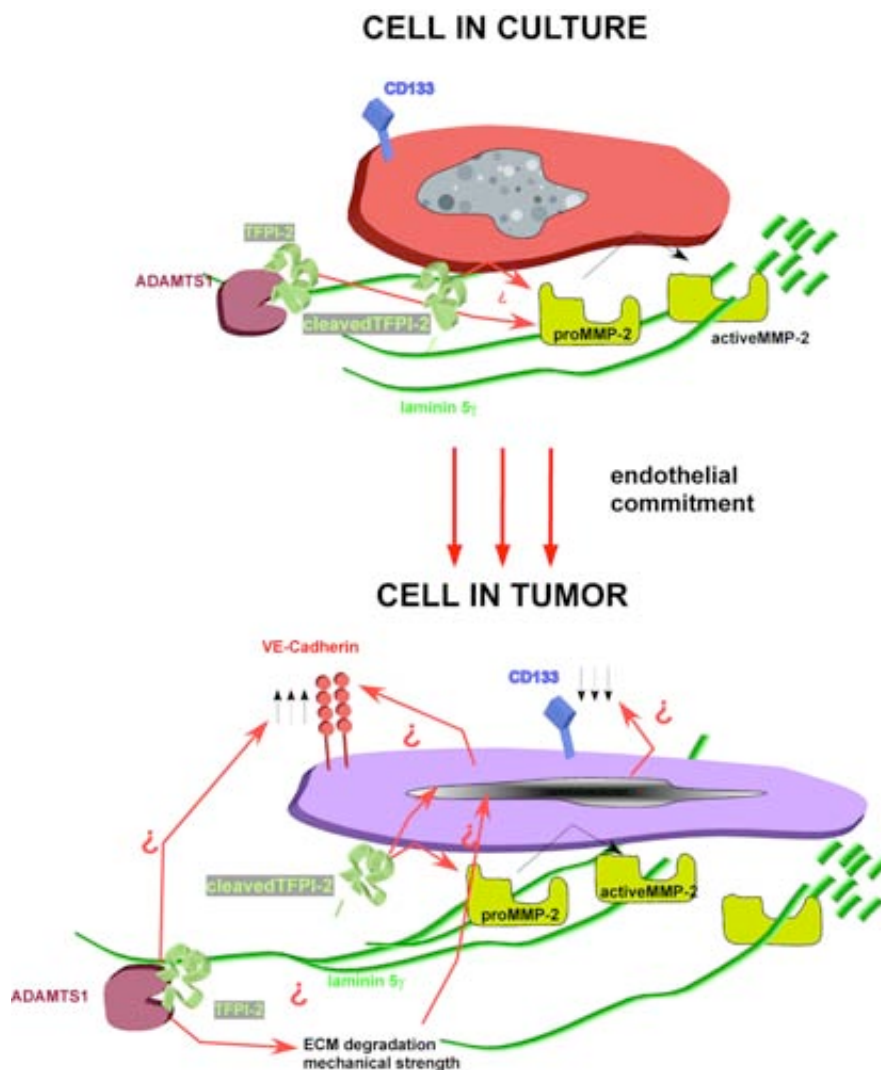
Obviously this findings need more work to ascertain the exact mechanistic pathways that underlies beyond tumor cell plasticity and vasculogenic mimicry.

## **Final Remarks.**

In this work we described the interaction of ADAMTS1 with the putative serine protease inhibitor TFPI-2, and how this interaction is functionally related with a cleavage event on this inhibitor at its C-term. According to the physico-chemical properties of TFPI-2 C-terminal region and its prominent role in ECM anchorage, the cleavage process promotes a de-localization of the inhibitor. Moreover, the new functional properties of both ADAMTS1 and TFPI-2 appear to be significant for the development of the vasculogenic mimicry phenomenon

in tumor progression as the presence and the cleavage event happens in tumor cell models tested.

HT-1080 fibrosarcoma cells represent a new paradigm of tumor cell plasticity as we reported in this work. The presence of ADAMTS1 in this model enhances tumor plasticity allowing them to undergo an endothelial cell-like commitment. Accordingly, an upregulation of vascular-related genes appears to be fundamental in the development of this tumor phenotype. Although the role of TFPI-2 is not fully understood yet, we propose its relevance to maintain local protease activity (as showed for MMP-2). It is also important to highlight the significance of TFPI-2 associated with endogenous endothelium, providing an additional source to the TFPI-2 delivered by tumor cells, as addressed in this work.



**Figure 37. Model representation.** HT-1080 cells in culture express high levels of the stemness marker CD133 and no detectable levels of VE-Cadherin. The cleavage of TFPI-2 by ADAMTS1 enhances MMP-2 expression. After challenging cells in a new microenvironment as could be a xenograft assay cell ADAMTS1 enhances the expression of VE-Cadherin, allowing tumor cells to undergo vasculogenic mimicry in combination with laminin, MMP-2 and other implicated proteins. As the cell is under endothelial commitment, the expression of CD133 is reduced.

## **Conclusions.**

- (i) Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 represents a new substrate for ADAMTS1.
- (ii) This cleavage event occurs at the C-terminal region of TFPI-2, with relevant consequences for its extracellular location.
- (iii) Both proteins, ADAMTS1 and TFPI-2, are present in melanoma and sarcoma tumor cells associated with a vasculogenic mimicry phenotype and high aggressiveness. This presence was also verified in EW7 derived-xenografts.
- (iv) TFPI-2 is cleaved in tumor cells that displayed a VM phenotype.
- (v) ADAMTS1 induces tumor plasticity in a fibrosarcoma tumor model.
- (vi) The partnership ADAMTS1/TFPI-2 appears relevant to induce a vasculogenic mimicry phenotype, potentially due to the modulation of MMP-2 levels.





## Material and Methods.

### 1.1. Yeast Two Hybrid Screening.

The MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 (Clontech Laboratories Inc.) was used according to the manufacturer. A cDNA fragment encoding aa residues 540 to 666 of human ADAMTS1 was amplified by PCR and inserted into the pAS2-1 vector that was previously digested with *NdeI* and *SalI*. The resulting GAL4BD-ADAMTS1<sup>540-666</sup> chimera protein was used as bait to screen a human placenta MATCHMAKER cDNA library (Clontech Laboratories Inc.). Both bait and library vectors were simultaneously introduced into *Saccharomyces cerevisiae* CG-1945 and double transformants were selected on synthetic minimal medium with dextrose but lacked tryptophan, leucine and histidine. A total of approximately  $7 \times 10^5$  clones were screened. Putative positive colonies were re-streaked and tested for  $\beta$ -galactosidase activity using a filter assay. DNA fragments from positive colonies were amplified by PCR using the MATCHMAKER 5'- and 3'-AD LD-Insert Screening Amplimers and then sequenced.

### 1.2. Expression vectors.

Bicistronic TFPI-2-GFP expression vector was obtained as follows: pZem 229 plasmid (Sprecher *et al.* 1994) containing the TFPI-2 cDNA was digested with *EcoRI* and subsequently cloned into the *EcoRI* pIRES2-EGFP (BD Biosciences Clontech). To generate the TFPI-2-Myc expression vector (scheme in Figure 1B), pZem229 was used as a template to amplify and create new restriction sites with the following oligonucleotides: TFPI-2 forward 5'- **C AGA ATT CCC ATG GAC CCC GCT CGC** - 3', TFPI-2 reverse 5'- **CT TGG TAC CTG CTT CTT CCG AAT TTT C** - 3' (*EcoRI* and *KpnI* restriction sites are in bold, and the starting ATG is underlined). The resulting PCR product was then cloned into pCR2.1 (Invitrogen) using the TOPO-TA cloning kit and the TFPI-2 cDNA was obtained by subsequent digestion with *EcoRI* and *KpnI*. This fragment was inserted into *KpnI/EcoRI* pcDNA 3.1/Myc-His (-) B expression vector (Invitrogen). This construct contains a functional *Myc-His* epitope at the C-terminal end. The C-terminal truncated TFPI-2 ( $\Delta$ CTFPI-2-Myc) expression vector (scheme in Figure 37) was generated by amplification of pZem229 with the same forward primer noted above and the following reverse primer: 5'- **CTT GGT ACC CTT TTT CAA AGC TTT TGC** -3'. The same procedure described above was used to subclone this truncated form into *KpnI/EcoRI* pcDNA 3.1/Myc-His(-) B expression vector (Invitrogen). The Myc chimeras are represented in figure 38.

Full-length human ADAMTS1, zinc-binding site mutant (E<sup>385</sup> >A)-ADAMTS1, and  $\Delta$ TSRs-ADAMTS1 (Met-Dis: 1-556) constructs have previously been described (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002; Luque *et al.* 2003). Recombinant human TFPI-2 and p87-ADAMTS1 were purified as described (Sprecher *et al.* 1994).



Figure 38. A representation of the Myc construct generated and used for this work.

### 1.3. Cell culture, transfection and treatments.

Mouse lung endothelial (LE), HEK293T, HEK293 and HT-1080 human fibrosarcoma cells were cultured at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> under saturated humidity, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PAA Laboratories) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Hyclone) penicillin-streptomycin, L-glutamine and plasmocin.

Transient and stable transfections were performed with FuGENE 6 transfection reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's specification. pLSHL-Hygro vector (Invitrogen) was co-transfected in stable transfection experiments for further selection with hygromycin. Bicistronic TFPI-2-GFP and full-length human ADAMTS1 used for the generation of stable clones were described here and elsewhere (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002). Additional stable cell lines used in this study are 293T overexpressors of ADAMTS1 (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000) and zinc-binding site mutant (E<sup>385</sup>>A)-ADAMTS1 (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002). Conditioned medium from stable 293T and HT-1080 cell lines was collected after 48 h of incubation in serum-free medium. For transient transfection experiments, cells were maintained for 24 h in 10 % FCS medium and then switched to serum-free medium prior to collecting the conditioned medium and harvesting the cell lysates. For LE treatments, cultures were serum-deprived overnight prior to being treated with the indicated conditioned medium or recombinant proteins diluted in serum-free DMEM. Conditioned medium was collected, and the cell layer was rinsed twice with PBS and harvested in RIPA buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 1 % NP40, 1 mM EDTA).

HUVEC were cultured in standard condition using EBM media supplemented with growth factors, cytokines and supplements (Clonetics).

EW7, SIM/EW27, RD-ES are human Ewing sarcoma's cell lines. MUM2B, MUM2C, C8161 and C81-61 are human melanoma's cell lines. These cell lines were cultured in RPMI with 10% FCS and 1% of 200mM L-glutamine with the exception SIM/EW27 that also need a flask gelatin (0,2%) precoating

for 15min at 37°C. All these cell lines were cultured at standard conditions. Transient transfection of these cells was performed with Metafectene Pro (Biontix) according to manufactures directions.

Cell culture treatments are as follows: 5 µg/ml heparin (Sigma-Aldrich Chemie); 1-10 µM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Calbiochem) 1 µg/ml tunicamycin (Sigma-Aldrich Chemie); 6 µM protease inhibitor BB94 (a generous gift from Richard Kenagy, University of Washington, Seattle) or 30µM 1,10 phenantroline (Sigma); 5 mU/ml plasmin (Roche); 1 U/ml thrombin (Sigma); 2 µg/ml aprotinin (Sigma); 20 µg/ml leupeptin (Sigma).

#### **1.4. Tumor xenograft assays.**

293T and HT-1080 clones were trypsinized, washed twice and re-suspended in free-serum DMEM. Nu/Nu Balb/c mice were subcutaneously injected in the right back with  $5 \times 10^6$  cells per 200 µl. Mice weight and tumor size were assessed every three days after cell injection. When the tumors reached 1.5-2.0 cm<sup>2</sup> (for 293T and HT-1080 respectively), mice were sacrificed, and the tumors were removed for further analysis.

Tumor volumes were calculated by the equation  $D * d^2 * \pi/6$  where  $D$  is the tumor diameter at its widest and  $d$  at its smallest (Matar *et al.* 2004).

#### **1.5. N-glycosidase F treatment.**

Conditioned medium was methanol-precipitated and re-suspended in 50 µl of reaction buffer (100 mM Na-phosphate pH 7, 0,2 % SDS, 10 mM EDTA). Samples were incubated for 3 min at 100 °C and then 10 % Triton X-100 was added to a 0,2% final concentration. Enzymatic incubation was performed at 37 °C for 20 h in the presence of 1-2 U of N-glycosidase F (Roche).

#### **1.6. *In vitro* digestion of TFPI-2.**

Conditioned medium from stable TFPI-2-Myc over-expressing 293T cells was purified under denaturing conditions (PBS pH 8, 8 M Urea) with Ni-NTA agarose (Qiagen). Bound protein was washed with PBS and equilibrated with reaction buffer (20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 µM ZnCl<sub>2</sub>, 5 µg/ml heparin). Digestions were performed at 37 °C for 16 h. Then samples were concentrated with StrataClean resin (Stratagene), resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot (antibodies listed in Table 7).

## **1.7. Co-Immunoprecipitation studies.**

Cell lysates or conditioned media were pre-absorbed with protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences AB) for 30 min at 4 °C in a rotation wheel. This material was then incubated with the appropriate antibody overnight at 4 °C. Protein G Sepharose was added for 1 h in the same condition. Finally, immunoprecipitates were pelleted, rinsed three times with RIPA:PBS (1:3), resuspended in loading buffer and analyzed by SDS-PAGE (antibodies listed in Table 7).

## **1.8. Immunoblot analysis.**

Cell layers and tumor samples were homogenized and lysed with RIPA buffer containing 1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 µg/ml aprotinin. Cell debris was discarded by centrifugation (20 min at 16,000xg) and protein suspension was quantified using Bio-Rad D<sub>C</sub> Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). When needed, cell lysates were precipitated with 3 volumes of methanol at -20 °C overnight. The precipitate was washed twice with acetone and left to dry at room temperature. Conditioned medium was concentrated with StrataClean resin (Stratagene). Samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuel). Membranes were blocked with 5 % low-fat milk and incubated with the proper antibodies (Table 7).

## **1.9. Immunochemistry.**

### ***1.9.1. Paraffin sections.***

Slides were deparaffinized and subsequently hydrated by ethanol gradient. After antigen retrieval, sections were blocked. Primary antibodies to detect laminin, anti-FVIII related antigen, and endoglin were used (Table 7). After washing proper secondary antibodies were applied and further visualized with DAB (3,3'-Diaminobenzidine). PAS staining was done in deparaffinized sections following standardized methodology.

### 1.9.2. Frozen sections.

Slides were microdissected (5µm), and subsequently fixed with cold acetone. After a brief incubation in PBS at room temperature, primary antibodies to detect mouse CD31, human TFPI-2 and human ADAMTS1 were applied (Table 7). Slides were rinsed and proper secondary antibodies were applied (Table 7). Visualization was obtained by incubation with DAB (3,3'-Diaminobenzidine).

Antibody	host	Technique	Dilution	Source
<i>h</i> TFPI-2	rabbit	Wb/IHQ	1/1000;1/100	Kindly provided by W. Kisiel (Iino <i>et al.</i> 1998)
<i>h</i> TFPI	rabbit	Wb	1/1000	Kindly provided by W. Kisiel (Werling <i>et al.</i> 1993)
<i>h</i> ADAMTS1 clone 5D4E11B5	mouse	Wb	1/20(s)	Kindly provided by M. L. Iruela-Arispe (Luque <i>et al.</i> 2003)
<i>h</i> Myc	mouse	Wb/IP	1/20(s); 1/20(p)	Kindly provided by J.Arribas
<i>h</i> ADAMTS1 clone 3E46B4	mouse	IHQ/IP	1/2(s);1/50(p)	Kindly provided by M. L. Iruela-Arispe (Rodriguez-Manzanque <i>et al.</i> 2002)
<i>h</i> MMP2	rabbit	Wb	1/1000	Chemicon
<i>h</i> MMP9	rabbit	Wb	1/2000	Chemicon
<i>h</i> Actin	mouse	Wb	1/1000	Sigma
<i>h</i> laminin	mouse	IHQ	1/50	Novocastra
<i>m</i> CD31	rat	IHQ	1/150	pharmigen
<i>m,h,r</i> F8	rabbit	IHQ	1/100	Chemicon
<i>h,m</i> CD105 clone Sn6h,	mouse	IHQ	1/100	Dako
Anti-mouse biotin-labelled		IHQ	1/200	Dako
Anti-rat biotin-labelled		IHQ	1/200	Dako
Anti-rabbit biotin-labelled		IHQ	1/200	Dako
Anti-mouse HPR		Wb	1/1000	Pierce
Anti-rabbit HPR		Wb	1/1000	Pierce

**Table 7. List of antibodies used in this work.** *h, m, r* denotes human, mouse and rat respectively. (s) and (p) denotes hybridoma supernatant and purified antibody respectively. Wb, western blot; IP, immunoprecipitation; IHQ, immunohistochemistry; HPR horseradish peroxidase.

## **1.10. Chalkley morphometry analysis.**

Tumor vascularization was evaluated by the Chalkley method, a morphometric point overlap counting system using a microscope eyepiece graticule. It has been shown to be both a rapid and a reproducible method that gives independent prognostic information and has been suggested as a standard method in an international consensus report on the quantification of angiogenesis. In brief, a complete paraffin section including the tumour border was immunostained with a monoclonal anti-FVIII related antigen antibody diluted 1:100 for 1 hour at room temperature after heat antigen retrieval procedure. The areas of highest vascular density ('hot spots') were identified at low magnification (x 10 ocular and x 10 objective). On a higher magnification (x 10 ocular and x 20 objective), a 25-point Chalkley eyepiece graticule (Chalkley grid area 0.22 mm<sup>2</sup>) was applied to each hot spot and orientated to permit the maximum number of points to hit on or in a microvessel. The Chalkley count in the hot spot with highest vascular density (the largest number of hits) was used for further analyses.

## **1.11. Heparin purification.**

The affinity of ADAMTS1 and TFPI-2 proteins to heparin has been previously reported (Liu *et al.* 1999; Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000). Samples were incubated with pre-equilibrated heparin beads (Amersham), overnight at 4 °C under constant agitation. Heparin beads were then washed twice with 100 mM NaCl and twice more with PBS. Finally, samples were pelleted, resuspended in loading buffer and analyzed by SDS-PAGE.

## **1.12. Zymography.**

Cell layers and tumor samples were homogenized and lysed as mentioned. 200 µg of each extract was purified with Gelatin Sepharose (GE Healthcare) 1h at 4 °C with constant rotation, washed once in PBS, dissolved in loading buffer without reduction agents and were electrophoresed through a 0,1% gelatine-containing SDS 11% polyacrylamide gel. The gel was washed once with H<sub>2</sub>O and three times with washing buffer (2,5% Triton X-100) for 1 h, and then incubated over night at 37 °C in reaction buffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02% sodium azide (Sigma)). The gels were stained in 0,1% amido black and destained with destain solution (10% acetic acid, 30% methanol, 60% H<sub>2</sub>O.). As positive control 50 ng of recombinant MMP-2 and MMP-9 were loaded. Gelatinolytic activity was identified as clear bands on a black background, but to easy visualization the images were inverted. Gelatine zymography detects the activity of both active and pro-form gelatinolytic MMPs. This is because

exposure to SDS during gel electrophoresis causes activation by denaturalization of the pro-form MMPs without proteolytic cleavage of the prodomain (Birkedal-Hansen and Taylor 1982).

### 1.13. RNA isolation and reverse transcription-PCR analysis.

Total RNA was isolated from cells and tissue sections using RNeasy (Qiagen), followed by RNase-free DNase treatment (Qiagen). RNA concentration was measured with Nanodrop (Nanodrop). RT-PCR was performed with 0.5 µg of total RNA using oligo dT primers and the SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) followed by specific amplification with the specific primers (listed in Table 8). PCR products were resolved in 2% agarose gels in TAE (40mM Tris Acetate, pH 8.3 and 1.0mM EDTA) stained with ethidium bromide (0,5 µg/ml). For quantitative RT-PCR 20µl of cDNA was synthesized from 200-500ng of RNA with iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad), and 80µl of H<sub>2</sub>O was added. PCR was done using an IQ5 real-time detection system (Bio-Rad) in 25 µL volume containing 12,5 µl IQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad), 1 µl each of forward and reverse primers listed in table 4 (10µM), 2-5 µl cDNA and H<sub>2</sub>O. The PCR profile was as follows: 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Absolute mRNA copy numbers were calculated from standard curves that were obtained by dilution of precisely quantified template DNA. Data were analyzed using IQ5 software (Bio-Rad). Melting curves were generated to monitor proper product formation and cycle threshold (Ct) values were obtained for quantification. Primers were specific for either human or mouse sequences and they were selected based on the following requirements:

- (i) high percentage of mismatch in the 3' region with at least 1 nucleotide (nt) mismatch at the 3' end,
- (ii) primer melting temperature of approximately 60°C,
- (iii) GC content of approximately 55%, (iv) preferably no G at the 5' end, (v) avoid runs of more than three identical nucleotides,
- (iv) amplicon length of approximately 100 nucleotides.

Specificity and cross-reactivity were checked with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Geometric averages of Ct values of the reference genes beta-actin, cyclophilinA, HPRT, beta2-microglobulin were subtracted from the Ct values of the test genes to generate dCt values. Relative expression levels were calculated as  $2^{-dCt}$ .

Primer name	Technique	Sequence
<i>hTFPI</i> forw	RTPCR	<i>TAT GGG GGA TGT GAA GGA AA</i>
<i>hTFPI</i> rev	RTPCR	<i>GAG GGA CCG TGA AAT TCA AA</i>
<i>hTFPI-2</i> forw	RTPCR	<i>GTC GAT TCT GCT GCT TTT CC</i>
<i>hTFPI-2</i> rev	RTPCR	<i>CGA AGC TTT GGC ATC TTC TT</i>
<i>hADAMTS1</i> forw	RTPCR	<i>ACG AGT GCG CTA CAG ATC CT</i>
<i>hADAMTS1</i> rev	RTPCR	<i>GTG GCT CCA GTT GGA ATT</i>
<i>hADAMTS4</i> forw	RTPCR	<i>CAT CTA CTT GGC CCT GAA GC</i>
<i>hADAMTS4</i> rev	RTPCR	<i>CAG CCG GGA TAG TGA GGT TA</i>
<i>hMMP2</i> forw	RTPCR	<i>GGG GCC TCT CCT GAC ATT</i>
<i>hMMP2</i> rev	RTPCR	<i>TCA CAG TCC GCC AAA TGA A</i>
<i>h laminin5 gamma2</i> forw	RTPCR	<i>TTT AGC TCA GCC CAA CGA CT</i>
<i>h laminin5 gamma2</i> rev	RTPCR	<i>GGC TGA AAT CAG GGT CAC AT</i>
<i>hendoglin</i> forw	RTPCR	<i>CTCTGCTGCTGAGCTGAATG</i>
<i>hendoglin</i> rev	RTPCR	<i>GATCTGCATGTTGTGGTTGG</i>
<i>hEphA2</i> forw	RTPCR	<i>AGGAGAGTTTGGGGAGGTGT</i>
<i>hEphA2</i> rev	RTPCR	<i>TCAGACACCTTGCAGACCAG</i>
<i>hTIE1</i> forw	RTPCR	<i>CCCTGAGCTACCCAGTGCTAGAGTG</i>
<i>hTIE1</i> rev	RTPCR	<i>TGGTCACAGGTTAGACAGCAGAGTTTG</i>
<i>hVEGFC</i> forw	RTPCR	<i>AGTCGCGACAAACACCTTCT</i>
<i>hVEGFC</i> rev	RTPCR	<i>CATCCAGCTCCTTGTTTGGT</i>
$\beta$ -actin forw	RTPCR	<i>CCT GAC CGA GCG TGG CTA C</i>
$\beta$ -actin rev	RTPCR	<i>GAA GCA TTT GCG GTG GAC G</i>
<i>hcyclophylin A</i> forw	qRTPCR	<i>CTC GAA TAA GTT TGA CTT GTG TTT</i>
<i>hcyclophylin A</i> rev	qRTPCR	<i>CTA GGC ATG GGA GGG AAC A</i>
<i>h<math>\beta</math>-actin</i> forw	qRTPCR	<i>GCT GTG CTA CGT CGC CCT G</i>
<i>h<math>\beta</math>-actin</i> rev	qRTPCR	<i>GGA GGA GCT GGA AGC AGC C</i>
<i>h<math>\beta</math>2-microglobulin</i> forw	qRTPCR	<i>TCC ATC CGA CAT TGA AGT TG</i>
<i>h<math>\beta</math>2-microglobulin</i> rev	qRTPCR	<i>TCC ATC CGA CAT TGA AGT TG</i>
<i>hHPRT</i> forw	qRTPCR	<i>AGA ATG TCT TGA TTG TGG AAG A</i>
<i>hHPRT</i> rev	qRTPCR	<i>ACC TTG ACC ATC TTT GGA TTA</i>
<i>hVEGF-A</i> forw	qRTPCR	<i>AAG GAG GAG GGC AGA ATC AT</i>
<i>hVEGF-A</i> rev	qRTPCR	<i>CCA GGC CCT CGT CAT TG</i>
<i>hADAMTS1</i> forw	qRTPCR	<i>AGC CCA TGA ATT AGG CCA CGT GTT</i>
<i>hADAMTS1</i> rev	qRTPCR	<i>AGC ATT GAC GCC ATC ATG TGG GAA</i>
<i>hTFPI-2</i> forw	qRTPCR	<i>TGC TCT GCC AAT GTG ACT CGC</i>
<i>hTFPI-2</i> rev	qRTPCR	<i>TGT CAT TCC CTC CAC AGC CAG TAT</i>
<i>hTie-1</i> forw	qRTPCR	<i>CCC CGC TGG TCT CGT TCT C</i>
<i>hTie-1</i> rev	qRTPCR	<i>CAC AAT GGT CGA CCA GTC C</i>
<i>hVE-Cadherin</i> forw	qRTPCR	<i>TCC CGG AGC AGA AGA CGT</i>
<i>hVE-Cadherin</i> rev	qRTPCR	<i>GAG AAA AGA AAG AGA GCA TGG ATT G</i>

**Table 8.** A detailed list of the primers used in this work for RT-PCR and qRT-PCR. (forw: forward; rev: reverse; RTPCR: semiquantitative PCR; qRTPCR: quantitative real time PCR).



## Bibliography.

- Acuff, H. B., M. Sinnamon, B. Fingleton, B. Boone, S. E. Levy, X. Chen, A. Pozzi, D. P. Carbone, D. R. Schwartz, K. Moin, B. F. Sloane and L. M. Matrisian (2006). "Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer." *Cancer Res* **66**(16): 7968-75.
- Aho, S. and J. Uitto (1998). "Two-hybrid analysis reveals multiple direct interactions for thrombospondin 1." *Matrix Biol* **17**(6): 401-12.
- Ahonen, M., A. H. Baker and V. M. Kahari (1998). "Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells." *Cancer Res* **58**(11): 2310-5.
- Ahram, M., J. N. Adkins, D. L. Auberry, D. S. Wunschel and D. L. Springer (2005). "A proteomic approach to characterize protein shedding." *Proteomics* **5**(1): 123-31.
- Alfalah, M., E. T. Parkin, R. Jacob, E. D. Sturrock, R. Mentele, A. J. Turner, N. M. Hooper and H. Y. Naim (2001). "A point mutation in the juxtamembrane stalk of human angiotensin I-converting enzyme invokes the action of a distinct secretase." *J Biol Chem* **276**(24): 21105-9.
- Armstrong, P. B. and J. P. Quigley (1999). "Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system." *Dev Comp Immunol* **23**(4-5): 375-90.
- Armulik, A., A. Abramsson and C. Betsholtz (2005). "Endothelial/pericyte interactions." *Circ Res* **97**(6): 512-23.
- Arner, E. C., M. A. Pratta, C. P. Decicco, C. B. Xue, R. C. Newton, J. M. Trzaskos, R. L. Magolda and M. D. Tortorella (1999). "Aggrecanase. A target for the design of inhibitors of cartilage degradation." *Ann N Y Acad Sci* **878**: 92-107.
- Arthur, H. M., J. Ure, A. J. Smith, G. Renforth, D. I. Wilson, E. Torsney, R. Charlton, D. V. Parums, T. Jowett, D. A. Marchuk, J. Burn and A. G. Diamond (2000). "Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development." *Dev Biol* **217**(1): 42-53.
- Asahara, T. and A. Kawamoto (2004). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(3): C572-9.
- Aspberg, A., S. Adam, G. Kostka, R. Timpl and D. Heinegard (1999). "Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican." *J Biol Chem* **274**(29): 20444-9.
- Ausprunk, D. H. and J. Folkman (1977). "Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis." *Microvasc Res* **14**(1): 53-65.
- Baker, A. H., D. R. Edwards and G. Murphy (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." *J Cell Sci* **115**(Pt 19): 3719-27.
- Barmina, O. Y., H. W. Walling, G. J. Fiacco, J. M. Freije, C. Lopez-Otin, J. J. Jeffrey and N. C. Partridge (1999). "Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization." *J Biol Chem* **274**(42): 30087-93.
- Barrios, A. M. and C. S. Craik (2002). "Scanning the prime-site substrate specificity of proteolytic enzymes: a novel assay based on ligand-enhanced lanthanide ion fluorescence." *Bioorg Med Chem Lett* **12**(24): 3619-23.
- Bech-Serra, J. J., B. Santiago-Josefat, C. Esselens, P. Saftig, J. Baselga, J. Arribas and F. Canals (2006). "Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis." *Mol Cell Biol* **26**(13): 5086-95.
- Becherer, J. D. and C. P. Blobel (2003). "Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs)." *Curr Top Dev Biol* **54**: 101-23.
- Belaouaj, A. A., A. Li, T. C. Wun, H. G. Welgus and S. D. Shapiro (2000). "Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor. Effects on coagulation." *J Biol Chem* **275**(35): 27123-8.
- Benjamin, L. E., D. Golijanin, A. Itin, D. Pode and E. Keshet (1999). "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal." *J Clin Invest* **103**(2): 159-65.
- Bergeron, F., R. Leduc and R. Day (2000). "Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications." *J Mol Endocrinol* **24**(1): 1-22.
- Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb and D. Hanahan (2000). "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." *Nat Cell Biol* **2**(10): 737-44.

- Bergers, G., K. Javaherian, K. M. Lo, J. Folkman and D. Hanahan (1999). "Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice." *Science* **284**(5415): 808-12.
- Bertaux, B., W. Hornebeck, A. Z. Eisen and L. Dubertret (1991). "Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases." *J Invest Dermatol* **97**(4): 679-85.
- Bevitt, D. J., J. Mohamed, J. B. Catterall, Z. Li, C. E. Arris, P. Hiscott, C. Sheridan, K. P. Langton, M. D. Barker, M. P. Clarke and N. McKie (2003). "Expression of ADAMTS metalloproteinases in the retinal pigment epithelium derived cell line ARPE-19: transcriptional regulation by TNFalpha." *Biochim Biophys Acta* **1626**(1-3): 83-91.
- Billinghurst, R. C., L. Dahlberg, M. Ionescu, A. Reiner, R. Bourne, C. Rorabeck, P. Mitchell, J. Hambor, O. Diekmann, H. Tschesche, J. Chen, H. Van Wart and A. R. Poole (1997). "Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage." *J Clin Invest* **99**(7): 1534-45.
- Billings, S. D., M. D. Southall, T. Li, P. W. Cook, L. Baldrige, W. B. Moores, D. F. Spandau, J. G. Foley and J. B. Travers (2003). "Amphiregulin overexpression results in rapidly growing keratinocytic tumors: an in vivo xenograft model of keratoacanthoma." *Am J Pathol* **163**(6): 2451-8.
- Birkedal-Hansen, H. and R. E. Taylor (1982). "Detergent-activation of latent collagenase and resolution of its component molecules." *Biochem Biophys Res Commun* **107**(4): 1173-8.
- Bittner, M., P. Meltzer, Y. Chen, Y. Jiang, E. Seftor, M. Hendrix, M. Radmacher, R. Simon, Z. Yakhini, A. Ben-Dor, N. Sampas, E. Dougherty, E. Wang, F. Marincola, C. Gooden, J. Lueders, A. Glatfelter, P. Pollock, J. Carpten, E. Gillanders, D. Leja, K. Dietrich, C. Beaudry, M. Berens, D. Alberts and V. Sondak (2000). "Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling." *Nature* **406**(6795): 536-40.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." *Nature* **385**(6618): 729-33.
- Block, K. L., Y. Shou, M. Thorton and M. Poncz (1996). "The regulated expression of a TATA-less, platelet-specific gene, alphaIIb." *Stem Cells* **14 Suppl 1**: 38-47.
- Boerboom, D., D. L. Russell, J. S. Richards and J. Sirois (2003). "Regulation of transcripts encoding ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1) and progesterone receptor by human chorionic gonadotropin in equine preovulatory follicles." *J Mol Endocrinol* **31**(3): 473-85.
- Bohn, H. and H. Sedlacek (1975). "[Comparative studies on placenta specific proteins in man and subhuman primates (author's transl)]." *Arch Gynakol* **220**(2): 105-21.
- Bohn, H. and W. Winckler (1977). "[Isolation and characterization of the placental protein pp5 (author's transl)]." *Arch Gynakol* **223**(3): 179-86.
- Boldt, H. B., K. Kjaer-Sorensen, M. T. Overgaard, K. Weyer, C. B. Poulsen, L. Sottrup-Jensen, C. A. Conover, L. C. Giudice and C. Oxvig (2004). "The Lin12-notch repeats of pregnancy-associated plasma protein-A bind calcium and determine its proteolytic specificity." *J Biol Chem* **279**(37): 38525-31.
- Bongrazio, M., C. Baumann, A. Zakrzewicz, A. R. Pries and P. Gaehtgens (2000). "Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by prolonged exposure of endothelial cells to shear stress." *Cardiovasc Res* **47**(2): 384-93.
- Bouck, N., V. Stellmach and S. C. Hsu (1996). "How tumors become angiogenic." *Adv Cancer Res* **69**: 135-74.
- Bourdeau, A., D. J. Dumont and M. Letarte (1999). "A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia." *J Clin Invest* **104**(10): 1343-51.
- Brat, D. J. and E. G. Van Meir (2001). "Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research." *Am J Pathol* **158**(3): 789-96.
- Bredemeyer, A. J., R. M. Lewis, J. P. Malone, A. E. Davis, J. Gross, R. R. Townsend and T. J. Ley (2004). "A proteomic approach for the discovery of protease substrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11785-90.
- Brew, K., D. Dinakarandian and H. Nagase (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 267-83.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier and D. A. Cheresh (1994). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." *Cell* **79**(7): 1157-64.

- Butler, G. S., M. J. Butler, S. J. Atkinson, H. Will, T. Tamura, S. Schade van Westrum, T. Crabbe, J. Clements, M. P. d'Ortho and G. Murphy (1998). "The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study." *J Biol Chem* **273**(2): 871-80.
- Butler, G. S. and C. M. Overall (2007). "Proteomic validation of protease drug targets: pharmacoproteomics of matrix metalloproteinase inhibitor drugs using isotope-coded affinity tag labelling and tandem mass spectrometry." *Curr Pharm Des* **13**(3): 263-70.
- Butzow, R., H. Alfthan, U. H. Stenman, A. M. Suikkari, H. Bohn and M. Seppala (1988). "Immunofluorometric demonstration and quantification of placental protein 5 in the absence of pregnancy." *Clin Chem* **34**(8): 1591-3.
- Butzow, R., V. P. Lehto, O. Ritvos, T. Ranta and M. Seppala (1988). "Regulation of the production of placental protein 5 by human endometrial stromal cells; the role of prostaglandins E2 and F2 alpha." *Mol Cell Endocrinol* **60**(2-3): 137-43.
- Butzow, R., I. Virtanen, M. Seppala, O. Narvanen, U. H. Stenman, A. Ristimaki and H. Bohn (1988). "Monoclonal antibodies reacting with placental protein 5: use in radioimmunoassay, Western blot analysis, and immunohistochemistry." *J Lab Clin Med* **111**(2): 249-56.
- Cal, S., J. M. Arguelles, P. L. Fernandez and C. Lopez-Otin (2001). "Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats." *J Biol Chem* **276**(21): 17932-40.
- Camaioni, A., A. Salustri, M. Yanagishita and V. C. Hascall (1996). "Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes." *Arch Biochem Biophys* **325**(2): 190-8.
- Canals, F., N. Colome, C. Ferrer, C. Plaza-Calonge Mdel and J. C. Rodriguez-Manzaneque (2006). "Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis." *Proteomics* **6 Suppl 1**: S28-35.
- Cao, J., M. Hymowitz, C. Conner, W. F. Bahou and S. Zucker (2000). "The propeptide domain of membrane type 1-matrix metalloproteinase acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in COS-1 cells." *J Biol Chem* **275**(38): 29648-53.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* **6**(4): 389-95.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**(6801): 249-57.
- Carmeliet, P., L. Moons, A. Luttun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. Vandendriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K. H. Plate, J. M. Foidart, W. Schaper, D. S. Charnock-Jones, D. J. Hicklin, J. M. Herbert, D. Collen and M. G. Persico (2001). "Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions." *Nat Med* **7**(5): 575-83.
- Castro, M. J. and S. Anderson (1996). "Alanine point-mutations in the reactive region of bovine pancreatic trypsin inhibitor: effects on the kinetics and thermodynamics of binding to beta-trypsin and alpha-chymotrypsin." *Biochemistry* **35**(35): 11435-46.
- Cavallaro, U., S. Liebner and E. Dejana (2006). "Endothelial cadherins and tumor angiogenesis." *Exp Cell Res* **312**(5): 659-67.
- Cooper, G., M. (2000). *The Cell - A Molecular Approach I*. Sinauer Associates.
- Corcoran, M. L. and W. G. Stetler-Stevenson (1995). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism." *J Biol Chem* **270**(22): 13453-9.
- Crawley, J. T., D. A. Goulding, V. Ferreira, N. J. Severs and F. Lupu (2002). "Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(2): 218-24.
- Cunningham, A. C., K. A. Hasty, J. J. Enghild and A. E. Mast (2002). "Structural and functional characterization of tissue factor pathway inhibitor following degradation by matrix metalloproteinase-8." *Biochem J* **367**(Pt 2): 451-8.
- Cunningham, B. C., D. J. Henner and J. A. Wells (1990). "Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor." *Science* **247**(4949 Pt 1): 1461-5.
- Chand, H. S., X. Du, D. Ma, H. D. Inzunza, S. Kamei, D. Foster, S. Brodie and W. Kisiel (2004). "The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice." *Blood* **103**(3): 1069-77.
- Chand, H. S., D. C. Foster and W. Kisiel (2005). "Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2." *Thromb Haemost* **94**(6): 1122-30.

- Chand, H. S., A. E. Schmidt, S. P. Bajaj and W. Kisiel (2004). "Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2." J Biol Chem **279**(17): 17500-7.
- Davie, E. W. and H. Neurath (1955). "Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen." J Biol Chem **212**(2): 515-29.
- Davie, E. W. and O. D. Ratnoff (1964). "Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting." Science **145**: 1310-2.
- Davies, S. G. and R. B. Sim (1981). "Intramolecular general acid catalysis in the binding reactions of alpha 2-macroglobulin and complement components C3 and C4." Biosci Rep **1**(6): 461-8.
- Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." Cell **103**(2): 239-52.
- Davis, S., T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre and G. D. Yancopoulos (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." Cell **87**(7): 1161-9.
- de Visser, K. E., A. Eichten and L. M. Coussens (2006). "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." Nat Rev Cancer **6**(1): 24-37.
- Deng, F. M., M. Ding, R. M. Lavker and T. T. Sun (2001). "Urothelial function reconsidered: a role in urinary protein secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 154-9.
- Diamantis, I., M. Luthi, M. Hosli and J. Reichen (2000). "Cloning of the rat ADAMTS-1 gene and its down regulation in endothelial cells in cirrhotic rats." Liver **20**(2): 165-72.
- Dome, B., S. Paku, B. Somlai and J. Timar (2002). "Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance." J Pathol **197**(3): 355-62.
- Dome, B., J. Timar and S. Paku (2003). "A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases." J Neuropathol Exp Neurol **62**(6): 655-61.
- Dong, J. T. (2001). "Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer." Cancer Metastasis Rev **20**(3-4): 173-93.
- Dours-Zimmermann, M. T. and D. R. Zimmermann (1994). "A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican." J Biol Chem **269**(52): 32992-8.
- Doyle, K. M., D. L. Russell, V. Sriraman and J. S. Richards (2004). "Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor." Mol Endocrinol **18**(10): 2463-78.
- Du, X., H. S. Chand and W. Kisiel (2003). "Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1." Biochim Biophys Acta **1621**(3): 242-5.
- Du, X., F. M. Deng, H. S. Chand and W. Kisiel (2003). "Molecular cloning, expression, and characterization of bovine tissue factor pathway inhibitor-2." Arch Biochem Biophys **417**(1): 96-104.
- Easty, D. J., S. P. Hill, M. Y. Hsu, M. E. Fallowfield, V. A. Florenes, M. Herlyn and D. C. Bennett (1999). "Up-regulation of ephrin-A1 during melanoma progression." Int J Cancer **84**(5): 494-501.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-74.
- Eisenberg, E. and E. Y. Levanon (2003). "Human housekeeping genes are compact." Trends Genet **19**(7): 362-5.
- Elliott, R. L. and G. C. Blobe (2005). "Role of transforming growth factor Beta in human cancer." J Clin Oncol **23**(9): 2078-93.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell **126**(4): 677-89.
- Enjyoji, K., M. Emi, T. Mukai, M. Imada, M. L. Leppert, J. M. Lalouel and H. Kato (1993). "Human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene: complete genomic structure and localization on the genetic map of chromosome 2q." Genomics **17**(2): 423-8.
- Espey, L. L., S. Yoshioka, D. L. Russell, R. L. Robker, S. Fujii and J. S. Richards (2000). "Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat." Biol Reprod **62**(4): 1090-5.
- Esteller, M. (2005). "Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 629-56.
- Ewing, J. (1921). "Diffuse endothelioma of bone." Proc N Y Pathol Soc(21): 17-24.
- Fan, H. and R. Derynck (1999). "Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades." Embo J **18**(24): 6962-72.
- Feinman, R. D. (1994). "The proteinase-binding reaction of alpha 2M." Ann N Y Acad Sci **737**: 245-66.

- Fejes-Toth, G. and A. Naray-Fejes-Toth (2007). "Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: clues to cardiac remodeling?" *Endocrinology* **148**(4): 1502-10.
- Felbor, U., L. Dreier, R. A. Bryant, H. L. Ploegh, B. R. Olsen and W. Mothes (2000). "Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII." *Embo J* **19**(6): 1187-94.
- Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* **9**(6): 669-76.
- Fields, G. B. (1991). "A model for interstitial collagen catabolism by mammalian collagenases." *J Theor Biol* **153**(4): 585-602.
- Flannery, C. R., C. B. Little, C. E. Hughes and B. Caterson (1999). "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(2): 318-22.
- Flannery, C. R., W. Zeng, C. Corcoran, L. A. Collins-Racie, P. S. Chockalingam, T. Hebert, S. A. Mackie, T. McDonagh, T. K. Crawford, K. N. Tomkinson, E. R. LaVallie and E. A. Morris (2002). "Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites." *J Biol Chem* **277**(45): 42775-80.
- Folberg, R., Z. Arbieva, J. Moses, A. Hayee, T. Sandal, S. Kadkol, A. Y. Lin, K. Valyi-Nagy, S. Setty, L. Leach, P. Chevez-Barrios, P. Larsen, D. Majumdar, J. Pe'er and A. J. Maniotis (2006). "Tumor cell plasticity in uveal melanoma: microenvironment directed dampening of the invasive and metastatic genotype and phenotype accompanies the generation of vasculogenic mimicry patterns." *Am J Pathol* **169**(4): 1376-89.
- Folberg, R., M. J. Hendrix and A. J. Maniotis (2000). "Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis." *Am J Pathol* **156**(2): 361-81.
- Folberg, R., V. Rummelt, R. Parys-Van Ginderdeuren, T. Hwang, R. F. Woolson, J. Pe'er and L. M. Gruman (1993). "The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma." *Ophthalmology* **100**(9): 1389-98.
- Galis, Z. S., R. Kranzhofer, J. W. Fenton, 2nd and P. Libby (1997). "Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(3): 483-9.
- Gao, G., A. Plaas, V. P. Thompson, S. Jin, F. Zuo and J. D. Sandy (2004). "ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1." *J Biol Chem* **279**(11): 10042-51.
- Gao, G., J. Westling, V. P. Thompson, T. D. Howell, P. E. Gottschall and J. D. Sandy (2002). "Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation." *J Biol Chem* **277**(13): 11034-41.
- Garcia-Touchard, A., T. D. Henry, G. Sangiorgi, L. G. Spagnoli, A. Mauriello, C. Conover and R. S. Schwartz (2005). "Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(6): 1119-27.
- Gasson, J. C., D. W. Golde, S. E. Kaufman, C. A. Westbrook, R. M. Hewick, R. J. Kaufman, G. G. Wong, P. A. Temple, A. C. Leary, E. L. Brown and et al. (1985). "Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity." *Nature* **315**(6022): 768-71.
- Ge, G. and D. S. Greenspan (2006). "BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein." *J Cell Biol* **175**(1): 111-20.
- Ghate, J. V., M. L. Turner, M. A. Rudek, W. D. Figg, W. Dahut, V. Dyer, J. M. Pluda and E. Reed (2001). "Drug-induced lupus associated with COL-3: report of 3 cases." *Arch Dermatol* **137**(4): 471-4.
- Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W. G. Stetler-Stevenson and V. Quaranta (1997). "Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5." *Science* **277**(5323): 225-8.
- Girard, T. J., R. Eddy, R. L. Wesselschmidt, L. A. MacPhail, K. M. Likert, M. G. Byers, T. B. Shows and G. J. Broze, Jr. (1991). "Structure of the human lipoprotein-associated coagulation inhibitor gene. Intro/exon gene organization and localization of the gene to chromosome 2." *J Biol Chem* **266**(8): 5036-41.
- Girard, T. J., L. A. Warren, W. F. Novotny, K. M. Likert, S. G. Brown, J. P. Miletich and G. J. Broze, Jr. (1989). "Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor." *Nature* **338**(6215): 518-20.
- Glasson, S. S., R. Askew, B. Sheppard, B. Carito, T. Blanchet, H. L. Ma, C. R. Flannery, D. Peluso, K. Kanki, Z. Yang, M. K. Majumdar and E. A. Morris (2005). "Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis." *Nature* **434**(7033): 644-8.

- Glasson, S. S., R. Askew, B. Sheppard, B. A. Carito, T. Blanchet, H. L. Ma, C. R. Flannery, K. Kanki, E. Wang, D. Peluso, Z. Yang, M. K. Majumdar and E. A. Morris (2004). "Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice." *Arthritis Rheum* **50**(8): 2547-58.
- Gocheva, V., W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan and J. A. Joyce (2006). "Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis." *Genes Dev* **20**(5): 543-56.
- Godenschwege, T. A., N. Pohar, S. Buchner and E. Buchner (2000). "Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of *Drosophila*." *Eur J Cell Biol* **79**(7): 495-501.
- Gomis-Ruth, F. X. (2003). "Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases." *Mol Biotechnol* **24**(2): 157-202.
- Gougos, A. and M. Letarte (1988). "Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line." *J Immunol* **141**(6): 1925-33.
- Greenbaum, D. C., W. D. Arnold, F. Lu, L. Hayrapetian, A. Baruch, J. Krumrine, S. Toba, K. Chehade, D. Bromme, I. D. Kuntz and M. Bogyo (2002). "Small molecule affinity fingerprinting. A tool for enzyme family subclassification, target identification, and inhibitor design." *Chem Biol* **9**(10): 1085-94.
- Grignon, D. J., W. Sakr, M. Toth, V. Ravery, J. Angulo, F. Shamsa, J. E. Pontes, J. C. Crissman and R. Fridman (1996). "High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer." *Cancer Res* **56**(7): 1654-9.
- Grzesiak, A., O. Buczek, I. Petry, Z. Szewczuk and J. Otlewski (2000). "Inhibition of serine proteinases from human blood clotting system by squash inhibitor mutants." *Biochim Biophys Acta* **1478**(2): 318-24.
- Grzesiak, A., R. Helland, A. O. Smalas, D. Krowarsch, M. Dadlez and J. Otlewski (2000). "Substitutions at the P(1) position in BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases." *J Mol Biol* **301**(1): 205-17.
- Gschwind, A., S. Hart, O. M. Fischer and A. Ullrich (2003). "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells." *Embo J* **22**(10): 2411-21.
- Guo, L., J. R. Eisenman, R. M. Mahimkar, J. J. Peschon, R. J. Paxton, R. A. Black and R. S. Johnson (2002). "A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases." *Mol Cell Proteomics* **1**(1): 30-6.
- Gupta, K., P. Gupta, R. Wild, S. Ramakrishnan and R. P. Hebbel (1999). "Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis." *Angiogenesis* **3**(2): 147-58.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**(3): 353-64.
- Haro, H., H. C. Crawford, B. Fingleton, K. Shinomiya, D. M. Spengler and L. M. Matrisian (2000). "Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption." *J Clin Invest* **105**(2): 143-50.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura and P. Saftig (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." *Hum Mol Genet* **11**(21): 2615-24.
- Hasegawa, Y., N. Sakamoto and K. Gotoh (1996). "Relationship of ultrasonic and histologic findings in benign prostatic hyperplasia." *Prostate* **28**(2): 111-6.
- Hashimoto, G., I. Inoki, Y. Fujii, T. Aoki, E. Ikeda and Y. Okada (2002). "Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165." *J Biol Chem* **277**(39): 36288-95.
- Hashimoto, G., M. Shimoda and Y. Okada (2004). "ADAMTS4 (aggrecanase-1) interaction with the C-terminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan." *J Biol Chem* **279**(31): 32483-91.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, E. Ohuchi and A. Shinagawa (1994). "Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)." *J Cell Sci* **107** ( Pt 9): 2373-9.
- Hayashi, T., M. V. Fleming, W. G. Stetler-Stevenson, L. A. Liotta, J. Moss, V. J. Ferrans and W. D. Travis (1997). "Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM)." *Hum Pathol* **28**(9): 1071-8.
- Helland, R., J. Otlewski, O. Sundheim, M. Dadlez and A. O. Smalas (1999). "The crystal structures of the complexes between bovine beta-trypsin and ten P1 variants of BPTI." *J Mol Biol* **287**(5): 923-42.

- Hendrix, M. J., E. A. Seftor, A. R. Hess and R. E. Seftor (2003). "Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 411-21.
- Hendrix, M. J., E. A. Seftor, P. S. Meltzer, L. M. Gardner, A. R. Hess, D. A. Kirschmann, G. C. Schatteman and R. E. Seftor (2001). "Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14): 8018-23.
- Hendrix, M. J., E. A. Seftor, R. E. Seftor, J. Kasemeier-Kulesa, P. M. Kulesa and L. M. Postovit (2007). "Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 246-55.
- Hendrix, M. J., R. E. Seftor, E. A. Seftor, L. M. Gruman, L. M. Lee, B. J. Nickoloff, L. Miele, D. D. Sheriff and G. C. Schatteman (2002). "Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination." *Cancer Res* **62**(3): 665-8.
- Herman, M. P., G. K. Sukhova, W. Kisiel, D. Foster, M. R. Kehry, P. Libby and U. Schonbeck (2001). "Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis." *J Clin Invest* **107**(9): 1117-26.
- Hess, A. R., E. A. Seftor, L. M. Gardner, K. Carles-Kinch, G. B. Schneider, R. E. Seftor, M. S. Kinch and M. J. Hendrix (2001). "Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2)." *Cancer Res* **61**(8): 3250-5.
- Hess, A. R., E. A. Seftor, L. M. Gruman, M. S. Kinch, R. E. Seftor and M. J. Hendrix (2006). "VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry." *Cancer Biol Ther* **5**(2): 228-33.
- Hillen, F. and A. W. Griffioen (2007). "Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond." *Cancer Metastasis Rev*.
- Hinkle, C. L., S. W. Sunnarborg, D. Loiselle, C. E. Parker, M. Stevenson, W. E. Russell and D. C. Lee (2004). "Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency." *J Biol Chem* **279**(23): 24179-88.
- Hintermann, E. and V. Quaranta (2004). "Epithelial cell motility on laminin-5: regulation by matrix assembly, proteolysis, integrins and erbB receptors." *Matrix Biol* **23**(2): 75-85.
- Hisaka, T., W. Kisiel and J. Rosenbaum (2002). "cDNA cloning and tissue distribution of the rat ortholog of tissue factor pathway inhibitor-2." *Thromb Haemost* **88**(2): 356-7.
- Hisaka, T., B. Lardeux, T. Lamireau, T. Wuestefeld, P. F. Lalor, V. Neaud, P. Maurel, A. Desmouliere, W. Kisiel, C. Trautwein and J. Rosenbaum (2004). "Expression of tissue factor pathway inhibitor-2 in murine and human liver regulation during inflammation." *Thromb Haemost* **91**(3): 569-75.
- Holash, J., S. J. Wiegand and G. D. Yancopoulos (1999). "New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF." *Oncogene* **18**(38): 5356-62.
- Horiuchi, K., S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig and C. P. Blobel (2007). "Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx." *Mol Biol Cell* **18**(1): 176-88.
- Hristov, M., W. Erl and P. C. Weber (2003). "Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(7): 1185-9.
- Hube, F., P. Reverdiau, S. Iochmann, C. Cherpi-Antar and Y. Gruel (2003). "Characterization and functional analysis of TFPI-2 gene promoter in a human choriocarcinoma cell line." *Thromb Res* **109**(4): 207-15.
- Huber, R., D. Schlessinger and G. Pilia (1998). "Multiple Sp1 sites efficiently drive transcription of the TATA-less promoter of the human glypican 3 (GPC3) gene." *Gene* **214**(1-2): 35-44.
- Hwang, I. K., S. M. Park, S. Y. Kim and S. T. Lee (2004). "A proteomic approach to identify substrates of matrix metalloproteinase-14 in human plasma." *Biochim Biophys Acta* **1702**(1): 79-87.
- Hynes, R. O. (1992). "Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily." *Curr Opin Genet Dev* **2**(4): 621-4.
- Hynes, R. O., B. L. Bader and K. Hodivala-Dilke (1999). "Integrins in vascular development." *Braz J Med Biol Res* **32**(5): 501-10.
- Iino, M., D. C. Foster and W. Kisiel (1998). "Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(1): 40-6.
- Iochmann, S., P. Reverdiau-Moalic, F. Hube, P. Bardos and Y. Gruel (2002). "Demonstration of inducible TFPI-2 mRNA synthesis in BeWo and JEG-3 trophoblast cells using a competitive RT-PCR." *Thromb Res* **105**(3): 217-23.

- Ito, K., T. Shinomura, M. Zako, M. Ujita and K. Kimata (1995). "Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing." *J Biol Chem* **270**(2): 958-65.
- Itoh, N. and D. M. Ornitz (2004). "Evolution of the Fgf and Fgfr gene families." *Trends Genet* **20**(11): 563-9.
- Ivanciu, L., R. D. Gerard, H. Tang, F. Lupu and C. Lupu (2007). "Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(2): 310-6.
- Iyer, S. and K. R. Acharya (2002). "Role of placenta growth factor in cardiovascular health." *Trends Cardiovasc Med* **12**(3): 128-34.
- Jackson, L. F., T. H. Qiu, S. W. Sunnarborg, A. Chang, C. Zhang, C. Patterson and D. C. Lee (2003). "Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling." *Embo J* **22**(11): 2704-16.
- Jiang, Y., M. Wang, M. Y. Celiker, Y. E. Liu, Q. X. Sang, I. D. Goldberg and Y. E. Shi (2001). "Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery." *Cancer Res* **61**(6): 2365-70.
- Jonsson-Rylander, A. C., T. Nilsson, R. Fritsche-Danielson, A. Hammarstrom, M. Behrendt, J. O. Andersson, K. Lindgren, A. K. Andersson, P. Wallbrandt, B. Rosengren, P. Brodin, A. Thelin, A. Westin, E. Hurt-Camejo and C. H. Lee-Sogaard (2005). "Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(1): 180-5.
- Joyce, J. A., A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F. Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogyo and D. Hanahan (2004). "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis." *Cancer Cell* **5**(5): 443-53.
- Kalinski, T., S. Krueger, S. Sel, K. Werner, M. Ropke and A. Roessner (2007). "ADAMTS1 is regulated by interleukin-1[ $\beta$ ], not by hypoxia, in chondrosarcoma." *Human Pathology* **38**(1): 86-94.
- Kamei, S., Y. Kazama, J. L. Kuijper, D. C. Foster and W. Kisiel (2001). "Genomic structure and promoter activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 gene." *Biochim Biophys Acta* **1517**(3): 430-5.
- Kamei, S., L. C. Petersen, C. A. Sprecher, D. C. Foster and W. Kisiel (1999). "Inhibitory properties of human recombinant Arg24-->Gln type-2 tissue factor pathway inhibitor (R24Q TFPI-2)." *Thromb Res* **94**(3): 147-52.
- Kang, Y., P. M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S. M. Kakonen, C. Cordon-Cardo, T. A. Guise and J. Massague (2003). "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." *Cancer Cell* **3**(6): 537-49.
- Kaplan, R. N., R. D. Riba, S. Zacharoulis, A. H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D. D. MacDonald, D. K. Jin, K. Shido, S. A. Kerns, Z. Zhu, D. Hicklin, Y. Wu, J. L. Port, N. Altorki, E. R. Port, D. Ruggero, S. V. Shmelkov, K. K. Jensen, S. Rafii and D. Lyden (2005). "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche." *Nature* **438**(7069): 820-7.
- Kashiwagi, M., J. J. Enghild, C. Gendron, C. Hughes, B. Caterson, Y. Itoh and H. Nagase (2004). "Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing." *J Biol Chem* **279**(11): 10109-19.
- Kaushal, G. P. and S. V. Shah (2000). "The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family." *J Clin Invest* **105**(10): 1335-7.
- Kazama, Y., S. Kamei, J. L. Kuijper, D. C. Foster and W. Kisiel (2000). "Nucleotide sequence of the gene encoding murine tissue factor pathway inhibitor-2." *Thromb Haemost* **83**(1): 141-7.
- Kempaiah, P., H. S. Chand and W. Kisiel (2007). "Identification of a human TFPI-2 splice variant that is upregulated in human tumor tissues." *Mol Cancer* **6**: 20.
- Kirsch, M., G. Schackert and P. M. Black (2004). "Metastasis and angiogenesis." *Cancer Treat Res* **117**: 285-304.
- Kisiel, W., C. A. Sprecher and D. C. Foster (1994). "Evidence that a second human tissue factor pathway inhibitor (TFPI-2) and human placental protein 5 are equivalent." *Blood* **84**(12): 4384-5.
- Kondo, T. (2007). "Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines." *Cancer Biomark* **3**(4-5): 245-50.
- Konduri, S. D., C. N. Rao, N. Chandrasekar, A. Tasiou, S. Mohanam, Y. Kin, S. S. Lakka, D. Dinh, W. C. Olivero, M. Gujrati, D. C. Foster, W. Kisiel and J. S. Rao (2001). "A novel function of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in human glioma invasion." *Oncogene* **20**(47): 6938-45.
- Konduri, S. D., K. S. Srivenugopal, N. Yanamandra, D. H. Dinh, W. C. Olivero, M. Gujrati, D. C. Foster, W. Kisiel, F. Ali-Osman, S. Kondraganti, S. S. Lakka and J. S. Rao (2003). "Promoter methylation and silencing of the tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), a gene encoding an inhibitor of matrix metalloproteinases in human glioma cells." *Oncogene* **22**(29): 4509-16.



- Konduri, S. D., A. Tasiou, N. Chandrasekar, G. L. Nicolson and J. S. Rao (2000). "Role of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in amelanotic melanoma (C-32) invasion." Clin Exp Metastasis **18**(4): 303-8.
- Konduri, S. D., A. Tasiou, N. Chandrasekar and J. S. Rao (2001). "Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro." Int J Oncol **18**(1): 127-31.
- Kong, D., D. Ma, H. Bai, H. Guo, X. Cai, W. Mo, Q. Tang and H. Song (2004). "Expression and characterization of the first kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor-2." Biochem Biophys Res Commun **324**(4): 1179-85.
- Koshikawa, N., G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki and V. Quaranta (2000). "Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5." J Cell Biol **148**(3): 615-24.
- Kossakowska, A. E., S. J. Urbanski and D. R. Edwards (1991). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas." Blood **77**(11): 2475-81.
- Krampert, M., S. Kuenzle, S. N. M. Thai, N. Lee, M. L. Iruela-Arispe and S. Werner (2005). "ADAMTS1 Proteinase Is Up-regulated in Wounded Skin and Regulates Migration of Fibroblasts and Endothelial Cells." J Biol Chem **280**(25): 23844-23852.
- Kuno, K., K. Bannai, M. Hakozaki, K. Matsushima and K. Hirose (2004). "The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential." Biochem Biophys Res Commun **319**(4): 1327-33.
- Kuno, K., H. Iizasa, S. Ohno and K. Matsushima (1997). "The exon/intron organization and chromosomal mapping of the mouse ADAMTS-1 gene encoding an ADAM family protein with TSP motifs." Genomics **46**(3): 466-71.
- Kuno, K., N. Kanada, E. Nakashima, F. Fujiki, F. Ichimura and K. Matsushima (1997). "Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene." J Biol Chem **272**(1): 556-62.
- Kuno, K. and K. Matsushima (1998). "ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region." J Biol Chem **273**(22): 13912-7.
- Kuno, K., Y. Okada, H. Kawashima, H. Nakamura, M. Miyasaka, H. Ohno and K. Matsushima (2000). "ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan." FEBS Lett **478**(3): 241-5.
- Kuno, K., Y. Terashima and K. Matsushima (1999). "ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix." J Biol Chem **274**(26): 18821-6.
- Kuo, H. J., C. L. Maslen, D. R. Keene and R. W. Glanville (1997). "Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen." J Biol Chem **272**(42): 26522-9.
- Kurz, H., P. H. Burri and V. G. Djonov (2003). "Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function." News Physiol Sci **18**: 65-70.
- Lafleur, M. A., M. D. Hollenberg, S. J. Atkinson, V. Knauper, G. Murphy and D. R. Edwards (2001). "Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species." Biochem J **357**(Pt 1): 107-15.
- Lakka, S. S., S. D. Konduri, S. Mohanam, G. L. Nicolson and J. S. Rao (2000). "In vitro modulation of human lung cancer cell line invasiveness by antisense cDNA of tissue factor pathway inhibitor-2." Clin Exp Metastasis **18**(3): 239-44.
- Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco and E. Dejana (1992). "A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts." J Cell Biol **118**(6): 1511-22.
- Lee, A. Y., B. C. Park, M. Jang, S. Cho, D. H. Lee, S. C. Lee, P. K. Myung and S. G. Park (2004). "Identification of caspase-3 degradome by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis." Proteomics **4**(11): 3429-36.
- Lee, J. N., J. G. Grudzinskas and T. Chard (1979). "Circulating levels of pregnancy proteins in early and late pregnancy in relation to placental tissue concentration." Br J Obstet Gynaecol **86**(11): 888-90.
- Lee, N. V., J. C. Rodriguez-Manzaneque, S. N. Thai, W. O. TwaI, A. Luque, K. M. Lyons, W. S. Argraves and M. L. Iruela-Arispe (2005). "Fibulin-1 acts as a cofactor for the matrix metalloprotease ADAMTS-1." J Biol Chem **280**(41): 34796-804.
- Lee, N. V., M. Sato, D. S. Annis, J. A. Loo, L. Wu, D. F. Mosher and M. L. Iruela-Arispe (2006). "ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2." Embo J **25**(22): 5270-83.

- Lee, S., S. M. Jilani, G. V. Nikolova, D. Carpizo and M. L. Iruela-Arispe (2005). "Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors." *J Cell Biol* **169**(4): 681-91.
- Lemire, J. M., K. R. Braun, P. Maurel, E. D. Kaplan, S. M. Schwartz and T. N. Wight (1999). "Versican/PG-M isoforms in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(7): 1630-9.
- Lemons, M. L., J. D. Sandy, D. K. Anderson and D. R. Howland (2001). "Intact aggrecan and fragments generated by both aggrecanase and metalloproteinase-like activities are present in the developing and adult rat spinal cord and their relative abundance is altered by injury." *J Neurosci* **21**(13): 4772-81.
- Li, A., S. Dubey, M. L. Varney, B. J. Dave and R. K. Singh (2003). "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis." *J Immunol* **170**(6): 3369-76.
- Li, A. and T. C. Wun (1998). "Proteolysis of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) by plasmin: effect on TFPI activity." *Thromb Haemost* **80**(3): 423-7.
- Li, D. Y., L. K. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness, E. C. Davis, D. G. Taylor, B. B. Boak and D. P. Wendel (1999). "Defective angiogenesis in mice lacking endoglin." *Science* **284**(5419): 1534-7.
- Lind, G. E., K. Kleivi, G. I. Meling, M. R. Teixeira, E. Thiis-Evensen, T. O. Rognum and R. A. Lothe (2006). "ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis." *Cell Oncol* **28**(5-6): 259-72.
- Liu, C., H. Huang, F. Donate, C. Dickinson, R. Santucci, A. El-Sheikh, R. Vessella and T. S. Edgington (2002). "Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors." *Cancer Res* **62**(19): 5470-5.
- Liu, Y., S. M. Stack, S. S. Lakka, A. J. Khan, D. T. Woodley, J. S. Rao and C. N. Rao (1999). "Matrix localization of tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor (TFPI-2/MSP1) involves arginine-mediated ionic interactions with heparin and dermatan sulfate: heparin accelerates the activity of TFPI-2/MSP1 toward plasmin." *Arch Biochem Biophys* **370**(1): 112-8.
- Liu, Y. J., Y. Xu and Q. Yu (2006). "Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively." *Oncogene* **25**(17): 2452-67.
- Loechel, F., B. J. Gilpin, E. Engvall, R. Albrechtsen and U. M. Wewer (1998). "Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease." *J Biol Chem* **273**(27): 16993-7.
- Loechel, F., M. T. Overgaard, C. Oxvig, R. Albrechtsen and U. M. Wewer (1999). "Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch." *J Biol Chem* **274**(19): 13427-33.
- Lopez-Otin, C. and C. M. Overall (2002). "Protease degradomics: a new challenge for proteomics." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 509-19.
- Luque, A., D. R. Carpizo and M. L. Iruela-Arispe (2003). "ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165." *J Biol Chem* **278**(26): 23656-65.
- Lyden, D., K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, W. Marks, L. Witte, Y. Wu, D. Hicklin, Z. Zhu, N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, K. A. Hajjar, K. Manova, R. Benezra and S. Rafii (2001). "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth." *Nat Med* **7**(11): 1194-201.
- Lynch, C. C., A. Hikosaka, H. B. Acuff, M. D. Martin, N. Kawai, R. K. Singh, T. C. Vargo-Gogola, J. L. Begtrup, T. E. Peterson, B. Fingleton, T. Shirai, L. M. Matrisian and M. Futakuchi (2005). "MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL." *Cancer Cell* **7**(5): 485-96.
- Llamazares, M., S. Cal, V. Quesada and C. Lopez-Otin (2003). "Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain." *J Biol Chem* **278**(15): 13382-9.
- Macfarlane, R. G. (1964). "An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier." *Nature* **202**: 498-9.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." *Science* **277**(5322): 55-60.
- Majerus, E. M., X. Zheng, E. A. Tuley and J. E. Sadler (2003). "Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity." *J Biol Chem* **278**(47): 46643-8.

- Makitie, T., P. Summanen, A. Tarkkanen and T. Kivela (1999). "Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas." *J Natl Cancer Inst* **91**(4): 359-67.
- Malfait, A. M., R. Q. Liu, K. Ijiri, S. Komiya and M. D. Tortorella (2002). "Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage." *J Biol Chem* **277**(25): 22201-8.
- Malinda, K. M. and H. K. Kleinman (1996). "The laminins." *Int J Biochem Cell Biol* **28**(9): 957-9.
- Malinda, K. M., M. Nomizu, M. Chung, M. Delgado, Y. Kuratomi, Y. Yamada, H. K. Kleinman and M. L. Ponce (1999). "Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting." *Faseb J* **13**(1): 53-62.
- Maniotis, A. J., R. Folberg, A. Hess, E. A. Seftor, L. M. Gardner, J. Pe'er, J. M. Trent, P. S. Meltzer and M. J. Hendrix (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." *Am J Pathol* **155**(3): 739-52.
- Mast, A. E., J. E. Stadanlick, J. M. Lockett, D. J. Dietzen, K. A. Hasty and C. L. Hall (2000). "Tissue factor pathway inhibitor binds to platelet thrombospondin-1." *J Biol Chem* **275**(41): 31715-21.
- Masui, T., R. Hosotani, S. Tsuji, Y. Miyamoto, S. Yasuda, J. Ida, S. Nakajima, M. Kawaguchi, H. Kobayashi, M. Koizumi, E. Toyoda, S. Tulachan, S. Arii, R. Doi and M. Imamura (2001). "Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer." *Clin Cancer Res* **7**(11): 3437-43.
- Matar, P., F. Rojo, R. Cassia, G. Moreno-Bueno, S. Di Cosimo, J. Tabernero, M. Guzman, S. Rodriguez, J. Arribas, J. Palacios and J. Baselga (2004). "Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting." *Clin Cancer Res* **10**(19): 6487-501.
- Matthews, D. J. and J. A. Wells (1993). "Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display." *Science* **260**(5111): 1113-7.
- McDonald, D. M., L. Munn and R. K. Jain (2000). "Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant?" *Am J Pathol* **156**(2): 383-8.
- McDonald, L., D. H. Robertson, J. L. Hurst and R. J. Beynon (2005). "Positional proteomics: selective recovery and analysis of N-terminal proteolytic peptides." *Nat Methods* **2**(12): 955-7.
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, E. M. Tam, C. A. McCulloch, I. Clark-Lewis and C. M. Overall (2000). "Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3." *Science* **289**(5482): 1202-6.
- Meisser, A., P. Bischof and H. Bohn (1985). "Placental protein 5 (PP5) inhibits thrombin-induced coagulation of fibrinogen." *Arch Gynecol* **236**(4): 197-201.
- Milla, M. E., M. A. Leesnitzer, M. L. Moss, W. C. Clay, H. L. Carter, A. B. Miller, J. L. Su, M. H. Lambert, D. H. Willard, D. M. Sheeley, T. A. Kost, W. Burkhart, M. Moyer, R. K. Blackburn, G. L. Pahl, J. L. Mitchell, C. R. Hoffman and J. D. Becherer (1999). "Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)." *J Biol Chem* **274**(43): 30563-70.
- Mittaz, L., D. L. Russell, T. Wilson, M. Brasted, J. Tkalcovic, L. A. Salamonsen, P. J. Hertzog and M. A. Pritchard (2004). "Adams-1 is essential for the development and function of the urogenital system." *Biol Reprod* **70**(4): 1096-105.
- Miyagi, Y., N. Koshikawa, H. Yasumitsu, E. Miyagi, F. Hirahara, I. Aoki, K. Misugi, M. Umeda and K. Miyazaki (1994). "cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2." *J Biochem (Tokyo)* **116**(5): 939-42.
- Miyagi, Y., H. Yasumitsu, H. Mizushima, N. Koshikawa, Y. Matsuda, H. Itoh, T. A. Hori, I. Aoki, K. Misugi and K. Miyazaki (1996). "Cloning of the cDNA encoding mouse PP5/TFPI-2 and mapping of the gene to chromosome 6." *DNA Cell Biol* **15**(11): 947-54.
- Miyamoto, S., M. Hirata, A. Yamazaki, T. Kageyama, H. Hasuwa, H. Mizushima, Y. Tanaka, H. Yagi, K. Sonoda, M. Kai, H. Kanoh, H. Nakano and E. Mekada (2004). "Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy." *Cancer Res* **64**(16): 5720-7.
- Moestrup, S. K., T. L. Holtet, M. Etzerodt, H. C. Thogersen, A. Nykjaer, P. A. Andreasen, H. H. Rasmussen, L. Sottrup-Jensen and J. Gliemann (1993). "Alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes, plasminogen activator inhibitor type-1-plasminogen activator complexes, and receptor-associated protein bind to a region of the alpha 2-macroglobulin receptor containing a cluster of eight complement-type repeats." *J Biol Chem* **268**(18): 13691-6.
- Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahl, W. Rocque, L. K. Overton, F.

- Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer and et al. (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." *Nature* **385**(6618): 733-6.
- Murphy, G. and V. Knauper (1997). "Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?" *Matrix Biol* **15**(8-9): 511-8.
- Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara and H. Saya (2004). "Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation." *J Cell Biol* **165**(6): 893-902.
- Nagase, H. (1997). "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases." *Biol Chem* **378**(3-4): 151-60.
- Nagase, H., Y. Itoh and S. Binner (1994). "Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms." *Ann N Y Acad Sci* **732**: 294-302.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." *J Biol Chem* **274**(31): 21491-4.
- Nakamura, H., Y. Fujii, I. Inoki, K. Sugimoto, K. Tanzawa, H. Matsuki, R. Miura, Y. Yamaguchi and Y. Okada (2000). "Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites." *J Biol Chem* **275**(49): 38885-90.
- Nakamura, K., S. Hirohata, T. Murakami, T. Miyoshi, K. Demircan, T. Oohashi, H. Ogawa, K. Koten, K. Toeda, S. Kusachi, Y. Ninomiya and Y. Shiratori (2004). "Dynamic induction of ADAMTS1 gene in the early phase of acute myocardial infarction." *J Biochem (Tokyo)* **136**(4): 439-46.
- Neaud, V., J. G. Duplantier, C. Mazzocco, W. Kisiel and J. Rosenbaum (2004). "Thrombin up-regulates tissue factor pathway inhibitor-2 synthesis through a cyclooxygenase-2-dependent, epidermal growth factor receptor-independent mechanism." *J Biol Chem* **279**(7): 5200-6.
- Neaud, V., T. Hisaka, A. Monvoisin, C. Bedin, C. Balabaud, D. C. Foster, A. Desmouliere, W. Kisiel and J. Rosenbaum (2000). "Paradoxical pro-invasive effect of the serine proteinase inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2 on human hepatocellular carcinoma cells." *J Biol Chem* **275**(45): 35565-9.
- Nemeth, J. A., A. Rafe, M. Steiner and C. L. Goolsby (1996). "TIMP-2 growth-stimulatory activity: a concentration- and cell type-specific response in the presence of insulin." *Exp Cell Res* **224**(1): 110-5.
- Ng, Y. H., H. Zhu, C. J. Pallen, P. C. Leung and C. D. MacCalman (2006). "Differential effects of interleukin-1beta and transforming growth factor-beta1 on the expression of the inflammation-associated protein, ADAMTS-1, in human decidual stromal cells in vitro." *Hum Reprod* **21**(8): 1990-9.
- Norata, G. D., L. Grigore, S. Raselli, P. M. Seccomandi, A. Hamsten, F. M. Maggi, P. Eriksson and A. L. Catapano (2006). "Triglyceride-rich lipoproteins from hypertriglyceridemic subjects induce a pro-inflammatory response in the endothelium: Molecular mechanisms and gene expression studies." *J Mol Cell Cardiol* **40**(4): 484-94.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, C. Chen and J. Folkman (1996). "Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice." *Nat Med* **2**(6): 689-92.
- Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi and M. Noda (2001). "The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis." *Cell* **107**(6): 789-800.
- Ohkura, N., K. Enjyoji, Y. Kamikubo and H. Kato (1997). "A novel degradation pathway of tissue factor pathway inhibitor: incorporation into fibrin clot and degradation by thrombin." *Blood* **90**(5): 1883-92.
- Ortego, J., J. Escribano and M. Coca-Prados (1997). "Gene expression of proteases and protease inhibitors in the human ciliary epithelium and ODM-2 cells." *Exp Eye Res* **65**(2): 289-99.
- Overall, C. M. (2002). "Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites." *Mol Biotechnol* **22**(1): 51-86.
- Overall, C. M. (2004). "Dilating the degradome: matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) cuts to the heart of the matter." *Biochem J* **383**(Pt. 3): e5-7.
- Overall, C. M. and C. P. Blobel (2007). "In search of partners: linking extracellular proteases to substrates." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 245-57.
- Overall, C. M. and O. Kleinfeld (2006). "Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **6**(3): 227-39.

- Overall, C. M., G. A. McQuibban and I. Clark-Lewis (2002). "Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics." *Biol Chem* **383**(7-8): 1059-66.
- Overall, C. M., E. M. Tam, R. Kappelhoff, A. Connor, T. Ewart, C. J. Morrison, X. Puente, C. Lopez-Otin and A. Seth (2004). "Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors." *Biol Chem* **385**(6): 493-504.
- Paku, S. and N. Paweletz (1991). "First steps of tumor-related angiogenesis." *Lab Invest* **65**(3): 334-46.
- Pan, H., F. Y. Che, B. Peng, D. F. Steiner, J. E. Pintar and L. D. Fricker (2006). "The role of prohormone convertase-2 in hypothalamic neuropeptide processing: a quantitative neuropeptidomic study." *J Neurochem* **98**(6): 1763-77.
- Parks, W. C., C. L. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol* **4**(8): 617-29.
- Pasquale, E. B. (1997). "The Eph family of receptors." *Curr Opin Cell Biol* **9**(5): 608-15.
- Peduto, L., V. E. Reuter, A. Sehara-Fujisawa, D. R. Shaffer, H. I. Scher and C. P. Blobel (2006). "ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression." *Oncogene* **25**(39): 5462-6.
- Peerschke, E. I., R. J. Petrovan, B. Ghebrehiwet and W. Ruf (2004). "Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) recognizes the complement and kininogen binding protein gC1qR/p33 (gC1qR): implications for vascular inflammation." *Thromb Haemost* **92**(4): 811-9.
- Perutelli, P. (1995). "[Disintegrins: potent inhibitors of platelet aggregation]." *Recenti Prog Med* **86**(4): 168-74.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March and R. A. Black (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." *Science* **282**(5392): 1281-4.
- Petersen, L. C., C. A. Sprecher, D. C. Foster, H. Blumberg, T. Hamamoto and W. Kisiel (1996). "Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor." *Biochemistry* **35**(1): 266-72.
- Petit, A. M., J. Rak, M. C. Hung, P. Rockwell, N. Goldstein, B. Fendly and R. S. Kerbel (1997). "Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors." *Am J Pathol* **151**(6): 1523-30.
- Pezzella, F., U. Pastorino, E. Tagliabue, S. Andreola, G. Sozzi, G. Gasparini, S. Menard, K. C. Gatter, A. L. Harris, S. Fox, M. Buyse, S. Pilotti, M. Pierotti and F. Rilke (1997). "Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis." *Am J Pathol* **151**(5): 1417-23.
- Piez, K. A. (1997). "History of extracellular matrix: a personal view." *Matrix Biol* **16**(3): 85-92.
- Ponti, D., N. Zaffaroni, C. Capelli and M. G. Daidone (2006). "Breast cancer stem cells: an overview." *Eur J Cancer* **42**(9): 1219-24.
- Porter, S., I. M. Clark, L. Kevorkian and D. R. Edwards (2005). "The ADAMTS metalloproteinases." *Biochem J* **386**(Pt 1): 15-27.
- Porter, S., S. D. Scott, E. M. Sassoon, M. R. Williams, J. L. Jones, A. C. Girling, R. Y. Ball and D. R. Edwards (2004). "Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma." *Clin Cancer Res* **10**(7): 2429-40.
- Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch and A. Ullrich (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." *Nature* **402**(6764): 884-8.
- Ramalho-Santos, M., S. Yoon, Y. Matsuzaki, R. C. Mulligan and D. A. Melton (2002). "'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells." *Science* **298**(5593): 597-600.
- Rao, C. N., B. Cook, Y. Liu, K. Chilukuri, M. S. Stack, D. C. Foster, W. Kisiel and D. T. Woodley (1998). "HT-1080 fibrosarcoma cell matrix degradation and invasion are inhibited by the matrix-associated serine protease inhibitor TFPI-2/33 kDa MSPI." *Int J Cancer* **76**(5): 749-56.
- Rao, C. N., S. S. Lakka, Y. Kin, S. D. Konduri, G. N. Fuller, S. Mohanam and J. S. Rao (2001). "Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas." *Clin Cancer Res* **7**(3): 570-6.
- Rao, C. N., S. Mohanam, A. Puppala and J. S. Rao (1999). "Regulation of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor." *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1): 94-8.

- Rao, C. N., P. Reddy, Y. Liu, E. O'Toole, D. Reeder, D. C. Foster, W. Kisiel and D. T. Woodley (1996). "Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (Mr 33,000, 31,000, and 27,000) are single-gene products with differential glycosylation: cDNA cloning of the 33-kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2." *Arch Biochem Biophys* **335**(1): 82-92.
- Rao, C. N., T. Segawa, J. R. Navari, L. Xu, S. Srivastava, J. W. Moul and B. Phillips (2003). "Methylation of TFPI-2 gene is not the sole cause of its silencing." *Int J Oncol* **22**(4): 843-8.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton and A. J. Barrett (2006). "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D270-2.
- Raza, S. L. and L. A. Cornelius (2000). "Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities." *J Invest Dermatol Symp Proc* **5**(1): 47-54.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* **386**(6626): 671-4.
- Robker, R. L., D. L. Russell, L. L. Espey, J. P. Lydon, B. W. O'Malley and J. S. Richards (2000). "Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4689-94.
- Rocks, N., G. Paulissen, F. Quesada Calvo, M. Polette, M. Gueders, C. Munaut, J. M. Foidart, A. Noel, P. Birembaut and D. Cataldo (2006). "Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC)." *Br J Cancer* **94**(5): 724-30.
- Rodgers, R. J., H. F. Irving-Rodgers and D. L. Russell (2003). "Extracellular matrix of the developing ovarian follicle." *Reproduction* **126**(4): 415-24.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C., A. B. Milchanowski, E. K. Dufour, R. Leduc and M. L. Iruela-Arispe (2000). "Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms." *J Biol Chem* **275**(43): 33471-9.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C., J. Westling, S. N. Thai, A. Luque, V. Knauper, G. Murphy, J. D. Sandy and M. L. Iruela-Arispe (2002). "ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 501-8.
- Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst and C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." *J Biol Chem* **274**(6): 3531-40.
- Rollin, J., S. Iochmann, C. Blechet, F. Hube, S. Regina, S. Guyetant, E. Lemarie, P. Reverdiu and Y. Gruel (2005). "Expression and methylation status of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in non-small-cell lung cancer." *Br J Cancer*.
- Rosenberg, I. M., M. Goke, M. Kanai, H. C. Reinecker and D. K. Podolsky (1997). "Epithelial cell kinase-B61: an autocrine loop modulating intestinal epithelial migration and barrier function." *Am J Physiol* **273**(4 Pt 1): G824-32.
- Rosendahl, M. S., S. C. Ko, D. L. Long, M. T. Brewer, B. Rosenzweig, E. Hedl, L. Anderson, S. M. Pyle, J. Moreland, M. A. Meyers, T. Kohno, D. Lyons and H. S. Lichenstein (1997). "Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases." *J Biol Chem* **272**(39): 24588-93.
- Rosse, G., E. Kueng, M. G. Page, V. Schauer-Vukasovic, T. Giller, H. W. Lahm, P. Hunziker and D. Schlatter (2000). "Rapid identification of substrates for novel proteases using a combinatorial peptide library." *J Comb Chem* **2**(5): 461-6.
- Ruf, W., E. A. Seftor, R. J. Petrovan, R. M. Weiss, L. M. Gruman, N. V. Margaryan, R. E. Seftor, Y. Miyagi and M. J. Hendrix (2003). "Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry." *Cancer Res* **63**(17): 5381-9.
- Rummelt, V., M. G. Mehaffey, R. J. Campbell, J. Pe'er, S. E. Bentler, R. F. Woolson, G. O. Naumann and R. Folberg (1998). "Microcirculation architecture of metastases from primary ciliary body and choroidal melanomas." *Am J Ophthalmol* **126**(2): 303-5.
- Rundhaug, J. E. (2005). "Matrix metalloproteinases and angiogenesis." *J Cell Mol Med* **9**(2): 267-85.
- Ruoslahti, E. (2002). "Specialization of tumour vasculature." *Nat Rev Cancer* **2**(2): 83-90.
- Russell, D. L., K. M. Doyle, S. A. Ochsner, J. D. Sandy and J. S. Richards (2003). "Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation." *J Biol Chem* **278**(43): 42330-9.
- Ruuls, S. R., R. M. Hoek, V. N. Ngo, T. McNeil, L. A. Lucian, M. J. Janatpour, H. Korner, H. Scheerens, E. M. Hessel, J. G. Cyster, L. M. McEvoy and J. D. Sedgwick (2001). "Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation." *Immunity* **15**(4): 533-43.
- Saghatelian, A., N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey and B. F. Cravatt (2004). "Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10000-5.

- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig and C. P. Blobel (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." *J Cell Biol* **164**(5): 769-79.
- Saito, E., A. Okamoto, M. Saito, H. Shinozaki, S. Takakura, N. Yanaihara, K. Ochiai and T. Tanaka (2005). "Genes associated with the genesis of leiomyoma of the uterus in a commonly deleted chromosomal region at 7q22." *Oncol Rep* **13**(3): 469-72.
- Sakamoto, T., M. Sakamoto, H. Yoshikawa, Y. Hata, T. Ishibashi, Y. Ohnishi and H. Inomata (1996). "Histologic findings and prognosis of uveal malignant melanoma in japanese patients." *Am J Ophthalmol* **121**(3): 276-83.
- Salisbury, C. M., D. J. Maly and J. A. Ellman (2002). "Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity." *J Am Chem Soc* **124**(50): 14868-70.
- Salustri, A., M. Yanagishita, C. B. Underhill, T. C. Laurent and V. C. Hascall (1992). "Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle." *Dev Biol* **151**(2): 541-51.
- Sandy, J. D., J. Westling, R. D. Kenagy, M. L. Iruela-Arispe, C. Verscharen, J. C. Rodriguez-Mazaneque, D. R. Zimmermann, J. M. Lemire, J. W. Fischer, T. N. Wight and A. W. Clowes (2001). "Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4." *J Biol Chem* **276**(16): 13372-8.
- Sasaki, M., S. Seo-Kiryu, R. Kato, S. Kita and H. Kiyama (2001). "A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type1 motifs (ADAMTS-1) and IL-1 receptor type 1 mRNAs are simultaneously induced in nerve injured motor neurons." *Brain Res Mol Brain Res* **89**(1-2): 158-63.
- Sato, N., A. R. Parker, N. Fukushima, Y. Miyagi, C. A. Iacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman and M. Goggins (2005). "Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Oncogene* **24**(5): 850-8.
- Scheidig, A. J., T. R. Hynes, L. A. Pelletier, J. A. Wells and A. A. Kossiakoff (1997). "Crystal structures of bovine chymotrypsin and trypsin complexed to the inhibitor domain of Alzheimer's amyloid beta-protein precursor (APPI) and basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): engineering of inhibitors with altered specificities." *Protein Sci* **6**(9): 1806-24.
- Schilling, O. and C. M. Overall (2007). "Proteomic discovery of protease substrates." *Curr Opin Chem Biol* **11**(1): 36-45.
- Schmidt, A., F. Echtermeyer, A. Alozie, K. Brands and E. Buddecke (2005). "Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds." *J Biol Chem* **280**(41): 34441-6.
- Schmidt, A. E., H. S. Chand, D. Cascio, W. Kisiel and S. P. Bajaj (2005). "Crystal structure of Kunitz domain 1 (KD1) of tissue factor pathway inhibitor-2 in complex with trypsin. Implications for KD1 specificity of inhibition." *J Biol Chem* **280**(30): 27832-8.
- Seals, D. F. and S. A. Courtneidge (2003). "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions." *Genes Dev* **17**(1): 7-30.
- Seftor, E. A., K. M. Brown, L. Chin, D. A. Kirschmann, W. W. Wheaton, A. Protopopov, B. Feng, Y. Balagurunathan, J. M. Trent, B. J. Nickoloff, R. E. Seftor and M. J. Hendrix (2005). "Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment." *Cancer Res* **65**(22): 10164-9.
- Seftor, E. A., P. S. Meltzer, D. A. Kirschmann, J. Pe'er, A. J. Maniotis, J. M. Trent, R. Folberg and M. J. Hendrix (2002). "Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis." *Clin Exp Metastasis* **19**(3): 233-46.
- Seftor, E. A., P. S. Meltzer, G. C. Schatteman, L. M. Gruman, A. R. Hess, D. A. Kirschmann, R. E. Seftor and M. J. Hendrix (2002). "Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry." *Crit Rev Oncol Hematol* **44**(1): 17-27.
- Seftor, R. E., E. A. Seftor, D. A. Kirschmann and M. J. Hendrix (2002). "Targeting the tumor microenvironment with chemically modified tetracyclines: inhibition of laminin 5 gamma2 chain promigratory fragments and vasculogenic mimicry." *Mol Cancer Ther* **1**(13): 1173-9.
- Seftor, R. E., E. A. Seftor, N. Koshikawa, P. S. Meltzer, L. M. Gardner, M. Bilban, W. G. Stetler-Stevenson, V. Quaranta and M. J. Hendrix (2001). "Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma." *Cancer Res* **61**(17): 6322-7.
- Sell, S. M., C. Tullis, D. Stracner, C. Y. Song and J. Gewin (2005). "Minimal interval defined on 7q in uterine leiomyoma." *Cancer Genet Cytogenet* **157**(1): 67-9.

- Seppala, M., A. I. Koskimies, A. Tenhunen, E. M. Rutanen, J. Sjoberg, R. Koistinen, M. Julkunen and T. Wahlstrom (1985). "Pregnancy proteins in seminal plasma, seminal vesicles, preovulatory follicular fluid, and ovary." Ann N Y Acad Sci **442**: 212-26.
- Seregard, S., B. Spangberg, C. Juul and M. Oskarsson (1998). "Prognostic accuracy of the mean of the largest nucleoli, vascular patterns, and PC-10 in posterior uveal melanoma." Ophthalmology **105**(3): 485-91.
- Shindo, T., H. Kurihara, K. Kuno, H. Yokoyama, T. Wada, Y. Kurihara, T. Imai, Y. Wang, M. Ogata, H. Nishimatsu, N. Moriyama, Y. Oh-hashii, H. Morita, T. Ishikawa, R. Nagai, Y. Yazaki and K. Matsushima (2000). "ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function." J Clin Invest **105**(10): 1345-52.
- Shinoda, E., Y. Yui, R. Hattori, M. Tanaka, R. Inoue, T. Aoyama, Y. Takimoto, Y. Mitsui, K. Miyahara, Y. Shizuta and S. Sasayama (1999). "Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **274**(9): 5379-84.
- Smale, S. T. (1997). "Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes." Biochim Biophys Acta **1351**(1-2): 73-88.
- Smith, M. M., L. Shi and M. Navre (1995). "Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries." J Biol Chem **270**(12): 6440-9.
- Sobue, T., Y. Hakeda, Y. Kobayashi, H. Hayakawa, K. Yamashita, T. Aoki, M. Kumegawa, T. Noguchi and T. Hayakawa (2001). "Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts." J Bone Miner Res **16**(12): 2205-14.
- Somerville, R. P., J. M. Longpre, E. D. Apel, R. M. Lewis, L. W. Wang, J. R. Sanes, R. Leduc and S. S. Apte (2004). "ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain." J Biol Chem **279**(34): 35159-75.
- Somerville, R. P., J. M. Longpre, K. A. Jungers, J. M. Engle, M. Ross, S. Evanko, T. N. Wight, R. Leduc and S. S. Apte (2003). "Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1." J Biol Chem **278**(11): 9503-13.
- Sood, A. K., E. A. Seftor, M. S. Fletcher, L. M. Gardner, P. M. Heidger, R. E. Buller, R. E. Seftor and M. J. Hendrix (2001). "Molecular determinants of ovarian cancer plasticity." Am J Pathol **158**(4): 1279-88.
- Sottrup-Jensen, L. (1994). "Role of internal thiol esters in the alpha-macroglobulin-proteinase binding mechanism." Ann N Y Acad Sci **737**: 172-87.
- Sprecher, C. A., W. Kisiel, S. Mathewes and D. C. Foster (1994). "Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3353-7.
- Stanton, H., F. M. Rogerson, C. J. East, S. B. Golub, K. E. Lawlor, C. T. Meeker, C. B. Little, K. Last, P. J. Farmer, I. K. Campbell, A. M. Fourie and A. J. Fosang (2005). "ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro." Nature **434**(7033): 648-52.
- Steiner, F. A., J. A. Hong, M. R. Fischette, D. G. Beer, Z. S. Guo, G. A. Chen, T. S. Weiser, E. S. Kassis, D. M. Nguyen, S. Lee, J. B. Trepel and D. S. Schrupp (2005). "Sequential 5-Aza 2'-deoxycytidine/depsipeptide FK228 treatment induces tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) expression in cancer cells." Oncogene **24**(14): 2386-97.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Stetler-Stevenson, W. G., N. Bersch and D. W. Golde (1992). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity." FEBS Lett **296**(2): 231-4.
- Straume, O. and L. A. Akslen (2002). "Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression." Am J Pathol **160**(3): 1009-19.
- Straume, O., P. O. Chappuis, H. B. Salvesen, O. J. Halvorsen, S. A. Haukaas, J. R. Goffin, L. R. Begin, W. D. Foulkes and L. A. Akslen (2002). "Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers." Cancer Res **62**(23): 6808-11.
- Sun, B., S. Zhang, D. Zhang, J. Du, H. Guo, X. Zhao, W. Zhang and X. Hao (2006). "Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma." Oncol Rep **16**(4): 693-8.
- Sundberg, C., J. A. Nagy, L. F. Brown, D. Feng, I. A. Eckelhoefer, E. J. Manseau, A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (2001). "Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular



- permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery." *Am J Pathol* **158**(3): 1145-60.
- Tachibana, M., K. Takeda, Y. Nobukuni, K. Urabe, J. E. Long, K. A. Meyers, S. A. Aaronson and T. Miki (1996). "Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics." *Nat Genet* **14**(1): 50-4.
- Takahashi, C., Z. Sheng, T. P. Horan, H. Kitayama, M. Maki, K. Hitomi, Y. Kitaura, S. Takai, R. M. Sasahara, A. Horimoto, Y. Ikawa, B. J. Ratzkin, T. Arakawa and M. Noda (1998). "Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13221-6.
- Takahashi, S., K. Kasai, K. Hatsuzawa, N. Kitamura, Y. Misumi, Y. Ikehara, K. Murakami and K. Nakayama (1993). "A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(2): 1019-26.
- Tam, E. M., C. J. Morrison, Y. I. Wu, M. S. Stack and C. M. Overall (2004). "Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(18): 6917-22.
- Tan, K., M. Duquette, J. H. Liu, Y. Dong, R. Zhang, A. Joachimiak, J. Lawler and J. H. Wang (2002). "Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: a novel layered fold and its biological implication." *J Cell Biol* **159**(2): 373-82.
- Tang, B. L. (2001). "ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(1): 33-44.
- Tasiou, A., S. D. Konduri, N. Yanamandra, D. H. Dinh, W. C. Olivero, M. Gujrati, M. Obeyesekere and J. S. Rao (2001). "A novel role of tissue factor pathway inhibitor-2 in apoptosis of malignant human gliomas." *Int J Oncol* **19**(3): 591-7.
- Thai, S. N. and M. L. Iruela-Arispe (2002). "Expression of ADAMTS1 during murine development." *Mech Dev* **115**(1-2): 181-5.
- Thies, A., U. Mangold, I. Moll and U. Schumacher (2001). "PAS-positive loops and networks as a prognostic indicator in cutaneous malignant melanoma." *J Pathol* **195**(5): 537-42.
- Thornberry, N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman and D. W. Nicholson (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis." *J Biol Chem* **272**(29): 17907-11.
- Tortorella, M., M. Pratta, R. Q. Liu, I. Abbaszade, H. Ross, T. Burn and E. Arner (2000). "The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage." *J Biol Chem* **275**(33): 25791-7.
- Tortorella, M. D., T. C. Burn, M. A. Pratta, I. Abbaszade, J. M. Hollis, R. Liu, S. A. Rosenfeld, R. A. Copeland, C. P. Decicco, R. Wynn, A. Rockwell, F. Yang, J. L. Duke, K. Solomon, H. George, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, D. M. Ellis, H. Ross, B. H. Wiswall, K. Murphy, M. C. Hillman, Jr., G. F. Hollis, R. C. Newton, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos and E. C. Arner (1999). "Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins." *Science* **284**(5420): 1664-6.
- Tortorella, M. D., M. Pratta, R. Q. Liu, J. Austin, O. H. Ross, I. Abbaszade, T. Burn and E. Arner (2000). "Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4)." *J Biol Chem* **275**(24): 18566-73.
- Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 785-99.
- Turk, B. E. and L. C. Cantley (2004). "Using peptide libraries to identify optimal cleavage motifs for proteolytic enzymes." *Methods* **32**(4): 398-405.
- Turk, B. E., L. L. Huang, E. T. Piro and L. C. Cantley (2001). "Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries." *Nat Biotechnol* **19**(7): 661-7.
- Udagawa, K., H. Yasumitsu, M. Esaki, H. Sawada, Y. Nagashima, I. Aoki, M. Jin, E. Miyagi, T. Nakazawa, F. Hirahara, K. Miyazaki and Y. Miyagi (2002). "Subcellular localization of PP5/TFPI-2 in human placenta: a possible role of PP5/TFPI-2 as an anti-coagulant on the surface of syncytiotrophoblasts." *Placenta* **23**(2-3): 145-53.
- Uzonyi, B., K. Lotzer, S. Jahn, C. Kramer, M. Hildner, E. Bretschneider, D. Radke, M. Beer, R. Vollandt, J. F. Evans, C. D. Funk and A. J. Habenicht (2006). "Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly correlated early genes in human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(16): 6326-31.

- Van Damme, P., L. Martens, J. Van Damme, K. Hugelier, A. Staes, J. Vandekerckhove and K. Gevaert (2005). "Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis." *Nat Methods* **2**(10): 771-7.
- van der Schaft, D. W., F. Hillen, P. Pauwels, D. A. Kirschmann, K. Castermans, M. G. Egbrink, M. G. Tran, R. Scot, E. Hauben, P. C. Hogendoorn, O. Delattre, P. H. Maxwell, M. J. Hendrix and A. W. Griffioen (2005). "Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia." *Cancer Res* **65**(24): 11520-8.
- van der Schaft, D. W., R. E. Seftor, E. A. Seftor, A. R. Hess, L. M. Gruman, D. A. Kirschmann, Y. Yokoyama, A. W. Griffioen and M. J. Hendrix (2004). "Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells." *J Natl Cancer Inst* **96**(19): 1473-7.
- Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(14): 5578-82.
- Vazquez, F., G. Hastings, M. A. Ortega, T. F. Lane, S. Oikemus, M. Lombardo and M. L. Iruela-Arispe (1999). "METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity." *J Biol Chem* **274**(33): 23349-57.
- Walker-Daniels, J., A. R. Hess, M. J. Hendrix and M. S. Kinch (2003). "Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells." *Am J Pathol* **162**(4): 1037-42.
- Wang, P., M. Tortorella, K. England, A. M. Malfait, G. Thomas, E. C. Arner and D. Pei (2004). "Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network." *J Biol Chem* **279**(15): 15434-40.
- Warso, M. A., A. J. Maniotis, X. Chen, D. Majumdar, M. K. Patel, A. Shilkaitis, T. K. Gupta and R. Folberg (2001). "Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma." *Clin Cancer Res* **7**(3): 473-7.
- Washburn, M. P., D. Wolters and J. R. Yates, 3rd (2001). "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology." *Nat Biotechnol* **19**(3): 242-7.
- Werling, R. W., L. R. Zacharski, W. Kisiel, S. P. Bajaj, V. A. Memoli and S. M. Rousseau (1993). "Distribution of tissue factor pathway inhibitor in normal and malignant human tissues." *Thromb Haemost* **69**(4): 366-9.
- Willem, M., A. N. Garratt, B. Novak, M. Citron, S. Kaufmann, A. Rittger, B. DeStrooper, P. Saftig, C. Birchmeier and C. Haass (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." *Science* **314**(5799): 664-6.
- Wojtukiewicz, M. Z., E. Sierko, L. Zimnoch, L. Kozlowski and W. Kisiel (2003). "Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue." *Thromb Haemost* **90**(1): 140-6.
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. H. von Andrian, E. I. Deryugina, A. Y. Strongin, E. B. Brocker and P. Friedl (2003). "Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis." *J Cell Biol* **160**(2): 267-77.
- Wolter, S., J. F. Mushinski, A. M. Saboori, K. Resch and M. Kracht (2002). "Inducible expression of a constitutively active mutant of mitogen-activated protein kinase kinase 7 specifically activates c-JUN NH2-terminal protein kinase, alters expression of at least nine genes, and inhibits cell proliferation." *J Biol Chem* **277**(5): 3576-84.
- Xia, W. and M. S. Wolfe (2003). "Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases." *J Cell Sci* **116**(Pt 14): 2839-44.
- Xu, Z., D. Maiti, W. Kisiel and E. J. Duh (2006). "Tissue factor pathway inhibitor-2 is upregulated by vascular endothelial growth factor and suppresses growth factor-induced proliferation of endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(12): 2819-25.
- Xu, Z., Y. Yu and E. J. Duh (2006). "Vascular endothelial growth factor upregulates expression of ADAMTS1 in endothelial cells through protein kinase C signaling." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(9): 4059-66.
- Yamazaki, S., R. Iwamoto, K. Saeki, M. Asakura, S. Takashima, A. Yamazaki, R. Kimura, H. Mizushima, H. Moribe, S. Higashiyama, M. Endoh, Y. Kaneda, S. Takagi, S. Itami, N. Takeda, G. Yamada and E. Mekada (2003). "Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities." *J Cell Biol* **163**(3): 469-75.
- Yanamandra, N., S. Kondraganti, C. S. Gondi, M. Gujrati, W. C. Olivero, D. H. Dinh and J. S. Rao (2005). "Recombinant adeno-associated virus (rAAV) expressing TFPI-2 inhibits invasion, angiogenesis and tumor growth in a human glioblastoma cell line." *Int J Cancer* **115**(6): 998-1005.

- Yokoyama, H., T. Wada, K. Kobayashi, K. Kuno, H. Kurihara, T. Shindo and K. Matsushima (2002). "A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-1 null mutant mice develop renal lesions mimicking obstructive nephropathy." *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 9**: 39-41.
- Yu, W. H., S. Yu, Q. Meng, K. Brew and J. F. Woessner, Jr. (2000). "TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix." *J Biol Chem* **275**(40): 31226-32.
- Zako, M., T. Shinomura, M. Ujita, K. Ito and K. Kimata (1995). "Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues." *J Biol Chem* **270**(8): 3914-8.
- Zhang, K., G. A. McQuibban, C. Silva, G. S. Butler, J. B. Johnston, J. Holden, I. Clark-Lewis, C. M. Overall and C. Power (2003). "HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration." *Nat Neurosci* **6**(10): 1064-71.
- Zheng, Y., P. Saftig, D. Hartmann and C. Blobel (2004). "Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17)." *J Biol Chem* **279**(41): 42898-906.
- Zhou, X. W., M. J. Blackman, S. A. Howell and V. B. Carruthers (2004). "Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex." *Mol Cell Proteomics* **3**(6): 565-76.
- Zhu, L., C. Tamvakopoulos, D. Xie, J. Dragovic, X. Shen, J. E. Fenyk-Melody, K. Schmidt, A. Bagchi, P. R. Griffin, N. A. Thornberry and R. Sinha Roy (2003). "The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38)." *J Biol Chem* **278**(25): 22418-23.
- Zou, J., F. Zhu, J. Liu, W. Wang, R. Zhang, C. G. Garlisi, Y. H. Liu, S. Wang, H. Shah, Y. Wan and S. P. Umland (2004). "Catalytic activity of human ADAM33." *J Biol Chem* **279**(11): 9818-30.